

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1-17</b>
1.1 IMPORTANCIA DEL ARSÉNICO	1
1.2 LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA DE REMEDIACIÓN	4
1.3 INCORPORACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE As EN PLANTAS	5
1.3.1 Incorporación de As	6
1.3.2 Transporte y metabolismo	7
1.4 INCORPORACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE As EN BACTERIAS	9
1.5 INTERACCIONES EN LA RIZÓSFERA Y BIODISPONIBILIDAD DE As	11
1.6 LA INTERACCIÓN RIZOBIO LEGUMINOSA	12
1.7 LA SIMBIOSIS SOJA- <i>B. japonicum</i> Y SU IMPLICANCIA EN LA REMEDIACIÓN DE As	15
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>18-19</b>
2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
2.2 OBJETIVO GENERAL	18
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20-29</b>
3.1 ESTUDIO DEL SISTEMA VEGETAL	20-24
3.1.1 Material biológico	20
3.1.2 Desinfección de semillas	20
3.1.3 Pre-germinación de semillas	20
3.1.4 Ensayo de germinación en placa y tolerancia en los primeros estadios de desarrollo	20
3.1.5 Remoción de As en sistema hidropónico en erlenmeyers	21

3.1.6 Ensayos de tolerancia de plántulas y remoción de As en sistema hidropónico en bolsas estériles	21
3.1.7 Determinación de As residual: Método espectrofotométrico con dietilditiocarbamato de plata	22
3.1.8 Determinación de pigmentos	23
3.1.9 Determinación de malondialdehído	24
3.2 ESTUDIO DEL MICROORGANISMO SIMBIONTE	25-26
3.2.1 Material biológico	25
3.2.2. Mantenimiento, conservación e identificación de la cepa	25
3.2.3 Ensayo de tolerancia a As en placa	25
3.2.4 Ensayo de tolerancia a As en medio líquido	26
3.2.5 Ensayos de movilidad frente a As: movimientos de <i>swarming</i> y <i>swimming</i>	26
3.3 ESTUDIO DEL SISTEMA PLANTA-MICROORGANISMO	27-29
3.3.1 Preparación del inóculo	27
3.3.2 Ensayo de inoculación	27
3.3.3 Determinación de As total en tejido: Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (EAA)	28
3.4 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
3.5 REGISTRO DE IMÁGENES	29
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>30-60</b>
4.1. ESTUDIO DEL SISTEMA VEGETAL	30-41
4.1.1 EFECTOS DEL ARSENIATO Y ARSENITO SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE SOJA	30
4.1.1 a) Germinación y tolerancia de plántulas de soja frente a diferentes concentraciones de As en estadios tempranos de desarrollo	30

4.1.1 b) Tolerancia de plántulas de soja frente a diferentes concentraciones de As en ensayos hidropónicos	33
4.1.2 NIVELES DE As REMANENTE EN SOLUCIONES DE SISTEMAS HIDROPÓNICOS	39
4.1.2 a) Determinación de los niveles de As remanente: sistema hidropónico en erlenmeyers	39
4.1.2 b) Determinación de los niveles de As remanente: sistema hidropónico en bolsas estériles	40
4.2 ESTUDIO DEL MICROORGANISMO SIMBIONTE	42-47
4.2.1 EFECTOS DEL As SOBRE EL DESARROLLO DE <i>B. japonicum</i> E109	42
4.2.1 a) Desarrollo en placa de <i>B. japonicum</i> E109 y tolerancia del microorganismo frente a diferentes concentraciones de As	42
4.2.1 b) Tolerancia de <i>B. japonicum</i> E109 frente a diferentes concentraciones de As en medio líquido	42
4.2.2 EFECTOS DEL As SOBRE LA MOVILIDAD DE <i>B. japonicum</i> E109: comportamientos de <i>swarming</i> y <i>swimming</i>	44
4.3 ESTUDIO DEL SISTEMA PLANTA-MICROORGANISMO	48-60
4.3.1 EFECTOS DEL As SOBRE EL DESARROLLO Y TOLERANCIA DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS CON <i>B. japonicum</i> E109	48
4.3.2 EFECTOS DEL As SOBRE LA INTERACCIÓN SOJA- <i>B. japonicum</i> E109: implicancias en la nodulación	51
4.3.3 DETERMINACIÓN DE As EN EL TEJIDO DE PLANTAS DE SOJA NO INOCULADAS E INOCULADAS CON <i>B. japonicum</i> E109	55
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>61-63</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64-74</b>



## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y mi papá, porque sin ustedes nunca habría llegado hasta acá. GRACIAS por habernos dado todo, por estar siempre y de forma incondicional apoyándome en mis decisiones, desde las más pequeñas hasta las más grandes. Fueron ustedes quienes me enseñaron, entre tantas cosas, el valor del esfuerzo y la dedicación. Me dieron siempre la oportunidad de elegir y también de formarme, así como toda su confianza. Es por esto y todos sus esfuerzos que este logro es compartido, hasta más suyo que mío... gracias por todo, los amo.

A mi hermana... siempre vas a ser mi "hermanita", nanita. Gracias por estar siempre y por ser también mi amiga. Te adoro con todo el corazón.

Meli, la "Mamá de laboratorio". Soy afortunada de que seas mi directora, siempre me escuchaste, me diste tu apoyo, tu tiempo y me cuidaste... cuanta paciencia a pesar de mi carácter. Aprendí muchas cosas de vos, sos una gran profesional y persona, siempre vas a tener mi admiración. Tu dedicación, responsabilidad y entusiasmo son ejemplos que quiero seguir. Infinitas gracias por todo.

Agus y Ceci, las 3 juntas desde el principio y ahora acá en el final. Cuantas cosas pasamos, crecimos juntas en este tiempo. Mates dulces, hablando cuando le tocaba a Ce, teóricos, horas y días de estudio... estos 6 años los viví con ustedes, en las buenas y en las malas siempre juntas. Que suerte que las conocí, las quiero muchísimo.

A mis amigas de siempre: Bel, Lau, Cele, Noe, Magda, Roci, Nati... no importa el tiempo, tampoco la distancia para nuestra amistad. Gracias porque siempre creyeron en mí y me apoyaron, y de una forma u otra estuvieron en todo momento. Son muy importantes en mi vida, que bueno que las tengo y que podamos compartir este momento. Las quiero!

Juanmi, apareciste hace poco pero ya me diste tanto. Gracias por ser mi cable a tierra en este último tiempo en que estuve con tantas ansias, por ayudarme con tantos favores y por estar junto a mí.

A la familia: mis abuelos, tios y primos. Espero hacerlos sentir orgullosos, gracias por estar en esta instancia tan importante en mi vida y por su cariño.

A mi grupo de amigos de "acá", que en éstos últimos años pasamos tantos buenos momentos juntos. Silvi A, por ser incondicional y tan buena amiga. Aye, mi concu, cuánto compartimos en éste último tiempo. Gracias por abrirme las puertas, por todos los favores, por todo lo vivido. Mauri, siempre estuviste cada vez que te necesite, sabes cuánto te quiero. Yamil, que siempre me visitaron y me llevaron a tomar helados

con Ce, a pesar de que te gusta pelearme. Ale y Mati, con las puertas abiertas de sus casas en las juntadas y siempre llevándonos, cuidándonos a todas.

Juli y Silvi G, inevitable no acordarme del anfi, el lugar con las charlas más interesantes de Río cuarto. Gracias por todo lo compartido. A Juan o “Juancete” que durante tanto tiempo nos escuchó hablar y cuántas veces calentaste el agua, nos cebaste mates y hasta nos hiciste café. A todos mis compañeros con los que compartimos tanto en estos años, entre ellos Aye T, Emi, Chris, Vero, Ale.

A todos los integrantes de los laboratorios 6A, 8 y 9 que me hicieron sentir parte desde el primer momento. A “los chicos del laboratorio” que me brindaron una mano cada vez que lo necesité y por la buena onda. A Pao, mi Co-directora, que también siempre estuvo dispuesta a darme ayuda y sobre todo gracias por los aportes realizados en este trabajo.

A todas las personas que desinteresadamente me abrieron las puertas de sus laboratorios, me asesoraron, me ayudaron y también a las que se interesaron por mí: Dr. Fabricio Cassán, Romi M y Belén P, Fiorella, Noemí, Bebeta.

A los integrantes del jurado, Pablo y Germán. Gracias por el tiempo dedicado al presente trabajo, sus contribuciones y por ser tan agradables conmigo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por ofrecer educación pública, gratuita y de calidad. En particular a todos aquellos docentes e investigadores entusiastas y dedicados, interesados en la formación de los futuros profesionales.

A mi país, que mediante las Universidades Nacionales, permite el acceso de cientos de jóvenes a la educación superior.

El presente Trabajo Final fue realizado en el Departamento de Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El mismo se presenta como requerimiento para optar al título de Microbiólogo.

Romina B. Cejas  
Alumna

Dra. Melina A. Talano  
Directora

Dra. Paola S. González  
Co-directora

Jurado:

Dra. Melina A. Talano

Dr. Pablo Boggino

Dr. Germán Barros

## RESUMEN

La soja constituye uno de los principales cultivos que se desarrollan en nuestro país, y en particular en la región de la llanura chaco-pampeana. Esta zona coincide con la presencia, tanto en suelos como en aguas subterráneas utilizadas para riego, de altos niveles de arsénico (As), metaloide que por su toxicidad y efectos sobre el rendimiento vegetal obstaculizaría un desarrollo agrícola sustentable. Dados los efectos perjudiciales que causa este metaloide sobre la salud humana y animal, la respuesta de las plantas frente al As y su posible incorporación, constituyen una importante problemática que debe ser abordada. Además, teniendo en cuenta que es una práctica común el uso de *Bradyrhizobium japonicum* E109 en inoculantes para soja, resulta también necesario conocer el efecto del As sobre el microorganismo como así también sobre la simbiosis con esta especie vegetal y la posible acumulación y/o traslocación del metaloide a los tejidos y/o granos. Por lo tanto, en el presente trabajo se analizó el efecto del arseniato y arsenito de sodio sobre el desarrollo de plántulas de soja, sobre su simbionte *B. japonicum* E109, como así también sobre la simbiosis rizobio-leguminosa.

En estadíos tempranos del desarrollo de soja, concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{M}$  de ambas especies iónicas de As resultaron tóxicas, inhibiendo la germinación en un 75%. El estudio de la tolerancia y capacidad de remoción de As de plántulas crecidas en sistemas hidropónicos, mostró que concentraciones 5 y 10  $\mu\text{M}$  de As no provocaron efectos en el desarrollo del hipocótilo, mientras que la biomasa de la raíz se redujo con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y con concentraciones de arsenito desde 5  $\mu\text{M}$ . Bajo tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito los niveles de clorofila *a*, *b* y carotenos disminuyeron, mientras que los niveles de malondialdehído aumentaron. En este sistema hidropónico las plántulas fueron capaces de remover el metaloide, sugiriendo su posible adsorción y/o incorporación al tejido vegetal.

*B. japonicum* E109 toleró en placa concentraciones de arseniato hasta 5 mM y arsenito 10  $\mu\text{M}$ . En medio líquido el desarrollo no se vio afectado con 500  $\mu\text{M}$  de arseniato, mientras que con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito la velocidad de crecimiento disminuyó levemente y de forma significativa con 50  $\mu\text{M}$ . Con respecto a la movilidad, el *swarming* se redujo frente a tratamientos con arseniato y arsenito, mientras que sólo el arsenito produjo cambios en el *swimming*.

En los ensayos de simbiosis soja-*B. japonicum* E109, el desarrollo de las plántulas en general se vio afectado para tratamientos a partir de 25  $\mu\text{M}$ , resultando de mayor toxicidad el arsenito en comparación con el arseniato, aunque sin diferencias en el desarrollo de plantas inoculadas/no inoculadas. Las plantas no inoculadas tratadas

con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito mostraron menores niveles de clorofila a y carotenos que las inoculadas, sin embargo, resulta importante considerar que el desarrollo de las plantas se vio afectado de manera significativa por concentraciones 25  $\mu\text{M}$  de As, aún en plantas inoculadas, por lo que la presencia de As en agua y suelos impactaría negativamente en términos de producción para este cultivo.

El As produjo una reducción significativa en el número de nódulos totales y efectivos, lo que podría explicarse por la disminución en la movilidad del microorganismo así como la afección del tejido radical ante la presencia del metaloide, entre otros motivos. Estos resultados sugieren que la presencia de As en suelos podría afectar la simbiosis soja-*B. japonicum* E109.

Los niveles de As en el tejido de las plantas, así como los factores de transferencia para As (FTs As) bajo tratamientos con 25  $\mu\text{M}$ , no mostraron diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas. Por lo tanto, se sugiere que *B. japonicum* E109 no influiría en la biodisponibilidad y consecuente absorción y/o traslocación del metaloide en soja. Los bajos valores de FT As encontrados en la porción aérea indicarían una baja posibilidad de que el metaloide sea acumulado en semilla, y por lo tanto, los cultivos de soja regados con aguas contaminadas no constituirían una potencial entrada de As a la cadena alimenticia.

# *Introducción*

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 IMPORTANCIA DEL ARSÉNICO**

El Arsénico (As) es un metaloide ubicuo y es el veintavo elemento más abundante de la corteza terrestre. Se presenta tanto en formas orgánicas como inorgánicas, en un amplio rango de concentraciones en aire, agua, suelos, vegetales y animales. Puede encontrarse en cuatro estados de oxidación en la naturaleza: -3, 0, +3 y +5, siendo las últimas dos formas las que cobran importancia en ambientes terrestres. Las especies inorgánicas son en general, mucho más tóxicas y las que principalmente se encuentran en suelo. El arseniato (As V) es un análogo del fosfato, por lo que interfiere con procesos celulares esenciales como la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, mientras que la toxicidad del arsenito (As III) se debe a su capacidad de unión a los grupos sulfhidrilos y consecuentes efectos detrimentales sobre el funcionamiento proteico general (Tripathi y col., 2007; Zhao y col., 2009, 2010).

El As es considerado un contaminante global que es introducido al ambiente tanto por procesos geológicos como antropogénicos, entre los que se incluyen la erosión de las rocas, emisiones volcánicas y descargas de fuentes termales y actividades como la minería, la fundición, el uso de pesticidas, herbicidas, preservantes de madera y aditivos de alimentos que contienen As (Zhu y Rosen, 2009; Zhao y col., 2010). Las especies de As III son de gran preocupación ambiental teniendo en cuenta su combinación de alta movilidad y toxicidad, en comparación con las especies pentavalentes, que pueden ser más fácilmente absorbidas y retenidas por diferentes superficies (Litter y col., 2010; Litter, 2010).

La presencia de elevadas concentraciones de As en suelos y agua de bebida, y por lo tanto, en algunos alimentos, afectan a millones de personas (Abernathy y col., 2003). Entre las áreas con mayor población y extensión geográfica implicadas, se destacan en Asia el Golfo de Bengala en Bangladesh y noreste de la India (Rahman y col., 2001; Bhattacharyya y col., 2003), Mongolia Interior en China (Guo y col., 2001), Taiwán y Vietnam (Smedley y Kinniburgh, 2002). En América esta problemática abarca en Norteamérica el oeste de Estados Unidos (BEST, 2001) y México (Rodríguez y col., 2004); y en Sudamérica a Argentina, Chile, Bolivia y Perú (Fernández Turiel y col., 2005).

La contaminación de los recursos hídricos subterráneos y superficiales en América Latina por As tiene el mismo orden de importancia que en el sureste de Asia, donde se

han realizado diversos estudios, especialmente durante las últimas dos décadas. Sin embargo, muy pocas publicaciones reflejan el problema en nuestro continente, donde la contaminación por As se conoce desde hace alrededor de 100 años (Bundschuh y col., 2010). La presencia de elevados niveles de As en aguas subterráneas de extensas regiones de nuestro país, tiene su origen en la actividad volcánica en la Cordillera de Los Andes, que tuvo como consecuencia la aparición de terrenos arseníferos. La región afectada es una de las más extensas del mundo, abarca aproximadamente  $1.10^6$  km<sup>2</sup> (Smedley y Kinniburg, 2002; Farías y col., 2003) y comprende las provincias de Córdoba, La Pampa, Santiago del Estero, San Luis, Santa Fé, Buenos Aires, Chaco, Salta, Jujuy, Tucumán, San Juan y Mendoza. En la provincia de Córdoba, la llanura sudeste es la más afectada (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli, 2005; 2010).

Se estima que en nuestro país, la población expuesta al consumo de agua con elevado contenido de As es de 2.000.000 de habitantes (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli, 2007). La OMS (Organización Mundial de la Salud) y la US EPA (Agencia de Protección de la Salud de los Estados Unidos) establecen un nivel permitido de As en aguas de bebida de 0,01 mg l<sup>-1</sup>. Por su parte, en nuestro país, la DIPAS (Dirección Provincial de Agua y Saneamiento de Córdoba) también adoptó en el año 2006 el mismo valor aceptable de As en agua (<http://www.lavoz.com.ar/nota.asp>) y el CAA (Código Alimentario Argentino) plantea que para aquellas regiones del país con suelos de alto contenido de As, se establece un plazo de hasta 5 años para adecuarse al valor de 0,01 mg l<sup>-1</sup> (Artículo 982, Resol. Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007). En muchos casos la concentración de As a la que está expuesta la población, considerando la ingesta de aguas y alimentos contaminados, excede estos niveles permitidos. El contenido de As varía ampliamente. En la llanura Chaco-Pampeana, una de las más grandes regiones con altos niveles de As en aguas subterráneas, las concentraciones encontradas variaron entre 0,001 a 5,3 mg l<sup>-1</sup> (Farías y col. 2003; González y col., 2003; Pérez-Carrera y Fernández Cirelli, 2004; 2005), mientras que en la provincia de Santiago del Estero se han reportado valores de 14,9 mg l<sup>-1</sup> (Bhattacharya y col., 2006).

El problema radica en que el agua subterránea también se utiliza para el riego de cultivos, por lo que los alimentos también son una fuente de contaminación, respecto de lo cual no hay prácticamente registros en nuestro país (Farid y col., 2003). La FDA (Administración de Drogas y Alimentos Estadounidense) no tiene actualmente ningún nivel de tolerancia para As en alimentos. No hay ninguna legislación en vigor para As en

productos alimenticios dentro de la Unión Europea sino que cada país tiene su propia legislación y es restringido a ciertos productos (ARSLAND), pero según diferentes regulaciones (Reino Unido, Japón) se establece un máximo de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso fresco de As como límite superior permitido para frutas, granos y vegetales (Mitchel y Barr, 1995). En nuestro país, el CAA establece un límite genérico de  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  para los alimentos líquidos y  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  para los alimentos sólidos.

Se han observado efectos severos sobre la salud humana por ingesta de agua contaminada con As por largos periodos (Litter, 2010), asociándose a una variedad de enfermedades que incluyen cáncer y diabetes (Tseng y col., 2002; Tchounwou y col., 2004). En Argentina, cobra importancia el Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE), enfermedad que caracteriza por lesiones en la piel y que puede llevar a desarrollar un tipo particular de cáncer en dicho órgano (Astolfi y col., 1981; 1982). En Córdoba, esta enfermedad se conoce desde hace muchos años, y fue reconocida como endémica (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli, 2010). Sin embargo, las investigaciones realizadas, han relacionado a dicha enfermedad con los niveles de As total en el agua de bebida, existiendo muy pocos estudios sobre los contenidos en forrajes, cultivos y animales (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli, 2007).

En este sentido, resulta necesario no sólo evaluar el efecto del As sobre el desarrollo de las plantas por su relación con la producción de los cultivos, considerando la importancia de las producciones de oleaginosas y cereales en nuestra provincia, sino también su acumulación en tejidos y más particularmente en granos, ya que éste podría ser transferido a la cadena alimentaria. Además, dados los efectos que causa este metaloide en la salud y los altos niveles de As encontrados en aguas y suelos de la región central de nuestro país, la decontaminación del mismo constituye una importante problemática regional que debe ser abordada.

## **1.2 LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA DE REMEDIACIÓN**

La remediación de compuestos tóxicos mediante el uso de sistemas biológicos (biorremediación, fitorremediación, rizorremediación), representa una manera económica y eficiente de decontaminar sitios con altos niveles de sustancias tóxicas (Khan, 2004). La rizorremediación fusiona la fito y la biorremediación y se presenta como una de las aproximaciones más promisorias en los últimos años (Gerhardt y col., 2009). Esta técnica

consiste básicamente en promover el crecimiento de los microorganismos de la rizósfera (porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de los vegetales), ya que las raíces ofrecen un soporte físico y numerosos nutrientes, a través de sus exudados (Schwitzguebel y col., 2006). Por lo tanto, la degradación de varios contaminantes es mayor en suelos con vegetación, y más aún en la rizósfera (Schwitzguebel y col., 2006). Además, los microorganismos, dada su gran diversidad y versatilidad metabólica, pueden degradar o transformar una diversidad de compuestos sin la generación de intermediarios tóxicos (Furukawa, 2003). Se asume que las interacciones planta-microorganismo no sólo serían extremadamente benéficas para ambos, sino que también resultan ambientalmente importantes, permitiendo un manejo sustentable de los recursos naturales.

Las bacterias rizosféricas que promueven el crecimiento y/o desarrollo vegetal son denominadas PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), y pueden hacerlo por métodos directos (*Plant Growth Promoting Bacteria* o PGPB) o indirectos (*biocontrol-PGPB*) (Bashan y Holguin, 1998). Un tercer grupo denominado PSHR (*Stress Homeostasis Regulating Bacteria*), involucra a los microorganismos capaces de promover el crecimiento de la planta frente a condiciones de estrés abiótico (Cassán y col., 2009). Actualmente, en relación a la respuesta a estrés abiótico se plantea que, parte de la capacidad de las especies vegetales de tolerar condiciones de estrés abiótico (entre las que se podría incluir la exposición a As), podría depender de su capacidad de establecer y mantener asociaciones efectivas con rizobacterias promotoras del crecimiento o reguladoras de la homeostasis bajo estas condiciones desfavorables. De allí, que la inoculación con bacterias usualmente empleadas para la formulación de inoculantes, pueda resultar satisfactoria para la respuesta de las plantas frente a As y constituir una posible estrategia para lograr mejores resultados en rizadorremediación, evitando quizás la traslocación del metal a la planta.

### **1.3 INCORPORACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE As EN PLANTAS**

Como se mencionó anteriormente, además de los altos niveles de As en aguas a los que está expuesta la población, otras posibles vías de entrada de As surgen del consumo de alimentos que han sido regados con aguas contaminadas (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). Esto podría resultar en la contaminación tanto de los cultivos (Williams y col., 2007; Meharg y col., 2009) así como del ganado y sus productos (Pérez-Carrera y Fernández-

Cirelli, 2005; 2007), revistiendo una problemática para la salud tanto humana como animal.

Para poder estimar dichos riesgos es esencial comprender cómo el metaloide es absorbido por las plantas y posteriormente transformado, ya que los suelos, sedimentos y lodos contaminados con As son las principales fuentes de contaminación de la cadena de alimentos y del suministro de agua (Frankenberger, 2002). De esta forma, sería posible desarrollar estrategias de mitigación contra esta contaminación extendida en la cadena alimenticia.

Algunas especies vegetales presentan una variación fenotípica en respuesta a las especies de As, lo que nos ayuda a comprender su toxicidad y la forma en que las plantas han desarrollado resistencia al metaloide (Zhao y col., 2010). Este conocimiento podría utilizarse, por ejemplo, para producir variedades de plantas que sean más resistentes a As o que reduzcan su absorción (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002).

