

# 2018

Tesis de Grado:  
INGENIERÍA EN RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES.



**FCA**  
FACULTAD DE  
CIENCIAS AGRARIAS



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO

María Virginia Dávila

## **[SELECCIÓN DE BACTERIAS TOLERANTES A ASIII Y PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN VID. JÁCHAL, SAN JUAN, ARGENTINA.]**

Instituto de Biología Agrícola de Mendoza, Facultad de Ciencias Agrarias, CONICET-UNCuyo. Almirante Brown 500. Chacras de Coria - Luján de Cuyo. CPA M5528AHB - Mendoza - Argentina.

Título: Selección de bacterias tolerantes a As<sup>III</sup> y promotoras del crecimiento vegetal en vid. Jáchal, San Juan, Argentina.

Autor: María Virginia Dávila.

e-mail: [virgi.davila90@gmail.com](mailto:virgi.davila90@gmail.com)

cel.: 0261-5919429

Directora: Patricia Noemí Piccoli.

Co-director: Mariano Iván Funes Pinter.

Comité evaluador:

Cohen, Ana.

Farrando, Silvina.

Salomón, Victoria

## Índice.

RESUMEN .....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
As en el mundo y en Argentina. ....	5
Generalidades del As.....	7
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). ....	8
Fijación de nitrógeno atmosférico. ....	9
Solubilización de fosfatos.....	10
Producción de Sideróforos. ....	13
Estrés oxidativo: As. ....	14
Tolerantes. ....	15
OBJETIVOS E HIPÓTESIS. ....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Selección de bacterias tolerantes a As con capacidad PGPR. ....	19
Tinción de Gram (Hucker). ....	19
Fijación biológica de nitrógeno. ....	20
Solubilización de fosfato. ....	20
Producción de sideróforos. ....	21
Ensayo <i>in vitro</i> . ....	22
Análisis estadísticos.....	22
RESULTADOS. ....	23
Selección de bacterias en base a la tolerancia a As <sup>III</sup> . ....	23
Tinción de Gram. ....	25
Fijación de Nitrógeno. ....	26
Solubilización de fosfatos.....	27
Producción de Sideróforos. ....	33
Selección de bacterias para el ensayo <i>in vitro</i> . ....	39
Ensayo <i>In vitro</i> . ....	40
DISCUSIÓN.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO .....	61

## RESUMEN

En general, la presencia de metales en el suelo altera el crecimiento y funciones fisiológicas de las plantas, la densidad poblacional de microorganismos y las propiedades físico-químicas del suelo. Cuando los metales son captados por las plantas, estas pueden sufrir la desintegración de organelas celulares, disrupción de membranas, producir genotoxicidad e interrumpir procesos fisiológicos tales como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas y el metabolismo de carbohidratos.

En lo que respecta a la fitotoxicidad del arsénico (As), esta se encuentra determinada en primer lugar, por la forma química presente en el suelo, en donde el arsenito es la más fitotóxica. En consecuencia, las diferentes especiaciones de As varían en su disponibilidad y por tanto, en su toxicidad; siendo el As soluble en agua más fitotóxico que otros más fuertemente enlazados. Este metaloide puede causar alteraciones en el metabolismo y desarrollo de las plantas como la reducción del crecimiento, disrupción de la actividad fotosintética o inhibir la absorción de nutrientes.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son aquellas capaces de beneficiar el desarrollo vegetal debido principalmente al incremento en la disponibilidad de nutrientes minerales, provisión de sustancias promotoras del crecimiento y supresión de microorganismos patógenos en la rizósfera. Algunas de las propiedades por las que se explican estos resultados, se deben al papel que cumplen en mejorar la fertilidad del suelo y promover la productividad de los cultivos proporcionando nutrientes esenciales y reguladores del crecimiento. Además, alivia el impacto del stress inducido por el etileno, al reducir sus niveles mediante la síntesis ACC deaminasa. Existen estudios que evidencian que las PGPR contribuyen a reducir la fitotoxicidad producida por metales.

Se encuentran diferentes mecanismos, mediante los cuales las bacterias promueven el crecimiento vegetal. Los estudiados en el presente trabajo son: fijación de nitrógeno (N) atmosférico, solubilización de fosfato y producción de sideróforos. Además, de la contribución nutricional hacia las plantas, estos mecanismos modifican la dinámica del As en la rizósfera y confieren tolerancia al metaloide.

La importancia del estudio de las PGPR tolerantes al As, se debe a la existencia de zonas en la Argentina con elevada concentración de As en suelo que afecta tanto la producción agrícola como la salud humana. En San Juan se ha reportado un elevado contenido del metaloide en aguas del Río Jáchal, superando los límites establecidos para consumo humano y riego agrícola. El uso de PGPR tolerantes a As<sup>III</sup> podrían disminuir el efecto tóxico del metaloide sobre cultivos en la zona.

El **objetivo general** del trabajo fue seleccionar bacterias aisladas de rizósfera y raíces de vid de Jáchal, San Juan, en base a la resistencia a As<sup>III</sup> y a la capacidad de promover el crecimiento vegetal. Este, estuvo compuesto por los siguientes objetivos particulares: Seleccionar bacterias en base a su tolerancia As<sup>III</sup>, seleccionar bacterias tolerantes a As<sup>III</sup> con propiedades PGPR y determinar la capacidad de las bacterias seleccionadas de promover el crecimiento de plantas de vid *in vitro*.

De un total de 99 bacterias aisladas, 19 (19,1%) fueron seleccionadas por su tolerancia a 30 mM  $As^{III}$ . Todas las bacterias seleccionadas por tolerancia, mostraron potencial PGPR en al menos uno de los mecanismos estudiados en presencia de As (fijación de N atmosférico, solubilización de fosfato y producción de sideróforos). En base a las pruebas PGPR, fueron seleccionadas para el ensayo *in vitro*, solo 4 bacterias que dieron resultados positivos para los tres mecanismos estudiados en la concentración más alta de  $As^{III}$  probada (20 mM).

La hipótesis de que las bacterias tolerantes a  $As^{III}$  con capacidad de promover el crecimiento vegetal, son capaces de reducir los efectos fitotóxicos del As sobre el crecimiento de plantas de vid, no se cumplió. Esto puede deberse a que en el método *in vitro* no se generaron las condiciones necesarias para visibilizar los efectos de las bacterias sobre las plantas. Considerando además, que las bacterias seleccionadas mostraron un amplio potencial en las características evaluadas individualmente.

**Palabras claves:** PGPR, tolerancia, As.

## MARCO TEÓRICO

### As en el mundo y en Argentina.

La problemática del Arsénico (As) en suelo y agua está ampliamente distribuida en el mundo. La abundancia terrestre del As a nivel mundial se encuentra entre 1,5 y 3 mg Kg<sup>-1</sup>, considerando tanto las fuentes naturales como antropogénicas. Los principales factores que determinan la cantidad de As del suelo, son la constitución de la roca madre y las actividades humanas. Otros factores como el clima, los componentes orgánicos e inorgánicos del suelo y el potencial redox también afectan el contenido de As del suelo. En base a esto, Schwarzenbach y col. (2010) elaboraron un mapa de riesgo de contaminación de aguas con As a partir de las condiciones hidrogeológicas (ver figura nº 1) en donde se puede apreciar los alcances de la problemática. En Argentina, de acuerdo al autor, se encuentran comprendidos todos los rangos de riesgo establecidos. En la tabla nº 1 se pueden ver rangos para varios países en los que se han analizado sus suelos y para el caso de la Argentina este rango se encuentra entre 0,8 y 22 mg kg<sup>-1</sup> (Mandal y Suzuki 2002).

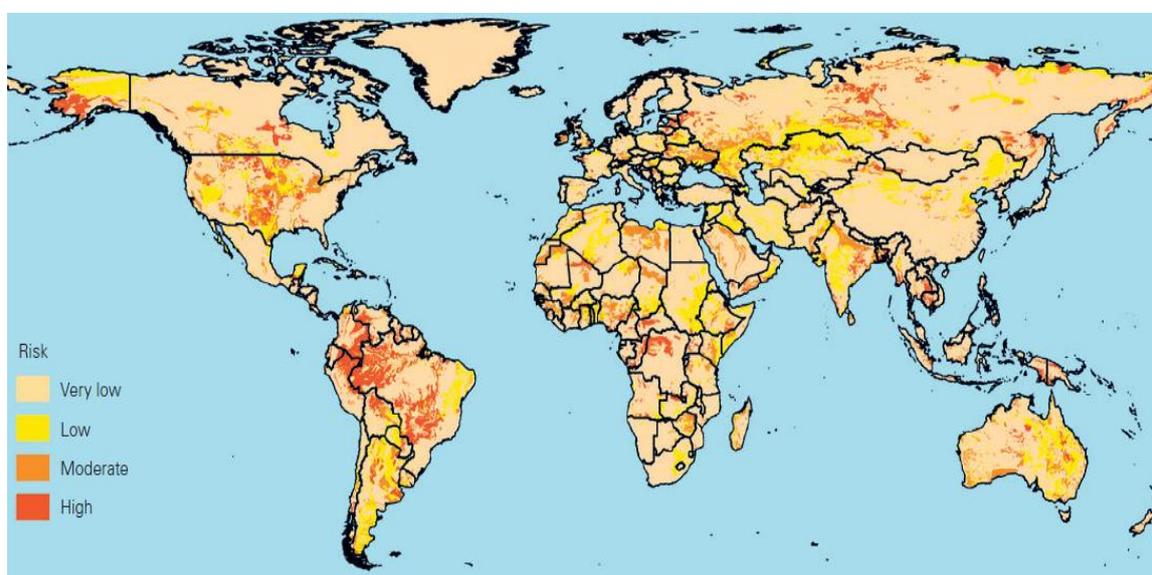


Figura 1: Riesgo estimado por contaminación de As en agua para beber basado en condiciones hidrogeológicas. Fuente: Schwarzenbach et al. 2010.

Tabla 1. Contenido de As en suelos de diferentes países.

País	Tipo de suelo/sedimento	Nº de muestra	Rango (mg Kg <sup>-1</sup> )	Media (mg Kg <sup>-1</sup> )
India (Oeste de Bengala)	Sedimentos	2235	10-196	-
Bangladesh	Sedimentos	10	8-28	22,1
Argentina	De todo tipo	20	0,8-22	5
China	De todo tipo	4095	0,01-626	11,2
Francia	De todo tipo	-	0,1-5	2
Alemania	Región Berlín	2	2,5-4,6	3,5
Italia	De todo tipo	20	1,8-60	20
Japón	De todo tipo	358	0,4-70	11

	Arrozal	97	1,2-38,2	9
<b>México</b>	De todo tipo	18	2-40	14
<b>Sudáfrica</b>	-	2	3,2-3,7	3
<b>Suiza</b>	-	2	2-2,4	2,2
<b>Estados Unidos</b>	Varios estados	52	1-20	7,5

Fuente: Mandal y Suzuki 2002

También se ha registrado la presencia de As en agua subterránea en diferentes países (ver tabla nº 2). En este marco, la Agencia de Protección Ambiental de USA (EPA) y la Organización mundial de la Salud (OMS) establecen que la concentración máxima permitida en agua para consumo, de este metaloide es de 0,01 mg L<sup>-1</sup>.

Tabla 2: Concentraciones de As en agua subterránea de algunos países.

Ubicación	Fuente de Arsénico	Concentración (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Hungría</b>	Agua subterránea	68 (1-174)
<b>Sur Oeste de Finlandia</b>	Agua de pozo, origen natur	17-980 (rango)
<b>Nueva Jersey, E.E.U.U.</b>	Agua de pozo	1 (media), 1160 (máxim
<b>Western, E.E.U.U.</b>	Ambientes geoquímicos	48000
<b>Sur Oeste de E.E.U.U.</b>	Acuíferos aluviales	16-62 (rango)
<b>Sur de Iowa y Oeste de Missouri E.E.U.U.</b>	Origen natural	34-490 (rango)
<b>Norte de Ohio, E.E.U.U.</b>	Origen natural	1-100 (rango)
<b>Región Lagunera, Norte de México</b>	Agua de pozo	8-624 (rango)
<b>Córdoba, Argentina</b>	-	Mayores de 100
<b>Chile</b>	-	470-770 (rango)
<b>Pampa, Córdoba, Argentina</b>	-	100-3810 (rango)
<b>Kuitum-Usum, China</b>	Agua de pozo	0,05-850 (rango)
<b>Shanxi PR, China</b>	Agua de pozo	0,03-1,41 (rango)
<b>Hsinchu, Taiwan</b>	Agua de pozo	Menos de 0,7
<b>Oeste de Bengala, India</b>	Sedimentos ricos en As	0,03-3700 (rango)
<b>Calcutta, India</b>	Cercano a planta productora de pesticidas	50-23080 (rango)
<b>Blangadesh</b>	Agua de pozo	10-1000 (rango)
<b>Nakhon, Tailandia</b>	Agua superficial, actividad minera	503,5 (1,25- 5114)
<b>Nakhon, Tailandia</b>	Agua subterránea, actividad minera	95,2 (1,25-1032)
<b>Fukuoka, Japón</b>	Origen natural	0,001-0,25
<b>Hanoi, Vietnam</b>	Sedimentos ricos en As	159 (1-3050)

<sup>a</sup> Media y rangos de As total a excepción de los determinados de otra manera.

Fuente: Mandal y Suzuki 2002.

Existen zonas en Argentina con elevada concentración de As en suelo que afecta tanto la producción agrícola como la salud humana. En Jáchal, San Juan, se han reportado concentraciones totales de este metaloide, en un rango de 9-357 µg L<sup>-1</sup> en aguas superficiales y subterráneas (O'Reilly et al. 2010), llegando a superar los límites establecidos para consumo humano (0,01 mg L<sup>-1</sup> según la OMS) y riego agrícola (0,1 mg L<sup>-1</sup> según la FAO). El uso de PGPR resistentes a As podría disminuir el efecto tóxico del metaloide sobre cultivos en la zona (Walsh y Keeney 1975).

## Generalidades del As.

El As es considerado un metaloide, que comparte propiedades con el nitrógeno y el fósforo, por estar en el mismo grupo químico. Sus números de oxidación son -3, 0, +3 ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) y +5 ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) y se los puede encontrar tanto en especies orgánicas como inorgánicas (Alvarez et al. 2003, Albores et al. 1997). No se le conocen funciones esenciales en los organismos aunque existen estudios en animales que sugieren que cumple un rol fisiológico en el metabolismo de la metionina, actuando en la producción de amino ácidos sulfurados. En las plantas, no se conocen funciones vitales, aunque la exposición de estas, a determinadas concentraciones, ha sido capaz de estimular el crecimiento vegetal (Uthus 1994, Nielsen 1991, Walsh y Keeney 1975, Jacobs et al. 1970).

Sin embargo, el contenido de As en los sistemas biológicos, puede producir efectos tóxicos, afectando organelas, enzimas y el material genético (Tchouwou et al. 2012). De esta manera, se inhibe irreversiblemente la actividad enzimática y el metaloide desplaza a otros elementos de su metabolismo, produciendo disrupciones en las rutas metabólicas y catalizando reacciones productoras de especies químicas reactivas de oxígeno (ROS) provocando un estrés oxidativo (Navarro et al. 2007).

El As es un elemento ubicuo, forma parte de minerales y del suelo (solución o adsorbido). También puede ser liberado al ambiente por la actividad volcánica y por la actividad antrópica, como es la utilización de combustibles fósiles, pesticidas, procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos, colorantes, protección de maderas (Tratamiento Chromated Copper Arsenate, CCA) y la manufactura de semiconductores a base de arseniuro de galio e indio (Tchouwou et al. 2012, Wuana y Okieimen 2011, Albores et al. 1997). Este elemento se encuentra en una amplia variedad de minerales principalmente como  $\text{As}_2\text{O}_3$  ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) junto con cobre (Cu), plomo (Pb), zinc (Zn), plata (Ag) y oro (Au). En el suelo se encuentra sujeto a procesos de oxidación-reducción, precipitación-disolución, adsorción-desorción, metilación orgánica y bioquímica (Alvarez et al. 2003).