En este sentido, el coeficiente o factor de transferencia planta-suelo para As (FT As, alternativamente llamado factor de concentración) va de 0,01 a 0,1 (Kloke y col., 1984); y se define según Warren y col. (2003) como:

$$\text{FT As} = \frac{\text{concentración de As en el cultivo (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentración total de As en suelo (mg kg}^{-1}\text{)}}$$

Teniendo en cuenta que en ambientes contaminados las concentraciones de As en suelo pueden llegar a cientos o miles de mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; IARC, 2004), se sugiere que, en un suelo con 200 mg kg<sup>-1</sup> de As y un FT de 0,1 puede resultar un cultivo con más As que el límite establecido de 1 mg kg<sup>-1</sup> en alimentos (Warren y col., 2003).

Las plantas varían considerablemente en su capacidad de acumular As. Las concentraciones de As en parte aérea de plantas creciendo en suelos no contaminados son típicamente menores a 1 mg kg<sup>-1</sup> de peso fresco (Kabata-Pendias y Pendias, 1992), menos de una décima parte de la concentración de As en la tierra (esto es un FT < 0,1). Las plantas con estos bajos FTs son llamadas exclusoras, dada su resistencia a la incorporación y, más importante, traslocación restringida de As de raíz a tallo (Zhao y col., 2010). En el otro extremo, las hiperacumuladoras de As son capaces de acumular más

del 2% de As en la parte aérea, con FTs que usualmente exceden 1 (Ma y col., 2001; Zhao y col., 2009).

Por lo tanto, la alta absorción de As por plantas de cultivo, puede ser un problema de seguridad alimentaria. Un ejemplo de ello es el arroz (*Oryza sativa*), cultivo capaz de incorporar As de los suelos donde se desarrolla. Esto lleva a la acumulación en sus granos a concentraciones que pueden suponer un riesgo para la salud de las personas que consumen grandes cantidades de éste cereal en su dieta (Williams y col., 2007; Zhu y col., 2008).

### 1.3.1 Incorporación de As

El As es incorporado por las plantas por las vías de transporte de nutrientes esenciales de forma inadvertida, sin embargo, por ser un elemento no esencial y tóxico, es detoxificado por diferentes mecanismos. Tanto la vía de incorporación como las formas de detoxificación varían según el estado iónico en el que se encuentra el metaloide.

El arseniato (As V) es la principal especie de As encontrada en suelos aerobios (Zhao y col., 2009). La mayoría del ácido As ( $H_3AsO_4$ ) se disocia como oxianiones  $H_2AsO_4^{-1}$  o  $HAsO_4^{-2}$  bajo condiciones normales de pH (pH 4-8), y son análogos que se corresponden con iones fosfatos (Zhao y col., 2009; 2010). Por lo tanto, el arseniato es confundido por su analogía con el fósforo (P), uno de los elementos esenciales requeridos para el desarrollo vegetal, y es incorporado por las raíces vía transportadores de fosfatos (Abedin y col., 2002; Rausch y Bucher, 2002; Bucher, 2007). El mecanismo involucra el co-transporte con protones, según la estequiometría de al menos 2  $H^+$  por cada  $H_2AsO_4^{-2}$  o  $H_2PO_4^{-1}$  (Ullrich-Eberius y col., 1989). Esto se puso en evidencia a través de estudios fisiológicos y electrofisiológicos mostrando una potente inhibición del fosfato en la incorporación de arseniato (Ullrich-Eberius y col., 1989; Abedin y col., 2002), como en el caso de *Arabidopsis* donde altos niveles de fosfatos aumentaron la tolerancia a As (V) (Dhankher y col., 2006). Además, diferentes reportes mostraron que mutantes de *A. thaliana* defectivos en transportadores de fosfato, fueron más tolerantes al arseniato (Shin y col., 2004; González y col., 2005; Catarecha y col., 2007). De hecho, algunos de estos mutantes fueron identificados en base a una búsqueda de toxicidad a arseniato (González y col., 2005; Catarecha y col., 2007).

El arsenito (As III) es la especie dominante en ambientes reductores; la reducción de arseniato a arsenito puede ocurrir muy fácilmente a potenciales redox intermedios (Zhao y col., 2009). En contraste con el arseniato, el ácido arsenioso ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{pK}_a = 9,2; 12,1 \text{ y } 13,4$ ) se encuentra mayormente no disociado en condiciones de pH normales (>94% no asociado a pH <8.0) (Zhao y col., 2010).

El arsenito es transportado e incorporado por las raíces de las plantas en la forma neutral  $\text{As}(\text{OH})_3$  a través de los canales de acuagliceroporinas (Tripathi, 2007); que consisten en canales que conducen agua, glicerina y pequeños solutos sin carga (Bhattacharjee y col., 2008).

### **1.3.2 Transporte y metabolismo**

Luego de la incorporación de arseniato por las raíces, algo del mismo se pierde de las células vía eflujo al medio externo (Xu y col., 2007). El mecanismo no se conoce, pero podría ser similar al de eflujo de fosfato que es a través de canales aniónicos (Mimura, 1999). En cuanto a los mecanismos de eflujo de arsenito, éstos aún no han sido elucidados (Zhao y col., 2009).

Una vez incorporado, el As V es reducido a As III, reacción catalizada por arseniato reductasas, miembros de la superfamilia de proteínas tirosin fosfatasas (PTPasa) (Mukhopadhyay y Rosen, 2002). La mayoría de las plantas tienen una alta capacidad de reducción de arseniato y el As se encuentra presente predominantemente en el estado de oxidación As III, aún cuando las plantas han sido expuestas a arseniato (Dhankher y col., 2002; Xu y col., 2007).

El arsenito presente en las células radicales debe ser detoxificado por alguna vía, de forma contraria afectaría el metabolismo vegetal. Las plantas desencadenan diferentes mecanismos de homeostasis en respuesta a metales tóxicos, entre ellos el As, e incluyen sistemas de transporte en compartimientos específicos, exclusión de los mismos y síntesis de ligandos que disminuyen la toxicidad de ciertos elementos (Vázquez y col., 2009). En particular, las fitoquelatinas (PQs) han demostrado tener un rol crucial en la detoxificación y homeostasis de metales pesados y metaloides en plantas (Cobbett y Goldsbrough, 2002).

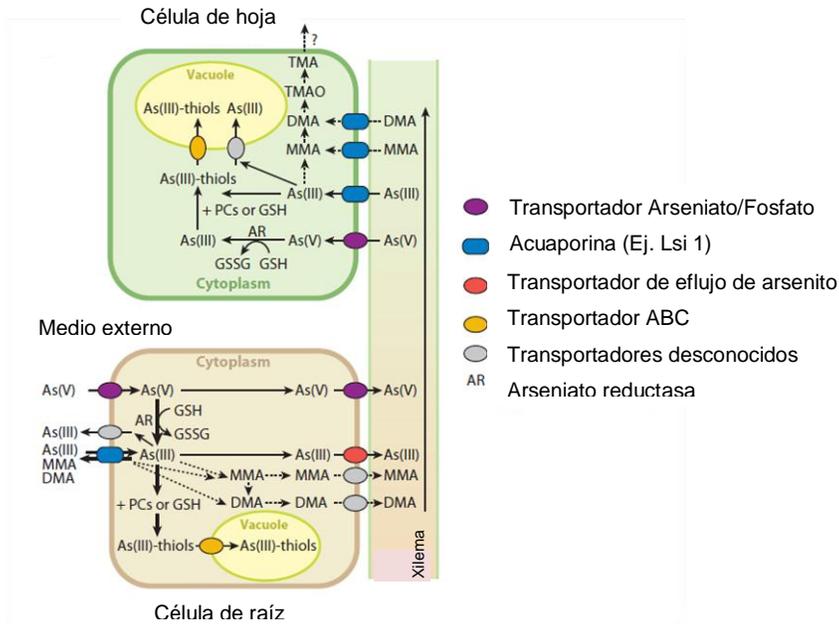
Las PQs son sintetizadas a partir de glutatión (GSH) por la enzima PQ sintasa. En algunas legumbres, como es el caso de soja (*Glycine max*), el GSH es reemplazado por

homoglutatión o GSHh ( $\beta$ -Ala sustituida por Gly) y los correspondientes péptidos quelantes de metales sintetizados a partir de GSHh, se los conoce como homofitoquelatinas (hPQs) (Vázquez y col., 2009). Las leguminosas sintetizan hPQs además de PQs durante el estrés frente a As (Grill y col., 2006; Gupta y col., 2009), y tanto las PQs como las hPQs forman complejos con metal(oides) a través de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. Estos complejos PQ/hPQ-metal atraviesan el tonoplasto y son subsecuentemente compartimentalizados en vacuolas por proteínas homólogas de multiresistencia a drogas (Tommasini y col., 1998; Guo y col., 2001).

La movilidad del As desde las raíces al tallo varía entre las diferentes especies (Zhu y Rosen, 2009) y la incorporación del As al xilema no es del todo conocida. Sólo se ha identificado un gen que codifica una proteína de eflujo, Lsi2, que es responsable del transporte de arsenito al xilema (Ma y col., 2006), sugiriendo que el As es traslocado principalmente en la forma As III (Xu y col., 2007; Su y col., 2008).

El arsenito puede seguir la vía de metilación para dar monometilarseniato (MMAs(V)), dimetilarseniato (DMAs(V)), y trimetil oxido de arsina (TMAO(V)) (Wu y col., 2002; Zhao y col., 2009), producto final que puede volatilizarse (Zhu y Rosen, 2009).

En la *Fig. 1* se pueden observar algunos de los aspectos mencionados en esta sección.



**Figura 1)** Diagrama esquemático simplificado del transporte y metabolismo de As en plantas. Las líneas punteadas delgadas indican el flujo relativo. Se asume que los transportadores para la incorporación de As dentro de las células foliares son similares a los encontrados en raíz, pero hay poco conocimiento sobre sus identidades. Tomado de Zhao y col. (2010).

Referencias: GSH: glutatión, PCs: fitoquelatinas, As(III)-thiols: complejo As III-tiol, AR: arseniato reductasa, MMA: monometilarseniato, DMA: dimetilarseniato, TMAO: trimetil oxido de arsina, TMA: trimetilarsina.

#### 1.4 INCORPORACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE As EN BACTERIAS

Las interacciones entre los microorganismos y los iones metálicos han sido divididas en distintos procesos: interacciones extracelulares y con la pared celular, e intracelulares.

Las principales interacciones extracelulares entre bacterias y metales son la movilización e inmovilización de éstos, la producción de polímeros extracelulares y la liberación de sideróforos (Suárez y Reyes, 2002).

La bioadsorción es la propiedad de los microorganismos de inmovilizar y concentrar metales en soluciones acuosas (López y col., 2000). Esto es el resultado de la presencia de polímeros estructurales (compuestos principalmente por polisacáridos) y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales cargados negativamente (polianiones), los cuales son capaces de interactuar con los metales, atrapándolos dentro de su estructura (Ford y Mitchell, 1992; Chen y col., 1995). Esta interacción tiene implicancias ecológicas y prácticas muy importantes, ya que puede mediar la fijación de metales a las

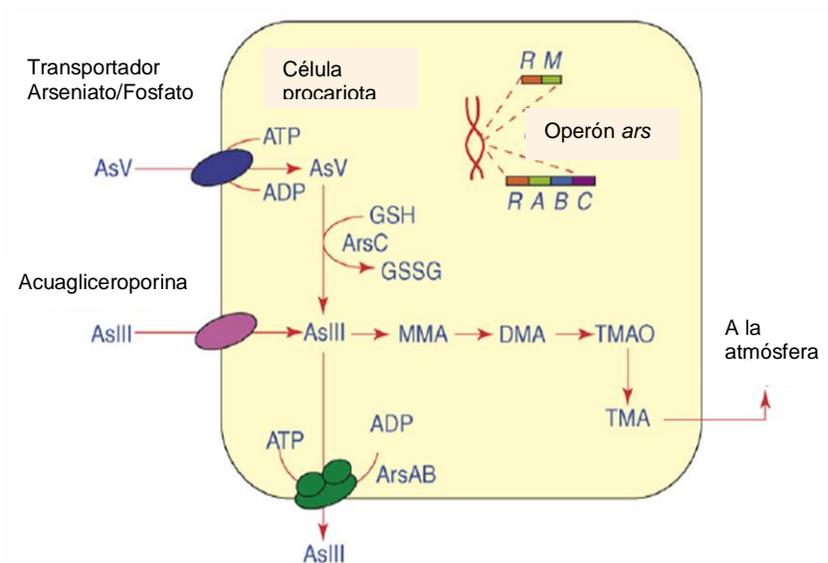
partículas de arcilla en el suelo, con las consecuentes alteraciones en los cultivos agrícolas, intervenir en algunos pasos de los ciclos biogeoquímicos de los elementos, alterándolos, e inmovilizar los metales tóxicos de efluentes líquidos, reduciendo su biodisponibilidad (Suárez y Reyes, 2002).

Las interacciones a nivel intracelular comienzan una vez que el metal(oide) ha sido incorporado (bioacumulación), sufriendo transformaciones enzimáticas y/o inducción de la síntesis de proteínas acomplejantes. En procariontes y en eucariotes unicelulares, el arseniato y el arsenito ingresan a la célula a través de transportadores de fosfato y acuagliceroporinas, respectivamente (Zhao y col., 2009; 2010).

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a As, que pueden dividirse en 2 categorías básicas: las que consisten en reacciones redox que conservan la energía ganada para el crecimiento celular y las reacciones de detoxificación por los genes presentes en el operón *ars* (Mukhopadhyay y col., 2002; Oremland y col., 2005). Este último ha sido más estudiado y por lo tanto el mecanismo regulatorio es mejor conocido. La resistencia a As en bacterias, se encuentra bajo control de genes localizados en el operón *ars*. Este operón usualmente contiene 3 genes: *ars R*, *B* y *C*, codificando 3 proteínas: *Ars R* es un represor que actúa en trans, censa As III y controla la expresión de *Ars B* y *Ars C*; *Ars C* codifica una reductasa que reduce As V a As III utilizando glutatión (GSH) como agente reductor; y *Ars B* expulsa As III de las células funcionando como un antiporte  $\text{As}(\text{OH})_3\text{-H}^+$  (Tripathi y col., 2007). En algunas bacterias, el operón *ars* contiene 5 genes: *ars R*, *D*, *A*, *B* y *C*, que codifican 2 proteínas adicionales, *Ars A* es una ATPasa que se une a *Ars B* y convierte a la proteína transportadora de As III en una bomba ATP de expulsión de As III al exterior; *Ars D* exhibe una actividad débil de represor transcripcional (Rosen, 2002).

La transformación y volatilización de As también se ha descrito para bacterias (Bentley y col., 2002; Quin y col., 2006). La enzima AsIII-S-adenosilmetionina metiltransferasa (*ArsM*) se encuentra en el operón *ars RM* y es la responsable de la metilación secuencial de As III hasta óxido de trimetilarsina, que finalmente es oxidado a trimetilarsina y volatilizado (Quin y col., 2006).

En la *Fig. 2* se puede observar un diagrama del metabolismo de As en bacterias.



**Figura 2)** Método de detoxificación de As en bacterias. Tomado de Tripathi y col. (2007).

Referencias: GSH: glutatión, MMA: monometilarseniato, DMA: dimetilarseniato, TMAO: trimetil óxido de arsina, TMA: trimetilarsina.

## 1.5 INTERACCIONES EN LA RIZÓSFERA Y BIODISPONIBILIDAD DE As

Como ya se mencionó, diferentes procesos químicos y biológicos que ocurren en la rizósfera pueden interferir en la especiación de As y su biodisponibilidad para las plantas.

El metabolismo de los microorganismos del suelo influye en el ciclo biogeoquímico del As, afectando tanto su especiación como su toxicidad por producir cambios en la movilidad y disponibilidad de As para las plantas. Por ejemplo, los microorganismos pueden sintetizar quelantes y sideróforos, reducir el pH del suelo y/o solubilizar complejos que forman los metales con diferentes componentes del suelo, modificando de esta forma, la eficiencia de los procesos de acumulación (Cavalca y col., 2010).

Tanto las bacterias arseniato-reductoras como las arsenito-oxidantes, se encuentran en el suelo. La reducción microbiana del arseniato ocurre mediante dos mecanismos principales: reducción desasimiladora, donde el arseniato sirve como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica y la detoxificación, donde el arseniato es reducido a arsenito y bombeado fuera de las células microbianas.

En suelos aerobios, el arsenito es oxidado rápidamente a arseniato, ya sea por reacciones químicas con óxido de manganeso o por los microbios arsenito-oxidantes.

Además, como ya se mencionó, tanto las plantas como los microorganismos son capaces de expulsar arsenito. Por lo tanto, el arseniato y el arsenito pueden coexistir en la vecindad de las raíces generalmente bajo condiciones aeróbicas. Así el suelo, las raíces de las plantas y los microorganismos son capaces de participar constantemente en el ciclo de reducción-oxidación de arseniato-arsenito (Zhao y col., 2009; 2010).

Debido a ello, las bacterias As-resistentes no sólo tienen un rol importante en el control de la especiación y biodisponibilidad del As, sino que también pueden tener importantes aplicaciones en las estrategias de biorremediación (Valverde y col., 2011).

Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto del arseniato y arsenito sobre los diferentes cultivos que se encuentran presentes en las diferentes regiones arseníferas de nuestra provincia, ni cómo la presencia de los microorganismos rizosféricos podría afectar el ciclo biogeoquímico y la biodisponibilidad de As para los mismos.

## **1.6 LA INTERACCIÓN RIZOBIO LEGUMINOSA**

En la atmósfera terrestre hay una abundante disponibilidad de nitrógeno (N), 80% en la forma molecular  $N_2$ . Esta forma debe ser transformada para ser empleada por la mayoría de los organismos vivos. La capacidad de fijar N o diazotrofia es exclusiva de los procariontes, y las bacterias lo asimilan por el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). El mismo reduce el N gaseoso a especies de N biológicamente disponibles ( $NH_4^+$ ), por intermedio del complejo enzimático de la nitrogenasa (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Peticari, 2006).

La simbiosis rizobio-leguminosa es muy importante desde un punto de vista agronómico y se establece entre bacterias Gram negativas fijadoras de nitrógeno, englobadas bajo el término rizobios, y las raíces de las leguminosas. Estas bacterias heterótrofas se asocian en estructuras nodulares fijadoras de  $N_2$ , contribuyendo de manera fundamental a la fertilidad del suelo, a la producción de alimentos para el hombre y animales y a la reducción del uso de fertilizantes nitrogenados (Frioni, 1999).

En cuanto a las leguminosas o Fabáceas comprende una familia amplia, que incluye plantas de importancia económica como la soja, el trébol, la alfalfa, maní, poroto, vicia, entre otras y se caracterizan por poseer semillas dentro de una vaina (Madigan y col., 2004; Bianco y col., 2006). Esta familia de plantas con semillas dicotiledóneas ocupa el

tercer lugar en número de especies, con 650 géneros y más de 18.000 especies descritas (Allen y Allen, 1981).

Los rizobios son bacilos Gram negativos que pueden encontrarse aislados o de a pares, generalmente móviles en cultivos frescos, por flagelos peritricos, polares o subpolares. La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos extracelulares mucilaginosos, de composición variable según la cepa y el medio de cultivo (Frioni, 1999).

La filogenia del gen *rrs* (RNA ribosomal 16S en procariontes) agrupa a los rizobios dentro de la división Proteobacteria, mayoritariamente en  $\alpha$ -Proteobacteria con siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Alorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*, y en  $\beta$ -Proteobacteria con dos géneros recientemente descritos *Burkholderia* y *Wautersia*. *Bradyrhizobium* es el género de rizobio de crecimiento lento (con tiempos de generación que oscilan entre 6 y 8 horas) y probablemente el más antiguo (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

El proceso de provisión de N a la planta mediante la simbiosis incluye dos procesos principales: el proceso de infección y nodulación y el proceso de FBN.

La FBN se da con la formación de nuevos órganos en las raíces denominados nódulos, estructuras especializadas dentro de las cuales se realiza el proceso de transformación del  $N_2$ . La formación de nódulos comienza cuando las leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios, entre los que se encuentran los flavonoides, y en respuesta a ellos las bacterias activan una serie de genes implicados en la nodulación (Lloret y Martínez-Romero, 2005; Peticari, 2006).

Los genes microbianos que dirigen las etapas específicas de la nodulación en leguminosas, se denominan genes *nod*. Muchos de ellos están muy bien conservados y se transmiten mediante plásmidos de gran tamaño denominados plásmidos *sym*, que además de poseer los genes de nodulación, contienen genes de especificidad que restringen a una cepa a una determinada planta hospedadora (Madigan y col., 2004). En el caso de *Bradyrhizobium* los genes de simbiosis son cromosomales y se encuentran agrupados en un fragmento de alrededor de 400 Kb que podría ser móvil (Gottfert y col., 2001).

El primer paso en la formación de nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. Después de la unión y debido a la acción de lipoquitooligosacáridos secretados por los rizobios, conocidos como factores de nodulación (factores Nod), los pelos radicales se curvan (Lerouge y col., 1990). Las bacterias penetran los pelos radicales y se induce la

formación por parte de la planta del canal de infección. El proceso de adhesión e infección es muy rápido y requiere que una cantidad determinada de rizobios estén presentes a medida que emergen los pelos radiculares.

A continuación la infección alcanza a las células corticales de la raíz adyacentes a los pelos radicales, las bacterias proliferan dentro del parénquima de las células huésped y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo. Los rizobios sufren cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, dando lugar a células pleomórficas llamadas bacteroides que se caracterizan por ser inmóviles y no sufrir división. Los bacteroides quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora, llamada membrana peribacteroidal (Frioni, 1999; Madigan y col., 2004; Peticari, 2006).

La fijación de N no se inicia hasta que se han formado los bacteroides. La nitrogenasa, enzima que cataliza la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ , se localiza en el interior de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Maddoni y col., 2004) y se inactiva en presencia de oxígeno (Zehr y col., 1993). Durante el proceso de simbiosis, la planta también expresa proteínas específicas del nódulo llamadas nodulinas, entre ellas la leghemoglobina. Ésta es una hemoproteína que se une específicamente al  $O_2$  y lo libera a bajas concentraciones, de esta forma provee la cantidad suficiente para el metabolismo de los bacteroides sin dañar el funcionamiento de la nitrogenasa. Esta proteína se localiza en el citosol de las células de la planta infectadas, y confiere color rojo o rosado a los nódulos funcionales, los nódulos no fijadores generalmente son blancos en su interior (Frioni, 1999; Peticari, 2006).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la FBN. El primer producto estable que se obtiene de la fijación es el amonio, que en el caso de soja es asimilado en forma de alanina y luego exportado vía xilema a las hojas como ureídos. Los nódulos se nutren de fotoasimilados vía floema (Peticari, 2006).

En el caso particular de soja, leguminosa objeto de estudio en el presente trabajo, se ha visto que en condiciones ideales de expresión de la simbiosis, la nodulación comienza a visualizarse entre los 3 a 5 días y la actividad de fijación desde los 10 a 15 días de emergencia. Los valores de N fijados son bajos desde los estadios vegetativos hasta comienzos de floración, de ahí en adelante se registra la mayor actividad, situándose los máximos niveles de fijación en los estadios reproductivos. Wilson y Umbreit (1973) reconocieron 3 estadios de fijación durante el ciclo de la soja; en el primer estadio (hasta

pre-floración) la nutrición del cultivo está ligada mayormente a la absorción de nitratos del suelo (actividad nitrato reductasa predominante en la planta). En el segundo estadio, la actividad de FBN es detectada con incrementos marcados de la actividad nitrogenasa, en esta fase que coincide con el período de floración-llenado de vainas, los nódulos transfieren 80-90% del N fijado a la planta. En el estadio final (desarrollo de semillas), los nódulos se tornan senescentes ante un cambio en la prioridad de destinos, y el N de los órganos vegetativos es movilizado y redistribuido a los órganos reproductivos. La transferencia de N de los nódulos alcanza un máximo durante este estadio (Maddoni y col., 2004).

### **1.7 LA SIMBIOSIS SOJA-*B. japonicum* Y SU IMPLICANCIA EN LA REMEDIACIÓN DE As**

No hay dudas de que la soja (*Glycine max*) constituye un cultivo de importancia en nuestro país y región. La superficie cultivada creció significativamente entre las campañas 1990/91-2001/02 y continuó haciéndolo con el paso de los años. En la campaña 2010-2011 llegó a los 18,7 millones de hectáreas, con una producción estimada en 49 millones de toneladas (<http://www.siiia.gov.ar>). El Cono Sur se ha constituido en un importante productor, procesador y exportador de granos, aceite y harina de soja, donde las exportaciones representan más de un 96% de la producción (Revista Agromercado, 2006).

Dado que la soja presenta una alta acumulación de proteínas en sus semillas, se convierte en el cultivo con la mayor demanda de N y la menor producción de biomasa de semilla por fotoasimilado producido (Peticari, 2006), y se conoce que debe incorporar en su rendimiento biológico 80 kg N ha<sup>-1</sup> para producir cada tonelada de grano (Andrade y col., 2000). En su carácter de leguminosa, puede cubrir estos requerimientos de N a partir del aporte de N del suelo por la mineralización de N orgánico o, como ya hemos tratado, por medio de la FBN.

Por el método denominado inoculación se agregan artificialmente rizobios seleccionados sobre la semilla o el suelo. El producto biológico desarrollado para este fin se denomina inoculante.

Las cepas más eficientes son las que producen mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, siendo rojos en su interior, ubicados en raíz primaria y con rápida y prolongada fijación. En cambio, los rizobios menos eficientes producen nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias y tienden a paralizar la FBN en etapas más tempranas (floración). Los biotipos ineficientes producen nódulos pequeños, no tienen presencia visible de leghemoglobina y son blancos en su interior desde etapas muy tempranas. Éstos no realizan la FBN y son considerados cepas parásitas (Peticari, 2006).

La tasa de adopción de la técnica de inoculación se puede considerar alta en nuestro país (González, 2007); estimaciones de la tasa de fijación de N en localidades del centro y norte de la región productora de soja, indican que entre el 26 y el 71% del nutriente acumulado procede de la FBN (Collino y col., 2007). Como la soja ha sido introducida en Argentina y su simbiote no estaba presente en los suelos, la aplicación de rizobios a este cultivo ha sido una práctica generalizada (Benintende, 2010). En particular la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum* fue seleccionada como la más apropiada para las formulaciones de inoculantes de soja en Argentina, por el IMYZA (Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola) y el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agrícola), luego de un programa de selección iniciado en 1980, con numerosos ensayos en diferentes áreas productivas (Cassán y col., 2009). La legislación vigente en Argentina establece que la concentración estándar exigida en los inoculantes es de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  o  $ml^{-1}$  de soporte a la fecha de elaboración. El inoculante debe proveer como mínimo  $8.10^4$  rizobios sobre cada semilla de soja hasta la fecha de vencimiento del producto (SAGyP, Res. 310/94).

En este marco, la soja constituye uno de los principales cultivos de la provincia de Córdoba; ya que se trata de una planta que se adapta perfectamente a las características edáficas y climáticas de nuestra zona, en la cual se han registrado niveles crecientes de As en suelos y principalmente, en agua. También se sabe que la aplicación de inoculantes formulados en base a *B. japonicum* E109 es una práctica común. Existe un creciente interés en el uso de leguminosas asociadas a microorganismos para biorremediación (Carrasco y col., 2005; Dashti y col., 2009; Khan y col., 2009). Este sistema presenta varias ventajas para tal fin debido al uso combinado de microorganismos y leguminosas. Además, la interacción rizobio-leguminosa mejora la disponibilidad de nitrógeno en suelo (Lafuente y col., 2010).

Las leguminosas son usualmente utilizadas con fines de re-vegetación y remediación de xenobióticos ya que, estas especies vegetales aparecen naturalmente como pioneras frente a otras en sitios contaminados (Carrasco y col., 2005; Reichman, 2007) e incluso presentan características agronómicas favorables como buen desarrollo radicular y biomasa. También rizobios libres son comúnmente encontrados en suelos con altas concentraciones de As (Macur, 2001; Carrasco y col., 2005) lo que ha permitido proponer a la interacción *Rhizobium*-leguminosa como una interesante herramienta para la remediación de suelos contaminados con As (Carrasco, 2005; Reichman, 2007). En este sentido, resulta importante determinar el impacto de los contaminantes del suelo sobre la interacción simbiótica. Es poco conocido el efecto del As sobre la fisiología de las plántulas de soja, la simbiosis soja-*Bradyrhizobium* y la formación de nódulos y si la presencia de éste microorganismo en la rizósfera de leguminosas provoca algún tipo de cambios sobre la toxicidad del As para estas plantas. Por esta razón, el potencial uso de rizobios como bacterias promotoras del crecimiento bajo condiciones de altos niveles de As, resulta una nueva e interesante área de investigación, más aún cuando aguas con alto contenido del metaloide están siendo usadas para riego de este cultivo de gran importancia socio-económica tanto en nuestra zona como en el país. Por todo ello, se plantean a continuación la hipótesis y objetivos del presente trabajo.

# *Hipótesis y objetivos*

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La exposición de soja frente a As constituye un riesgo para la salud animal y humana por su potencial acumulación en los tejidos y/o granos y la consecuente transferencia a la cadena alimenticia. La interacción con *Bradyrhizobium japonicum* E109 puede modificar la respuesta de las plantas frente a la presencia de altos niveles del metaloide, resultando en una potencial fuente de aplicación como sistema de rizorremediación *in-situ*.

### **2.2 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la respuesta de plántulas de soja frente a As y comparar la respuesta de las mismas cuando son inoculadas con *B. japonicum* E109, evaluando el efecto del metaloide sobre la interacción con el simbionte. Caracterizar la tolerancia frente a As de *B. japonicum* E109.

### **2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.3.1 Estudio del sistema vegetal**

- ④ Caracterizar la tolerancia de soja frente a arseniato y arsenito mediante evaluación de su efecto sobre la germinación y desarrollo en estadíos tempranos.
  
- ④ Analizar las concentraciones de As residual en las soluciones hidropónicas, una vez desarrolladas las plantas.

### **2.3.2 Estudio del microorganismo simbiote**

- ④ Determinar la tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a diferentes concentraciones de As.
- ④ Estudiar cambios en la movilidad de *B. japonicum* E109 en respuesta al metaloide.

### **2.3.3 Estudio de asociación plántulas de soja-microorganismo simbiote**

- ④ Evaluar el desarrollo (longitud y peso fresco) y el contenido de pigmentos de plántulas de soja, para estudiar comparativamente la respuesta frente a As cuando las mismas fueron no-inoculadas/inoculadas con el simbiote *B. japonicum* E109.
- ④ Analizar el efecto del As sobre la nodulación de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109.
- ④ Determinar la concentración de As, tanto en raíz como en la porción aérea, de plantas de soja no-inoculadas/inoculadas con *B. japonicum* E109.

# *Materiales y métodos*

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 ESTUDIO DEL SISTEMA VEGETAL**

##### **3.1.1 Material biológico**

Semillas de soja (*Glycine max*), correspondientes al cultivar Don Mario DM 4670.

##### **3.1.2 Desinfección de semillas**

Las semillas fueron colocadas en solución de etanol 70% durante 10 minutos, y posteriormente en solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 15 minutos. Luego las mismas fueron lavadas 3-4 veces con agua destilada estéril. Se las dejó en agitación con agua destilada, en oscuridad, durante toda la noche y posteriormente fueron utilizadas para los ensayos correspondientes.

##### **3.1.3 Pre-germinación de semillas**

Las semillas desinfectadas fueron colocadas en placas con papel de filtro y algodón previamente embebido con 6 ml de agua destilada, en condiciones de esterilidad. Se las colocó en oscuridad y en condiciones de temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C), durante 1, 3 ó 5 días, según el ensayo para el cual fueron utilizadas.

##### **3.1.4 Ensayo de germinación en placa y tolerancia en los primeros estadios de desarrollo**

Las semillas desinfectadas fueron colocadas a germinar en placas con papel de filtro previamente humedecido con 6 ml de agua destilada (control) o soluciones 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu$ M de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente. Se sembraron (por cuadruplicado) 10 semillas por placa y se las colocó bajo condiciones de oscuridad, a  $25 \pm 2$  °C. Al término de 8 días se realizó el recuento de semillas germinadas y se determinó longitud (mm) y peso fresco (mg) tanto de radícula como de hipocótilo, considerándose como germinadas a aquellas semillas con una radícula de más de 3 mm.

### **3.1.5 Remoción de As en sistema hidropónico en erlenmeyers**

Se colocaron 6 semillas desinfectadas pre-germinadas de 5 días en erlenmeyers de 250 ml, con 70 ml de soluciones que contenían 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente, en medio Hoagland (Hoagland y Boyer, 1936) diluido  $\frac{1}{2}$ . Las semillas fueron incubadas en agitación con régimen de fotoperíodo (16 hs de luz, 8 hs de oscuridad) y a temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) durante 30 días. Las soluciones resultantes del medio hidropónico donde se desarrollaron las plantas constituyeron los diferentes tratamientos. En paralelo se suplementó solución de Hoagland con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio, a las cuales no se les adicionó semillas y constituyeron las soluciones control. Como se detalla posteriormente, se determinaron los niveles de As de estas soluciones, por método espectrofotométrico mediante la técnica con dietiltiocarbamato de plata (APHA, 2005). Se compararon los diferentes valores obtenidos entre los tratamientos y sus respectivos controles.

### **3.1.6 Ensayos de tolerancia de plántulas y remoción de As en sistema hidropónico en bolsas estériles**

Para evaluar el desarrollo de plántulas de soja en presencia de As en hidroponia, se diseñó un sistema con soporte para las semillas, de tal forma que sólo la raíz tomara contacto con la solución.

El mismo consistió en bolsas plásticas estériles de 30 x 40 cm con papel filtro de alrededor de 15 cm de alto en su interior, con 5 orificios para la colocación de las semillas pre-germinadas. Fueron adicionados en cada una de ellas 120 ml de soluciones 0, 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente, preparadas en medio de Hoagland. Además, tal como se describió para el ensayo anterior, en paralelo se suplementó solución Hoagland con 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente, a las cuales no se les adicionó semillas y constituyeron las soluciones control.

Se transfirieron (por duplicado) al sistema hidropónico 5 semillas pre-germinadas de 5 días que se mantuvieron bajo régimen de fotoperíodo en condiciones de temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C), y al término de 25 días las plantas fueron cosechadas y separadas en porción aérea y radicular.

El efecto del As sobre el desarrollo fue evaluado por la determinación de la longitud (cm) y peso fresco (mg) de las porciones aérea y radicular, así como por la cuantificación del contenido de pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos (Dere y col., 1998) de la porción aérea y de la concentración de MDA total (Heat y Packer, 1986).

Además, y para determinar la posible incorporación de As por las plantas, fueron cuantificados los niveles de As por método espectrofotométrico (APHA, 2005) de las soluciones hidropónicas remanentes y de las soluciones control (sin plantas) según se detalla a continuación.

### **3.1.7 Determinación de As residual: Método espectrofotométrico con dietilditiocarbamato de plata**

El nivel de As total se expresó en ppm. Estas determinaciones fueron realizadas como servicio por la Dra. González del Depto. de Química de la Universidad Nacional de San Luis. La técnica consistió en la digestión de la muestra en un frasco generador con HCl concentrado, solución de KI y Sn<sub>2</sub>Cl a 100 °C, durante 15 minutos. Luego se agregó 3 g de Zn al frasco generador y se lo conectó inmediatamente a un tubo en U conteniendo solución clorofórmica de dietiltiocarbamato de plata. Se dejó por 30 minutos para un desprendimiento completo de la arsina que reaccionó con la solución clorofórmica de dietilditiocarbamato de plata, formando un compuesto de color rojo que se midió a 520 nm en espectrofotómetro (Hewlett Packard 8452).

De esta forma, se cuantificó el As elemental residual en el medio de cultivo, tanto del sistema hidropónico en erlenmeyer como del sistema hidropónico en bolsas donde se desarrollaron las plántulas de soja, así como también de sus respectivas soluciones control (sin plantas). Con el objetivo de evaluar indirectamente la posible incorporación/adsorción del metaloide al tejido vegetal, se compararon los niveles de As resultantes entre los distintos tratamientos y sus respectivos controles.

Debe tenerse en cuenta que esta técnica identifica el metaloide en estado elemental (As<sup>0</sup>) sin diferenciar el estado iónico de especiación (As<sup>+3</sup>/ As<sup>+5</sup>) y es la empleada para la determinación de As en aguas según el CAA donde los resultados se expresan en ppm (mg l<sup>-1</sup>). Por lo tanto, resulta conveniente tener presentes las equivalencias entre la concentración de las sales derivadas (μM) y la concentración teórica de As que resulta de las mismas considerando peso molecular y atómico de las sales y del As, respectivamente. Donde:

<b>Arseniato o Arsenito de sodio (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>As (ppm)</b>
<b>5</b>	<b>0,37</b>
<b>10</b>	<b>0,75</b>
<b>25</b>	<b>1,87</b>

### 3.1.8 Determinación de pigmentos

Se pesaron 100 mg de material vegetal correspondientes a la porción aérea de plántulas previamente congeladas, homogeneizadas y conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este material fue disuelto con 5 ml de metanol 96 %, conservando una proporción de  $50\text{ ml g}^{-1}$  de muestra. Luego de 10 minutos de homogeneización, la muestra fue centrifugada a 1000-2000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante resultante fue empleado para registrar la absorbancia a 664, 646 y 469 nm, longitudes de onda en las que absorben la clorofila *a*, clorofila *b* y los carotenos, respectivamente (Dere y col., 1998).

Las concentraciones de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos fueron calculadas mediante la aplicación de las siguientes fórmulas, las cuales permiten calcular el contenido de los pigmentos en  $\text{mg g}^{-1}$  peso fresco de tejido vegetal:

$$C_{f_a} = (15,65 \cdot A_{664} - 7,34 \cdot A_{646}) \cdot \text{Vol (ml)}/\text{PF tejido (g)} \cdot 1000$$

$$C_{f_b} = (27,05 \cdot A_{646} - 11,21 \cdot A_{664}) \cdot \text{Vol (ml)}/\text{PF tejido (g)} \cdot 1000$$

$$C_{x+c} = (1000 \cdot A_{469} - 2,86 \cdot C_{f_a} - 129,2 \cdot C_{f_b}/245) \cdot \text{Vol (ml)}/\text{PF tejido (g)} \cdot 1000$$

Donde:

$C_{f_a}$  : Clorofila *a*

$C_{f_b}$  : Clorofila *b*

$C_{x+c}$  : Carotenos

A: Absorbancia (nm)

Vol: Volumen (ml) en el que fue resuspendido el tejido

PF tejido: Peso fresco (g) de tejido

### 3.1.9 Determinación de malondialdehído

Se realizó según la metodología de Heath y Packer (1986). Para ello se pesaron 50 mg de material vegetal de plántulas maceradas y conservadas a -80 °C. Este tejido fue homogenizado con 500 µl ácido tricloroacético (TCA) 20 %, guardando una relación de 1:10 de tejido respecto de TCA, para la extracción. Se agregó igual volumen (500 µl) de reactivo de determinación que consistió en una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5 % en TCA al 20 %. Se calentó la mezcla a 95 °C en baño María durante 25 minutos y luego fue enfriada en hielo. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, en centrífuga refrigerada y el sobrenadante fue utilizado para medir la absorbancia a 532 nm. A los valores obtenidos se les restó la absorbancia de turbidez inespecífica leída a 600 nm.

La concentración de malondialdehído (MDA) fue calculada mediante la aplicación de la siguiente fórmula, la cual permite calcular el contenido de MDA en µmoles g<sup>-1</sup> peso fresco de tejido vegetal, utilizando el coeficiente de extinción molar 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$$\mathbf{MDA} = (A_{532} - A_{600}) \cdot 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{Vol. (ml)} / \text{PF tejido (g)} \cdot 1000$$

Donde:

A: Absorbancia (nm)

Vol.: Volumen (ml) en el que fue resuspendido el tejido

PF tejido: Peso fresco (g) de tejido

## **3.2 ESTUDIO DEL MICROORGANISMO SIMBIONTE**

### **3.2.1 Material biológico**

La cepa bacteriana utilizada en el presente trabajo fue *B. japonicum* E109, recomendada como inoculante de soja y cedida gentilmente por el Dr. F. Cassán (Cassán y col., 2009).

### **3.2.2. Mantenimiento, conservación e identificación de la cepa**

El microorganismo se mantuvo en su medio óptimo de crecimiento YEMA y fue incubado a 30 °C durante 6-7 días hasta apreciar la aparición de colonias. El mismo fue repicado periódicamente (cada 2 semanas).

Para su conservación, se mantuvo la cepa a 4 °C y en glicerol a -80 °C.

Para verificar la pureza de la cepa se realizó:

- Siembra en medio TSA (tripticosa soya agar) periódicamente.
- Tinción de Gram con el kit Gram Britania (Britania). Los preparados fueron observados en microscopio óptico (1000 X).
- Siembra periódica en el medio selectivo y diferencial YEMA con el agregado de colorante (rojo congo) y Vancomicina (4 µg/ml). Se registró el tiempo de aparición de las colonias y coloración, textura y morfología característica en dicho medio.

### **3.2.3 Ensayo de tolerancia a As en placa**

Se analizó la tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a concentraciones crecientes de arseniato y arsenito de sodio mediante ensayo en placa.

El microorganismo se sembró en estrias por agotamiento (por triplicado) en placas conteniendo medio YEMA sin As y con concentraciones 5, 10, 50, 100 y 500 µM y 5 mM de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 30 °C y al cabo de 7 días se registró la presencia/ausencia de desarrollo. La máxima concentración en la que se observó desarrollo de colonias fue determinada como la concentración máxima tolerada (CMT).

### **3.2.4 Ensayo de tolerancia a As en medio líquido**

Se preparó un cultivo madre a partir de la cepa crecida en medio YEMA. Para ello se sembró una ansada del mismo, en medio YEM suplementado con Vancomicina (4 µg/ml) y fue incubado en agitación a 30 °C y 200 rpm durante 5 días. El cultivo resultante fue utilizado para inocular (por triplicado) tubos Falcon conteniendo 20 ml de medio YEM suplementado con Vancomicina (control) y concentraciones 25 y 500 µM de arseniato y 25, 50 y 100 µM de arsenito de sodio. El volumen del inóculo fue ajustado de manera de obtener una DO final de 0,05. Los tubos se incubaron en agitación a 30 °C y 200 rpm por 5 días, durante los cuales fueron tomadas alícuotas de 1 ml cada 24 hs para determinar el crecimiento de los microorganismos. Este fue realizado mediante turbidimetría (Abs. 600nm) en espectrofotómetro Beckman. Dichos valores fueron utilizados para la construcción de curvas de crecimiento.

### **3.2.5 Ensayos de movilidad frente a As: movimientos de *swarming* y *swimming***

Se analizó el comportamiento de *swarming* y *swimming* de *B. japonicum* E109 frente a concentraciones crecientes de arseniato y arsenito de sodio mediante ensayo en placa en agar semi-sólido. Para ello, el microorganismo se sembró (por triplicado) con ansa en superficie (*swarming*) o por picadura (*swimming*) en placas conteniendo medio YEMA 1/10 (con 0,5 % ó 0,3 % de agar, respectivamente) sin As y con concentraciones 25, 50, 100 y 500 µM de arseniato y 10 y 25 µM de arsenito de sodio. Las placas fueron incubadas a 30 °C y al cabo de 8 días se determinó el diámetro (mm) de los halos de movilidad resultantes y se registró su aspecto mediante la toma de fotografías. Cada condición fue ensayada por duplicado, y el ensayo se repitió en 3 oportunidades.

### **3.3 ESTUDIO DEL SISTEMA PLANTA-MICROORGANISMO**

#### **3.3.1 Preparación del inóculo**

Se preparó un inóculo a partir de la cepa crecida en medio YEMA. Para ello se sembró una ansada de la misma en medio YEM suplementado con Vancomicina (4 µg/ml) y fue incubada en agitación a  $30 \pm 2$  °C y 200 rpm durante 6 días. El cultivo fue centrifugado durante 20 minutos a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en solución fisiológica obteniéndose una DO de 1,56. La suspensión celular resultante fue utilizada para inocular las semillas. Además, se tomó una alícuota de la misma, para determinar el número de células viables mediante la técnica de microgota. Para ello se realizaron diluciones seriadas (por duplicado) del inóculo, las cuales fueron sembradas (por triplicado) utilizando 10 µl por dilución, en placas conteniendo medio YEMA con Vancomicina. Las mismas fueron incubadas a 30 °C y al cabo de 6 días se realizó el recuento en aquellas diluciones donde se observaron entre 3 y 30 colonias. Se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{promedio número de colonias} \cdot \text{factor de dilución} \cdot \text{factor alícuota}$$

#### **3.3.2 Ensayo de inoculación**

Se transfirieron (por triplicado) 5 semillas estériles pre-germinadas de 1 día a macetas conteniendo 190 g de arena volcánica estéril, previamente humedecida durante 1 día con 110 ml de solución Hoagland o Hoagland modificado (sin nitrógeno) y suplementados con concentraciones 5, 10 o 25 µM de arseniato y arsenito de sodio, respectivamente.

Cada semilla fue inoculada con 0,5 ml de suspensión bacteriana de DO 1,56 (equivalente a  $10^9$  UFC) en aquellos recipientes conteniendo Hoagland modificado. Los tratamientos con Hoagland con nitrógeno constituyeron los controles y no fueron inoculados.

Las macetas fueron colocadas en cámara con temperatura controlada  $25 \pm 2$  °C y con régimen de fotoperíodo y regadas día por medio; con solución Hoagland  $\frac{1}{4}$  o Hoagland

modificado  $\frac{1}{4}$ , según correspondiera, durante los primeros 6 días, y luego con agua destilada. Las plántulas fueron cosechadas a los 30 días.

En las plantas que fueron inoculadas, se realizó el recuento del número de nódulos de cada raíz. Los mismos fueron diseccionados para inspeccionar el color interior y se los clasificó en efectivos (rojos por la presencia de leghemoglobina) o inefectivos (blancos). También se determinó el peso fresco de la porción aérea y raíz, así como la longitud de tallo y de la raíz principal de cada una de las plantas para cada tratamiento.

Las distintas porciones (aérea o radicular) de las plantas de un mismo tratamiento, fueron congeladas con nitrógeno líquido, homogeneizadas por maceración y conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos macerados fueron utilizados para la determinación de pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos en la porción aérea (Dere y col., 1998). También se los utilizó para la determinación de los niveles de As en el tejido vegetal de plantas no-inoculadas e inoculadas, mediante espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, tal como se detalla a continuación.

### **3.3.3 Determinación de As total en tejido: Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (EAA)**

Las muestras de raíz y porción aérea de las plantas de soja no-inoculadas e inoculadas, desarrolladas durante 30 días en macetas suplementadas con soluciones  $25\text{ }\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito, fueron secadas en estufa a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. La concentración de As en estas muestras se determinó mediante espectrometría de absorción atómica, previa extracción del metaloide por digestión con ácido nítrico. Dicho servicio fue prestado por Laboratorios Fares Taie (Mar del Plata).

Se optó por analizar a aquellas plantas que se desarrollaron en medio suplementado con soluciones  $25\text{ }\mu\text{M}$  (equivalente a  $1,87\text{ mg l}^{-1}$ ), ya que frente a este tratamiento se observaron los mayores cambios en las variables analizadas (desarrollo de las plantas, nodulación, niveles de pigmentos). Además, esta condición sería representativa de suelos regados con aguas contaminadas de nuestra región, donde las concentraciones varían entre  $0,001$  a  $5,3\text{ mg l}^{-1}$  (Smedley y Kinniburgh, 2002; Farías y col., 2003; González y col., 2003; Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli 2004; 2005).