La toxicidad de As depende del estado de valencia y de la forma química. Siendo el gas Arsina la forma más tóxica. Por otro lado la solubilidad es un factor determinante de su toxicidad, ya que las formas solubles son biodisponibles para los organismos, en donde el aumento del pH aumenta la solubilidad del  $\text{As}^{\text{V}}$ , mientras que el  $\text{As}^{\text{III}}$  sigue la relación inversa (Wuana y Okieimen 2011, Fitz et al. 2002, Albores et al. 1997).

En ambientes reductores la forma más abundante de As es el  $\text{As}^{\text{III}}$ , generalmente como arsenito ( $\text{AsO}_3^{-3}$ ) junto con sus formas químicas protonadas. Los compuestos de  $\text{As}^{\text{III}}$  poseen una estructura piramidal con un par de electrones desapareados, lo que le permite formar complejos con ácidos de Lewis y metales de transición. El arsenito puede precipitar o adsorberse con sulfuros metálicos y posee una alta afinidad por otros compuestos de azufre, como son los grupos sulfhidrilos de las proteínas (Ghosh et al. 2015, Albores et al. 1997). Se conoce que los compuestos de  $\text{As}^{\text{III}}$  son capaces de inactivar más de 200 tipos de enzimas, afectando varias rutas bioquímicas (Tchouwou et al. 2012). El  $\text{As}^{\text{III}}$  se encuentra presente en especies químicas neutras y es transportado a través de las membranas celulares por medio de las aquaporinas en plantas (Ghosh et al. 2015). Es más soluble y móvil que el  $\text{As}^{\text{V}}$  y en presencia de otros metales como aluminio (Al), hierro (Fe) o manganeso (Mn) pueden formarse compuestos poco solubles (Alvarez et al. 2003). Por todo lo anteriormente descrito, los compuestos inorgánicos de  $\text{As}^{\text{III}}$  son considerados entre 2 a 10 veces

más tóxico que los de  $As^V$  (Tchouwou et al. 2012). Además los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos (Fitz et al. 2002).

Por otro lado, en ambientes aerobios, la forma dominante es el  $As^V$ , generalmente como arseniato ( $AsO_4^{-3}$ ) y en variados estados de protonación (Wuana y Okieimen 2011, Alvarez et al. 2003). El  $As^V$  posee una estructura trigonal bipyramidal en ausencia de pares de electrones desapareados lo que contribuye a que sea el más estable en la naturaleza (Albores et al. 1997). El arseniato junto con otras formas aniónicas de As se comportan como quelantes y pueden precipitar cuando se encuentran cationes metálicos en el medio. En base a esto, puede precipitar o adsorberse junto con los oxihidróxidos de Fe, bajo condiciones ácidas y moderadamente reductoras (Wuana y Okieimen 2011). El arseniato ( $AsO_4^{-3}$ ) es químicamente similar al fosfato ( $PO_4^{-2}$ ) y el As ingresa a las plantas por la vía del fósforo (P) para ser luego trimetilado dentro de la célula. Éste produce interferencia en las reacciones de fosforilación y compite por el transporte con el P. El  $As^V$  está generalmente asociado a minerales de Fe/Al en el suelo, lo que ocurre de manera similar con el P (Gosh et al. 2015, Tchouwou et al. 2012, Carbonell et al. 1995).

Las cinéticas de las reacciones de óxido-reducción del suelo son lentas y por lo tanto generalmente se encuentran ambos estados de oxidación del elemento (Álvarez et al. 2003). La concentración de As en suelos no contaminados se encuentra alrededor de 0,2 y 40  $mg\ Kg^{-1}$  de suelo, siendo 20  $mg\ kg^{-1}$  el límite para suelos de uso agrícola en Chile, Australia y Alemania (Gobierno de Chile 2004). Asimismo, se han registrados suelos que alcanzaron concentraciones mayores a 550  $mg\ Kg^{-1}$  (Fitz et al. 2002, Carbonell et al. 1995). De acuerdo a Carbonell et al. (1995), pueden encontrarse concentraciones naturalmente altas en áreas de actividad geotérmica, suelos sobre depósitos de minerales sulfurados y suelos procedentes de roca madre de origen volcánico.

La biodisponibilidad del As depende tanto de la forma química del elemento como de características físico-químicas del suelo: capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica, pH y temperatura (Khan et al. 2009). En plantas la adsorción del arsenito y arseniato a nivel de las raíces, es rápida e intensa, por lo que pueden encontrarse en la rizósfera, concentraciones más altas de As que en el suelo. Se conoce que la ingesta del arseniato es 3 a 4 veces mayor que la del arsenito (Carbonell et al. 1995).

### **Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).**

Las PGPR son aquellas capaces de beneficiar el desarrollo vegetal, contribuyendo a la disponibilidad de nutrientes, minerales y precursores de vitaminas a la planta, además de la supresión de microorganismos patógenos en la rizósfera (Frioni 2005). Además de promover el crecimiento en plantas, las PGPR se caracterizan por modificar completamente la comunidad microbiana de la rizósfera debido a que producen una variedad de sustancias que modifican el medio circundante. Son eficientes colonizadoras de la superficie radicular, prolíferas y competitivas con el resto de los microorganismos presentes (Ahemad y Kibret 2014).

Existen estudios que evidencian que las PGPR contribuyen a reducir la fitotoxicidad producida por metales y metaloides (Funes Pinter et al. 2016, Sarabia et al. 2010, Khan et al. 2009, Madhaiyan et al. 2007, Rajkumar y Freitas 2007). Específicamente se han obtenido evidencia de que la implementación de bacterias tolerantes a As y con propiedades PGPR no solo pueden sostener el

crecimiento vegetal ante el estrés causado por el As sino también disminuir la fitotoxicidad de este elemento para la planta (Das et al. 2014).

Adicionalmente, sintetizan precursores de fitohormonas como enzimas, vitaminas, sideróforos y antibióticos (Cohen et al. 2014, Cassán et al. 2001, Piccoli y Bottini 1994). Además, son capaces de modular diferentes tipos de estrés (oxidativo, salino, hídrico) actuando sobre el etileno a partir de la síntesis de ACC deaminasa (Khan 2009). Concentraciones altas de etileno, inducen la defoliación y otros procesos celulares que detienen el crecimiento de la planta. La producción de ACC deaminasa reduce los niveles endógenos de etileno, induciendo la tolerancia hacia el estrés (Ahemad y Kibret 2014, Khan et al. 2009, Rajkumar et al. 2009). A nivel local, el grupo de trabajo liderado por Patricia Piccoli estudia estas características de las PGPR desde hace 20 años.

Estas bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de la relación que establezcan con la planta: simbióticas o no simbióticas. También se utiliza como medio de clasificación la función que cumplen como PGPR en la planta, ya sea como biofertilizante, fitoestimulador, rizoremediador o biopesticida (Ahemad y Kibret 2014, Khan et al. 2009, Zhuang et al. 2007).

La actividad PGPR sobre las plantas puede efectuarse por mecanismos directos o indirectos. Dentro de los directos podemos mencionar la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, producción de fitohormonas y producción de ACC deaminasa. El principal mecanismo indirecto es el control biológico de enfermedades en las plantas, en donde la competición por los nutrientes, la exclusión del nicho y la producción de metabolitos antifúngicos o antibióticos, producen en la planta un efecto denominado *resistencia sistémica inducida*. Entre los compuestos producidos por bacterias se encuentran lipopolisacáridos, sideróforos y lipopéptidos cíclicos (Ahemad y Kibret 2014).

#### **Fijación de nitrógeno atmosférico.**

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para la vida en la tierra. La atmósfera está constituida en un 79% de este elemento, aunque en un estado en el que no se encuentra disponible para los organismos heterótrofos. Las plantas captan el N desde la solución acuosa del suelo como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y N-orgánico. Estas especies químicas se obtienen a partir de procesos físicos y naturales como tormentas eléctricas y por procesos biológicos mediados por microorganismos (Reed et al. 2011). Los organismos eucariontes no poseen la capacidad de fijar nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_{2(g)}$ ), por lo que esta actividad, se lleva a cabo exclusivamente por Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (BFN) (Reed et al. 2011, Piccoli y Bottini 1994, Sprent et al. 1987).

Las BFN promueven el crecimiento en plantas al facilitar la captación de N, aumentando la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, incrementando el área superficial de las raíces, promoviendo otras relaciones simbióticas y reduciendo el efecto deletéreo de organismos fitopatógenos (Khan et al. 2009). Estas, pueden dividirse en dos grandes grupos las simbióticas y las no simbióticas que pueden ser de vida libre, asociadas o endófitas. Las PGPR fijadoras de  $\text{N}_2$  en plantas no leguminosas son llamadas diazotróficas y son capaces de formar interacciones no obligadas con sus huéspedes (Ahemad et al. 2014).

Se han registrado estudios en donde los fijadores simbióticos han alcanzado valores de  $150 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en ciertos ecosistemas, mientras que la fertilización nitrogenada en la agricultura

moderna se encuentra entre 50-100 Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, en el caso de los fijadores de vida libre los valores son menores encontrándose en un rango de 1 a 20 Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> dependiendo del ecosistema (Reed et al. 2011).

El proceso de fijación es llevado a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa. Consiste en una metaloenzima de dos componentes, uno es la dinitrogenasa reductasa, que es una proteína de Fe y una dinitrogenasa que posee un cofactor metálico. Este cofactor puede ser de molibdeno (Mo), vanadio (Va) o Fe, pero el primero es, el más generalizado y se encuentra en todos los diazótrofos (Ahemad y Kibret 2014). Debido a que el Fe es un elemento constituyente del complejo enzimático para la fijación de N<sub>2</sub>, los mecanismos que contribuyan a la nutrición de Fe, como la producción de sideróforos resultarían beneficiosos para este proceso. Además, el proceso es altamente demandante de energía, 16 moles de ATP por mol de N<sub>2</sub> reducido, en donde la reductasa provee electrones con alto poder reductor para que la nitrogenasa pueda reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> (Ahemad y Kibret 2014).

Los microorganismos mejor adaptados a la vida libre suelen ser cianobacterias filamentosas y heterocísticas (Sprent et al. 1987). Las bacterias fijadoras de vida libre son afectadas fuertemente por los requerimientos de la nitrogenasa. La actividad de esta enzima depende de la concentración de oxígeno, de los metales constituyentes de la misma enzima (Fe, Va y/o Mo), disponibilidad de poder reductor y ATP y de la del nitrógeno. La fijación biológica de N<sub>2</sub> se ve inhibida ante la disponibilidad del elemento (Reed et al. 2011). A su vez, los metales pesados pueden estimular el proceso de fijación en bajas concentraciones y disminuirlo o inhibirlo en altas concentraciones (Baath 1989).

La fijación simbiótica de N<sub>2</sub> trae como resultado la liberación de H<sup>+</sup> al medio circundante, provocando la acidificación de la rizósfera. Esto contribuye a inmovilizar el As<sup>V</sup> en condiciones aerobias debido a la relación pH-solubilidad de la especie química mencionada (Fitz et al. 2002).

#### *Solubilización de fosfatos.*

Las plantas adquieren el P de la solución del suelo, en sus formas inorgánicas solubles como fosfatos mono y dibásicos (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-1</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) siendo óptima la disponibilidad del ion ortofosfórico a un pH de 6,5; fuera de este rango la precipitación de fosfatos de aluminio y calcio (formas insolubles) aumenta. Luego del N, el P representa un elemento crítico en la nutrición vegetal, este llega a conformar el 0,2% del peso seco de la planta y el 1,5 a 2,5% en bacterias. Su baja disponibilidad está relacionada con: la relativa escasez edáfica, elevada retención de la matriz del suelo, lenta y escasa reposición natural y su baja movilidad en relación a otros macronutrientes. Es capaz de formar enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de Fe, Al o Mn siendo menos solubles que los compuestos de P orgánico (Ahemad y Kibret 2014, Beltrán 2014).

El As y el P pertenecen al mismo grupo químico y tienen similares constantes de disociación de sus ácidos y solubilidades de sus sales, provocando que estos elementos tengan un comportamiento similar en los suelos. Es por este motivo, que el sistema de captación de fosfato de las plantas, constituye la vía de ingreso del As en forma de arseniato, implicando consecuentemente la interacción del metaloide con la nutrición de P de la planta (Fitz et al. 2002). En consecuencia, el As captado, participa en reacciones celulares y pasa a formar parte de compuestos órgano-arsenicales, en donde se ha encontrado que es capaz de reemplazar los grupos fosfatos del ADN.

Lo mismo ocurre para otros organismos como musgos, líquenes, hongos y bacterias (Carbonell et al. 1995).

De esta manera se ha demostrado que la adición de P a la solución del suelo disminuye la ingesta de As en plantas, mitigando los efectos fitotóxicos del mismo. Por el contrario, la presencia de P implica una competencia con el As por los sitios de adsorción en el suelo y por lo tanto aumentaría la biodisponibilidad del As. Este contra efecto se encuentra relacionado a las características mineralógicas del suelo (Fitz et al. 2002). De esta manera se ha encontrado que los óxidos de Mn, Fe y Ti y filosilicatos ricos en Fe son más efectivos en la sorción de  $\text{AsO}_4^{-3}$  que en el  $\text{PO}_4^{-3}$  (Violante y Pigna 2002).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos son un grupo funcional dentro de las PGPR, que comprenden bacterias, hongos y actinomicetes capaces de movilizar el fosfato insoluble desde la matriz mineral hasta la solución del suelo. Este puede ser absorbido por las raíces siendo las bacterias, los organismos predominantes en realizar este proceso. Se ha encontrado que en la rizósfera, las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) son más abundantes que en suelos no rizosféricos, en donde los exudados de las plantas suministran compuestos carbonados a estas últimas y a su vez las BSF facilitan la toma de P (Beltrán 2014).

Generalmente los géneros de BSF pueden solubilizar complejos de fosfato de calcio (Ca) y sólo una minoría los complejos asociados al Fe y Al. Algunos géneros en los que ha sido demostrada la función de solubilizar fosfatos son *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Ahemad y Kibret 2014, Beltrán 2014).

El proceso de solubilización microbiológica puede ocurrir mediante dos procesos, en donde ambas funciones pueden ser intrínsecas de una misma bacteria. Uno a través de la solubilización proveniente de fuentes inorgánicas y el otro por la mineralización a partir de fuentes orgánicas (ver figura nº 2). Este último ocurre como consecuencia de la acción de diferentes fosfatasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres fosforados (Ahemad y Kibret 2014).

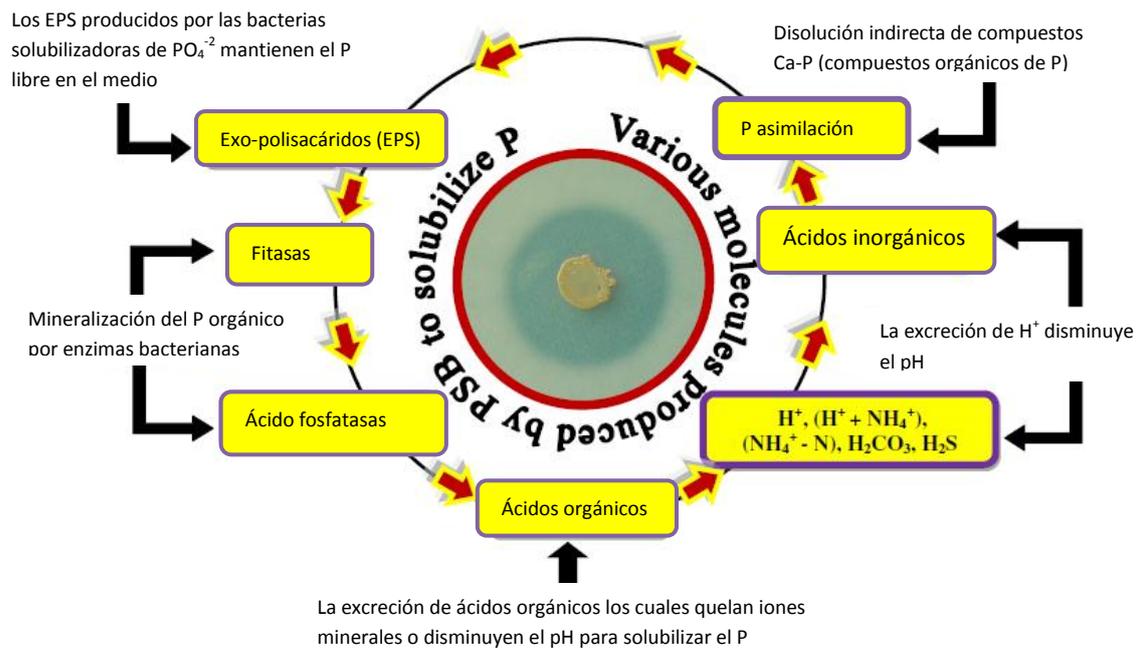


Figura 2: Sustancias orgánicas e inorgánicas producidas por BSF. Fuente: Ahemad y Kibret 2014.