Dado que los resultados obtenidos por esta técnica se expresan en  $\text{mg kg}^{-1}$  en base al peso seco y que las legislaciones, incluyendo el CAA, establecen los límites permitidos para alimentos sólidos en  $\text{mg kg}^{-1}$  de peso fresco; se determinó el FT As de las muestras

analizadas como una forma más aproximada de inferir si el metaloide sería acumulado y traslocado a niveles peligrosos por las plantas de soja. El FT As se calculó mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{FT As} = \text{mg As planta} / \text{mg As maceta}$$

$$\text{FT As} = (\text{PS (g)} \cdot \text{C As (ppm)} / 1000) / 0,11 \text{ l} \cdot 1,87 \text{ ppm}$$

Donde:

PS (g)= Peso seco promedio por planta para un tratamiento dado

C As (ppm)= Concentración de As en el tejido (raíz o porción aérea)

0,11 l= volumen de solución 25  $\mu\text{M}$  de As añadida a cada maceta

1,87 ppm= equivalencia en ppm de una solución 25  $\mu\text{M}$  de As

### **3.4 PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2007 para calcular promedios, valores de error estándar así como para la construcción de tablas y gráficos.

Se empleó el programa estadístico STATISTICA versión 6.0. Para determinar diferencia estadística entre las medias de los distintos parámetros evaluados, se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y para determinar cuáles de ellas presentaron diferencias significativas respecto al control se aplicó el test de Duncan, cuyo nivel de significancia para ambos casos fue de 0,05. También fueron calculados las medias y desvíos estándar con dicho software.

### **3.5 REGISTRO DE IMÁGENES**

Se empleó una cámara Kodak modelo K Z712 IS ZOOM DIGITAL CAMERA para fotografiar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

# *Resultados y discusión*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ESTUDIO DEL SISTEMA VEGETAL

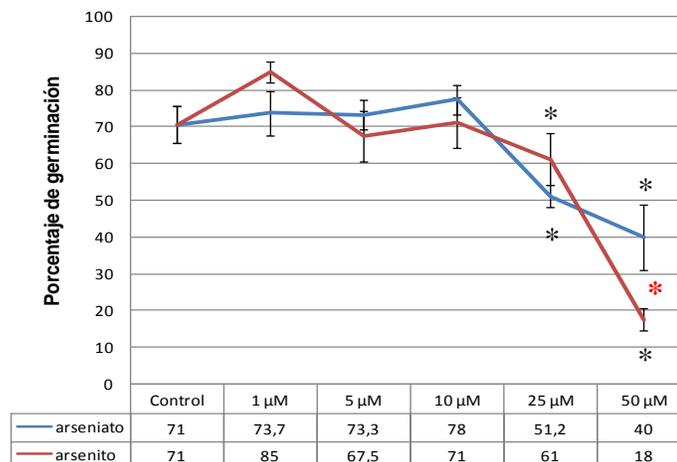
#### 4.1.1 EFECTOS DEL ARSENIATO Y ARSENITO SOBRE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE SOJA

##### 4.1.1 a) Germinación y tolerancia de plántulas de soja frente a diferentes concentraciones de As en estadios tempranos de desarrollo

Se evaluó la tolerancia de soja frente a As a través de la determinación del porcentaje de germinación como así también mediante la longitud de hipocótilo y radícula de las plántulas al cabo de 8 días.

Como se observa en la *Fig. 3*, concentraciones de arseniato y arsenito de hasta 10  $\mu\text{M}$  no afectaron significativamente el porcentaje de germinación mientras que a partir de 25  $\mu\text{M}$  inclusive, las sales de este metaloide resultaron tóxicas, efecto que se vio acentuado con el incremento de la concentración de las mismas.

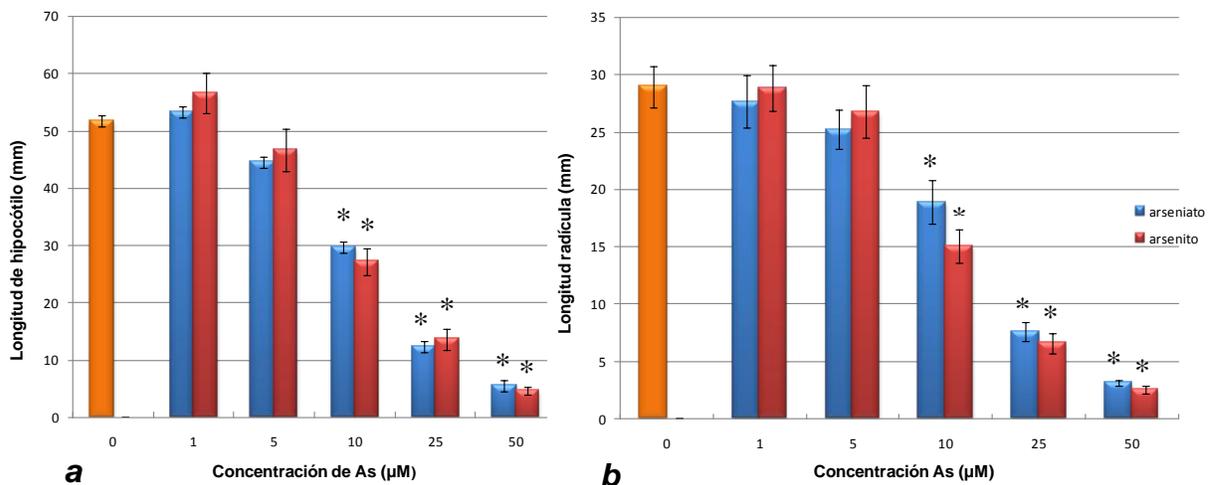
La germinación solo mostró diferencias significativas entre tratamientos de arseniato y arsenito para concentraciones 50  $\mu\text{M}$  donde ésta se vio inhibida alrededor de un 46% y 76%, respectivamente, lo que muestra la mayor toxicidad del arsenito.



**Figura 3)** Porcentaje de germinación de semillas de soja al cabo de 8 días de exposición a distintas concentraciones de arseniato y arsenito. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos de arseniato y arsenito.

En cuanto al desarrollo del hipocótilo al cabo de 8 días de tratamiento (Fig. 4a, Fig. 5), no se observaron diferencias significativas en la longitud respecto al control para concentraciones 1 y 5  $\mu\text{M}$  de las sales de As. Cuando las concentraciones fueron iguales o mayores a 10  $\mu\text{M}$  (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ), se observó una importante inhibición en la elongación del mismo, con diferencias significativas respecto al control, efecto que se vio aumentado con el incremento en la concentración tanto para arseniato como para arsenito. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos de arseniato y arsenito para ninguna de las concentraciones ensayadas.

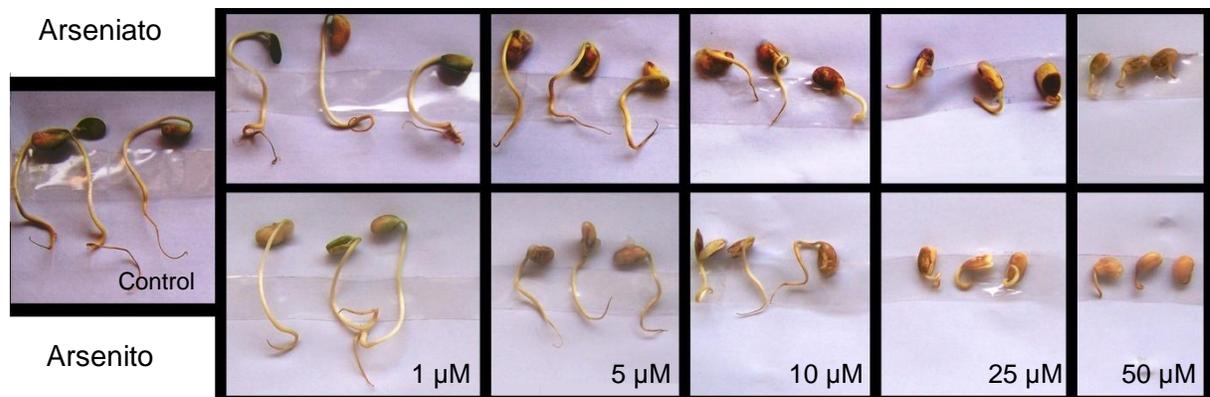
Al igual que para el desarrollo del hipocótilo, los tratamientos con 1 y 5  $\mu\text{M}$ , tanto de arseniato como de arsenito, no provocaron efectos significativos sobre la longitud de radícula respecto al control (Fig. 4b, Fig. 5). Concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  afectaron negativamente el largo de radícula comparando con los controles. Una vez más, no se observaron diferencias entre los tratamientos de arseniato y arsenito.



**Figura 4) a.** Longitud de hipocótilo de plántulas de soja frente a tratamientos con diferentes concentraciones de arseniato y arsenito. **b.** Longitud de radícula de plántulas de soja frente a tratamientos con diferentes concentraciones de arseniato y arsenito, luego de 8 días de germinación. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

Como pudo observarse, tanto para tratamientos con arseniato como con arsenito de sodio, el desarrollo radicular y de la porción aérea de las plántulas no se vieron afectados por concentraciones 1 y 5  $\mu\text{M}$ , mientras que concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$  tuvieron un impacto negativo, efecto que se acentuó a medida que aumentó la concentración, hasta prácticamente inhibir el desarrollo de las plántulas en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de las sales de As.

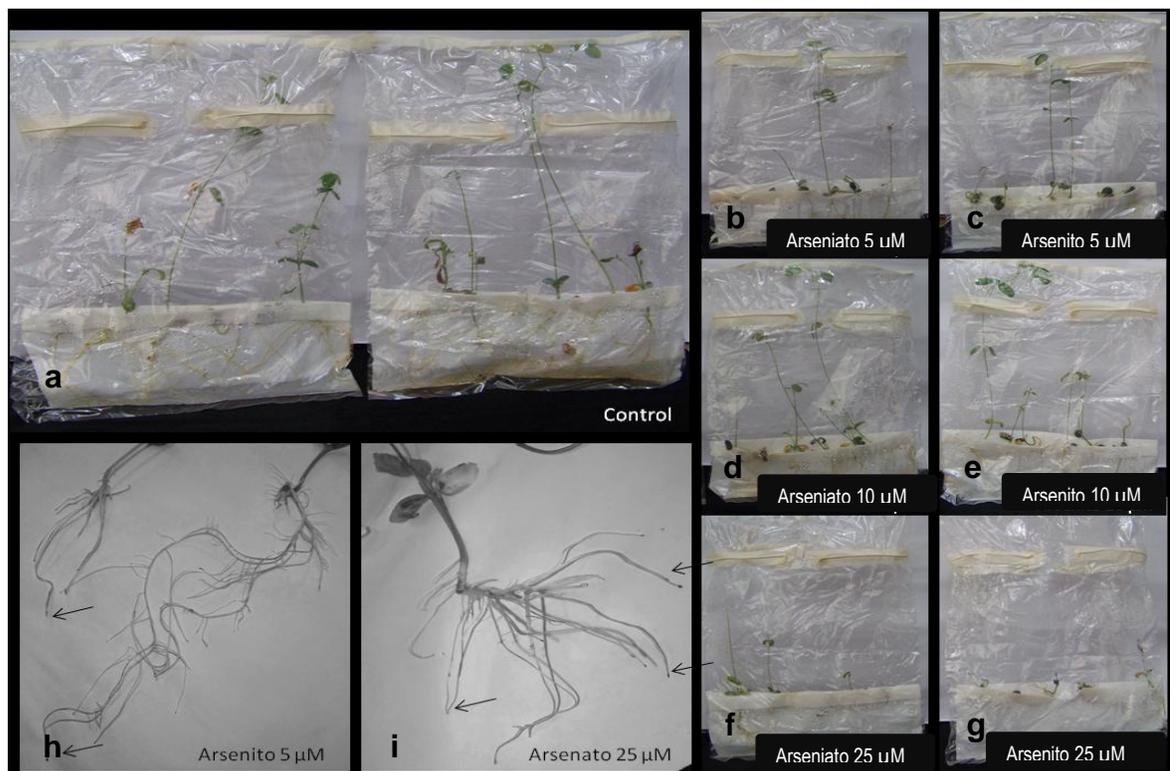
Las plántulas de soja respondieron de igual manera independientemente del estado iónico del metaloide en los primeros estadios del desarrollo, salvo en el caso de tratamientos de arsenito de sodio 50  $\mu\text{M}$  donde se observó mayor toxicidad por una disminución marcada sobre el porcentaje de germinación de las semillas. En especies vegetales comestibles como lo son *Lactuca sativa* (lechuga), *Sichorium endivia* (escarola) y *Sichorium intybus* (achicoria), el porcentaje de germinación no se vió afectado frente a concentraciones de 1000  $\mu\text{M}$  de As, e incluso mayores (Navarro y col., 2006). En relación con estas especies vegetales, resultó mayor la toxicidad del As sobre semillas de soja donde el porcentaje de germinación se vio inhibido alrededor de un 46% y 76% frente a concentraciones 50  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito, respectivamente.



**Figura 5)** Aspecto de semillas de soja germinadas en placa al cabo de 8 días, en condiciones control y expuestas a tratamientos con 1, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio.

#### 4.1.1 b) Tolerancia de plántulas de soja frente a diferentes concentraciones de As en ensayos hidropónicos

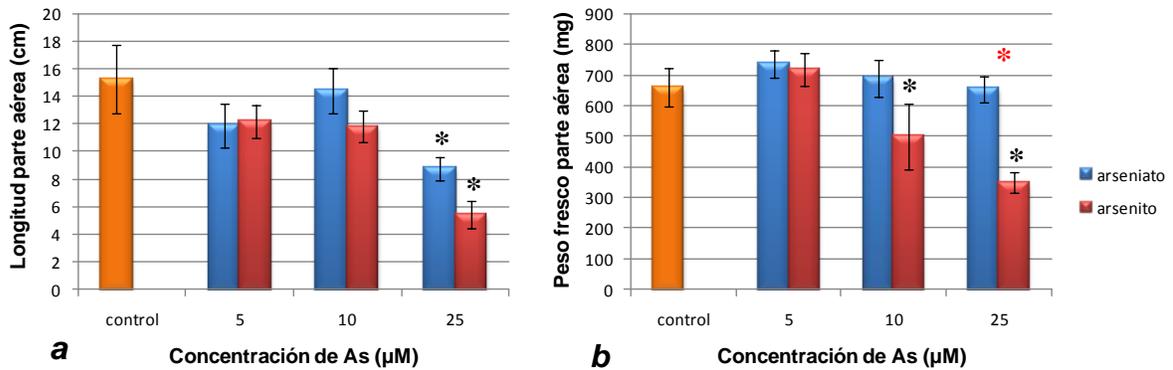
Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de As sobre el desarrollo de plántulas crecidas en hidroponia (sistema de bolsas estériles, *Fig. 6*) y se determinó el nivel del metaloide remanente en las soluciones hidropónicas, resultados que se muestran en el inciso 4.1.2b.



**Figura 6) a-g.** Aspecto de plántulas de soja crecidas en hidroponia durante 25 días bajo condiciones control y tratamientos con distintas concentraciones de arseniato o arsenito. **h, i.** Aspecto de raíces de plántulas tratadas con arsenito de sodio 5  $\mu$ M y arseniato de sodio 25  $\mu$ M, respectivamente. Las flechas muestran ápices amarronados, característicos de necrosis.

Como puede observarse en la *Fig. 7a*, tratamientos con 5 y 10  $\mu$ M de arseniato o arsenito, no provocaron efectos significativos sobre la longitud de la porción aérea, mientras que la misma se vio significativamente reducida con concentraciones 25  $\mu$ M respecto de plántulas control.

La biomasa (*Fig. 7b*) no presentó diferencias para tratamientos con 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y 5  $\mu\text{M}$  de arsenito, pero sí se vio disminuida significativamente con arsenito desde 10  $\mu\text{M}$ , respecto al control. Para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de las sales de As la disminución en el peso fresco de la porción aérea mostró diferencias entre los efectos del arseniato y arsenito.

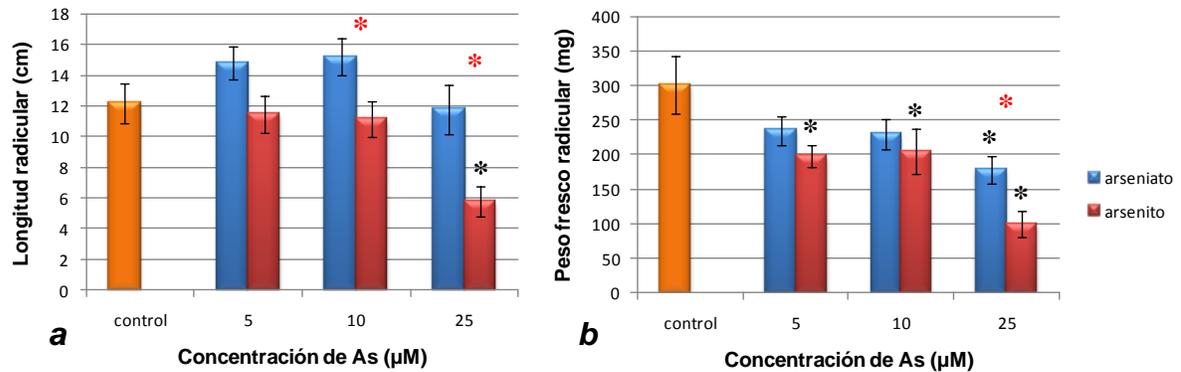


**Figura 7) a.** Longitud (cm) y **b.** peso fresco (mg) de la porción aérea de plántulas de soja crecidas en medio hidropónico durante 25 días (control) y suplementados con concentraciones 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos de arseniato y arsenito.

En cuanto a la longitud del sistema radical no se encontraron diferencias respecto al control en los tratamientos de arseniato, mientras que la longitud disminuyó significativamente con arsenito 25  $\mu\text{M}$  (*Fig. 8a*). Las diferencias en la longitud de raíz entre arseniato y arsenito fueron significativas para concentraciones 10 y 25  $\mu\text{M}$ .

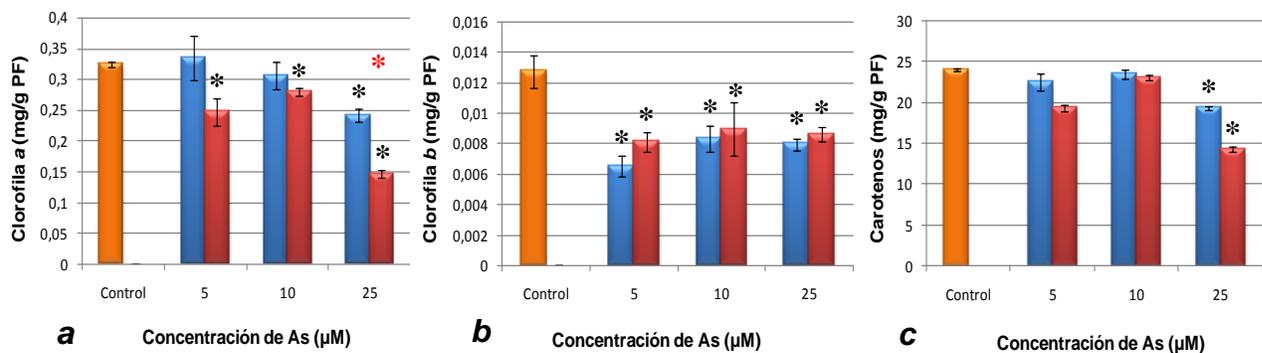
En la *Fig. 8b* se observa que el peso fresco de las raíces disminuyó de forma significativa frente a arseniato 25  $\mu\text{M}$  y para todas las concentraciones de arsenito ensayadas, efecto deletéreo sobre éste órgano que se refuerza con la observación de un gran número de ápices de raíces que mostraron necrosis o senescencia con la presencia de As en la solución de crecimiento (*Fig. 6h, i*).

Por lo tanto, en términos generales y en base a los parámetros de desarrollo analizados, el tratamiento con arsenito 25  $\mu\text{M}$  resultó de mayor toxicidad en comparación con arseniato en igual concentración.



**Figura 8) a.** Longitud (cm) y **b.** peso fresco (mg) de la porción radicular de plántulas de soja crecidas en medio hidropónico durante 25 días (control) y suplementados con concentraciones 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos de arseniato y arsenito.

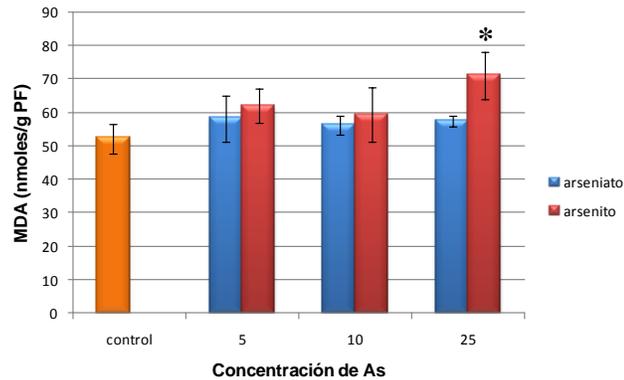
En relación a la determinación de clorofila de la porción aérea, se observaron niveles significativamente menores de clorofila a bajo tratamientos con arseniato 25 µM y para todas las concentraciones ensayadas de arsenito (5, 10 y 25 µM); siendo el mayor efecto para tratamientos con arsenito 25 µM, y con diferencias significativas respecto a arseniato a igual concentración (Fig. 9a). El contenido de clorofila b disminuyó significativamente para todos los tratamientos respecto al control, sin mostrar diferencias entre los tratamientos de arseniato y arsenito.



**Figura 9) a.** Contenido de clorofila a (mg de pigmento/ g de peso fresco de tejido), **b.** clorofila b y **c.** carotenos de la porción aérea de plántulas de soja crecidas en medio hidropónico durante 25 días (control) y suplementados con concentraciones 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos de arseniato y arsenito. ■ Arseniato ■ Arsenito.

Los resultados de carotenos totales (*Fig. 9c*) mostraron una disminución significativa para los tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito.

Cuando se analizó el contenido de MDA, éste mostró un aumento significativo respecto al control para tratamientos con arsenito 25  $\mu\text{M}$  (*Fig. 10*).



**Figura 10)** Contenido de MDA total (nmol/g de peso fresco de tejido) de plántulas de soja crecidas en medio hidropónico durante 25 días (control) y suplementados con concentraciones 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

Teniendo en cuenta el estado de las plántulas crecidas bajo condiciones hidropónicas, en base a los parámetros fisiológicos analizados, podemos decir que la porción aérea se vio menos afectada que la raíz. Tratamientos con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de arseniato y/o arsenito no provocaron efectos significativos sobre la longitud de la porción aérea, y la biomasa no presentó cambios para ninguna de las concentraciones ensayadas de arseniato ni para 5  $\mu\text{M}$  de arsenito. Sin embargo, al analizar parámetros bioquímicos se observó que, en general, los niveles de clorofila disminuyeron. En el caso de clorofila *a*, el contenido de este pigmento disminuyó bajo tratamientos con arseniato 25  $\mu\text{M}$  y para todas las concentraciones ensayadas de arsenito, mientras que la clorofila *b* lo hizo para todos los tratamientos. Podríamos destacar, que éste parámetro es particularmente sensible en cuanto a la detección del estrés en la porción aérea de las plántulas, incluso se lo considera (junto con la peroxidación lipídica) uno de los principales biomarcadores utilizados en plantas, para la evaluación de la respuesta frente a metales pesados (De la Rosa y col., 2005; Mendoza y Moreno, 2006). La cuantificación de clorofila y MDA tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos del daño causado, y por lo tanto, pueden ser utilizados como evidencia de la presencia de contaminantes químicos (Pernía y col., 2008).