Para fuentes inorgánicas de P, el principal mecanismo microbiológico de solubilización de fosfatos, implica una disminución en el pH del medio extracelular hasta valores de pH de 2 aproximadamente. Las BSF son capaces de bajar el pH gracias a la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, cuyas propiedades quelantes permiten la formación de complejos insolubles con los metales que retienen al P. Esto trae como resultado el desplazamiento y liberación de este último. En bacterias Gram negativas, estos ácidos son producidos en el periplasma, a través de la ruta de oxidación directa de la glucosa. Las enzimas implicadas en esta ruta, quinoproteínas (quinoproteína glucosa deshidrogenasa y glucanato deshidrogenasa) participan en la generación de la fuerza motriz de protones y son capaces de oxidar sustratos en el espacio periplasmático, provocando la difusión de ácidos orgánicos hacia el exterior. La solubilización por ácidos orgánicos, puede ocurrir por medio de dos mecanismos estudiados, de los cuales uno consiste en el intercambio de los protones del ácido por el P retenido en la superficie de los minerales, como el  $\text{Al}(\text{OH})_3$  y el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . El otro mecanismo depende de la cantidad y el tipo de ácido producido y consiste en un proceso de quelación de los cationes unidos al fosfato convirtiéndolo a una forma más soluble (Beltrán 2014).

La indisponibilidad del P induce la actividad de estas enzimas y el ácido glucónico es el que se encuentra más generalizado en las BSF. Otros que han sido registrados son los ácidos cítrico, láctico, acético, malónico, indolacético, oxálico, butírico, succínico, fumárico y glicónico (Beltrán 2014).

La capacidad de solubilizar fosfatos se encuentra relacionada con la naturaleza de la fuente de N, del contenido de potasio (K), del pH y de la mineralogía del suelo. En los casos en los que la fuente de N predominante son las sales de amonio las tasas de solubilización son mayores que en los casos con nitratos, eso puede explicarse por la extrusión de protones que compensan la toma de amonio y reducen el pH extracelular (Ahemad y Kibret 2014).

### Producción de Sideróforos.

El hierro (Fe), a pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (5%) no se encuentra generalmente en sus formas disponibles para los organismos vivos, especialmente en suelos calcáreos (Tarbuck y Lutgens 2010, Lamanceau et al. 2009). La concentración de Fe en la solución del suelo es de aproximadamente  $10^{-18}$  M. En donde los rangos de concentración de este elemento para un óptimo crecimiento, para las planta es de  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M y para microorganismos es de  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M (Guerinot y Yi 1994, Joyce y Buyer 1991). Una de las estrategias de plantas y bacterias para aumentar la absorción del hierro es la producción de fitosideróforos y sideróforos respectivamente.

Tanto para plantas como bacterias, el Fe es un elemento esencial (Gram 1996, Neiland et al. 1995). Constituye todas las enzimas hemo (que incluyen citocromos y hidroxiperoxidasas), ribonucleotido reductasa, proteínas sulfoferrosas y nitrogenasas (Bagg y Neilands 1987). Además es esencial en el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico en el cual se encuentra involucrado en la síntesis del complejo enzimático (nitrogenasa, leghemoglobina, ferredoxinas, hidrogenasas y citocromos). En consecuencia, la deficiencia de Fe afecta la fijación simbiótica de N (Berraho et al. 1997).

Otra función de importancia del Fe es el rol que cumple en la defensa contra el estrés oxidativo constituyendo núcleos activos de enzimas antioxidantes. Por el contrario, el Fe libre, actúa como catalizador en la degradación de moléculas orgánicas (lípidos, proteínas, ADN), por la denominada reacción Fenton en la que se producen radicales libres de oxígeno de alta reactividad (Lamanceau et al. 2009, Guerinot y Yi 1994).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular de 0,5 a 1 kDa (Aguado et al. 2012), de alta afinidad por el  $Fe^{+3}$  producidos por microorganismos y plantas que contribuyen en la toma de este elemento en ambientes de baja disponibilidad (Lamanceau et al. 2009, Frioni 2005, Neiland et al. 1995, Joyce y Buyer 1991). Estos poseen la capacidad de complejarse con metales (Schalk et al. 2011).

Se conocen más de 500 tipos de sideróforos (Ahmed y Holmstrom 2014, Ali et al. 2013, Schalk et al. 2011) y la afinidad del mismo por el Fe es representada generalmente por la *constante de estabilidad*. Sin embargo, esta constante, no refleja la cantidad de protones perdidos por el ligando en el proceso de quelación y no es suficientemente representativo para juzgar la habilidad del ligando para competir con otros en la toma del elemento. El proceso de quelación puede describirse mediante la siguiente ecuación, pH dependiente (Joyce y Buyer 1991):



Algunas bacterias producen solo una clase de sideróforos, otras secretan diversos tipos que las hacen más eficientes para colonizar diferentes ambientes (Aguado et al. 2012, Lamanceau et al. 2009). *Pseudomonas* (Ventury et al. 1995) y *Escherichia coli* (Bagg y Neilands 1987) se conoce que producen diversos tipos. Se han encontrado que numerosos géneros de bacterias fijadoras de N atmosférico, son también productoras de sideróforos (Aguado et al. 2012, Joyce y Buyer 1991), tales como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Ali y Vidhale 2013).

La producción de sideróforos, en plantas y bacterias, se ve estimulada por la limitación del Fe, como así también la síntesis de receptores de membrana (Aguado et al. 2012, Fioni 2005). La síntesis se encuentra regulada por una proteína represora dependiente de  $\text{Fe}^{+2}$  (Aguado et al. 2012).

A su vez, las bacterias producen proteínas de la membrana externa (outer membrane proteins, OMPs) que actúan como receptores del complejo Fe-sideróforo. Este sistema de regulación de la entrada de Fe es de gran importancia, ya que el exceso de Fe puede producir daños en moléculas orgánicas (Gram 1996, Joyce y Buyer 1991).

Las plantas, captan este micronutriente de la solución del suelo preferentemente como  $\text{Fe}^{+2}$ , el cual se encuentra en escasa disponibilidad en un suelo de pH neutro (Colombo et al. 2014, Guerinot y Yi 1994). Estas, enfrentan el problema por medio de dos estrategias generales (ver figura nº 3): la estrategia I (dicotiledóneas y monocotiledóneas a excepción de las gramíneas) que consiste en la reducción externa del  $\text{Fe}^{+3}$  y la posterior inducción del sistema de transporte de  $\text{Fe}^{+2}$  en la membrana plasmática y la estrategia II (gramíneas) consiste en la producción de fitosideróforos. La liberación de estas moléculas sigue un ritmo diurno y se activa con las concentraciones limitantes del Fe (Davenport et al. 2015, Ahmed y Holmstrom 2014, Colombo et al. 2014, Aguado et al. 2012, Lamanceau et al. 2009, Guerinot y Yi 1994).

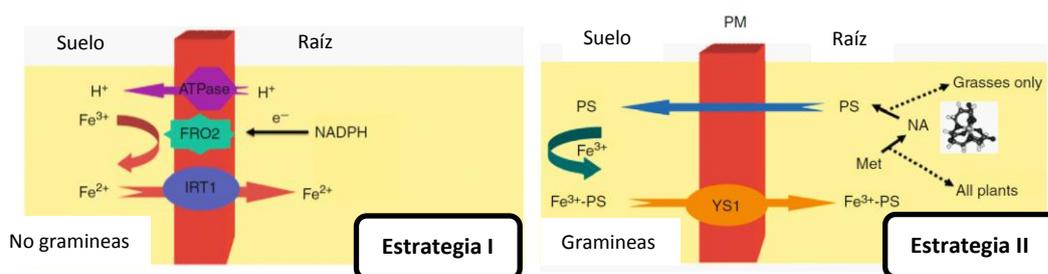


Figura 3: Estrategia I y II en plantas. Fuente: Lamanceau et al. 2009.

Existen estudios que sustentan que las plantas de estrategia I y II, utilizan los sideróforos bacterianos indirectamente a través de la reducción del complejo  $\text{Fe}^{+3}$ -sideróforo y por el intercambio de ligandos con los fitosideróforos, respectivamente. En algunos casos, las plantas pueden aprovechar de manera eficiente los sideróforos microbianos, pero son sus propios queladores de hierro, los que principalmente les permiten sobrevivir en suelos con baja disponibilidad del micronutriente (Aguado et al. 2012). Los fitosideróforos, en comparación con los microbianos, poseen una afinidad relativamente menor por el Fe, menor diversidad de formas y tamaño (Aguado et al. 2012, Guerinot y Yi 1994).

Contrariamente, los complejos  $\text{Fe}^{+3}$ -fitosideróforo son una buena fuente de Fe y carbono (C) para las bacterias (Guerinot y Yi 1994). Las interacciones entre los dos tipos de queladores, dependen de su afinidad hacia el Fe y de sus concentraciones relativas. En este sentido, la abundancia relativa de los fitosideróforos de gramíneas es mayor en el ápice radical durante el día y pueden incluso remover Fe de los complejos microbianos (Aguado et al. 2012, Guerinot y Yi 1994).

#### Estrés oxidativo: As.

Los organismos producen constantemente radicales libres y no solamente por la presencia de metales libres. Estos presentan mecanismos por medio de los cuales se protegen del estrés

oxidativo, por la acción de compuestos antioxidantes y quelantes que permiten que el elemento no se encuentre en su forma libre dentro del organismo. A su vez, el Fe forma parte de núcleos activos de enzimas antioxidantes que reducen al radical libre convirtiéndolo en una especie de baja toxicidad o actuando como catalizadores de reacciones que tienen como sustrato a estas especies químicas de alta reactividad (Adjimani y Asare 2015, Mayor 2010).

En las plantas, el etileno es un regulador del crecimiento, que es característicos de situaciones de estrés, ya sea salino, hídrico (sequía o anegamiento), oxidativo o patogénico. Se encuentra estudiado que las bacterias PGPR pueden aliviar los efectos producidos por diferentes estreses (García et al. 2015, Cohen et al. 2014, Diby y Sudha 2008). El 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) es un precursor del etileno y existen PGPR que poseen la enzima ACC deaminasa que lo hidrolizan a 2-oxobutanato de amonio y hacen descender los niveles de etileno y reducir por lo tanto los efectos del estrés (ver figura nº 4). Además se ha encontrado que plantas sometidas a un estrés oxidativo han aumentado su actividad enzimática antioxidante luego de ser inoculadas con bacterias PGPR (Islam et al. 2014). Alguno de los géneros a los que se les conoce esta función son: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* y *Rhizobium* (Ahemad y Kibret 2014, Rajkumar et al. 2009).

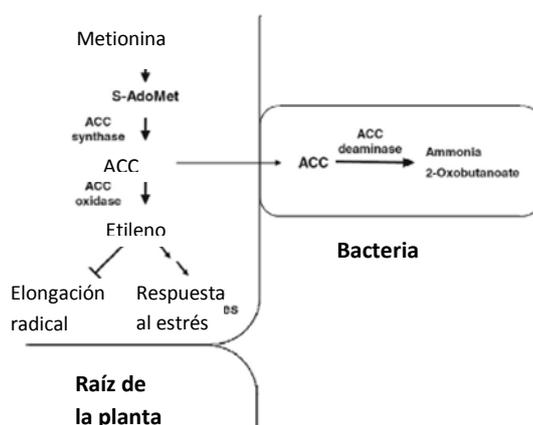


Figura 4: Mecanismo de control del estrés en plantas a través de la ACC deaminasa de bacterias. Fuente: Ahemad y Kibret 2014.

### Tolerantes.

Existen mecanismos a partir de los cuales los microorganismos interactúan con los metales estos son: la sorción biológica y química, la biolixiviación, biotransformación, biodegradación de agentes quelantes, biomineralización y bioacumulación (ver figura nº 5) (Tabak et al. 2005).

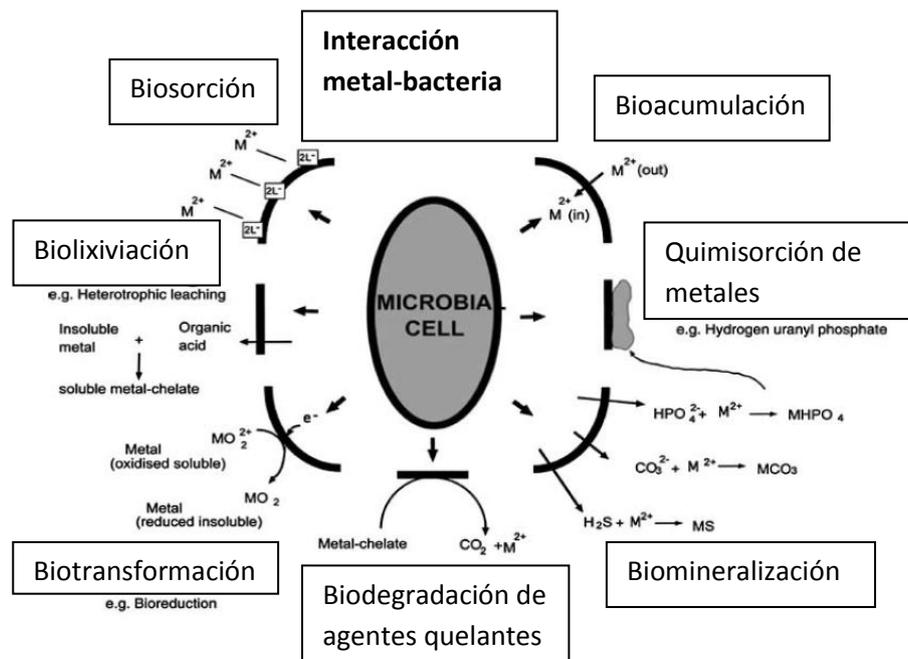


Figura 5: Mecanismos de interacción de las bacterias con metales. Fuente: Tabak et al. 2005.

Los mecanismos a partir de los cuales las bacterias toleran la ingesta de metales pesados consisten en la inmovilización-movilización y transformación de los iones metálicos. Estos mecanismos son: exclusión del ion metálico de los órganos target, extrusión en donde este es eliminado de la célula por medio de los plástidos, formación de complejos, biotransformación y la metilación-desmetilación. Estos mecanismos pueden ser inducidos o constitutivos. Los mecanismos de resistencia están codificados en el ADN de los plásmidos y transposones (Khan et al. 2009).

Con el fin de evitar los efectos deletéreos del estrés oxidativo, causado por metales pesados, en primer lugar, los microorganismos producen enzimas antioxidantes capaces de transformar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otro lado, poseen mecanismos para tolerar la ingesta de metales pesados estos son la expulsión del metal al exterior de la célula, la acumulación y compartimentación del ion metálico dentro de la célula y la transformación del metal a especies químicas menos tóxicas (Khan et al. 2009).

La tolerancia es la habilidad de hacer frente a la toxicidad causada por metales por medio de propiedades intrínsecas de los organismos mientras que la resistencia es la habilidad de sobrevivir en concentraciones tóxicas del metal por mecanismos de detoxificación, activados por la respuesta directa a la presencia de metales pesados (Khan et al. 2009).

El mecanismo de resistencia a As más distribuido entre los microorganismos es la expulsión del arsénico al medio, el cual consta de un sistema de proteínas codificado en plásmidos o cromosomas y el cual se conoce como operón *ars*. La expulsión se realiza en forma de arsenito, sin embargo, este sistema confiere resistencia a ambos iones al reducir previamente al arseniato por medio de una proteína arseniato reductasa (Ars C). El arsenito es expulsado por un complejo formado por una proteína interna de membrana, Ars B, en donde otra proteína hidrofílica asociada a la membrana (Ars A), aporta la energía de transporte. Existen numerosas variantes homólogas del operón *ars*, en algunos casos estos operones carecen del gen para la ATPasa, Ars A. En estos casos, la energía de transporte es aportada por un proceso quimiosmótico impulsado por el potencial eléctrico de transmembrana producido en la cadena respiratoria (Ghosh et al. 2015, Cervantes et al. 2006).