En cuanto al sistema radicular, el mismo se vio mayormente afectado por la presencia de As, lo cual se puso de manifiesto tanto por las lesiones necróticas encontradas en ápices, como por la marcada disminución en los valores de biomasa, en comparación con la parte aérea para un tratamiento dado, ya que el peso fresco de las raíces disminuyó de forma significativa frente a arseniato 25  $\mu\text{M}$  y para todas las concentraciones de arsenito ensayadas.

El mayor efecto deletéreo del As sobre la raíz en comparación con la porción aérea no resulta sorprendente, ya que es el órgano vegetal que toma contacto directo con la solución contaminada. Esta respuesta presentada por las plantas también se observa para otros metales, tal es el caso de *Brassica oleracea* expuesta a una solución nutritiva conteniendo  $\text{Al}^{+3}$ . Esta planta no mostró una sintomatología clara en las hojas como consecuencia de la toxicidad por  $\text{Al}^{+3}$ , sin embargo, en las raíces, los síntomas negativos fueron evidentes (Cassiera-Posada y Aguilar-Avenidaño, 2007).

Si bien la longitud de la raíz no difirió para los tratamientos con arseniato, y sólo arsenito 25  $\mu\text{M}$  lo hizo respecto al control, la disminución de la biomasa indica un cambio en la arquitectura radical lo cual podría atribuirse a una disminución en el desarrollo de raíces laterales. Tal como se mencionó anteriormente, el  $\text{Al}^{+3}$  afectó el desarrollo de las raíces con lo que se reduce la capacidad de las plantas de tomar nutrientes y agua (Cassiera-Posada y Aguilar-Avenidaño, 2007). Entonces, la disminución del volumen radical observado en las plántulas de soja, podría constituir una posible respuesta con el objeto de minimizar la superficie de contacto con la solución conteniendo el metal, tal como ha sido reportado por algunos autores (Ownby y Popham, 1989; Ryan y col., 1992).

En cuanto al efecto de las distintas concentraciones y formas de As, es clara la toxicidad del tratamiento con arsenito 25  $\mu\text{M}$ . Con esta concentración, se encontró reducción significativa de todos los parámetros analizados (longitud, biomasa y pigmentos) comparados con el control, y un aumento en los niveles de MDA total, indicando peroxidación lipídica de las plántulas de soja. Esto último implica la formación y propagación de radicales lipídicos, pérdida de  $\text{O}_2$  y la eventual destrucción de las membranas, generando una variedad de productos, entre ellos MDA, utilizado para determinar el grado de peroxidación. Este es un parámetro comúnmente utilizado para inferir estrés oxidativo por metales; tal es el caso de plantas de *Bacopa monnieri* las cuales presentaron un aumento en los niveles de MDA, tanto en raíces como en hojas, frente a tratamientos con Cd (Pernía y col., 2008).

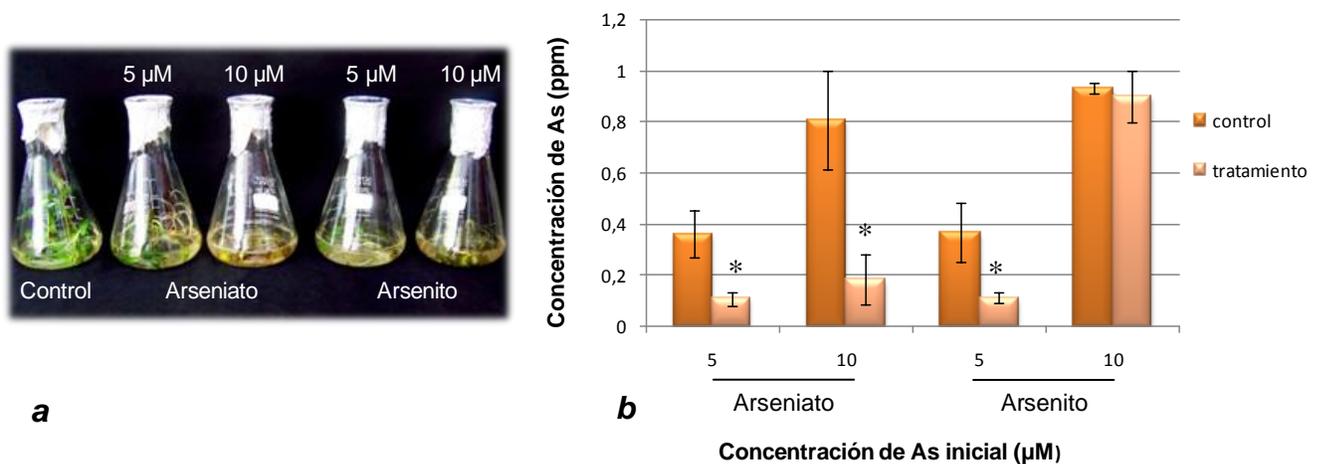
El arsenito resultó de mayor toxicidad que el arseniato. La biomasa de la porción aérea no se vio afectada por arseniato pero sí por arsenito 10 y 25  $\mu\text{M}$ , siendo mayor el impacto deletéreo de ésta última concentración, como ya se discutió anteriormente. Para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato también se observó una disminución en el peso fresco radicular, presentándose diferencias significativas entre la reducción provocada por arsenito respecto de arseniato a igual concentración. Ocurrió un comportamiento similar ante la respuesta a As cuando se analizaron los niveles de clorofila a y biomasa radicular, donde para ambos parámetros se observaron valores significativamente menores bajo tratamientos con arseniato 25  $\mu\text{M}$  y para todas las concentraciones ensayadas de arsenito (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ); siendo el mayor efecto para esta última concentración, y con diferencias significativas respecto a arseniato para la misma concentración.

Por lo tanto, existió una respuesta dependiente de la concentración y de las formas iónicas del metaloide, resultando mayor la tolerancia de las plántulas al arseniato. Dicho comportamiento era de esperarse, ya que se conoce que el estado redox determina la toxicidad del As, además de la biodisponibilidad y movilidad del metaloide, siendo en términos generales, el arsenito 25-60 veces más tóxico que el arseniato (Kim y Davis, 2003; Miretzky y Cirreli, 2010). Como el arseniato ingresa a través de los canales de fosfatos (Bucher, 2007; Zhao y col., 2009; 2010), los resultados sugieren que, los fosfatos que componen el medio nutritivo en que se hizo crecer a las plantas, compiten con el arseniato por su entrada a las células radicales, resultando menor la cantidad de metaloide que ingresa en comparación con el arsenito cuya vía de incorporación es a través de los canales de acuaporinas (Tripathi, 2007; Bhattacharjee y col., 2008). Esto a su vez podría explicar entre otras causas, el hecho de que no se encontraron diferencias en el efecto de las formas de As en los estadios tempranos del desarrollo (inciso 4.1.1a), donde el medio no se encontraba suplementado con fosfato. Inclusive, éste conocimiento es utilizado como una estrategia de fitorremediación, de forma de generar plantas transgénicas con modificaciones en genes claves que permitan integrar múltiples vías de incorporación y metabolismo de As (Zhu y Rosen, 2009), o bien limitar la incorporación del metaloide de ciertas especies vegetales por variaciones en los niveles de fosfatos en el medio (Wang y Duan, 2008). Estas investigaciones están basadas en el uso de micorrizas como PGPRs (Dong y col., 2008) ya que las mismas son capaces de solubilizar fosfatos e inmovilizar metales en raíz, entre otras propiedades (Navarro Aviñó y col., 2007).

#### 4.1.2 NIVELES DE As REMANENTE EN SOLUCIONES DE SISTEMAS HIDROPÓNICOS

##### 4.1.2 a) Determinación de los niveles de As remanente: sistema hidropónico en erlenmeyers

Se cuantificó el As elemental residual del medio de cultivo donde se desarrollaron plántulas de soja durante 25 días y de sus controles, con el objetivo de evaluar indirectamente la adsorción/incorporación del metaloide a los tejidos (*Fig. 11a*).



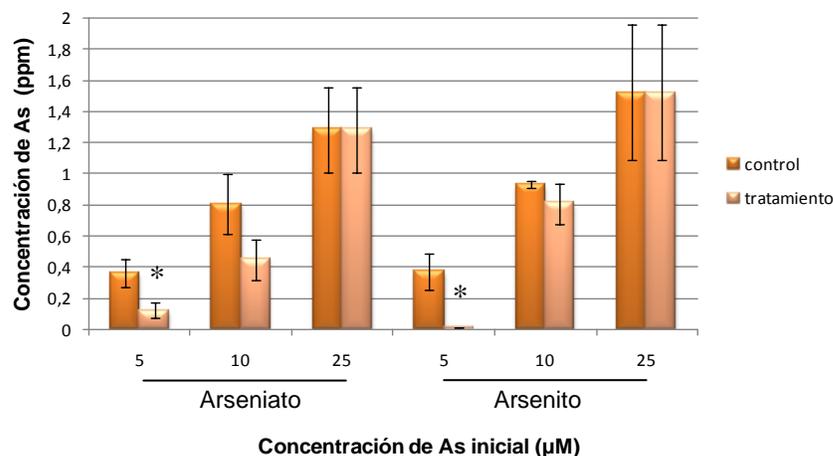
**Figura 11) a.** Aspecto de las plántulas de soja desarrolladas durante 25 días en medio hidropónico suplementado con concentraciones 5 y 10  $\mu$ M de arseniato y arsenito. **b.** Concentraciones de As (ppm) de las soluciones control (sin planta) y de las resultantes de remanentes hidropónicos suplementados inicialmente con concentraciones 5 y 10  $\mu$ M de arseniato y arsenito donde se desarrollaron plántulas de soja durante 25 días (tratamiento). (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

Como se observa en la *Fig. 11b*, las soluciones con arseniato 5 y 10  $\mu$ M así como con arsenito 5  $\mu$ M donde se desarrollaron las plantas, presentaron una reducción significativa (de aproximadamente un 70%) en los niveles de As respecto de sus correspondientes controles. En soluciones que inicialmente contenían arsenito 10  $\mu$ M la presencia de las plantas de soja no produjo diferencias en el contenido de As respecto de la solución control correspondiente.

#### 4.1.2 b) Determinación de los niveles de As remanente: sistema hidropónico en bolsas estériles

A fin de evaluar la incorporación cuando sólo las raíces de las plantas están en contacto con las soluciones de As, lo que se acercaría más a una situación real, se cuantificó el As elemental residual del medio líquido del sistema de bolsas estériles (*Fig. 6*) donde se hicieron crecer plántulas de soja durante 25 días, así como de sus respectivos controles.

Puede observarse en la *Fig. 12*, que las soluciones inicialmente conteniendo arseniato y arsenito 5  $\mu\text{M}$  y en las cuales se desarrollaron las plántulas de soja, presentaron una reducción significativa en el contenido de As respecto de su correspondiente control. En cambio los tratamientos con 10 y 25  $\mu\text{M}$ , tanto de arseniato como de arsenito, no presentaron diferencias significativas respecto de la solución control correspondiente.



**Figura 12)** Concentraciones de As obtenidas experimentalmente (ppm) de las soluciones control (sin planta) y de las resultantes de remanentes hidropónicos suplementados inicialmente con concentraciones 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito donde se desarrollaron plántulas de soja durante 25 días (tratamiento). (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

En términos generales y para ambos sistemas de desarrollo de las plantas, los niveles de As residual encontrados en las soluciones tratadas, fueron menores para concentraciones bajas del metal. Esto también está correlacionado con el estado fisiológico de las plantas. Como se discutió anteriormente en el punto 4.1.1b el daño es mayor cuando la concentración de As aumenta, siendo también dependiente del estado iónico del metaloide. En la *Fig. 11a* pueden observarse a simple vista, la menor biomasa y los síntomas de

clorosis de las plántulas crecidas en soluciones con 10  $\mu\text{M}$  de las sales de As. Por lo tanto, a menores concentraciones, las plantas se vieron menos afectadas por lo que se encontraron menores valores de As residual. Esto puede explicarse por el hecho de que con el incremento en la concentración de As en los tratamientos, disminuye la cantidad de tejido viable con capacidad de incorporar metaloide. Por estos motivos podríamos inferir, dado que los niveles de As en las soluciones acuosas disminuyeron en presencia de las plántulas de soja, que parte de éste podría ser bioadsorbido y/o incorporado al tejido vegetal a través de los canales de transporte de fosfatos y acuaporinas (Zhao y col., 2009; Zhao y col., 2010).

Por lo tanto, considerando que la diferencia en los valores de As residual entre las soluciones controles y tratadas corresponderían al incorporado por las plantas, y que los mismos presentaron diferencias significativas ante tratamientos 5  $\mu\text{M}$  en ambos sistemas, puede calcularse un valor de coeficiente de transferencia aproximado que en este caso correspondería a un valor cercano a 0,7.

El coeficiente de transferencia planta-suelo para As (FT As) típico va de 0,01 a 0,1 (Kloke y col., 1984; Warren y col., 2003); las plantas exclusoras presentan FTs < 0,01 mientras que en las hiperacumuladoras los FTs exceden a 1 (Ma y col., 2001; Zhao y col., 2009). En base a que el FT fue aproximadamente 0,7, *Glycine max* se encontraría dentro de las especies de plantas con capacidades intermedias de acumular As, en el caso en que se desarrolle en medio hidropónico. Algunos ejemplos de plantas con FT As intermedios son la pinácea *Pseudotsuga menziesie* (Haug y col., 2004), diferentes especies de equisetos (Meharg, 2003) e *Isatis capadocica* (Karimi y col., 2009). Inclusive, existen evidencias de que plantas de soja crecidas en medio hidropónico acumulan arseniato (Reichman, 2007).

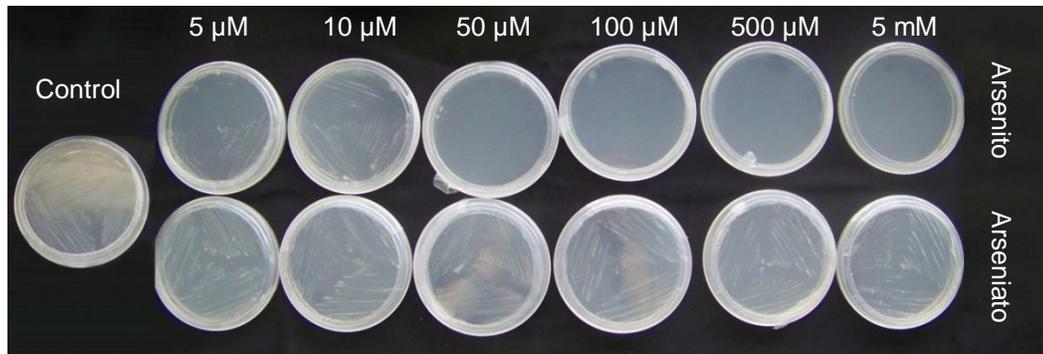
Dado estas evidencias de remoción de As de soluciones 5  $\mu\text{M}$ , y siendo que se han reportado valores por encima de 2,3  $\mu\text{M}$  de As en soluciones de suelos altamente contaminados (Wenzel y col., 2002), se planteó la posibilidad de que el metaloide podría ser bioacumulado a niveles peligrosos para el consumo animal y humano, constituyendo una posible vía de entrada del mismo a la cadena alimenticia.

## 4.2 ESTUDIO DEL MICROORGANISMO SIMBIONTE

### 4.2.1 EFECTOS DEL As SOBRE EL DESARROLLO DE *B. japonicum* E109

#### 4.2.1 a) Desarrollo en placa de *B. japonicum* E109 y tolerancia del microorganismo frente a diferentes concentraciones de As

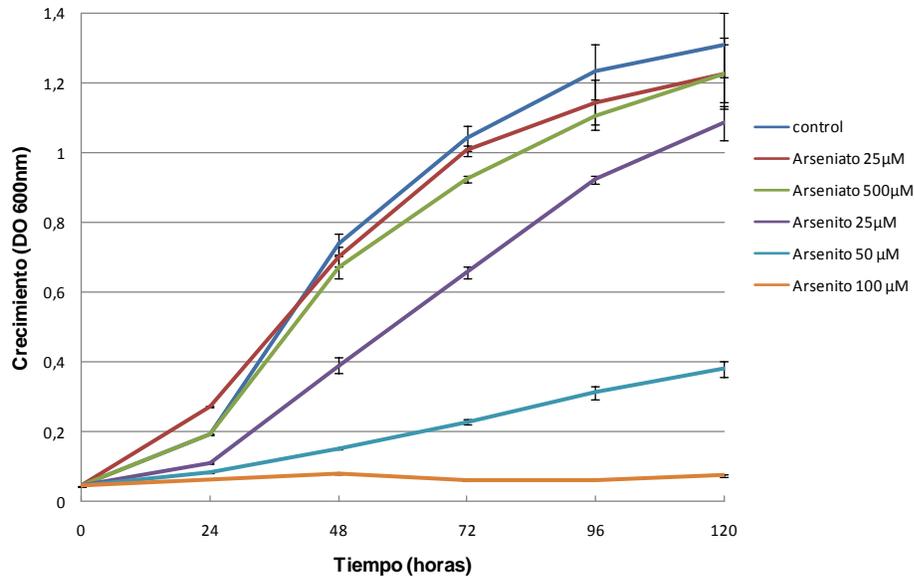
Como puede observarse en la *Fig. 13*, el microorganismo fue capaz de crecer en placas para todas las concentraciones de arseniato ensayadas mientras que para arsenito sólo logró hacerlo en aquellas que contenían concentraciones hasta 10  $\mu\text{M}$  inclusive.



**Figura 13)** Evaluación de la tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a concentraciones crecientes de arseniato y arsenito, por ensayo en placa con medio YEMA.

#### 4.2.1 b) Tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a diferentes concentraciones de As en medio líquido

El crecimiento de *B. japonicum* E109 en medio líquido no mostró cambios significativos respecto a la curva control (sin As), en presencia de 25 y 500  $\mu\text{M}$  de arseniato, mientras que se observó inhibición en el desarrollo del microorganismo cuando creció en presencia de arsenito (*Fig. 14*). En este último caso *B. japonicum* E109 mostró menor crecimiento respecto del control en presencia de 25 y 50  $\mu\text{M}$  de arsenito, alcanzando una menor DO a las 120 hs ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$  1,087 para 25  $\mu\text{M}$  y 0,380 para 50  $\mu\text{M}$ ), efecto que aumentó con el incremento en la concentración a tal punto de que el desarrollo del microorganismo se vio completamente inhibido para tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de arsenito.



**Figura 14)** Crecimiento de *B. japonicum* E109 en medio YEM suplementado con concentraciones crecientes de arseniato y arsenito.

Tal como se mostró anteriormente, *B. japonicum* E109 fue capaz de tolerar la más alta concentración de arseniato ensayada (5 mM) (Fig. 13). Siendo que el desarrollo en placa a concentraciones 5 mM no presentó diferencias apreciables con el control y que la curva de crecimiento en medio líquido (Fig. 14) no se vio afectada con concentraciones 500 μM de arseniato, se especula que el microorganismo sería capaz de tolerar aún mayores concentraciones de arseniato.

En el caso de arsenito, el microorganismo logró crecer en presencia de 25 μM de esta sal en medio líquido, aunque con menor velocidad de crecimiento en comparación con el control y con respecto a 25 y 500 μM de arseniato. A concentraciones 50 μM de arsenito el crecimiento disminuyó de forma significativa en medio líquido, y no se apreció desarrollo en placas transcurridos 7 días (Fig. 13).

Por lo tanto, la tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a arseniato resulta mucho mayor que a arsenito. Esta observación ha sido reportada también para otras bacterias. Chopra y col. (2007) mostraron que todas las cepas tolerantes a As aisladas y estudiadas, presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) a arsenito de 5 mM, mientras que las CMI para arseniato mostraron valores mucho más altos (mayores a 75 mM). Por su parte, Cavalca y col. (2010) han reportado que la mayoría de las cepas de una comunidad bacteriana aislada de suelos con As crecieron en presencia de 100 mM de arseniato y hasta sólo 10 mM de arsenito.

La tolerancia a arseniato hallada para *B. japonicum* E109 puede considerarse relativamente alta por encontrarse en el orden de concentraciones mM, pero para definir la CMI deberían ensayarse concentraciones mayores, teniendo en cuenta que cepas asociadas a la rizósfera de plantas en suelos contaminados fueron capaces de crecer en agar suplementado con concentraciones 100 y 200 mM de arseniato e incluso mayores (Chopra y col., 2007; Cavalca y col., 2010).

La tolerancia de *B. japonicum* E109 frente a arsenito fue relativamente baja (CIM 25  $\mu$ M). Rizobios altamente tolerantes a As fueron capaces de crecer en placas conteniendo arsenito de sodio 10 mM (*Sinorhizobium* sp.), 0,8 y 1 mM (cepas de *S. meliloti*) (Pajuelo y col., 2008) mientras que se ha reportado tolerancia a concentraciones de hasta 50 mM en comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de plantas en suelos contaminados (Cavalca y col., 2010).

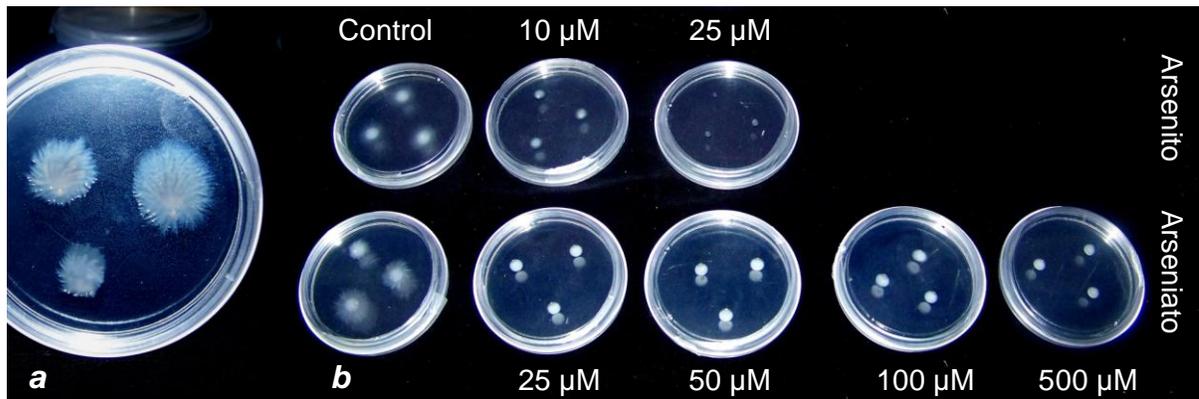
Si bien *B. japonicum* E109 fue capaz de tolerar altas concentraciones de arseniato, y se especula que podría tolerar aún mayores, lo que se pretende estudiar es la asociación de éste microorganismo con soja. Considerando que las plántulas mostraron alta susceptibilidad al metaloide y que en la región en que se desarrolla el cultivo (llanura Chaco-Pampeana), los niveles de As en aguas varían entre 0,001 a 5,3 mg l<sup>-1</sup> (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli 2004; 2005), realizar ensayos con concentraciones mayores se aleja de los fines del presente trabajo, e incluso de situaciones reales o medioambientalmente naturales.

#### **4.2.2 EFECTOS DEL As SOBRE LA MOVILIDAD DE *B. japonicum* E109: comportamientos de *swarming* y *swimming***

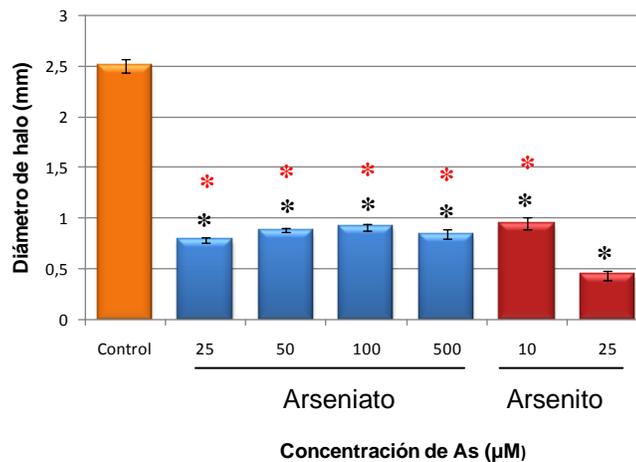
Dado que la movilidad microbiana está involucrada en los procesos de colonización e infección de la rizósfera de las plantas, necesarias para el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, se estudió la movilidad en superficie o *swarming* y en profundidad o *swimming* de *B. japonicum* E109 frente a diferentes concentraciones de arseniato y arsenito de sodio, mediante ensayo en placa en medio YEMA semi-sólido.

Puede observarse claramente en las *Fig. 15* y *16* la disminución del diámetro del halo de *swarming* ante los diferentes tratamientos con As, presentando todos ellos diferencias significativas respecto al control. Para tratamientos de arseniato no se presentó variación del diámetro entre las diferentes concentraciones ensayadas. Este tipo de movilidad se vio principalmente afectada ante tratamientos con arsenito 25  $\mu$ M.

Además de la disminución en el diámetro, se observó una variación en la forma de los halos. Cuando *B. japonicum* E109 creció en presencia de As no se observó el comportamiento de *swarming* característico presente en las placas control (Fig. 15a), sino que las colonias presentaron aspecto circular con bordes definidos, lo que también puede apreciarse en la Fig. 15b.

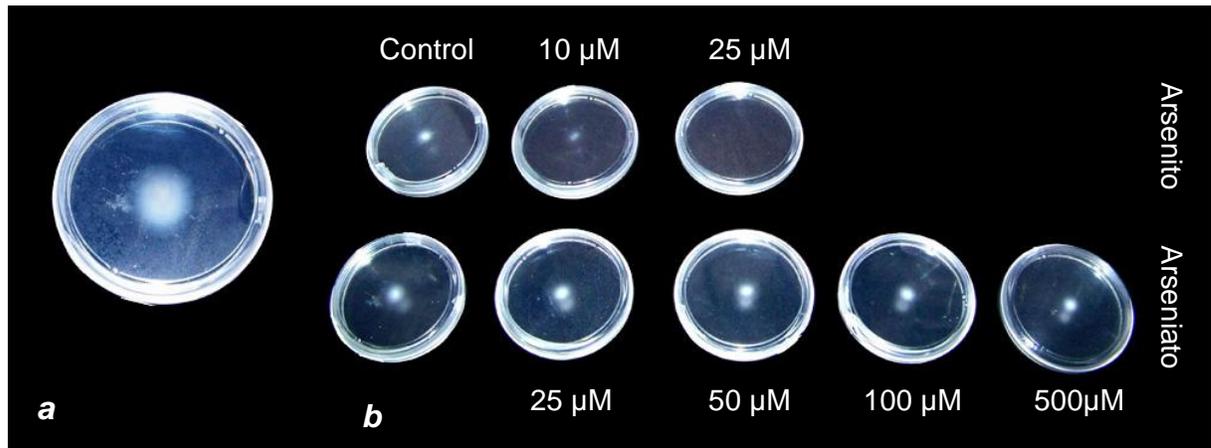


**Figura 15) a.** Comportamiento de *swarming* de *B. japonicum* E109 en medio control. **b.** Comportamiento de *swarming* de *B. japonicum* E109 frente a concentraciones crecientes de arseniato y arsenito en placas con medio YEMA semi-sólido (0,5% agar).

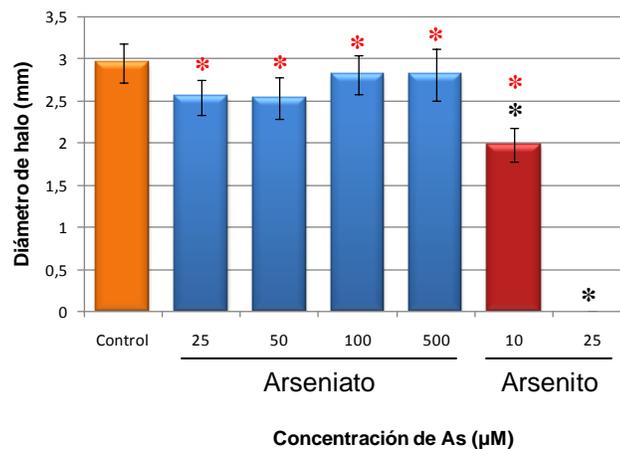


**Figura 16)** Diámetro del halo de *swarming* frente a concentraciones 25, 50, 100 y 500 µM de arseniato y 10 y 25 µM de arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el tratamiento de arsenito 25 µM.

El diámetro del halo de *swimming* no varió con tratamientos de arseniato, mientras que disminuyó significativamente respecto al control para los tratamientos con arsenito (Fig. 17 y 18). Más aún, para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito el comportamiento de *swimming* fue nulo.



**Figura 17) a.** Comportamiento de *swimming* de *B. japonicum* E109 en condiciones control. **b.** Comportamiento de *swimming* de *B. japonicum* E109 frente a concentraciones crecientes de arseniato y arsenito en placas con medio YEMA semi-sólido (0,3% agar).



**Figura 18)** Diámetro del halo de *swimming* frente a concentraciones 25, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$  de arseniato y 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el tratamiento de arsenito 25  $\mu\text{M}$ .

El comportamiento de *swarming* es un tipo de traslación que se considera un comportamiento bacteriano grupal. Los microorganismos secretan *slime* extracelular (una mezcla de carbohidratos, proteínas, péptidos, surfactantes, etc.) en el cual se pueden diseminar como biofilm en la superficie, impulsados por movimientos flagelares (Daniels y col., 2004; Braeken y col., 2007). Esto puede apreciarse claramente en el control, donde se observan los bordes irregulares de las colonias (Fig. 15a). Esta respuesta también se ha reportado en miembros de *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* (Harshey, 1994; Ghelardi y col., 2002), y en el caso de los rizobios, sólo ha sido demostrado en *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* (Braeken y col., 2007) y en *B. japonicum* USDA 3lb110 (Kanbe y col., 2006). Sin embargo, según nuestro conocimiento, no existen aún estudios en relación al efecto del As y otros metales sobre la movilidad en rizobios y por lo tanto, si de esta forma podría verse afectada la interacción rizobio-leguminosa.

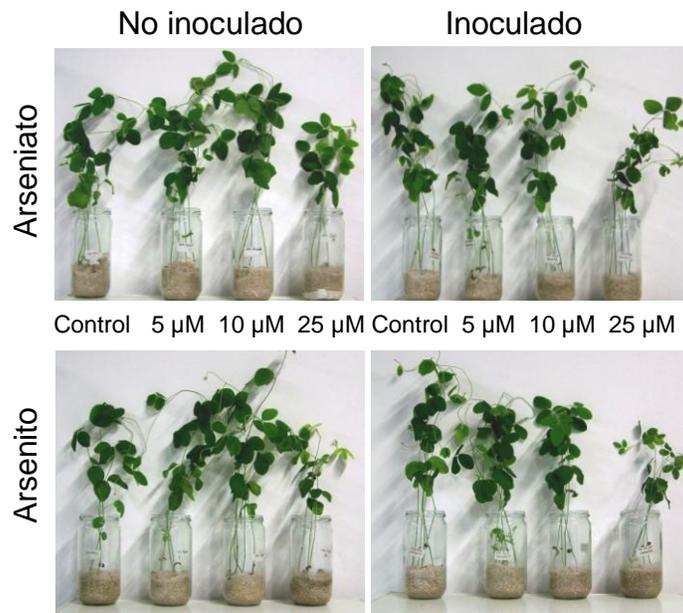
Tanto el comportamiento de *swarming* como el de *swimming* de *B. japonicum* E109 se vieron afectados, en el caso del primero para ambas especies iónicas mientras que el *swimming* se redujo sólo con arsenito. A diferencia del efecto observado para *B. japonicum* E109, se ha reportado inducción de *swimming* frente a As en la bacteria hipertolerante *H. arsenicoxydans* (Muller y col., 2007); mecanismo que se suele asociar con la búsqueda de un nuevo nicho con mejores condiciones para el crecimiento (Deziel y col., 2003).

Se sabe que *B. japonicum* posee 2 conjuntos de flagelos. Uno de ellos puede ser utilizado durante el *swimming* para alcanzar las raíces de la planta, mientras que el otro conjunto puede ser expresado durante el *swarming* formando películas o *biofilms* en la superficie de la raíz, previo a la formación de nódulos (Kanbe y col., 2007). Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el proceso de nodulación podría verse afectado debido al impacto negativo del As sobre la movilidad de *B. japonicum* E 109, impidiendo de alguna forma la colonización y formación de *biofilms* con la consecuente alteración en el proceso de infección, lo que podría llevar a una disminución en el número de nódulos. Sin embargo, el efecto podría variar en presencia de la planta, ya que las leguminosas pueden secretar en sus exudados, sustancias elicitoras que inducen la movilidad bacteriana (Braeken y col., 2007).

### 4.3 ESTUDIO DEL SISTEMA PLANTA-MICROORGANISMO

#### 4.3.1 EFECTOS DEL As SOBRE EL DESARROLLO Y TOLERANCIA DE PLANTAS DE SOJA INOCULADAS CON *B. japonicum* E109

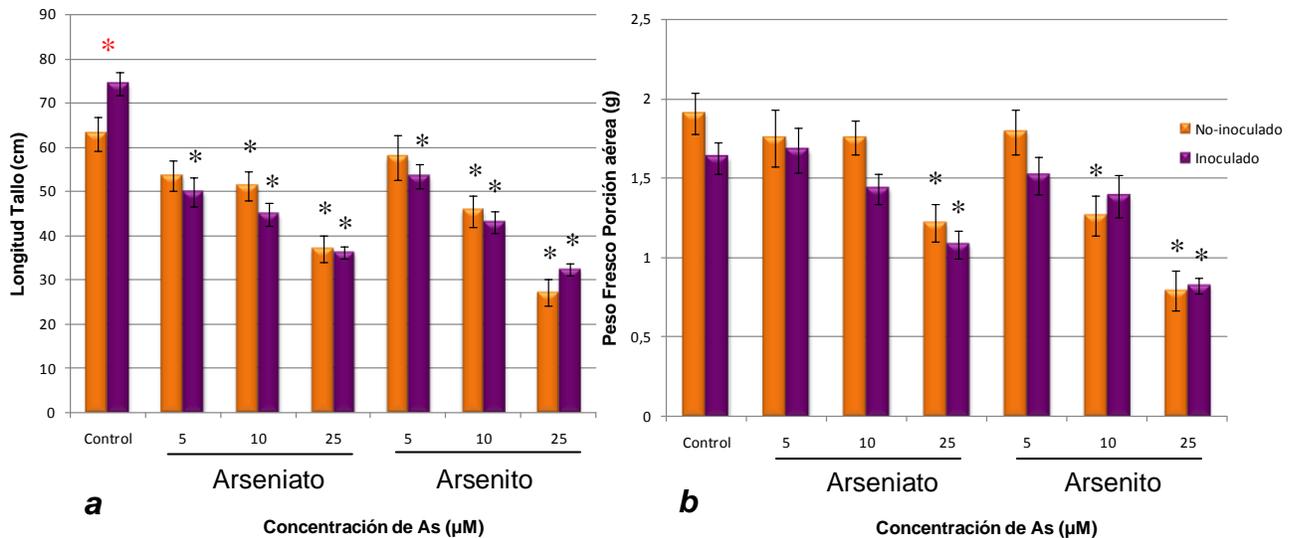
Se evaluó el efecto del arseniato y arsenito (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ) sobre el desarrollo de plantas inoculadas con *B. japonicum* E109, crecidas en sistemas de macetas con arena volcánica durante 30 días (Fig. 19).



**Figura 19)** Aspecto de las plantas de soja no inoculadas e inoculadas con *B. japonicum* E109 bajo tratamientos con 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio luego de 30 días.

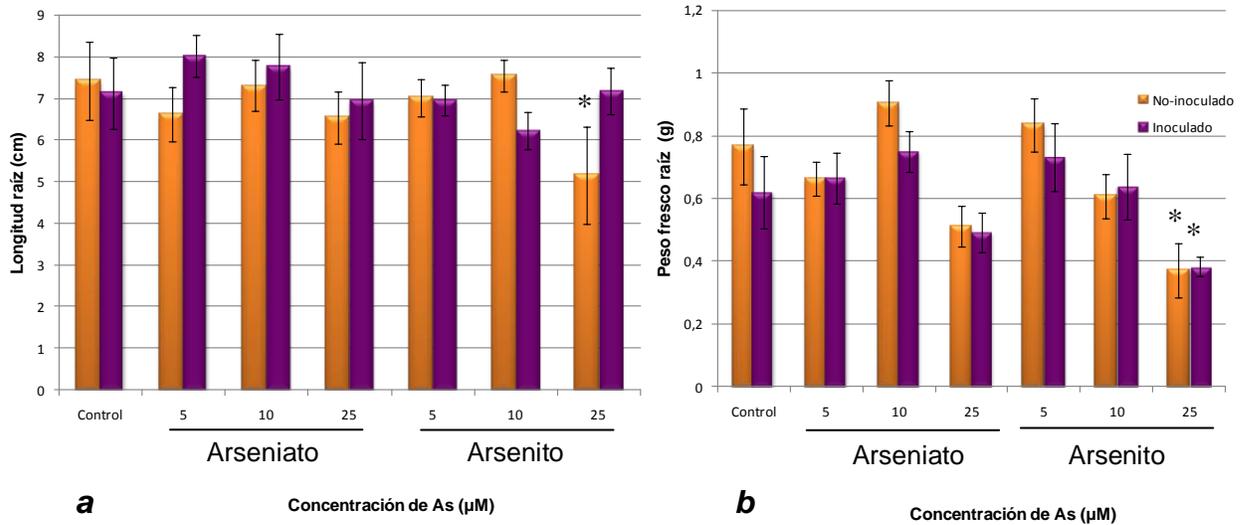
Como se observa en la Fig. 20, tanto la longitud como el peso fresco de la porción aérea de las plantas inoculadas y no inoculadas disminuyeron con el aumento en la concentración de As. Dicho efecto resultó más notable para la longitud del tallo (Fig. 20a) donde las diferencias respecto al control (sin As) fueron significativas a partir de 5  $\mu\text{M}$ , tanto para arseniato como para arsenito, en plantas inoculadas, y a partir de 10  $\mu\text{M}$  en las no inoculadas. En cambio, el peso fresco (Fig. 20b) solo disminuyó significativamente para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato, y para arsenito a partir de 10  $\mu\text{M}$  en plantas no inoculadas y desde 25  $\mu\text{M}$  en aquellas inoculadas.

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre arseniato y arsenito para ninguno de los tratamientos ensayados. Tampoco hubo diferencias entre aquellas plantas inoculadas respecto de las que no lo fueron, con excepción de la longitud, donde la misma aumentó en aquellas plantas inoculadas respecto de su control no-inoculado para los tratamientos sin As.



**Figura 20) a.** Longitud (cm) y **b.** peso fresco (g) de la porción aérea de plantas de soja de 30 días no inoculadas e inoculadas, sin As (control) y suplementadas con concentraciones 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre plantas no inoculadas e inoculadas para un tratamiento particular de As.

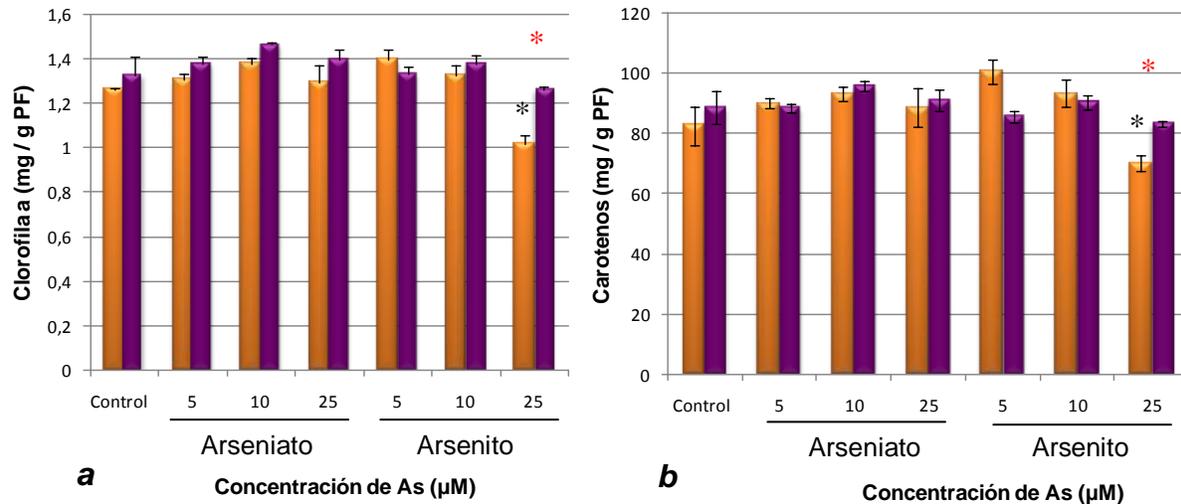
En cuanto a la porción radical los efectos de los diferentes tratamientos sólo provocaron una disminución significativa en la longitud para arsenito 25 µM en plantas no inoculadas (Fig. 20a), mientras que la biomasa disminuyó para tratamientos con 25 µM de arsenito tanto en plantas no inoculadas, como en las inoculadas (Fig. 20b). Ninguno de los demás tratamientos presentaron diferencias significativas respecto al control y tampoco fueron observadas diferencias entre arseniato y arsenito, ni entre plantas inoculadas respecto de las que no lo fueron.



**Figura 21) a.** Longitud (cm) y **b.** peso fresco (g) de la raíz de plantas de soja de 30 días no inoculadas e inoculadas, sin As (control) y suplementadas con concentraciones 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

También fue analizado el contenido de pigmentos de la porción aérea. Se observó que el contenido de clorofila *a* (Fig. 22a) disminuyó significativamente para tratamientos de arsenito 25  $\mu\text{M}$  no inoculado, presentando a su vez diferencias estadísticamente significativas respecto de su control 25  $\mu\text{M}$  inoculado. En cambio, los niveles de clorofila *b* no mostraron diferencias para ninguno de los tratamientos ensayados (datos no mostrados).

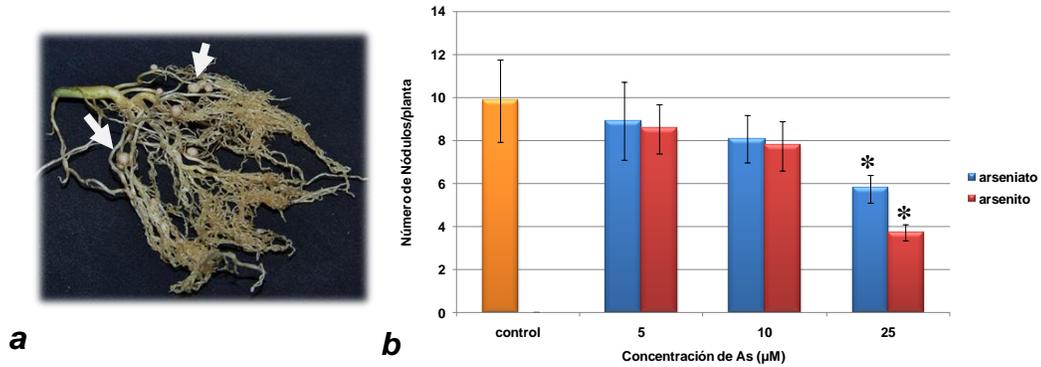
La concentración de carotenos también disminuyó significativamente para tratamientos de arsenito 25  $\mu\text{M}$  no inoculado, tratamiento que presentó diferencias estadísticamente significativas con su respectivo control inoculado (Fig. 22b).



**Figura 22)** Contenido (mg/g de peso fresco) de **a.** clorofila a y **b.** carotenos de la porción aérea de plantas de soja de 30 días no inoculadas e inoculadas, sin As (control) y suplementadas con concentraciones 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre plantas no inoculadas e inoculadas para un tratamiento particular de As.

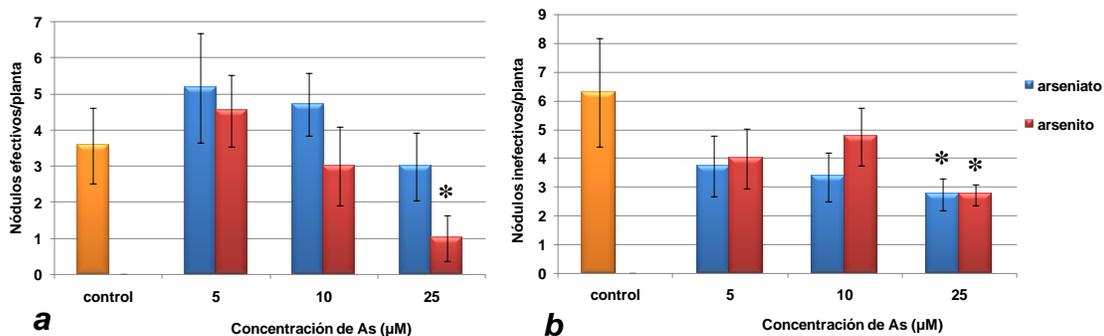
#### 4.3.2 EFECTOS DEL As SOBRE LA INTERACCIÓN SOJA-*B. japonicum* E109: implicancias en la nodulación

Se evaluó el efecto del As sobre la nodulación de las plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109. Puede observarse en la Fig. 23 que el número de nódulos por planta disminuyó con el incremento de la concentración del metaloide, presentando los tratamientos con 25 µM de arseniato y arsenito diferencias significativas respecto al control. En dichos tratamientos la formación de nódulos disminuyó aproximadamente un 40 y 60% para arseniato y arsenito, respectivamente. No se presentaron diferencias en el número de nódulos entre los tratamientos con arseniato y arsenito para ninguna de las concentraciones ensayadas.



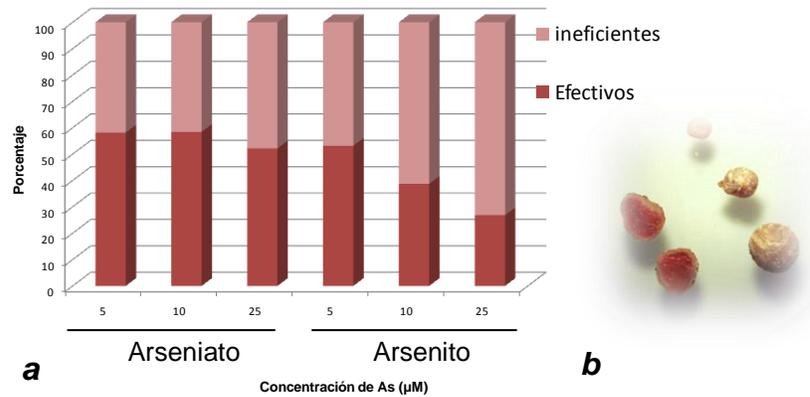
**Figura 23) a.** Raíz de soja (*Glycine max*) donde pueden observarse nódulos de diferentes tamaños (señalados con flechas blancas) luego de 30 días de haber sido inoculadas con *B. japonicum* E109. **b.** Número de nódulos totales (promedio) por planta para tratamientos sin As (control) y con 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

También se clasificó a los nódulos como efectivos o inefectivos según su coloración interna (Fig. 25b). El número de nódulos efectivos sólo mostró una disminución significativa respecto al control para tratamientos de arsenito 25 µM (Fig. 24a). Mientras que el número de nódulos inefectivos lo hicieron tanto con arseniato como con arsenito para dicha concentración (Fig. 24b), sin presentarse diferencias entre ambos tratamientos.