La transformación del As dentro del microorganismo consiste en 3 metilaciones, los productos de este proceso se consideran de baja toxicidad. De esta manera cada metilación requiere de la reducción de  $As^V$  a  $As^{III}$ , en donde la S-adenosilmetionina actúa como donador de los grupos metilo y la glutatión reductasa como agente reductor y transportador de As (Albores et al. 1997).

En las plantas la adición de nutrientes puede afectar la ingesta de metales por competencia por los sitios de fijación y vías de captación de nutrientes de las raíces. De esta manera, el fosfato actúa como inhibidor competitivo en la toma de arseniato. La adición de nitrato de amonio y fosfato de calcio son las fertilizaciones que producen los niveles de As disponible más bajos y los menores residuos y efectos deletéreos de As en plantas (Carbonell et al. 1995).

El nivel de As que produce efectos perjudiciales para las plantas es  $5mg\ kg^{-1}$  para especies sensibles y  $50mg\ Kg^{-1}$  para tolerantes (Carbonell et al. 1995). Bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Rhizobium sp.* han mostrado tolerancia a diferentes concentraciones de As (Mandal et al. 2008).

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

El **objetivo general** del trabajo fue seleccionar bacterias aisladas de rizósfera y raíces de vid de Jáchal, San Juan, en base a la resistencia a  $As^{III}$  y a la capacidad de promover el crecimiento vegetal.

Los objetivos particulares fueron:

1. Seleccionar bacterias en base a su tolerancia a  $As^{III}$ .
2. Seleccionar bacterias tolerantes a  $As^{III}$  con propiedades PGPR.
3. Determinar la capacidad de las bacterias seleccionadas de promover el crecimiento de plantas de vid *in vitro*.

Como **hipótesis** del trabajo se estableció que, bacterias tolerantes a  $As^{III}$  con capacidad de promover el crecimiento vegetal son capaces de reducir los efectos fitotóxicos del As sobre el crecimiento de plantas de vid.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó con bacterias previamente aisladas de rizósfera y raíces de vid, en cultivos de pequeñas fincas en zonas aledañas al río Jáchal, San Juan. Una vez en el laboratorio, las bacterias, fueron agrupadas según las similitudes morfológicas. Se realizó una selección de bacterias según sus tolerancias a As y se determinaron sus capacidades PGPR. En este trabajo cada bacteria aislada, fue identificada con una letra para indicar su procedencia (S: bacterias aisladas de rizósfera y R: bacterias aisladas de raíces) y un número.

Las bacterias fueron mantenidas en tubos Eppendorf de 1 mL con medio Luria Broth (LB, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), conservados en heladera. El medio LB se preparó al 1,5%, es decir 1,5 g de LB en 100 mL de agua destilada. Para reproducir el cultivo, se colocó el contenido del tubo conservado con la bacteria en un Erlenmeyer de 50 mL con 10 mL de medio LB líquido. Todo esto se realizó en flujo laminar bajo condiciones asépticas y luego fue colocado en agitación a 28 °C por 24 horas a 140 rpm. El 23% de las bacterias aisladas de rizósfera y el 15% de las de raíz, no pudieron ser reproducidas a partir de los tubos conservados.

### Selección de bacterias tolerantes a As con capacidad PGPR.

La selección se realizó en placas de *Petri* de 5 cm de diámetro con medio sólido LB 1,5% y concentraciones crecientes de NaAsO<sub>2</sub> (0; 5; 10; 20 y 30 mM a pH 8). Cada bacteria fue sembrada en dos cajas de Petri con 3 alícuotas de 5 µL de cultivo líquido LB. A su vez, en cada placa se sembraron, 2 cepas bacterianas (ver figura nº 6) y se incubaron a 28 °C durante 72 horas. El cultivo líquido se realizó en Erlenmeyer de 50mL al que se le colocaron 10 mL de medio LB 1,5% y se incubaron durante 24 h a 28 °C y 140 rpm. Las bacterias que resultaron tolerantes a 30mM de As fueron seleccionadas para realizar los posteriores estudios.

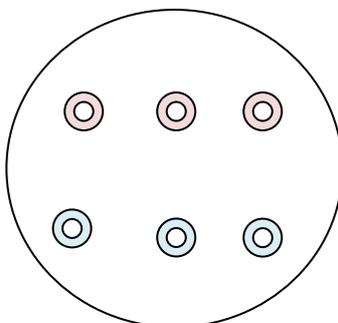


Figura 6 Placa de *Petri* con dos cepas bacterianas y sus respectivas alícuotas.

### Tinción de Gram (Hucker).

Se realizó la tinción de Gram a las cepas aisladas a partir de cultivo líquido, para evaluar las características de la pared celular y clasificarlas en Gram positivas G (+) o negativas G (-), de acuerdo al protocolo del kit para determinar Gram (Britania 2 minutos, Argentina). El mismo consta de 4 soluciones: violeta de genciana, lugol, decolorante (mezcla alcohol/acetona: 70,5/29,5) y safranina, listas para usar, a excepción del lugol que debe ser diluido 1/10.

1. Preparación del extendido.

En primer lugar, se partió del cultivo de las bacterias en medio líquido LB. Luego se preparó el extendido colocando una pequeña gota de agua destilada sobre el portaobjetos y frotando sobre ella un ansa con una pequeña cantidad de cultivo de cada bacteria. El extendido fue secado en la columna de aire caliente del mechero. Una vez seco se fija el extendido, pasando el portaobjetos (del lado que no tiene la preparación) 3 veces sobre la llama del mechero. Luego se lava con un chorro fino de agua durante 10 segundos.

## 2. Coloración.

- Se cubrió el extendido con Violeta de Genciana, se dejó actuar 20 segundos.
- Se lavó con agua por 10 segundos.
- Se cubrió con Lugol y se dejó por 30 segundos.
- Se lavó con agua por 10 segundos.
- Se cubrió con decolorante por 10 segundos.
- Se lavó con agua por 10 segundos.
- Se cubrió con Safranina por 20 segundos.
- Se lavó con agua por 10 segundos y se dejó secar.

## 3. Observación.

Una vez secos los portaobjetos, se colocó sobre el extendido una gota de aceite de inmersión para observar en el microscopio óptico con el aumento 100X. Las bacterias G (+) se visualizaron de color violeta y las G (-) de color rosado.

### *Fijación biológica de nitrógeno.*

Para la prueba de FBN se partió de los cultivos bacterianos en Erlenmeyer de 25 mL con 10 mL de medio LB líquido. Se extrajo 1 mL de cultivo en fase exponencial y a continuación se centrifugó en tubos de plástico de 1,5 mL durante tres minutos a 10000 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se acondicionó con solución fisiológica. El proceso de centrifugado y lavado fue repetido dos veces. Luego, se sembraron las bacterias en el medio libre nitrógeno (NFB) a concentraciones crecientes de  $As^{III}$  ( $NaAsO_2$ ), 0, 2, 5 y 10 mM.

La técnica de FBN, se realizó de acuerdo a Döbereiner (1995) utilizando el medio NFB. Para la preparación del medio, cada droga se agregó en el orden en que aparecen en la tabla N° 8 del anexo y se disolvieron a medida que se incorporaron. Se ajustó el pH a 6,8-6,5 con Na(OH), se incorporó el agar al 1,5 % y se autoclavó a 1 atm por 20 min para luego, ser dosificado en las placas de Petri de 5 cm de diámetro.

Se colocaron 3 alícuotas de 5  $\mu$ L de cultivo líquido de cada bacteria por duplicado, previamente centrifugado y resuspendido ( $1 \cdot 10^7$  UFC  $mL^{-1}$ ). Se verificó el crecimiento de colonia, con el correspondiente viraje del color del medio sólido. Se consideraron (+) las bacterias que mostraron crecimiento y viraje de color en las 3 alícuotas de la placa de Petri y (-) las que no mostraron crecimiento ni viraje de color en las 3 alícuotas de la caja de Petri.

### *Solubilización de fosfato.*

Para la prueba de solubilización de fosfatos se partió de los cultivos bacterianos en Erlenmeyer de 25 mL con 10 mL de medio LB líquido. Se extrajo 1 mL de cultivo en fase exponencial y a

continuación se centrifugó en tubos de plástico de 1,5 mL durante tres minutos a 10000 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet bacteriano se acondicionó con solución fisiológica. El proceso de centrifugado y lavado fue repetido dos veces. Luego, se sembraron las bacterias en el medio de solubilización de fosfatos a concentraciones crecientes de  $As^{III}$ , 0, 2, 5 y 10 mM. Posteriormente se realizó el análisis estadístico.

La capacidad de solubilizar fosfatos se realizó de acuerdo a Nautiyal (1999). Las drogas y soluciones utilizadas pueden consultarse en el anexo correspondiente. Se ajustó el pH a 7 con  $K(OH)$ , se colocó el agar al 1,5 % y se autoclavó a 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, se dosificó en las cajas de Petri de 5 cm y se dejó enfriar. Como resultado se obtuvo un medio blanco opaco, que al cultivar una bacteria solubilizadora de fosfatos se visibiliza un halo transparente.

Se colocaron 3 alícuotas de 5  $\mu L$  de cultivo líquido de cada bacteria por duplicado, previamente centrifugado y resuspendido ( $1 \cdot 10^7$  UFC  $mL^{-1}$ ). Los medios presentaron concentraciones crecientes de 0, 2, 5 y 10 mM de  $As^{III}$  ( $NaAsO_2$ ).

Se registró el diámetro de colonia y el halo formado a los 12 días de iniciado el ensayo en los tratamientos testigo y de concentraciones crecientes de  $As^{III}$ . El diámetro de halo fue dividido por el diámetro de colonia, obteniéndose un valor relativo, adimensional, del tamaño de halo formado en relación al tamaño de colonia.

#### **Producción de sideróforos.**

La producción de sideróforos se determinó en base a la técnica Chrome Azurol S-agar (CAS-AGAR) (Milagres et al. 1999), con modificaciones de Funes Pinter et al. (2016) para evitar el efecto biocida del reactivo HDTMA.

La preparación del medio CAS, consta de 4 soluciones (ver anexo). Una vez preparadas las mismas, la solución N° 2 se mezcló con la N° 1 y posteriormente se agregó la solución N° 3 de HDTMA para luego autoclavarlas por separado de la solución N° 4 a 1 atm por 20 min.

La solución N° 4, se le reguló el pH a 8 con  $Na(OH)$  obteniéndose una solución azul y se incorporó el agar al 1,5 %. Se llevó a autoclave y una vez finalizado este proceso se mezclaron las dos soluciones bajo campana para dosificar en las placas de Petri.

Se utilizaron placas de *Petri* de 5 cm, donde se colocó una capa inferior de 3,5 mL de medio CAS-Agar y una superior con 3,5 mL de medio LB sólido al 1,5 %, a pH 8. La adición de  $NaAsO_2$  fue en concentraciones crecientes, 0, 2, 5 y 10 mM en el medio LB sólido. Se determinó el diámetro de colonia y halo formado a los 12 días de iniciado el ensayo. Con estos datos se dividió el diámetro de halo por el diámetro de colonia, obteniéndose un valor relativo, adimensional, del tamaño de halo formado en relación al tamaño de colonia. Posteriormente se realizó el análisis estadístico.

El medio no posee Fe libre disponible para el microorganismo, sino que el elemento se encuentra formando un complejo de EDTA-Fe-HDTMA. Por lo tanto, la captación del Fe del medio, es realizada por ligandos que poseen una afinidad mayor por el elemento que el complejo EDTA-Fe-HDTMA. En el caso de que la afinidad sea menor, el ligando producido debe encontrarse en mayor abundancia relativa para producir el viraje de color del medio (Schwyn y Neilands 1987).

### Ensayo *in vitro*.

Este estudio se realizó en plantas *in vitro* de *Vitis vinifera* var. Malbec. El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962; ver anexo). Cada tratamiento estuvo compuesto por 7 plantas (n=7).

Para la preparación del medio, se colocaron todas las drogas (ver anexo), se enrazó a un litro y se corrigió el pH a 6,2-6,3 con K(OH). Se agregó 7,5 g de agar por litro y se llevó a autoclave a 0,5 atm por 10 min para fundir el agar. Una vez terminado este proceso se dosificaron 70 mL en frascos de 500 g, se cerraron y volvieron a autoclavarse a 1 atm por 20 min.

De las plantas con las que se contó inicialmente, se realizaron dos repiques para lograr la cantidad de plantas deseadas. Los repiques se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar, bajo condiciones asépticas, se extrajeron estacas de las plantas originales las cuales contaban con dos nudos. Al nudo inferior se le quitó la hoja con peciolo, posteriormente se colocó en un frasco estéril con medio sólido MS, corroborando que el nudo inferior quede sumergido en el medio. Por último, se selló el frasco con doble celite.

Las plantas *in vitro* se mantuvieron en una cámara de crecimiento, a  $25 \pm 2$  °C, bajo lámparas fluorescentes ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). A los 15 días de haber realizado el segundo repique, se agruparon y etiquetaron 7 plantas por tratamientos que fueran de tamaño similar. Luego, se inocularon las plantas con las bacterias seleccionadas y el consorcio conformado por estas mismas, (con 10  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano en medio LB líquido) en el cuello de la planta. A las plantas con los tratamientos de  $\text{As}^{\text{III}}$  se agregó con pipeta automática en los próximos 5 días, una dosis de 15  $\mu\text{L}$  de solución 1M de  $\text{As}^{\text{III}}$ , dosificado en 3 gotas de 5  $\mu\text{L}$  cada una, sobre el medio MS para obtener una concentración final de 200  $\mu\text{M}$  de As. El ensayo finalizó cuando una de las plantas rozó el celite (aproximadamente 40 días).

En esa fecha, se registraron los siguientes parámetros de crecimiento: longitud de tallo y raíz (cm), número de hojas y peso fresco aéreo y de raíz (g) de cada planta. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico.

### Análisis estadísticos.

Con los datos de los ensayos de solubilización de fosfatos, producción de sideróforos e *in vitro* se les realizaron ADEVA. Se utilizó como método de comparación LSD de Fisher con un nivel de significancia del 0,05 a través del software InfoStat (versión 2016e; Grupo InfoStat, FCA Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

En los ensayos de solubilización de fosfatos y producción de sideróforos se realizaron dos ADEVA en cada uno. Uno con partición datos, haciendo diferencia entre bacterias de rizósfera y raíz y otro sin partición de datos que en los resultados se cita como “Comparación”.

En el ensayo *in vitro*, se realizó un ADEVA por cada variable medida: longitud de tallo, raíz y planta, nº de hojas, peso fresco aéreo y radical.