**Figura 24) a.** Número de nódulos efectivos y **b.** número de nódulos inefectivos (promedio) por planta para tratamientos sin As (control) y con 5, 10 y 25 µM de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

Como se observa en la Fig. 25a la proporción de nódulos eficientes/ineficientes se mantuvo constante para los tratamientos de arseniato, mientras que para arsenito a medida que aumentó la concentración disminuyó el número de nódulos eficientes, aumentando los ineficientes.



**Figura 25) a.** Proporción (en porcentaje) de nódulos ineficientes e ineficientes para tratamientos 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio. **b.** Nódulos de soja (10 X) de diferentes tamaños y con interior rojo, con presencia de leghemoglobina que le confiere el color característico e indicando efectividad.

Para garantizar la sobrevivencia de rizobios suficientes para que se produzca la colonización de las raíces y consecuente formación de nódulos, cada semilla fue inoculada con  $4.10^9$  UFC. Esto se realizó en base a la recomendación de la CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de Argentina), que establece que un buen inoculante es aquel que aporta aproximadamente  $10^6$  bacterias vivas por cada semilla, y a la Resolución N° 310/94 del SENASA que establece que los inoculantes deben contener no menos de  $10^9$  rizobios por g o ml de producto a la fecha de elaboración y no menos de  $10^8$  por g o ml a la fecha de vencimiento.

Como se muestra en el inciso 4.2.1b) *B. japonicum* E109 fue capaz de tolerar y desarrollarse a concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito; sin embargo, la formación de nódulos en las plantas de soja disminuyó para ésta concentración, independientemente de la forma en que el metaloide fue suplementado al medio. Estos resultados concuerdan con estudios realizados con *Sinorhizobium* sp. en los cuales el microorganismo fue capaz de crecer a concentraciones de hasta 10 mM, pero la formación de nódulos en *Medicago sativa* disminuyó alrededor de un 75% con concentraciones de 25 a 35  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio (Pajuelo y col., 2008). Por otra parte, Reichman (2007) observó que el número de nódulos por planta de soja disminuyó con el incremento en la concentración de arseniato.

Una posible explicación para la menor nodulación observada bajo tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de As podría relacionarse con la alteración del tejido radicular vegetal en relación al estrés provocado por el metal. Como se discutió anteriormente en el punto 4.2.1, *B. japonicum*

E109 fue capaz de desarrollar hasta concentraciones de 5 mM de arseniato y hasta 25  $\mu\text{M}$  de arsenito (*Fig. 13*); sin embargo el desarrollo de las plantas de soja, y en particular la raíz, se vio afectada ante tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  tanto de arseniato como de arsenito (incisos 4.1.1 b y 4.3.1). Inclusive en sus trabajos, tanto Pajuelo y col. (2008) como Reichman (2007), encontraron síntomas de daño y disminución del número de pelos radicales, lo que fue relacionado con bajas de hasta un 90% para *Medicago sativa* en el número de infecciones por parte de los rizobios. También existen antecedentes en legumbres en cuyo caso para otros metales como  $\text{Cu}^{+2}$  (Kopittke y col., 2007),  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$  (Ortega-Villasante y col., 2005) el efecto negativo sobre el proceso de nodulación fue atribuido al daño que producen los mismos sobre los pelos radicales.

Otro factor que podría estar influenciando la disminución en el número de nódulos, es la reducción de la movilidad de *B. japonicum* E109. Teniendo en cuenta que el comportamiento de *swarming* se vio afectado con concentraciones 25  $\mu\text{M}$  para ambas especies iónicas de As, y como ya se mencionó en el punto 4.2.2, esta reducción en la movilidad podría haber dificultado la formación de películas o *biofilms* en la superficie de la raíz, entre otros factores, posiblemente llevando a una menor formación de nódulos (Kanbe y col., 2007).

Dado que la leghemoglobina es una proteína sintetizada durante la simbiosis rizobio-leguminosa y que tiene como finalidad controlar los niveles de  $\text{O}_2$  en los nódulos, la presencia de color rojo-rosado en el interior de los mismos (*Fig. 25b*), y con ello la presencia de la proteína, es una forma sencilla de inferir FBN. Para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio, se observó una disminución en el número de nódulos efectivos respecto al control (*Fig. 24a*) y además, para tratamientos de arsenito 25  $\mu\text{M}$ , se presentó aumento en la proporción de nódulos blancos o no fijadores (*Fig. 25a*). Sin embargo, no se repitieron estas diferencias para tratamientos de As con concentraciones menores a 25  $\mu\text{M}$ ; de manera similar, la concentración de As (para tratamientos 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) no tuvo efectos significativos en la proporción de nódulos con capacidad de fijar N en plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* CB1809 (Reichman, 2007).

En consecuencia podría sugerirse que en general, una vez lograda la infección y colonización, el resto del proceso de formación del nódulo y FBN sería independiente tanto de las formas iónicas como de las concentraciones de As. El comportamiento observado para arsenito 25  $\mu\text{M}$  podría atribuirse al menos en parte, a la ya planteada reducción en la infectividad ocasionada por toxicidad del As sobre los pelos radicales, así como a la disminución sobre la movilidad del microorganismo.

### 4.3.3 DETERMINACIÓN DE As EN EL TEJIDO DE PLANTAS DE SOJA NO INOCULADAS E INOCULADAS CON *B. japonicum* E109

Se analizó el contenido de As en el tejido vegetal de las plantas desarrolladas en medio suplementado con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito. Además, y en base a los niveles de As presentes en el tejido, se calculó el FT As para la porción aérea y raíz.

En la *Tabla 1* puede observarse que las concentraciones de As presentes en raíz fueron significativamente mayores que las encontradas en la porción aérea. Dicha observación coincide con los valores de FT As encontrados, los cuales resultaron alrededor de 1000 veces mayores en la raíz que en la porción aérea.

No se presentaron diferencias significativas en los niveles de As presentes en el tejido en relación a la inoculación, ni tampoco frente a tratamientos con arseniato o arsenito, tanto en raíz como en la porción aérea de las plantas.

**Tabla 1)** Concentración (ppm) y factor de transferencia de As con sus respectivos errores, en raíz y porción aérea de plantas de soja de 30 días no inoculadas e inoculadas, suplementadas con 25  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito de sodio. (\*) Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los diferentes tratamientos entre la porción aérea y raíz. Referencias: No-inoc.: no inoculado, Inoc: inoculado, C As (ppm): concentración en ppm de As en el tejido, FT As: factor de transferencia de As.

		Tratamiento	C As (ppm)	FT As
Raíz	Arseniato	No-inoc.	357,4 $\pm$ 30,8	0,160 $\pm$ 0,014
		Inoc.	290,1 $\pm$ 5,5	0,159 $\pm$ 0,005
	Arsenito	No-inoc.	371,1 $\pm$ 12,7	0,094 $\pm$ 0,002
		Inoc.	423,2 $\pm$ 104,1	0,141 $\pm$ 0,035
Porción aérea	Arseniato	No-inoc.	0,63 $\pm$ 0,01 *	3,9.10 <sup>-4</sup> $\pm$ 9,2.10 <sup>-6</sup> *
		Inoc.	2,35 $\pm$ 0,19*	6,2. 10 <sup>-4</sup> $\pm$ 0 *
	Arsenito	No-inoc.	1,11 $\pm$ 0 *	9,6. 10 <sup>-4</sup> $\pm$ 7,7 10 <sup>-5</sup> *
		Inoc.	1,93 $\pm$ 1,37 *	8,2. 10 <sup>-4</sup> $\pm$ 5,8. 10 <sup>-4</sup> *

En base a los resultados obtenidos en el ensayo en macetas, podemos establecer que el efecto del As sobre las plantas, en general, fue más notable en la porción aérea que en la raíz. Se observó para la primera, una disminución dependiente de la concentración tanto en

la longitud como en la biomasa, mientras que la longitud de la raíz sólo disminuyó significativamente con arsenito 25  $\mu\text{M}$  en plantas no inoculadas. Esto concuerda con resultados obtenidos por Lafuente y col. (2010) de acuerdo a los cuales para tratamientos con arsenito de sodio 25  $\mu\text{M}$ , la longitud de la raíz de plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. mediacae*, cepa altamente tolerante a As, tampoco mostró diferencias respecto al control sin As. La biomasa de la raíz disminuyó tanto en plantas inoculadas como en las no inoculadas frente a tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito. En las experiencias realizadas en sistema hidropónico la raíz fue el órgano más afectado, lo que refleja que el estado fisiológico de las plantas mejora cuando éstas no se desarrollan directamente sumergidas en las soluciones contaminadas con el metaloide. En el sistema hidropónico sería mayor la exposición al metal y en consecuencia su incorporación por parte de la raíz, además de que las condiciones de crecimiento en inmersión de las plantas podrían resultar desfavorables y estar sumándose al propio efecto tóxico del As, lo que explicaría el mejor desarrollo de soja en macetas.

En términos generales en base a los parámetros analizados, las plantas no se vieron afectadas por tratamientos 5 y 10  $\mu\text{M}$  de arseniato ni arsenito (salvo en la longitud de la porción aérea, anteriormente mencionado) y los efectos de tratamientos con arseniato 25  $\mu\text{M}$  sólo fueron notables en la longitud y biomasa de la porción aérea. Claramente el tratamiento que produjo un efecto deletéreo notable en el estado general de las plantas fue arsenito 25  $\mu\text{M}$ , para el cual todos los parámetros analizados (longitud y biomasa de ambas porciones y contenido de clorofila *a* y carotenos) mostraron disminución significativa respecto al control sin As, y en particular, en las plantas no inoculadas. En cambio, en los ensayos desarrollados en sistema hidropónico, las plantas se vieron afectadas aún ante tratamientos con menores concentraciones de arseniato y arsenito. En estas plantas crecidas en hidroponía, los niveles de clorofila *a* y biomasa radicular presentaron valores significativamente menores bajo tratamientos con arseniato 25  $\mu\text{M}$  y para todas las concentraciones ensayadas de arsenito (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ), y el peso fresco de la porción aérea disminuyó para concentraciones de arsenito a partir de 10  $\mu\text{M}$  (*Fig. 5, 6 y 7*). Incluso, la toxicidad de As resultó ser mayor en los primeros estadios del desarrollo, durante el cual concentraciones iguales o mayores a 10  $\mu\text{M}$  (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ), tanto de arseniato como de arsenito, afectaron el desarrollo del hipocótilo y radícula (*Fig. 4*). Por lo tanto, en base a estas observaciones y comparando los sistemas estudiados, la tolerancia de las plantas de soja frente al As aumentó conforme lo hizo su grado de desarrollo. Esto coincide con los ya mencionados estudios en alfalfa (Lafuente y col., 2010) según los cuales los tratamientos no

presentaron diferencias respecto al control cuando los períodos de exposición aumentaron de 6 a 15-21 días.

Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la longitud y la biomasa entre plantas inoculadas y no inoculadas en respuesta a As, como ya se mencionó, tratamientos con 25  $\mu$ M de arsenito provocaron una disminución en la longitud radical en plantas no inoculadas respecto al control, sin embargo la longitud no disminuyó en las plantas inoculadas. También se observó que tratamientos a partir de 10  $\mu$ M de arsenito afectaron el peso fresco de la porción aérea en plantas no inoculadas, mientras que disminuye bajo tratamientos a partir de 25  $\mu$ M de arsenito en plantas inoculadas. Estas observaciones, sumado al hecho de que tanto el contenido de clorofila *a* como el de carotenos disminuyeron bajo tratamientos con 25  $\mu$ M de arsenito en plantas no inoculadas, a diferencia de las plantas en asociación a *B. japonicum* E109 (presentándose a su vez diferencias significativas entre el tratamiento inoculado del no inoculado); reflejan al menos en parte, un efecto leve de mejoría ante la tolerancia a As cuando las plantas de soja fueron inoculadas con *B. japonicum* E109, aún cuando la formación de nódulos disminuyó, e inclusive, también lo hizo el número de nódulos efectivos para dicho tratamiento (Fig. 24a y 25a).

Considerando que en base al análisis estadístico no se presentaron diferencias entre los tratamientos control (sin As) no inoculado e inoculado, podemos sugerir que bajo nuestras condiciones experimentales, el aporte de nitrógeno por parte de los nódulos en el ensayo no sería considerable y que este nutriente provendría principalmente de la reserva presente en los cotiledones. Esto es teniendo en cuenta que a pocos días de la cosecha de las plantas (30 días) los cotiledones se encontraban aún presentes, tanto para plantas inoculadas como no inoculadas. Debe considerarse que para plantas inoculadas, los valores de N aportados por la simbiosis son bajos desde los estadios vegetativos hasta comienzos de floración (actividad nitrato reductasa predominante en la planta), de ahí en adelante se registra la mayor actividad situándose los máximos niveles de fijación en los estados reproductivos. Por otra parte, las plantas no inoculadas al no tener el gasto de energía de producción y mantenimiento de nódulos, tienen más fuentes de carbono disponibles para el crecimiento (Maddoni y col., 2004), de allí que podría no hacerse evidente el mejor desarrollo de las plantas inoculadas. Resultados similares también fueron encontrados por Reichman (2007) donde plantas de soja inoculadas y no inoculadas con *B. japonicum* no mostraron diferencias en el desarrollo en ausencia de As.

En base a esto, no habría diferencias de aporte nitrogenado entre plantas inoculadas y no inoculadas y los efectos observados podrían atribuirse directamente a los provocados por el As. Considerando que sólo se encontraron leves mejoras en algunos de los parámetros analizados para tratamientos con 25  $\mu\text{M}$  de arsenito cuando las plantas fueron inoculadas, en general, la tolerancia a As no difirió entre plantas inoculadas y no inoculadas para las diferentes concentraciones ensayadas, tanto con arseniato como con arsenito.

El metabolismo microbiano puede afectar la especiación y la biodisponibilidad del As en la rizósfera a través de diferentes mecanismos (Cavalca y col., 2010), afectando ya sea negativa o positivamente el desarrollo vegetal así como la incorporación y/o traslocación del metaloide por parte de las plantas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de As en el tejido de las plantas inoculadas respecto de las que no lo fueron. Tampoco se observaron diferencias en los valores de FT As, por lo que no diferiría la traslocación del metaloide, ni en raíz ni en la porción aérea, cuando las plantas se encontraron en asociación a *B. japonicum* E109. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Reichman (2007), en cuyo caso la inoculación de plantas de soja no tuvo efectos significativos en la concentración de As encontrada en raíz o tallo. Por lo tanto, el leve aumento en la tolerancia a As observada para arsenito 25  $\mu\text{M}$  cuando las plantas son inoculadas, podría deberse a una consecuente mejora en el estado fisiológico en la planta en estas condiciones, más que a una interacción directa del microorganismo con el metaloide.

Los valores de FT As encontrados fueron de alrededor de 0,1 para raíz mientras que resultaron alrededor de 1000 veces menores en la porción aérea. Estos se corresponden con valores de FT As típicos, los cuales van de 0,01 a 0,1 (Kloke y col., 1984; Warren y col., 2003). A su vez, y correspondiéndose con lo mencionado, la concentración de As en raíz fue en general, alrededor de 250 veces mayor que en la porción aérea. Estos resultados concuerdan con los mencionados estudios en soja realizados por Reichman (2007) para los cuales las concentraciones de As en raíz fueron alrededor de 100 veces menores que las encontradas en tallo, bajo tratamientos con 10  $\mu\text{M}$  de arseniato de sodio y considerando que los niveles de As en tejido aumentaron conforme lo hizo la concentración del metaloide en solución.

El FT As en porción aérea, y por ende su traslocación a las partes superiores de la planta, resultó bajo y el metaloide fue principalmente acumulado en raíz. Teniendo en cuenta que el valor promedio del FT As en la porción aérea de las plantas fue de  $7 \cdot 10^{-4}$  (que corresponde al 0,07 % del As total presente en el suelo), para que este cultivo presentara el

límite establecido por el CAA de As para alimentos sólidos de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de PF, debería desarrollarse en un suelo con más de  $1428 \text{ mg kg}^{-1}$  de As, en base a la suposición de que el 100 % del metal se encontrase biodisponible. Es decir, que sería equivalente a una solución acuosa de las sales de As de aproximadamente  $106 \text{ }\mu\text{M}$ . En base a los resultados obtenidos en el presente estudio y considerando que concentraciones  $25 \text{ }\mu\text{M}$  tienen un efecto negativo sobre el desarrollo, las plantas de soja no serían capaces de desarrollarse a tan altas concentraciones. Además, las concentraciones de As presentes en suelos y sedimentos reportadas para nuestra región, se encuentran entre  $2,1$  a  $8,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (Pérez-Carrera y Fernández-Cirelli, 2010). Esto claramente refleja la baja posibilidad de que el As sea acumulado en semilla, y por lo tanto los cultivos de soja regados con aguas contaminadas no constituirían una potencial entrada de As a la cadena alimenticia.

Dado que las plantas serían capaces de acumular en sus raíces alrededor de un 10% del As presente en el suelo, sin hacerlo a niveles significativos en la porción aérea (FT  $\sim 0,1$ , *Tabla 1*), la asociación soja-*B. japonicum* E109 resultaría un sistema “natural” de fitorremediación *in-situ*, sin que ello constituyera el principal objetivo. Esta estrategia de rizo-remediación de As del suelo y/o aguas cobraría importancia en nuestra región ya que el cultivo de soja, que abarca una importante extensión y es comúnmente inoculado, es frecuentemente regado con aguas contaminadas con As que progresivamente se incorpora al suelo. Si bien los valores de FT As en raíz no mostraron cambios cuando las plantas de soja se encontraban asociadas a su simbiote, no debería desestimarse la inoculación, ya que son conocidas sus ventajas y no estaría promoviendo la mayor biodisponibilidad del As en la rizósfera. Inclusive, la tolerancia de soja a As podría mejorar a campo ya que el grado de desarrollo alcanzado por las plantas sería mayor, y por consiguiente, su tolerancia y la biomasa radical capaz de acumular As y con ello la remoción de los suelos.

Resulta importante considerar que el desarrollo de las plantas se vio afectado de manera significativa ante tratamientos con concentraciones de  $25 \text{ }\mu\text{M}$  de As, principalmente con arsenito, aún en plantas inoculadas. Más aún, para dicha concentración también disminuyó el número de nódulos totales y efectivos para ambas especies iónicas, indicando que la presencia de este metaloide en suelos podría afectar la simbiosis soja-*B. japonicum* E109, y con ello podría también verse reducida la eficiencia de los inoculantes utilizados comúnmente. Por lo tanto, la presencia de elevados niveles de As en agua y suelos impactaría negativamente en términos de producción para este cultivo.

También surge como una propuesta interesante en base a lo discutido, la búsqueda de bacterias PGPRs tolerantes a As, compatibles con *B. japonicum* E109. El hecho de que el

rizobio se encuentra como endosimbionte disminuiría la competencia por la colonización de la rizósfera, resultando factible una co-inoculación, combinando de esta forma los beneficios de FBN con los de rizo-rremediación.

Finalmente y con el objeto de sustentar y enriquecer los resultados obtenidos en el presente trabajo, así como para poder afirmar que la ingesta de granos de soja y sus derivados no constituyen una fuente de contaminación por As; se plantea como necesaria la realización de experiencias a campo de forma de evaluar el contenido del metaloide en los granos de plantas que se han desarrollado en suelos contaminados y/o regados con agua conteniendo altos niveles de As.

# *Conclusiones*

## 5. CONCLUSIONES

⊕ La germinación de las semillas de soja se vio afectada de manera significativa con concentraciones a partir de 25  $\mu\text{M}$ , e inclusive inhibida, en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de las sales de As, siendo mayor el efecto causado por el arsenito en comparación con el arseniato.

⊕ En los primeros estadios del desarrollo las plántulas de soja se vieron afectadas con concentraciones a partir de 10  $\mu\text{M}$ , efecto que se acentuó con el aumento en la concentración de As, independientemente del estado iónico del metaloide.

⊕ Cuando las plántulas se desarrollaron en hidroponia se observó un mayor efecto tóxico del As sobre la raíz en comparación con la porción aérea, resultando mayor la toxicidad del arsenito que la del arseniato. En estas condiciones, tratamientos con arsenito 25  $\mu\text{M}$  produjeron una disminución significativa en la longitud y biomasa de la raíz y la porción aérea, reducción de los niveles de clorofila *a* y *b* y carotenos, así como un mayor grado de peroxidación lipídica.

⊕ Las plántulas de soja crecidas en hidroponia fueron capaces de remover As de soluciones 5  $\mu\text{M}$  sugiriendo su incorporación al tejido vegetal.

⊕ *B. japonicum* E109 fue capaz de desarrollarse en placas conteniendo 5 mM de arseniato y hasta 25  $\mu\text{M}$  de arsenito. El crecimiento en medio líquido no mostró diferencias significativas con arseniato, mientras que para arsenito la velocidad de crecimiento disminuyó.

⊕ La movilidad de *B. japonicum* E109 se redujo en presencia de As. El comportamiento de *swarming* fue el que se vio principalmente afectado, ya que disminuyó a partir de 25 y 10  $\mu\text{M}$  de arseniato y arsenito, respectivamente, mientras que el *swimming* sólo disminuyó con tratamientos de arsenito, con concentraciones a partir de 10  $\mu\text{M}$ .

⊕ La inoculación con *B. japonicum* E109 no promovió una mejor tolerancia de plantas de soja frente a As, ya que, la longitud, la biomasa y los niveles de clorofila y

carotenos no mostraron diferencias significativas entre plantas no inoculadas e inoculadas, así como tampoco redujo la acumulación de As en los tejidos de las mismas.

Ⓢ La nodulación de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109 se redujo frente a tratamientos con 25  $\mu$ M de las sales de As. Por lo tanto, la presencia de este metaloide en suelos, podría afectar la simbiosis soja-*B. japonicum* E109.

Ⓢ El As provocaría alteraciones sobre el tejido radicular vegetal así como de los comportamientos de *swimming*, y principalmente de *swarming*, de *B. japonicum* E109, interfiriendo de esta manera en la colonización e infección de las raíces de plantas de soja por el microorganismo.

Ⓢ Dado que tratamientos con 25  $\mu$ M de As, principalmente de arsenito, afectaron la nodulación así como el desarrollo de las plantas de soja; la presencia de As en agua y suelos, causarían impactos negativos en términos de producción de dicho cultivo.

Ⓢ Los valores de FT As fueron de alrededor de 0,1 en raíz y aproximadamente 1000 veces menores en la porción aérea. Por lo tanto, el metaloide fue principalmente acumulado en raíz y los FT As obtenidos sugerirían que las semillas provenientes de cultivos de soja regados con aguas contaminadas, no constituirían una potencial entrada de As a la cadena alimenticia.

Ⓢ La inoculación de soja con *B. japonicum* E109, no provocó cambios en la traslocación del metaloide. Por lo tanto, se sugiere que el metabolismo microbiano no afectaría la especiación y la biodisponibilidad del As en la rizósfera de plantas de soja inoculadas, ni tampoco sería capaz de bio-acumularlo y con ello evitar el efecto deletéreo del As.

Ⓢ Dada la acumulación de As principalmente en raíz, la asociación soja-*B. japonicum* E109 podría resultar un sistema “natural” de fitorremediación *in-situ*. Sin embargo, el efecto deletéreo del metaloide sobre el desarrollo de las plantas alienta a la búsqueda de nuevas estrategias, como podría ser la co-inoculación con microorganismos PGPR u otros capaces de bio-acumular el metaloide, de manera de evitar su efecto tóxico.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

La exposición de soja frente a As no constituiría un riesgo para la salud animal y humana, ya que en base a nuestros resultados, las plantas de soja presentan una baja acumulación del metaloide en sus tejidos y más aún, una baja traslocación a la porción aérea y con ello a los granos, por lo que no serían una fuente de transferencia del metaloide a la cadena alimenticia. Sin embargo, altas concentraciones del metal afectaron tanto el desarrollo de las plantas así como la interacción soja-*Bradyrhizobium japonicum* E109, por lo que su presencia en suelos podría afectar la producción de dicho cultivo.