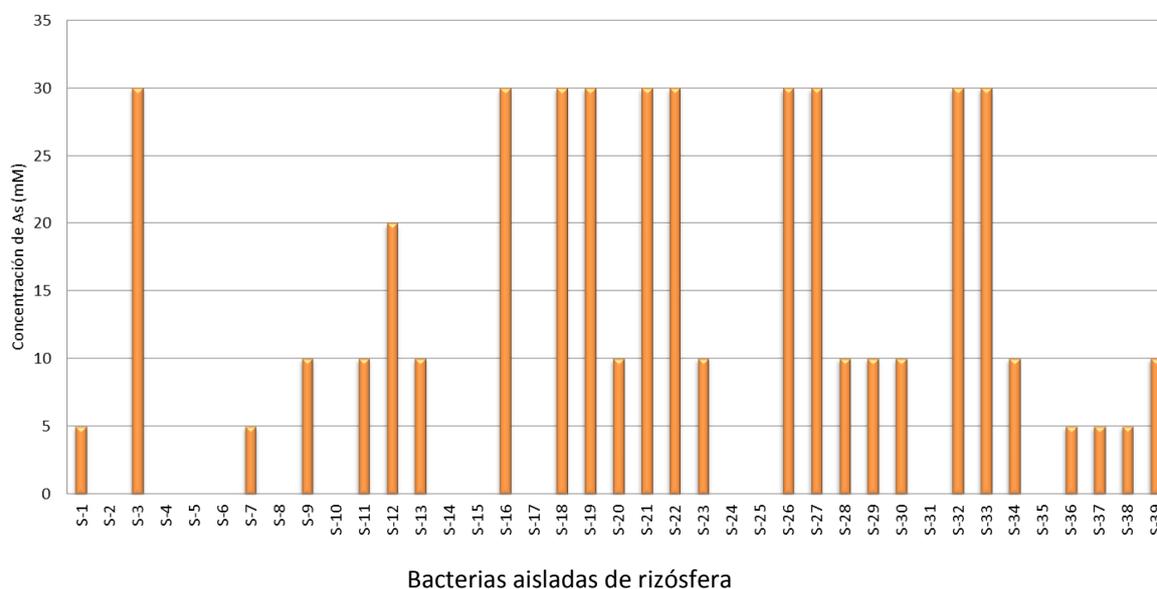
Con los resultados obtenidos de los análisis estadísticos se realizaron gráficos de barras, cada una con letras asignadas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

## RESULTADOS.

### Selección de bacterias en base a la tolerancia a $As^{III}$ .

Se aislaron 99 tipos de bacterias de las cuáles 39 procedían de la rizósfera y 60 de raíces de vid y plantas autóctonas (ver figura nº 7 y 8). A 30 mM de  $As^{III}$ , 10 las bacterias rizosféricas resultaron ser tolerantes (26%). Mientras que 9 de las bacterias de raíces, resultaron tolerantes (15%). El 67% de bacterias aisladas de rizósfera y el 68% de las de raíces, fueron tolerantes a la menor concentración de  $As^{III}$  aplicada (5 mM) (ver figura nº 9).

**Tolerancia a concentraciones de 0, 5, 10, 20 y 30 mM de  $As$  en bacterias de rizósfera.**



**Figura 7: Tolerancia de bacterias de rizósfera (S) a  $As^{III}$ . Las bacterias: S-2 S-4, S-14, S-25, S-31 y S-35 crecieron en el tratamiento testigo y no en los de arsénico. Las bacterias: S-5, S-6, S-8, S-10, S-15, S-17 y S-24, no pudieron ser reproducidas por el método utilizado. S-2 y S-14**

Tolerancia a concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mM de As en bacterias de raíz.

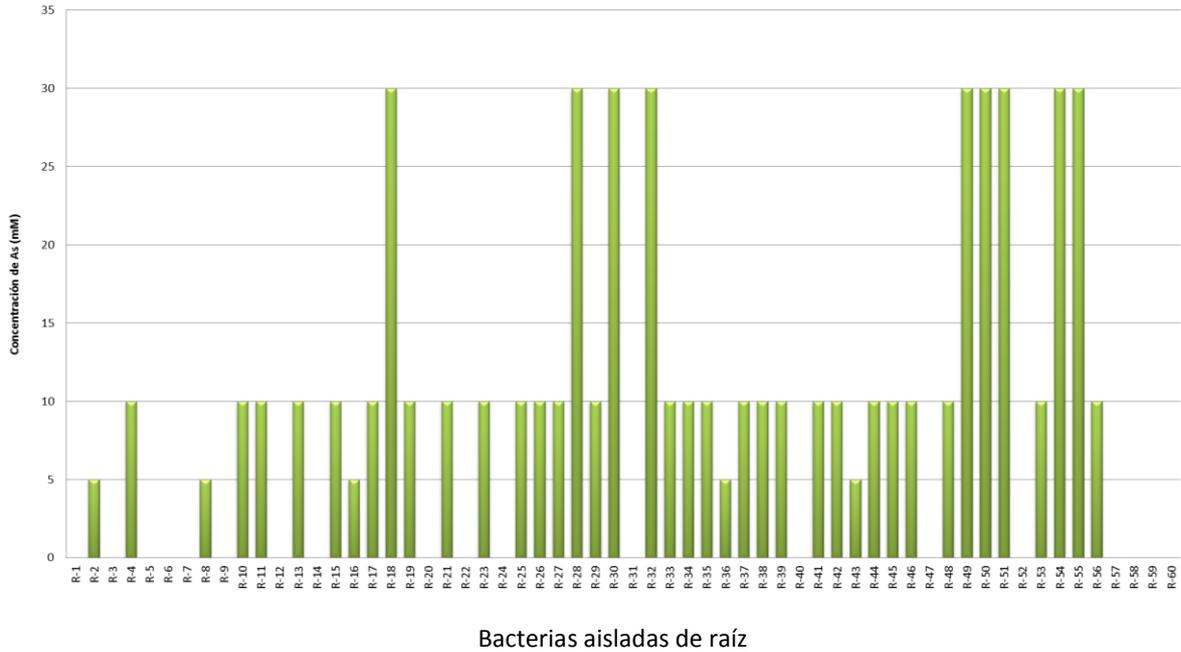
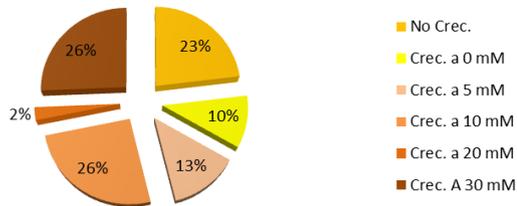


Figura 8: Tolerancia de bacterias de raíz (R) a As<sup>III</sup>. Las bacterias: R-3, R-6, R-9, R-12, R-20, R-24, R-31, R-40, R-47 y R-52, crecieron en el tratamiento testigo y no en los de arsénico. Las bacterias 1, 5, 7, 14, 22, 57, 58, 59, 60 no pudieron ser reproducidas por el método utilizado.

Rizósfera: % de cepas resistentes en función de la concentración de As.



Raíz: % de de cepas resistentes en función de las concetraciones de As

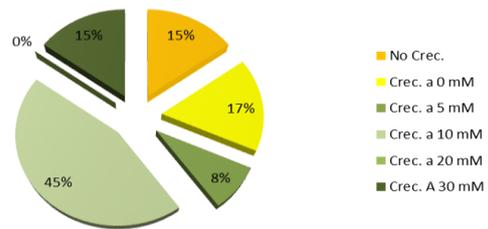


Figura 9: Porcentaje (%) de bacterias aisladas de la rizósfera y de raíces resistentes a las diferentes concentraciones de As<sup>III</sup> (0, 5, 10, 20 y 30 mM).

### Tinción de Gram.

Las bacterias que resultaron tolerantes a 30mM de As fueron seleccionadas para realizar los posteriores estudios. En las bacterias aisladas de raíces, el 55% resultaron ser Gram positiva, y el restante 45% fueron Gram negativas. En cambio, en las bacterias aisladas a partir de la rizósfera, se obtuvo que el 87,5% son Gram positivas y el restante 12,5 negativas (ver tabla nº 3 y 4).

Tabla 3: Tinción de Gram de bacterias aisladas de raíces de vid de Jachal, San Juan.

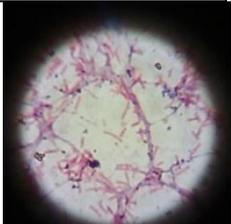
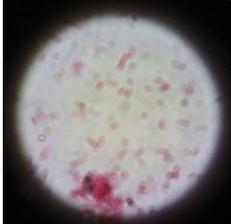
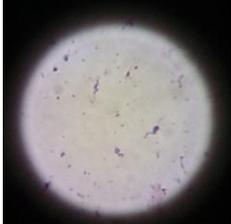
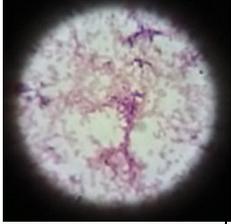
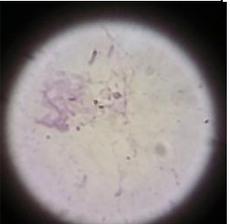
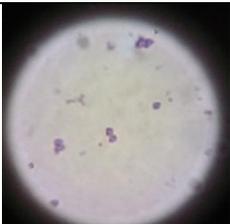
RAIZ					
Bacteria	Gram		Bacteria	Gram	
R18	+		R50	-	
R28	+		R51	-	
R30	-		R54	+	
R32	+		R55	+	
R49	-				

Tabla 4: Tinción de Gram (+/-) de bacterias aisladas de rizósfera de vid de Jáchal, San Juan.

RIZOSFERA					
Bacteria	Gram		Bacteria	Gram	
S12	-		S26	+	
S16	+		S27	+	
S21	+		S32	+	
S22	+		S33	+	

### Fijación de Nitrógeno.

Todas las bacterias (de rizósfera y raíces) evaluadas, a excepción de S-32, fueron capaces de fijar N atmosférico en ausencia de arsénico (ver tabla nº 5). El 90% de las bacterias de rizósfera realizaron fijación biológica de nitrógeno (FBN) en ausencia de As<sup>III</sup>, además esta relación se mantuvo en las concentraciones crecientes de As<sup>III</sup> (2, 5 y 10 mM).

En cuanto a las bacterias aisladas de raíces, todas resultaron FBN tanto en ausencia de As como a 2 mM de As. A partir de 5 y 10 mM de As<sup>III</sup>, el porcentaje de bacterias con capacidad FBN, disminuyó a 77 y 55% respectivamente (ver tabla nº 5).

Tabla 5: Resultados fijación de Nitrógeno atmosférico.

RIZÓSFERA					RAIZ				
Fijación de N <sub>2</sub> atmosférico*					Fijación de N <sub>2</sub> atmosférico*				
Grupo Rizósfera	Testigo	2 mM As	5 mM As	10 mM As	Grupo Raíz	Testigo	2 mM As	5 mM As	10 mM As
S-3	++	++	++	++	R-18	++	++	--	--
S-16	++	++	++	++	R-28	++	++	++	--
S-18	++	++	++	++	R-30	++	++	++	++
S-19	++	++	++	++	R-32	++	++	++	--
S-21	++	++	++	++	R-49	++	++	++	++
S-22	++	++	++	++	R-50	++	++	--	--
S-26	++	++	++	++	R-51	++	++	++	++
S-27	++	++	++	++	R-54	++	++	++	++
S-32	--	--	--	--	R-55	++	++	++	++
S-33	++	++	++	++	%FBN**	100	100	77	55
%FBN**	90	90	90	90					

\* Cada celda contiene dos símbolos, que corresponden a las dos repeticiones. El símbolo + indica el crecimiento y viraje de color del medio NFB y - indica ausencia de crecimiento. \*\* %FBN: porcentaje de bacterias que realizaron FBN por cada tratamiento.

### Solubilización de fosfatos.

#### *Bacterias Rizosféricas.*

El 70% de las bacterias de rizósfera solubilizaron fosfatos en ausencia de As y todas las que fueron capaces de solubilizar fosfatos no se vieron afectadas significativamente en los tratamientos de 2 y 5 mM de As<sup>III</sup>. Las bacterias que no mostraron esta capacidad son: S-26 y S-27.

Los resultados obtenidos a partir del ANOVA, indican que las bacterias S-21 y S-16 fueron las que arrojaron los valores medios más elevados en cuanto a la producción de halo (tanto presencia como en ausencia de As) que se traduce en la solubilización de los grupos fosfatos (figura nº 10).

## Producción de halo en bacterias de Rizósfera.

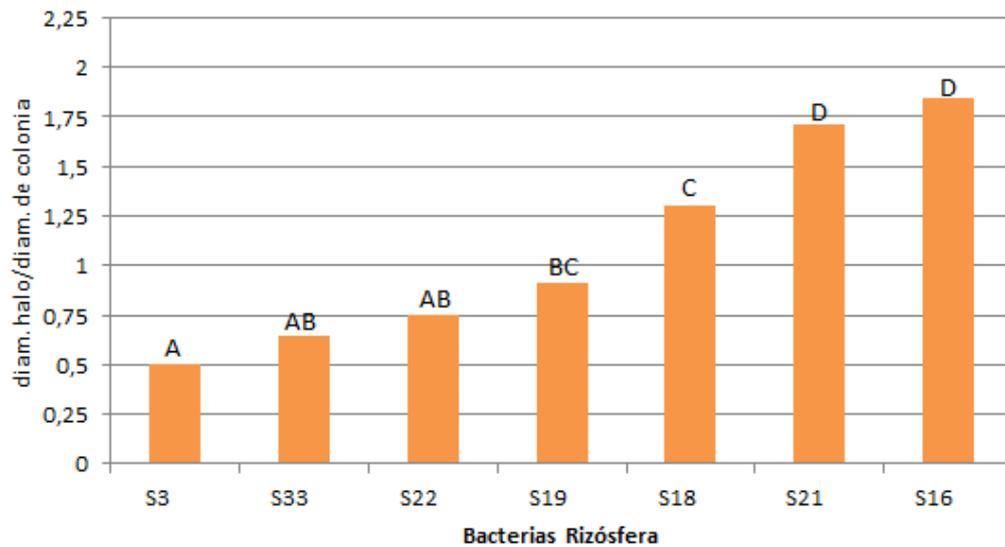


Figura 10: Solubilización de fosfatos en bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada una de las bacterias de rizósfera. Error Estándar (E.E.): 0,14. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Considerando el total de las bacterias de rizósfera que solubilizaron fosfatos, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos: 2 mM, 5 mM As y el testigo. Sin embargo, se diferenciaron significativamente del tratamiento 10 mM As, observándose una disminución en la producción de halo (figura nº 11).

## Producción de halo en función de la concentraciones de As en bacterias de Rizósfera.

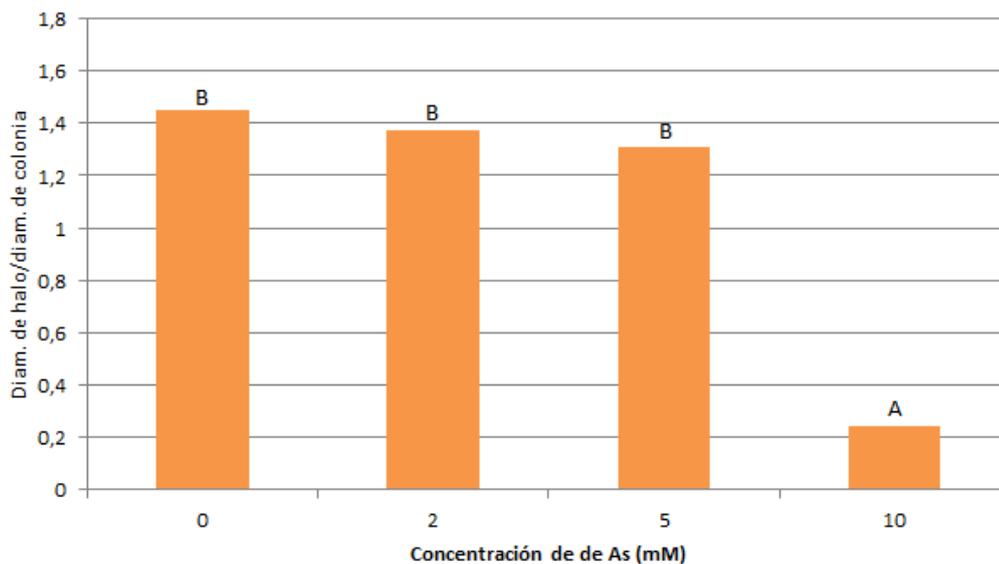


Figura 11: Solubilización de fosfatos a diferentes concentraciones de As del total de bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de rizósfera para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>). E.E.: 0,11. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

La mayor producción de halo (mayor a 2,5) ocurrió en el tratamiento 5 mM As por la bacteria S-18. Para este caso se puede apreciar que la presencia de As estimuló la producción de halo hasta los 5 mM As. Solo la bacteria S-21 solubilizó fosfatos en todos los tratamientos, con valores superiores a 1,5 y sin apreciarse una diferencia significativa entre los tratamientos. El comportamiento de la bacteria S-16, presentó valores altos para los tratamientos testigo, 2 y 5 mM de As con una marcada respuesta decreciente para el tratamiento 10 mM de As. Valores cercanos a 1, indican que el diámetro de la colonia es igual al diámetro del halo formado, este es el caso de S- 22 y S-3 y S-33 (ver figura nº 12).

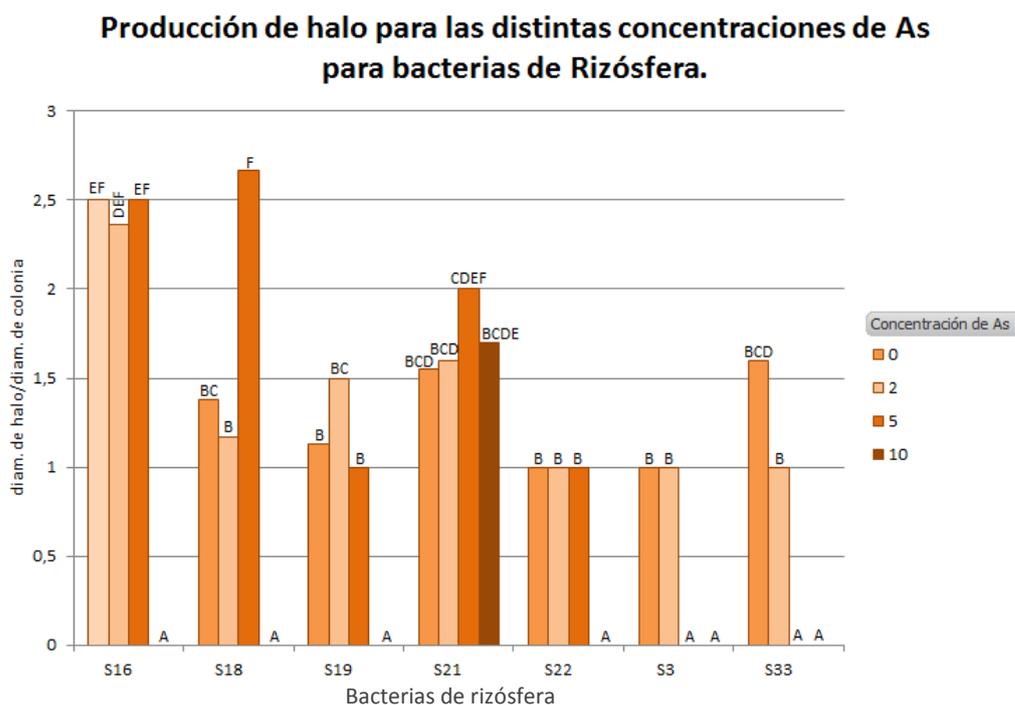


Figura 12: Solubilización de fosfatos para todos los tratamientos en bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada bacteria de rizósfera. E.E.: 0,28. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Bacterias de Raíz.

El 100% de las bacterias de raíz solubilizaron fosfatos en ausencia de As. R-54, R-55, R-51 fueron las que presentaron los valores medios más altos (mayores a 1) (figura nº 13).

### Producción de halo en bacterias de raíz.

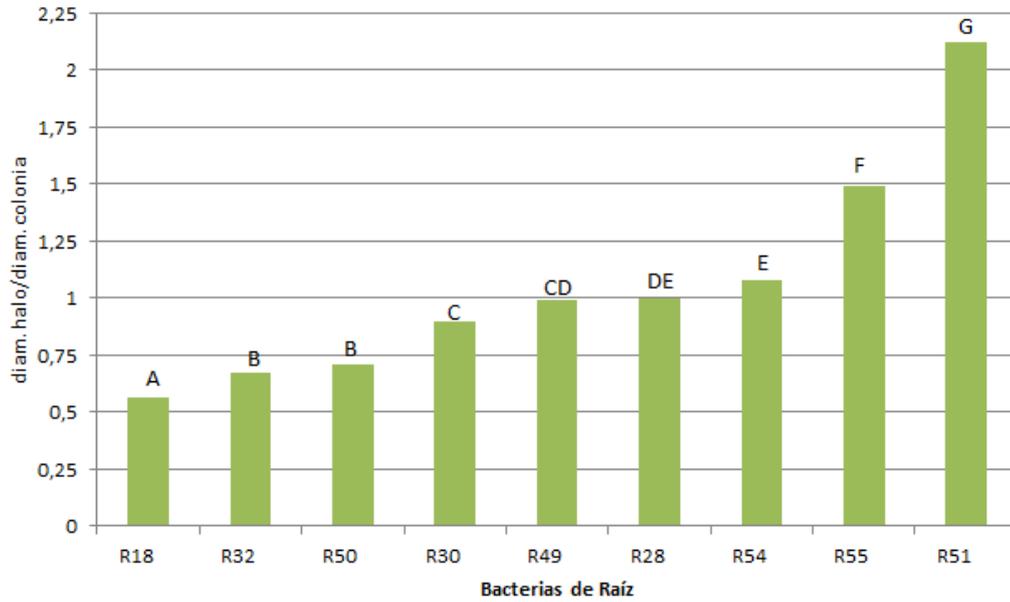


Figura 13: Solubilización de fosfatos en bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM  $As^{III}$ ) para cada una de las bacterias de raíz. Error Estándar (E.E.): 0,03. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Todos los tratamientos de As se diferenciaron significativamente entre sí, obteniéndose los valores de producción de halo más altos en la concentración de 2 mM As (figura nº 14).

### Producción de halo en función de la concentración de As en bacterias de Raíz.

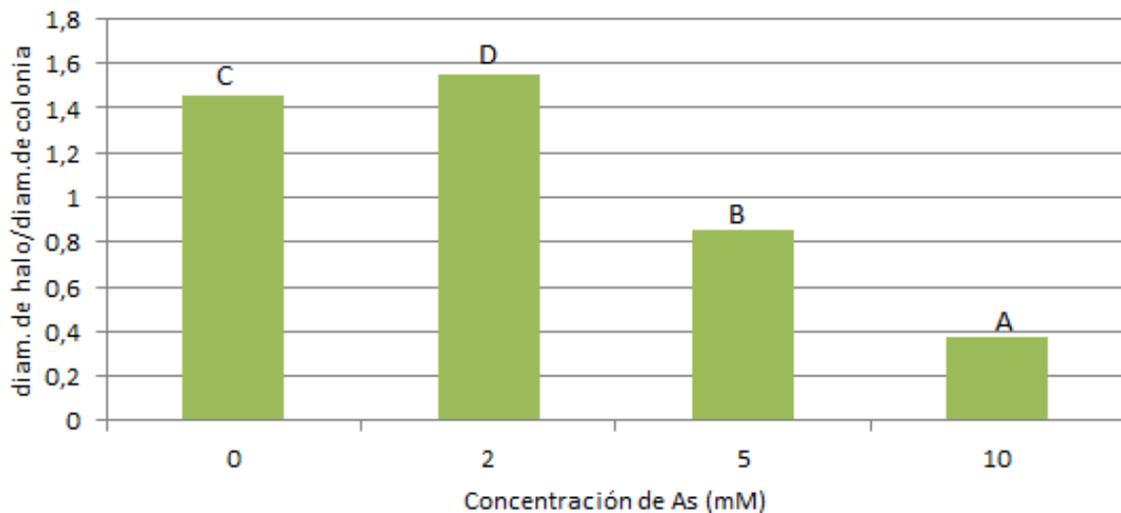


Figura 14: Solubilización de fosfatos a diferentes concentraciones de As del total de bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de raíz para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM  $As^{III}$ ). E.E.: 0,02. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

R-28, R-51 y R-55 (33%) fueron capaces de solubilizar fosfato para todos los tratamientos. Entre las bacterias aisladas de raíces, R-51 presentó, los valores más altos en el tratamiento testigo, 2 mM y 5 mM As. En la concentración 10mM As la producción de halo para esta bacteria, disminuyó significativamente. R-28 no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que, R-55 obtuvo valores significativamente elevados en los tratamientos testigo y 2 mM As, respecto a 5 y 10 mM As (figura nº 15).

### Producción de halo para distintas concentraciones de As para bacterias de Raíz.

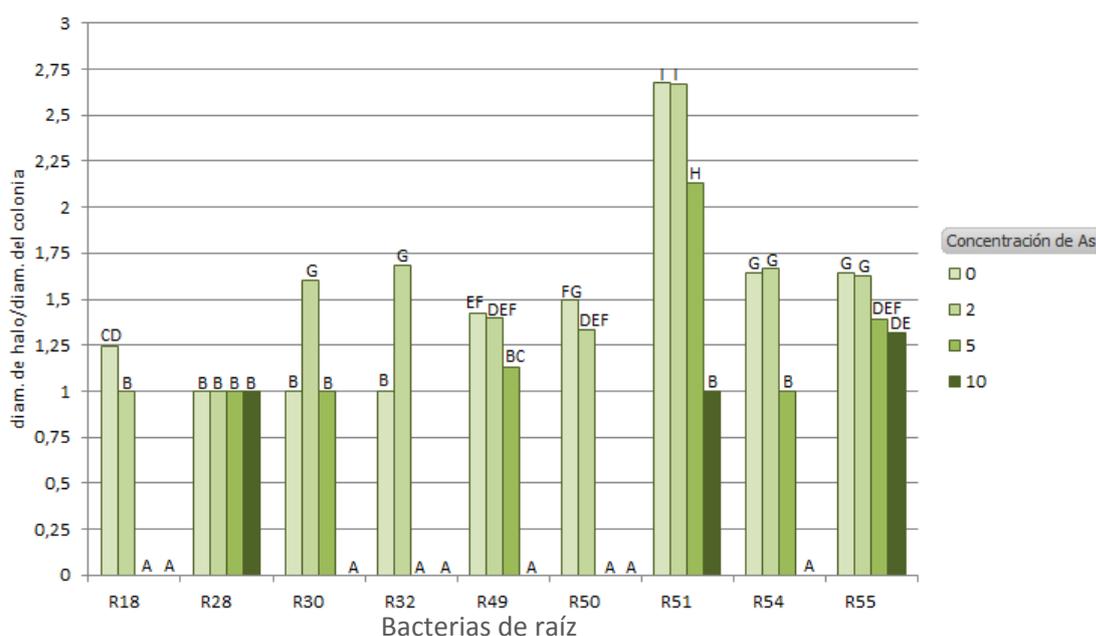


Figura 15: Solubilización de fosfatos para todos los tratamientos en bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada bacteria de raíz. E.E.: 0,06. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

#### Comparación (bacterias de rizósfera y raíz).

En el análisis conjunto de ambos grupos de bacterias, las que arrojaron los valores medios más altos son, en orden creciente R-55, S-21, S-16 y R-51 (figura nº 16).

### Producción media de halo en bacterias de Raíz y Rizósfera.

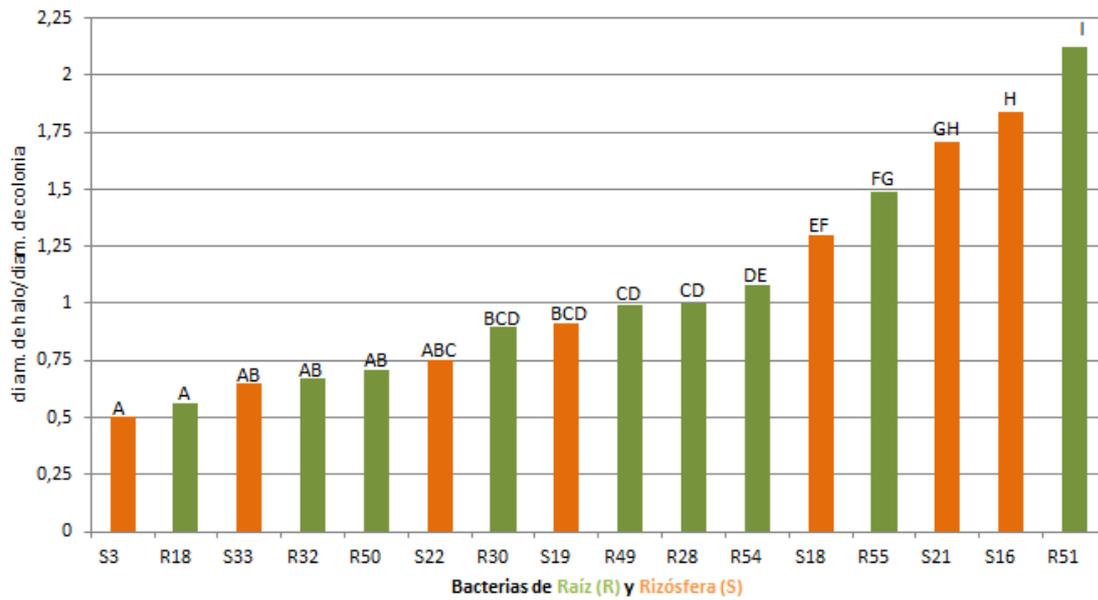


Figura 16: Solubilización de fosfatos de bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada una de las bacterias de raíz y rizósfera. Error Estándar (E.E.): 0,1. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Los tratamientos testigo y 2 mM As resultaron ser los más elevados sin diferenciarse significativamente entre sí, mientras que las concentraciones 5 y 10 mM As disminuyeron significativamente, en especial para el tratamiento de 10 mM As (figura nº 17).

### Producción de halo en función de la concentración de As en bacterias de rizósfera y raíz.

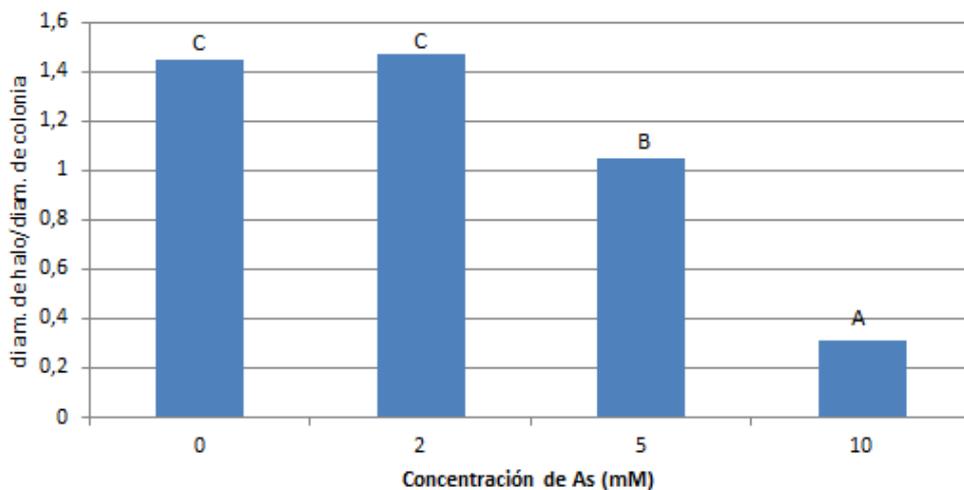


Figura 17: Solubilización de fosfatos a diferentes concentraciones de As para bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de rizósfera para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>). E.E.: 0,05. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Solo 4 bacterias fueron capaces de solubilizar fosfatos a valores de 10 mM As: R-28, R-51, R-55 y S-21. Todas estas, S-16 y S-18 presentaron los valores más elevados para los distintos tratamientos (figura nº 18).

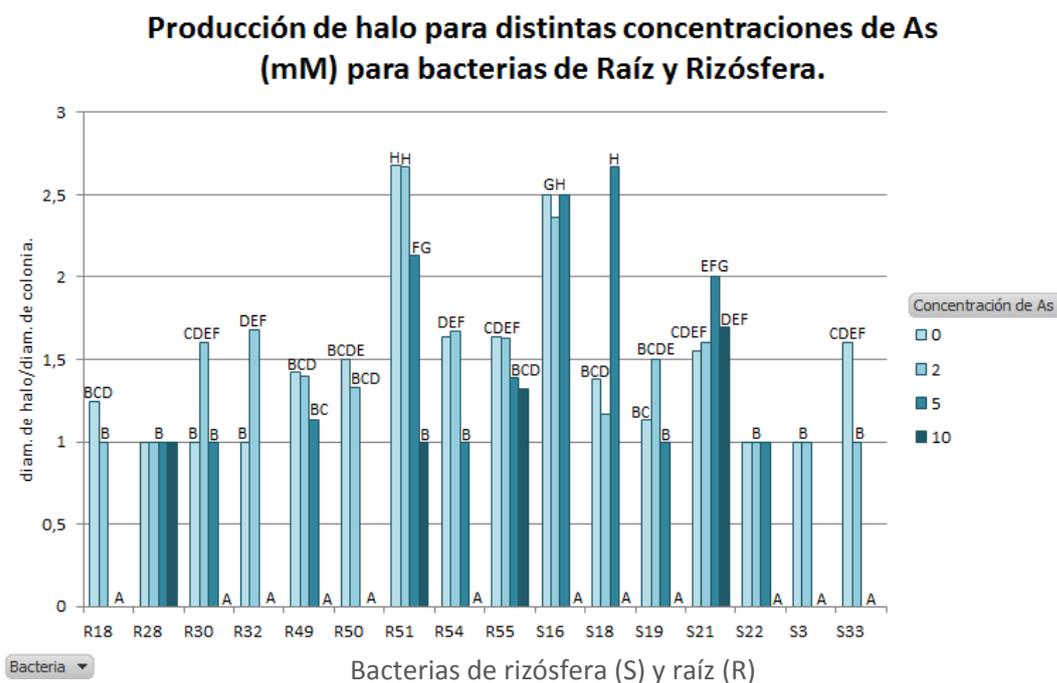


Figura 18: Solubilización de fosfatos para todos los tratamientos en bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada bacteria de rizósfera y raíz. E.E.: 0,19. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Producción de Sideróforos.