Dado que el cultivo abarca una importante extensión en suelos con As de nuestro país, la capacidad de acumular el metaloide en raíz podría resultar en un sistema “natural” de rizorremediación *in-situ*; aunque sería necesaria la realización de nuevos estudios, para la búsqueda de estrategias que eviten el efecto deletéreo del metaloide. Una de ellas podría ser la co-inoculación con microorganismos bio-acumuladores y/o PGPR que contrarresten el efecto negativo del As, y de esta forma promover su desarrollo y producción.

# *Bibliografía*

**BIBLIOGRAFÍA**

**Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA** (2002) Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol* 128:1120-1128.

**Abernathy CO, Thomas DJ, Calderon RL** (2003) Health effects and risk assessment of arsenic. *J Nutr* 133:1536-1538.

**Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)** (2002) Arsenic toxicity: case studies in environmental medicine. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry and Support Lab.

**Allen ON, Allen EK** (1981) The *Leguminosae*: A source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, USA. pp 800-843.

**Andrade FH, Echeverria HE, Gonzalez NS, Uhart S** (2000) Requerimientos de nutrientes minerales. En: F. Andrade, V. Sadras (Eds) Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. ISBN: 987-521-016-1. INTA 2006, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp 207-233.

**APHA (American Public Health Association)** (2005) Standard methods for the water and waste water. 21st Edition. Washington DC.

**ARSLAND (Project: Sustainable management of arsenic contaminated water and soil in rural areas of Latin America)** (2007) D04: Revisión de regulaciones y leyes relacionadas con el arsénico.

**Astolfi E, Besuschio SC, García Fernández JC, Guerra C, Maccagno A** (1982) Hidroarsenicismo crónico regional endémico. FECIC, Buenos Aires. pp 12-20.

**Astolfi EA, Maccagno A, García Fernández JC, Vaccaro R, Stimola R** (1981) Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol Trace Element Res* 3:133-143.

**ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)** (2002) Arsenic toxicity: case studies in environmental medicine.

**Bashan Y, Holguin G** (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225-1228.

**Benintende S** (2010) Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Rev Argent Microbiol* 42:129-132.

**Bentley Rm, Chasteen TG** (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 250-271.

- BEST (Board on Environmental Studies and Toxicology)** (2001) <http://www.nap.edu/books/0309076293/html>. Arsenic in drinking water: 2001 update. National Academy Press, Washington. pp 225-227.
- Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R, Thiyagarajan S, Rosen BP** (2008) Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *J Biol* 7: 33-10.
- Bhattacharya P, Claesson M, Bundschuh J, Sracek O, Fagerberg J, Jacks G, Martin RA, Storniolo AR, Thir JM** (2006) Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. *Sci Total Environ* 358:97-120.
- Bhattacharya R, Chatterjee D, Nath B, Jana J, Jacks G, Vahter M** (2003) High arsenic groundwater: Mobilization, metabolism and mitigation-an overview in the Bengal Delta Plain. *Molec Cell Biochem* 253(1-2):347-355.
- Bianco CA, Kraus TA, Nuñez CO** (2006) Botánica agrícola. 2da Edición, UNRC, Río Cuarto, Argentina. pp 175-351.
- Braeken K, Daniels R, Vos K, Fauvart M, Bachaspatimayum D, Vanderleyden J, Michiels J** (2007) Genetic Determinants of Swarming in *Rhizobium etli*. DOI: 10.1007/s00248-007-9250-1. Springer Science+Business Media, LLC.
- Bucher M** (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol* 173:11-26.
- Bundschuh J, Litter M, Ciminelli VST, Morgada ME, Cornejo, Garrido-Hoyos S, Hoinkis J, Alarcoón-Herrera MT, Armienta MA, Bhattacharya P** (2010) Emerging mitigation needs and sustainable options for solving the arsenic problems of rural and isolated urban areas in Latin America-A critical analysis. *Water Res* 44:5828-5845.
- CAA (Código Alimentario Argentino)** Artículo 982. Res Conj. SPRyRS y SAGPyA N° 68/2007 y N° 196/2007
- Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, López R** (2005) Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biol Biochem* 37:1131-1140.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina)** Inoculantes.
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V** (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European J of Soil Biology* 45:28-35.
- Cassiera-Posada F, Aguilar-Avenidaño OE** (2007) Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión. *Revista Colombiana Ciencias Hortícolas* 1(2):246-250.

**Catarecha P, Segura MD, Franco-Zorrilla JM, García-Ponce B, Mónica Lanza, Solano R, Paz-Ares J, Leyv A** (2007) A mutant of the Arabidopsis phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *The Plant Cell* 19:1-11.

**Cavalca L, Zanchi R, Corsini A, Colombo M, Romagnoli C, Canzi E, Andreoni V** (2010) Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Syst Appl Microbiol* 33:154-164.

**Chen J, Czajka D, Lion L, Shuler M, Ghiorse W** (1995) Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ Health Perspect* 103:53-58.

**Chopra BK, Bhat S, Mikheenko IP, Xu Z, Yang Y, Luo X, Chen H, Zwieter van L, McC. Lilley R, Zhang R** (2007) The characteristics of rhizosphere microbes associated with plants in arsenic-contaminated soils from cattle dip sites. *Sci of the Total Environ* 378:331-342.

**Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 53:159-182.

**Collino D, de Luca M, Peticari A, Urquiaga Caballero S, Racca R** (2007) Aporte de la FBN a la nutrición de la soja y factores que la limitan en diferentes regiones del país. XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Los Cocos, Córdoba, Argentina. pp 25-29.

**Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J** (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28:261-289.

**Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, Ali N, Radwan S** (2009) The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere* 74:1354-1359.

**De la Rosa G, Martinez-Martinez A, Pelayo H, Peralta-Videa JR, Sanchez-Salcido B, Gardea-Torresdey JL** (2005) Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kali*). *Plant Physiol Biochem* 43:491-498.

**Dere S, Gunes T, Sivaci R** (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Tr J Botany* 22:13-17.

**Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R** (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol* 149:2005-2013.

**Dhankher OP, Li YJ, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA, Meagher RB** (2002) Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining

arsenate reductase and gammaglutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnol* 20:1140-1145.

**Dhankher OP, Rosen BP, McKinney EC, Meagher RB** (2006) Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5413-5418.

**Dong Y, Zhu YG, Smith AF, Wang Y, Chen B** (2008) Arbuscular mycorrhiza enhanced arsenic resistance of both white clover (*Trifolium repens* Linn.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants in an arsenic-contaminated soil. *Environ Pollution* 155:174-181.

**Farías SS, Casa AV, Vázquez C, Ferpozzi L, Pucci GN, Cohen IM** (2003) Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean Plain. *Sci Total Environ* 309: 187-199.

**Farid ATM, Roy KC, Hossain KM, Sen R** (2003) A study of arsenic contaminated irrigation water and its carried over effect on vegetable. En Ahmed MF, Ali MA, Adeel Z (Eds) *Fate of arsenic in the environment*. Bangladesh University of Engineering and Technology. Dhaka, Bangladesh/The United Nations University, Tokyo, Japan. pp 113-121.

**Fernández-Turiel JL, Galindo G, Parada MA, Gimeno D, García-Vallés M, Saavedra J** (2005) Estado actual del conocimiento sobre el arsénico en el agua de Argentina y Chile: origen, movilidad y tratamiento. II Seminario Hispano-Latinoamericano sobre temas actuales de hidrología subterránea y IV Congreso Hidrogeológico Argentino. Río Cuarto, 25-28 de octubre de 2005. pp 1-15.

**Ford T, Mitchell R** (1992) Microbial transport of toxic metals. En: Mitchell R (Ed) *Environmental Microbiology*. Wiley-Liss. New York. pp 321-342.

**Frankenberger WT** (2002) Prefacio. En: Frankenberger WT (Ed) *Environmental chemistry of arsenic*. Marcel Dekker. New York. pp 3-5.

**Froni L** (1999) Procesos microbianos. En: Fijación de nitrógeno por la simbiosis rizobio-leguminosa. Ed. de la Fundación UNRC, Río Cuarto, Argentina. pp 1-15.

**Furukawa K** (2003) Super bugs for bioremediation. *Tr Biotechnol* 21:187-190.

**Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM** (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci* 176:20-30.

**Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Gominet M, Lereclus D, Wong AC, Senesi S** (2002) Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 184:6424-6433.

**González D, Ferrúa N, Cid J, Sansone G, Jiménez I** (2003) Arsénico en aguas de San Luis (Argentina). Uso de un equipo alternativo Al De Gutzeit modificado. Acta Toxicológica Argentina 11(1)3-6.

**González E, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J** (2005) Phosphate transporter traffic facilitator 1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:3500-3512.

**González N** (2007) Fijación de nitrógeno en soja. Inoculantes: Situación actual y perspectivas en la Argentina. Cap. 9 En Thuar A, Olmedo C, Cassan F (Eds) De la Biología del Suelo a la Agricultura. ISBN 978-950-665-439-9 UNRC, Río Cuarto, Córdoba. INTA.

**Gottfert M, Rothlisberger S, Kundig C, Beck C, Marty R, Hennecke H** (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. J Bacteriol 183:1405-1412.

**Grill E, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD** (2006) Role of phytochelatins in phytoremediation of heavy metals. En SN Singh, RD Tripathi (Eds) Environ bioremed technol pp 101-146.

**Guo X, Fujino Y, Kaneko S, Wu K, Xia Y, Yoshimura T** (2001) Arsenic contamination of groundwater and prevalence of arsenical dermatosis in the Hetao plain area, Inner Mongolia, China. Mol Cell Biochem 222:137-140.

**Gupta M, Sharma P, Sarin NB, Sinha AK** (2009). Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. Chemosphere 74:1201-1208.

**Harshey RM** (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. Mol Microbiol 13:389-394.

**Haug CM, Reimer KJ, Cullen WR** (2004) Arsenic uptake by the Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesie*). Appl Organomet Chem 18:626-630.

**Heath RL, Packer L** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125:189-198.

**Hoagland D, Boyer T** (1936) General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods. Plant Physiol 11:477-507.

**[http://www.lavoz.com.ar/nota.asp?nota\\_id=23753](http://www.lavoz.com.ar/nota.asp?nota_id=23753)**. (2006) La voz del Interior. Napas en Córdoba, El 90% del agua subterránea está contaminada con arsénico.

**<http://www.siaa.gov.ar>**

**IARC (International Agency Research of Cancer)** (2004) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water, disinfectants and contaminants, including Arsenic. Vienna. IARC, Vol 84.

**Kabata-Pendias A, Pendias H** (1992) Trace elements in soils and plants. Boca Raton, FL, CRC Press pp 700-781.

**Kanbe M, Yagasaki J, Zehner S, Göttfert M, Aizawa SI** (2007) Characterization of Two Sets of Subpolar Flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 189(3):1083.

**Karimi N, Ghaderian SM, Raab A, Feldmann J, Meharg AA** (2009) An arsenic accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis capadocica*. New Phytol 184:41-47.

**Khan AG** (2004) Micotrophy and its significance in wetland ecology and wetland management. En: Wong MH (Ed) Developments in ecosystems, Northampton, UK, Elsevier. pp 97-114.

**Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M** (2009) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ Chem Lett 7:1-19.

**Kim J, Davis AP** (2003) Stabilization of available arsenic in highly contaminated mine tailings using iron. Environ Sci Technol 37:189-195.

**Kloke A, Sauerbeck DR, Vetter H** (1984) The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. En: Nriagu J (Ed) Changing metal cycles and human health, Springer, Berlin. pp 113-141.

**Kopittke PM, Dart PJ, Menzies NW** (2007) Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). Environ Pollution 145:309-315.

**Lafuente A, Pajuelo E, Caviedes MA, Rodríguez-Llorente ID** (2010) Reduced nodulation in alfalfa induced by arsenic correlates with altered expression of early nodulins. J Plant Physiol 167:286-291.

**Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé, Denarié J** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344:781-784.

**Litter MI** (2010) La problemática de arsénico en la Argentina: El HACRE. Revista SAEGRE 17(2):5-10.

**Litter MI, Morgada ME, Bundschuh J** (2010) Possible treatments for arsenic removal in Latin American waters for human consumption. Environ Pollution 158:1105-1118.

**Lloret L, Martínez-Romero E** (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Rev Latinoam Microbiol 47(1-2):43-60.

**López A, Lazaro N, Priego J, Márquez A** (2000) Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4K39. Industrial Microbiol Biotechnol 24:146-151.

**Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi K, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M** (2006) A silicon transporter in rice. Nature 440:688-691.

**Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang WH, Cai Y, Kennelley ED** (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409:579.

**Macur RE, Wheeler JT, McDermott TR, Inskeep WP** (2001) Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ Sci Technol* 35: 3676-3682.

**Maddoni GA, Vilariño P, García de Salamone I** (2004). Fertilización en los cultivos para granos y dinámica de los nutrientes en el sistema suelo-planta. En Satorre EH, Benech Arnold RL, Slafer GA, de la Fuente EB, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R. Producción de granos. Editorial Fac. Agronomía, UBA: Buenos aires, Argentina. pp 463-553.

**Madigan MT, Martinko JM, Parker J** (2004) Biología de los microorganismos. En Bacterias de los nódulos radicales y simbiosis con leguminosas. 10a Edición. Ed Pearson educación SA, Madrid. pp 1096:677-684.

**Meharg AA** (2003) Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies. *New Phytol* 157:25-31.

**Meharg AA, Hartley-Whitaker J** (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* 154:29-43.

**Meharg AA, Williams PN, Adomako E, Lawgali YY, Deacon C, Villada A, Cambell RC, Sun G, Zhu YG, Feldmann J, Raab A, Zhao FJ, Islam R, Hossain S, Yanai J** (2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environ Sci Technol* 43:1612-1617.

**Mendoza DG, Moreno R** (2006) Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J Theor Biol* 238:919-936.

**Mimura T** (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Rev Cytology-a Survey of Cell Biol* 191:149-200.

**Miretzky P, Cirrelli AF** (2010) Remediation of arsenic-contaminated soils by iron amendements: a review. *Critical Rev Environ Sci Technol* 40(2):93-115.

**Mitchell P, Barr D** (1995) The nature and significance of public exposure to arsenic: a review of its relevance to South West England. *Environ Geochem Health* 17:57-82.

**Mukhopadhyay R, Rosen BP** (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* 110(5):745-748.

**Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S** (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 26:311-325.

**Muller D, Medigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsene-Ploetze F, Carapito C, Chandler M, Cournoyer B, Cruveiller S, Dossat C, Duval S, Heymann M, Leize E, Lieutaud A, Lievremont D, Makita Y, Mangenot S, Nitschke W,**

**Ortet P, Perdrial N, Schoepp B, Siguier P, Simeonova DD, Rouy Z, Segurens B, Turlin E, Vallenet D, Dorsselaer AV, Weiss S, Weissenbach J, Lett MC, Danchin A, Bertin N** (2007). A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *Plos Genet* 3(4) e53.

**Navarro AR, Arrueta RG, Maldonado MC** (2006) Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Rev Toxicol* 23:125-129.

**Navarro-Aviñó JP, Aguilar Alonso I, López-Moya JR** (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16(2):10-25.

**Oremland RS, Kulp TR, Switzer Blum J, Hoefft SE, Baesman S, Miller G, Stolz JF** (2005) A microbial arsenic cycle in a salt saturated, extreme environment. *Science* 308:1305-1308.

**Ortega-Villasante C, Rellán-Alvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE** (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Experimental Bot* 56:2239-2251.

**Ownby, JD, Popham HR** (1989) Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. *J Plant Physiol* 135:588-591.

**Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Dary M, Palomares AJ** (2008) Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. *Environ Pollut* 154:2003-2011.

**Pérez-Carrera A, Fernández Cirelli A** (2004) Niveles de arsénico y flúor en agua de bebida animal en establecimientos de producción lechera (Pcia. de Córdoba, Argentina). *Investigación Veterinaria* 6(1):51-59.

**Pérez-Carrera A, Fernández-Cirelli A** (2005) Arsenic concentration in water and bovine milk in Córdoba, Argentina. Preliminary results. *J Dairy Research* 72:122-124.

**Pérez-Carrera A, Fernández-Cirelli A** (2007) Problemática del arsénico en la llanura sudeste de la provincia de Córdoba. Biotransferencia a leche bovina. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S166834982007000100013](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166834982007000100013)

**Pérez-Carrera A, Fernández-Cirelli A** (2010) Arsenic and water quality challenges in south America. En: G Schneier-Madanes, MF Courel (Eds) *Water and sustainability in arid regions*. Springer Science Business Media DOI 10.1007/978-90-481-2776-4\_17

**Pernía B, De Sousa A, Reyes R, Castrillo M** (2008) Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia* 33(2):112-119.

**Perticari A** (2006) Uso de biofertilizantes. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. <http://www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf>.

**Quin J, Rosen BP, Zhang Y, Wang G, Franke S, Rensing C** (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2075-2080.

**Rahman MM, Chowdhury UK, Mukherjee SC, Mondal BK, Paul K, Lodh D, Biswas BK, Chanda CR, Basu GK, Saha KC, Roy S, Das R, Palit SK, Quamruzzaman Q, Chakraborti D** (2001) Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India—a review and commentary. *J Toxicol Clin Toxicol* 39:683-700.

**Rausch C, Bucher M** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37.

**Reichman SM** (2007) The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol Biochem* 39:2587-2593.

**Revista Agromercado** (Septiembre 2006) Factores que hacen a la situación productiva actual del cultivo en Argentina. N° 129.

**Rodriguez R, Ramos JA, Armienta A** (2004) Groundwater arsenic variations: the role of local geology and rainfall. *Appl Geochem* 19(2):245-250.

**Rosen BP** (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529:86-92.

**Ryan PR, Shaff JE, Kochian LV** (1992) Aluminum toxicity in roots: Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol* 99:1193-1200.

**Schwitzguebel JP, Meyer J, Kidd P** (2006) Pesticides removal using plants: phytodegradation versus phytostimulation. En *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background*. Springer. pp 179-198.

**SAGyP (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca)** (1994) Resolución 310/94, Inscripción y normalización de fertilizantes biológicos, ensayos para productos nuevos, equipamiento para la elaboración de productos biológicos. Argentina.

**SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)** Resolución 310/1994. Artículo 8: Fertilizantes biológicos. Valores mínimos de microorganismos viables en inoculantes comerciales. <http://www.senasa.gov.ar>

**Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ** (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* 39:629-642.

**Smedley PL, Kinniburgh DG** (2002) A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem* 17(5):517-568.

**Su YH, McGrath SP, Zhu YG, Zhao FJ** (2008) Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol* 180:434-441.

**Suárez P, Reyes R** (2002) La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia* 27(4):160-164.

**Tchounwou PB, Centeno JA, Patlolla AK** (2004) Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis- a health risk assessment and management approach. *Mol Cell Biochem* 255:47-55.

**Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hortensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E** (1998) An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13:773-780.

**Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, J.M. Maathuis FJM** (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Tr Biotechnol* 25(4):158-165.

**Tseng CH, Tseng CP, Chiou HY, Hsueh YM, Chong CK, Chen CJ** (2002) Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic. *Toxicol Lett* 133:69-76.

**Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ** (1989) Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*-G1. *J Exp Botany* 40:119-128.

**US EPA** (2001) <http://www.epa.gov/sfewater/ars/arsenic-final rule.html>

**Valverde A, González-Tirante M, Medina-Sierra M, Santa-Regina I, García-Sánchez A, Igual JM** (2011) Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten–tin mining area. *Chemosphere* 85:129-134.

**Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO** (2009) Comparative analysis of the contribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. *Plant Physiol Biochem* 47:63-67.

**Wang L, Duan G** (2008) Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and accumulation in rice seedlings. *J Environ Sci* 21:346-351.

**Warren GP, Alloway BJ, Lepp NW, Singh B, Bochereau FJM, Penny C** (2003). Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *Sci Total Environ* 311: 19-33.

**Wenzel WW, Brandstetter A, Wutte H, Lombi E, Prohaska T, Stingeder G, Adriano DC** (2002) Arsenic in field-collected soil solutions and extracts of contaminated soils and its implication to soil standards. *J Plant Nutrition Soil Sci* 165:221-228.

**Williams PN, Raab A, Feldmann J, Meharg AA** (2007) Market basket survey shows elevated levels of As in South Central US processed rice compared to California: Consequences for human dietary exposure. *Environ Sci Technol* 41:2178-2183.

**Wilson PW, Umbreit WW** (1973) Fixation and transfer of nitrogen in the soybean. *Zentbl bakt 2 Abt* 96:402-411.

**Wu JH, Zhang R, Lilley RM** (2002) Methylation of arsenic in vitro by cell extracts from the bentgrass (*Agrostis tenuis*): effect of acute exposure of plants to arsenate. *Funct Plant Biol* 29:73-80.

**Xu XY, McGrath SP, Zhao FJ** (2007) Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytol* 176:590-599.

**Zehr JP, Wyman M, Miller V, Duguay L, Capone DG** (1993) Modification of the Fe protein of nitrogenase in natural populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* 59:669-676.

**Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* 181:777-794.

**Zhao FJ, McGrath PS, Meharg AA** (2010) Arsenic as a food chain contaminant: Mechanism of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* 61:535-559.

**Zhu YG, Rosen BP** (2009) Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic-contaminated environments: from imagination to reality? *Current Opinion in Biotechnol* 20:220-224.

**Zhu YG, Williams PN, Meharg AA** (2008) Exposure to inorganic arsenic from rice: a global health issue? *Environ Pollution* 154:169-171.

**ANEXO: MEDIOS NUTRITIVOS Y SOLUCIONES DE AS****MEDIOS NUTRITIVOS PARA PLANTAS****Solución Hoagland (1000 ml 1 X)**

## Macronutrientes

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M	1 ml
$\text{KNO}_3$ 1M	6 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	4 ml
$\text{MgSO}_4$ 1M	2 ml
Micronutrientes Stock	1 ml
Solución Hierro Stock	2 ml

**Solución Hoagland modificada / Libre de Nitrógeno (LN) (1000 ml 1 X)**

## Macronutrientes

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub>	0,44 g
$\text{MgSO}_4$ 1M 2	ml
Micronutrientes Stock	1 ml
Solución Hierro Stock	2 ml

## \*Solución Stock de Micronutrientes (100 ml 1 X)

$\text{H}_3\text{BO}_3$	286 mg
$\text{CaMn} 4\text{H}_2\text{O}$	901,3 mg
$\text{ZnSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$	21,84 mg
$\text{CuSO}_4 5\text{H}_2\text{O}$	8 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 2\text{H}_2\text{O}$	2,66 mg

**MEDIO NUTRITIVO PARA *B. japonicum* E109**

**Medio YEM / Yeast Extract Manitol (1000 ml)**

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
ClNa	0,1 g

*Agar	12 g
Rojo Congo 0,25% P/V	10 ml
Antibiótico y antifúngico:	
Vancomicina	4 µg/ml
Ciclohexamida	50 µg/ml

**SOLUCIONES STOCK DE AS**

Las soluciones stock fueron preparadas a partir de la sal de arseniato de sodio dibásico heptahidratado (AsHNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, SIGMA) y arsenito de sodio (AsNaO<sub>2</sub>, SIGMA) las cuales fueron esterilizadas por filtración y conservadas en recipientes al resguardo de la luz a 4 °C. Dichas soluciones madre se utilizaron para suplementar los medios de crecimiento para plantas y/o bacterias y así obtener las diferentes concentraciones finales correspondientes.