#### Bacterias Rizosféricas.

En el caso de las bacterias aisladas de rizósfera el 50% produjeron sideróforos desde la primer medición, a los dos días de iniciado el ensayo y a todas las concentraciones de As. Estas fueron S-16, S-21, S-26, S-27, S-32. Las bacterias rizosféricas en las que no se apreció crecimiento en la primer medición tampoco lo hicieron en las siguientes (7 y 12 días) estas fueron S-3, S-18, S-19, S-22 y S-33.

La media de la producción de halo, de S-21 fue el mayor (2,05 cm) y fue significativamente mayor que S-27 y S-26 (figura nº 19).

## Producción media de halo en bacterias de Rizósfera.

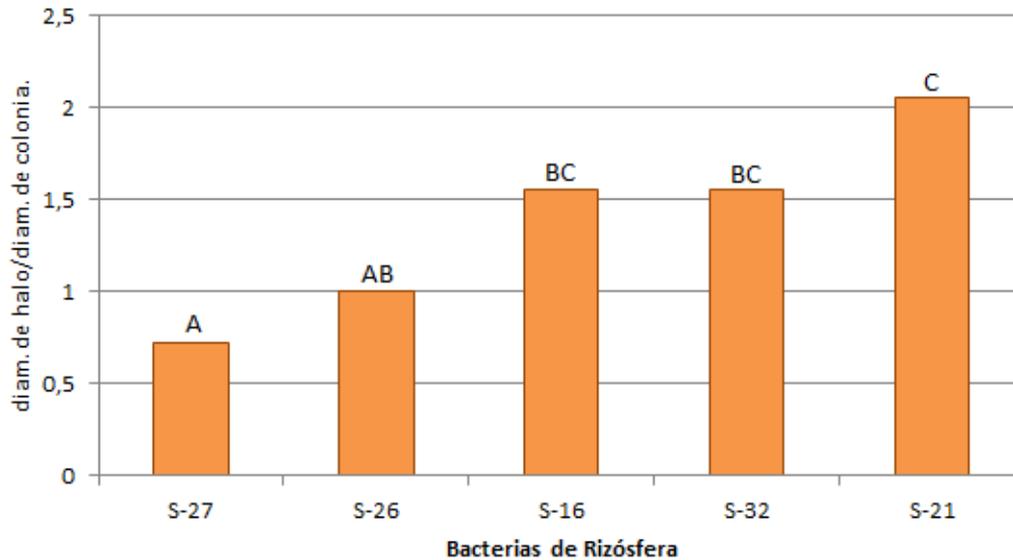


Figura 19: Producción de sideróforos en bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada una de las bacterias. Error Estándar (E.E.): 0,2.\*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Las mayores medias obtenidas entre las 5 bacterias, se encontraron a una concentración de 10mM As, obteniéndose diferencias significativas con respecto al testigo y 2 mM As. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las medias calculadas para el testigo (0mM As) 2 mM As y 5mM As (figura nº 20).

## Producción media de halo en función de la concentración de As en bacterias de Rizósfera.

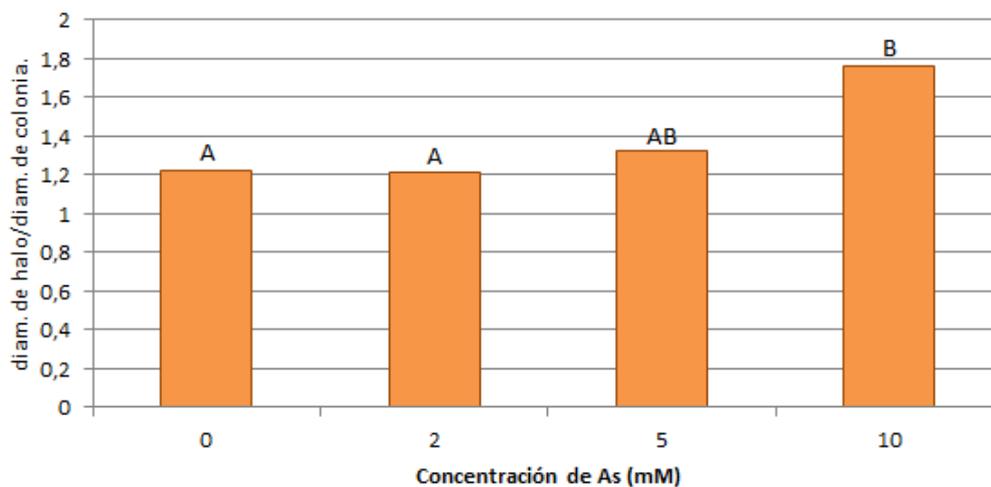


Figura 20: Producción de sideróforos en diferentes concentraciones de As del total de bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de rizósfera para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>). E.E.: 0,18.\*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En la figura nº 21, se puede apreciar que ninguna de las bacterias varió significativamente la producción de sideróforos en los distintos tratamientos. La media más alta fue la de la bacteria S-21 a 10 mM As, sin llegar a diferenciarse de la S-16 y S-32 para este tratamiento. A su vez la S-21 no presentó diferencia significativa entre los tratamientos 2 y 5 mM As y el testigo. En las bacterias S-16, S-21, S-27 y S-32, se puede apreciar una tendencia a aumentar la producción de halo al incrementar la concentración de As. La bacteria S-26 no presentó variaciones significativas en la producción de halo para los distintos tratamientos.

### Producción de halo en función de la concentración de As (mM) para bacterias de Rizósfera.

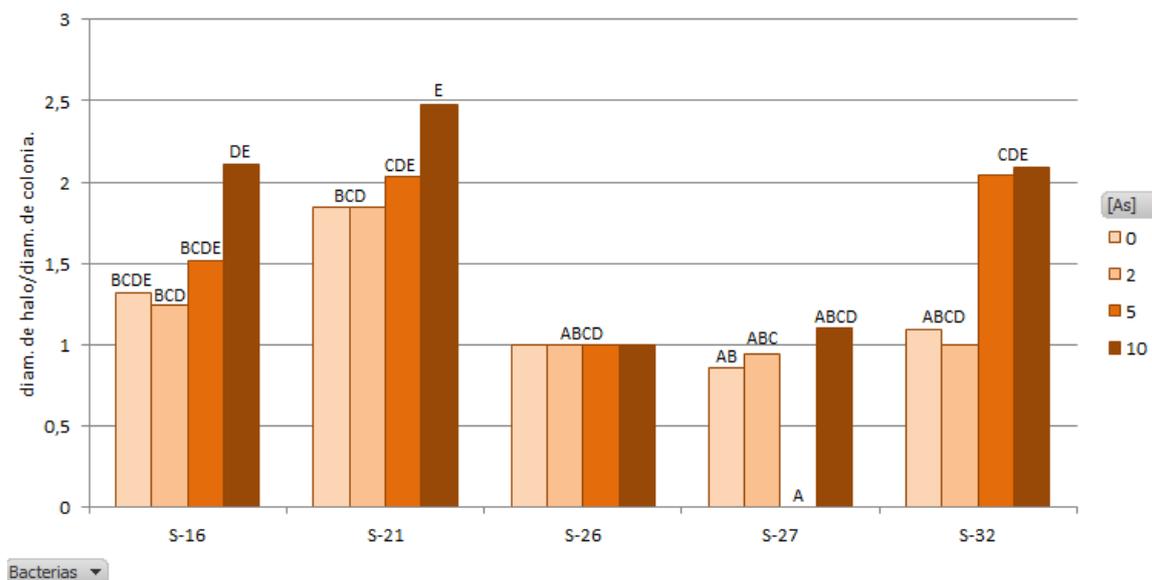


Figura 21: Producción de sideróforos para todos los tratamientos en bacterias de rizósfera. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada bacteria de rizósfera. E.E.: 0,39. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

#### Bacterias de Raíz.

El 100% de las bacterias aisladas de raíces produjeron sideróforos en alguno de los tratamientos. En donde, R-49, R-55, R-54 y R-51 produjeron medias significativamente mayores que R-18, R-28, R-30, R-32 y R-50 (figura nº 22).

## Producción media de halo para bacterias de Raíz.

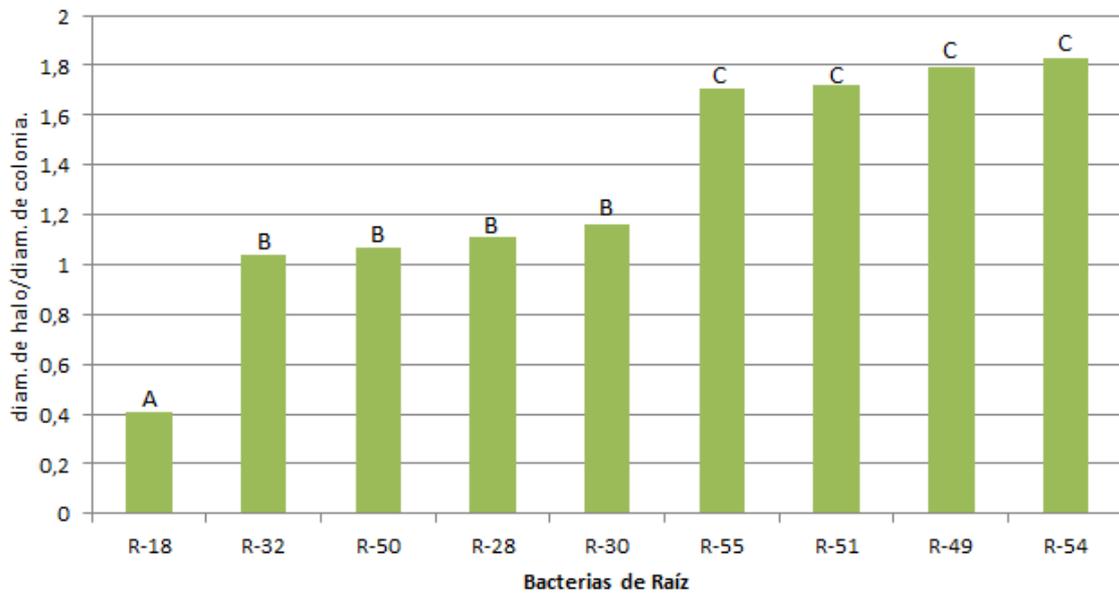


Figura 22: Producción de sideróforos en bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM  $As^{III}$ ) para cada una de las bacterias de raíz. Error Estándar (E.E.): 0,1. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

A diferencia de las bacterias de rizósfera, las bacterias de raíz presentaron la media más baja de producción de halo a 10 mM As, diferenciándose significativamente del testigo y del tratamiento con 5 mM As. El tratamiento testigo solo se diferenció significativamente del 10 mM As (figura nº 23).

## Producción de halo en función de la concentración de As en bacterias de Raíz.

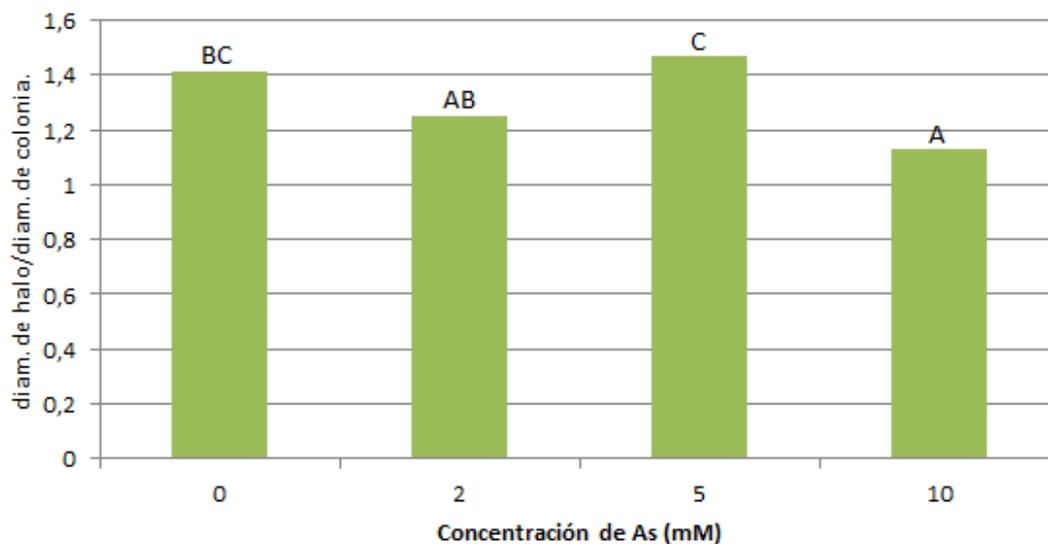


Figura 23: Producción de sideróforos para diferentes concentraciones de As en bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de raíces para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM  $As^{III}$ ). E.E.: 0,07. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En la figura nº 24 se puede apreciar que R-49, R-51, R-54 y R-55 en el tratamiento testigo obtuvieron valores significativamente mayores que el resto de las bacterias para ese tratamiento. A su vez estas mismas bacterias, en el tratamiento de 10mM As, produjeron halo significativamente mayores con valores medios mayores a 1cm.

Las bacterias R-49 y R-51 no presentaron diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos de As.

R-54 produjo un halo significativamente mayor que el de todas las bacterias para el tratamiento de 10 mM de As, sin diferenciarse significativamente del testigo. Sin embargo, para los tratamientos de 2 y 5 mM de As la producción fue significativamente menor.

En R-55 la producción de halo en los tratamientos con 5 y 10 mM de As, fue significativamente menor que en el testigo y en 2 mM de As.

### Producción de halo en función de la concentración de As (mM) para bacterias de Raíz.

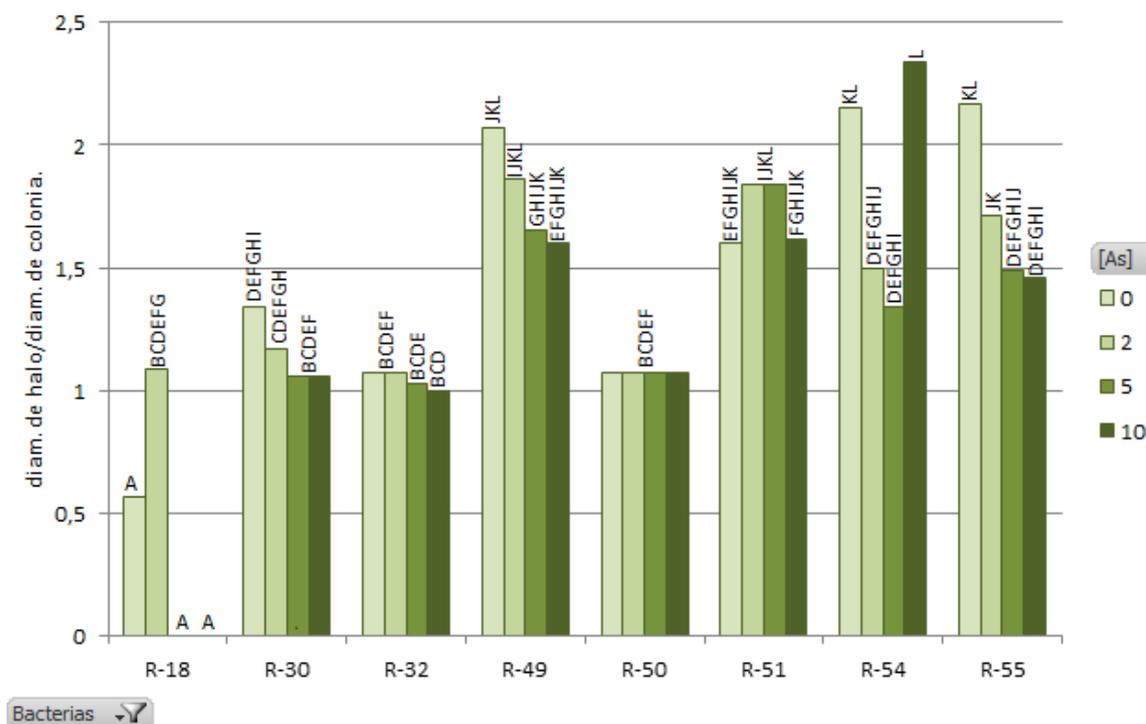


Figura 24: Producción de sideróforos para todos los tratamientos en bacterias de raíz. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada bacteria de raíz. E.E.: 0,2. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado.

#### Comparación (bacterias de rizósfera y raíz).

En general en cuanto a las medias de producción de halo calculadas para todas las bacterias, S-21, R-54, R-49, R-51 y R-55 presentaron las medias de producción de halo más altas, diferenciándose significativamente del resto. Por debajo de estas, S-16 y S-32 obtuvieron valores medios mayores a 1,5 sin llegar a diferenciarse de R-55, R-51, R-49 y R-54 (figura nº 25).

### Producción media de halo para bacterias de Raíz y Rizósfera.

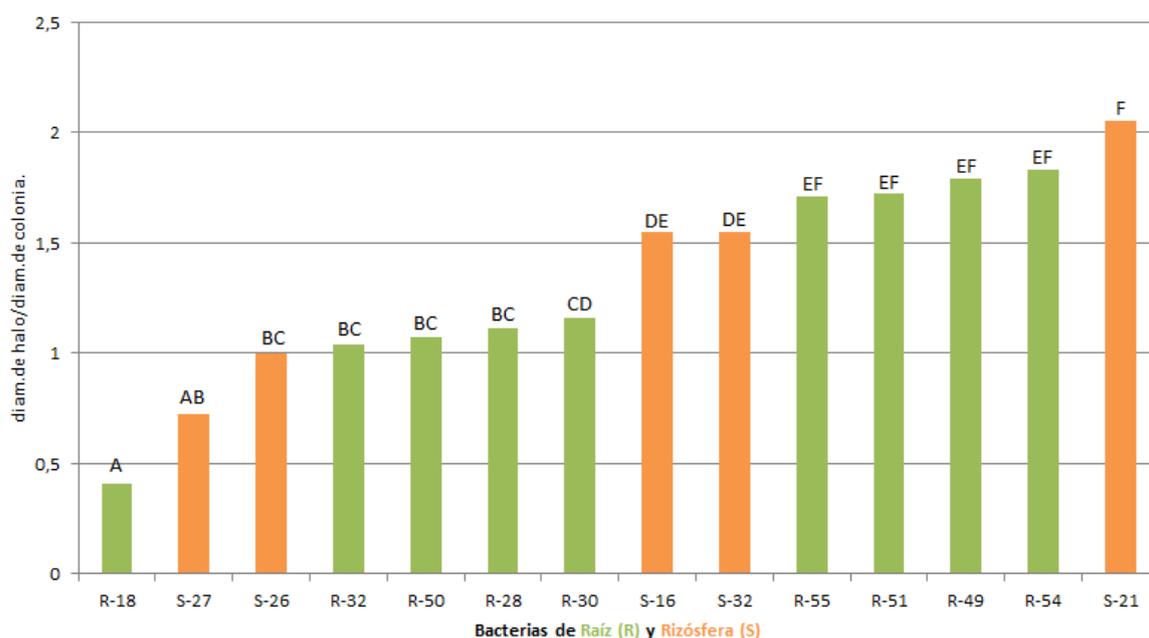


Figura 25: Producción de sideróforos en bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de todos los tratamientos (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>) para cada una de las bacterias de raíz y rizósfera. Error Estándar (E.E.): 0,14.\*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

No se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos testigo y de As (figura nº 26).

### Producción media de halo en función de la concentración de As para bacterias de Rizósfera y Raíz.

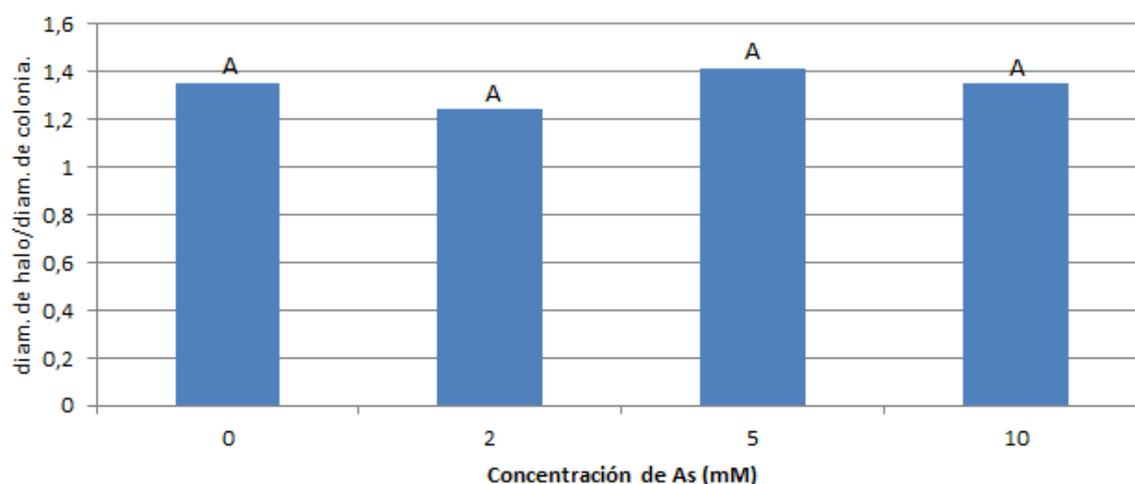


Figura 26: Producción de sideróforos para diferentes concentraciones de As en bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de todas las bacterias de raíz y rizósfera para cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM As<sup>III</sup>). E.E.: 0,08.\*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

S-16, S-21 y S-32, aumentaron la producción de halo a medida que fue en aumento la concentración de As, alcanzando a los 10 mM de As los valores diferenciados estadísticamente mas altos. R-30, R-32 y R-49, evidenciaron el comportamiento inverso, aunque no se obtuvieron

diferencias significativas entre los tratamientos. R-50, S-26 no mostraron variaciones significativas entre sus tratamientos (ver figura 27).

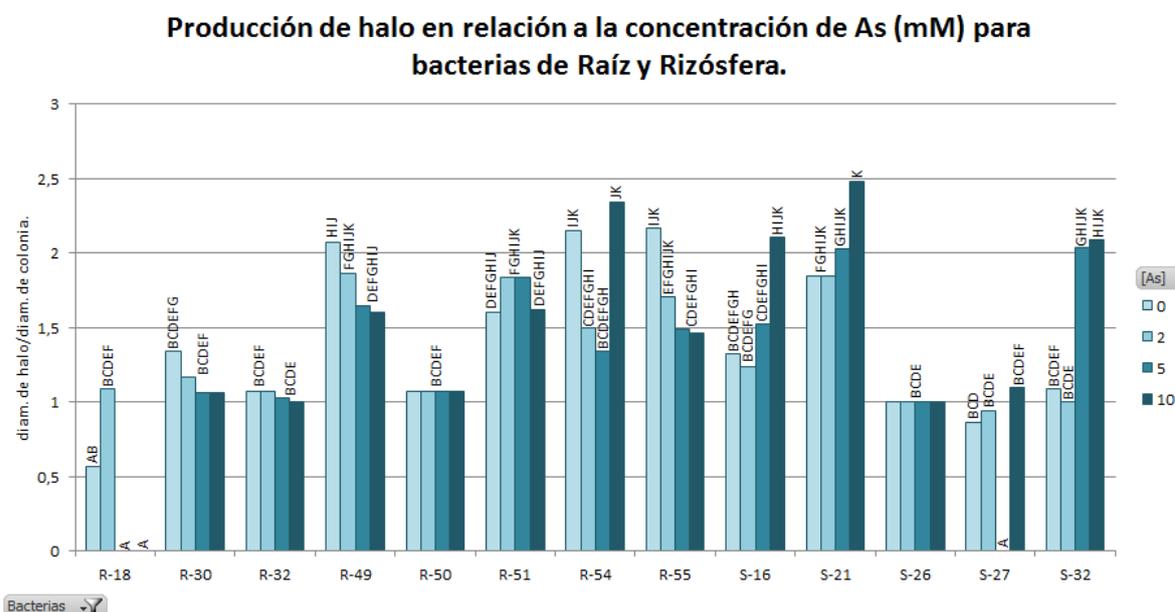


Figura 27: Producción de sideróforos para todos los tratamientos en bacterias de raíz y rizósfera. Representa la media (adimensional) de las dos repeticiones realizado en cada tratamiento (testigo, 2, 5 y 10 mM  $As^{III}$ ) para cada bacteria de raíz y rizósfera. E.E.: 0,28. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Selección de bacterias para el ensayo *in vitro*.

Para seleccionar las cuatro bacterias se buscaron aquellas que evidenciaron tolerancia a As, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y FBN. Para los casos en los que se midió halo, se consideraron positivas “+” los halos mayores a 1 cm de diámetro presente en todas las concentraciones de As, obteniéndose las tablas nº 6 y 7 en donde se seleccionaron dos aisladas de rizósfera (S-16 y S-21) y dos de raíz (R-51 y R-55). Además, se realizó un consorcio, en donde se mezclaron en iguales cantidades las 4 bacterias seleccionadas.

Tabla 6: Selección de potenciales bacterias PGPR. Bacterias de Rizósfera

Bacterias Rizosféricas	Sideróforo	Solubilización de $PO_4^{-3}$	Fijación de N
S-3	-	-	+
S-16	+	+	+
S-18	-	-	+
S-19	-	-	+
S-21	+	+	+
S-22	-	-	+
S-26	+	-	+
S-27	+	-	+
S-32	+	-	-
S-33	-	-	+

Tabla 7: Selección de potenciales bacterias PGPR. Bacterias de Raíz.

Bacterias Raíz	Sideróforo	Solubilización de $PO_4^{-3}$	Fijación de N
R-18	-	-	-
R-28	-	-	-
R-30	+	-	+
R-32	+	-	-
R-49	+	-	+
R-50	+	-	-
R-51	+	+	+
R-54	+	-	+
R-55	+	+	+

### Ensayo *In vitro*.

#### Largo de raíz.

Los tratamientos con la bacteria S-16 y el testigo presentaron los valores medios de largo de raíz más altos (mayores a 4cm), no diferenciándose estadísticamente. Mientras que el consorcio (M) y R-55 arrojaron los valores más bajos (figura nº 28).

### Largo medio de Raíz.

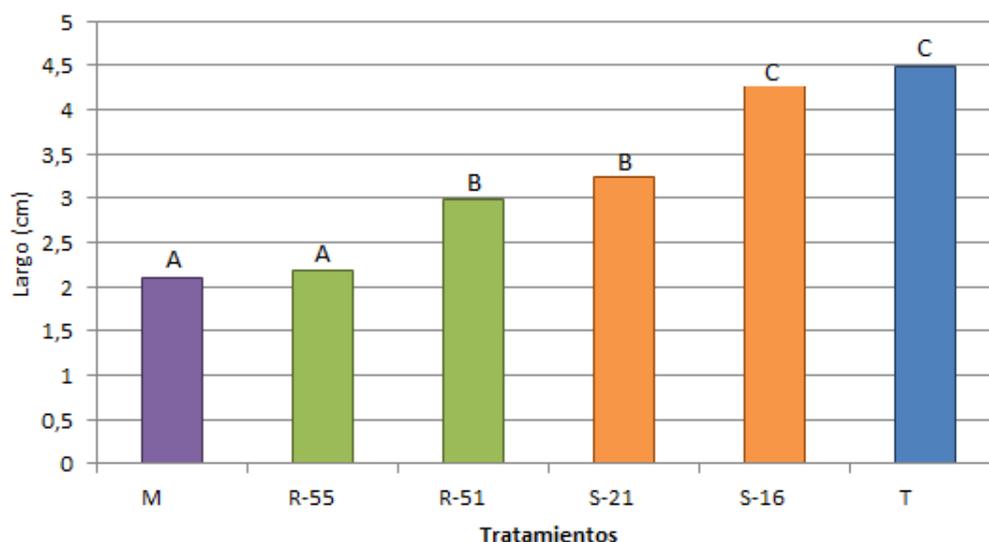
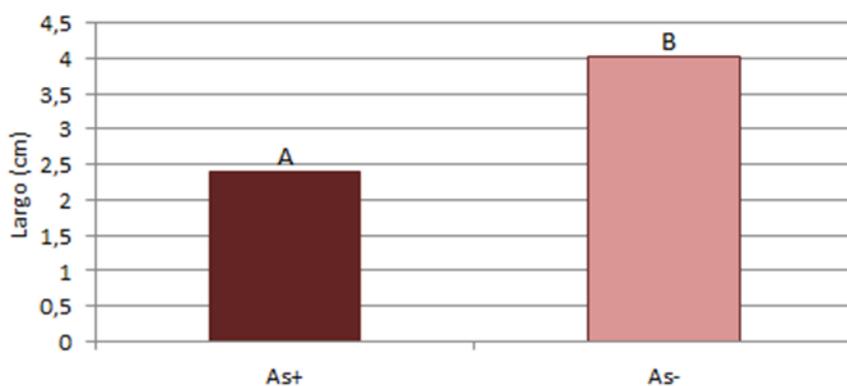


Figura 28: Largo medio de la raíz (cm) en los diferentes tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del largo de raíces de las plantas de As(+) y As(-) para cada tratamiento (M E.E.: 0,27; R-55 E.E.: 0,26; R-51 E.E.: 0,27; S-21 E.E.: 0,29; S-16 E.E.: 0,29 y T E.E.: 0,29). \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Se observó un efecto significativo del As sobre el largo de raíces (figura nº 29).

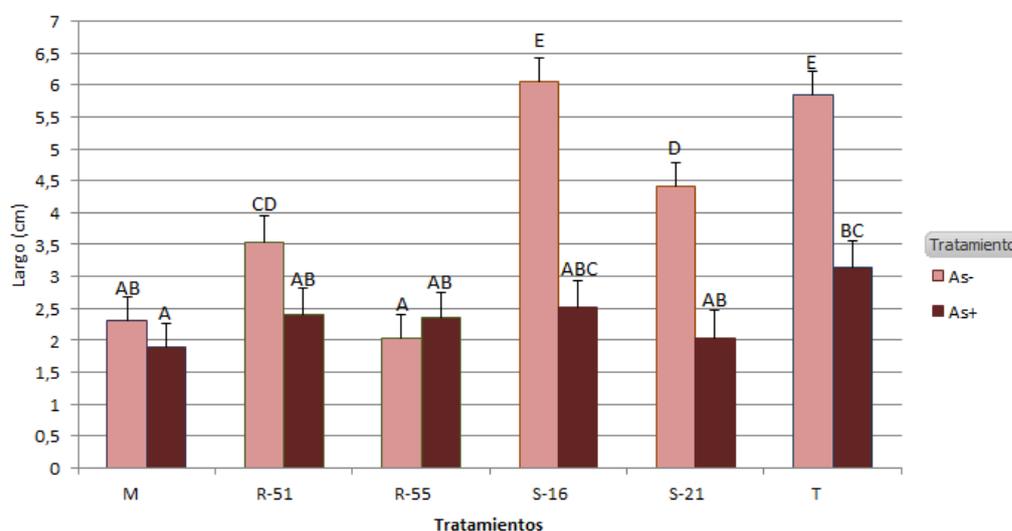
## Largo medio de raíz en función de la presencia de As.



**Figura 29:** Largo medio de raíces. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,15 y As (-). E.E.: 0,17. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En el Testigo, la presencia de As produjo una disminución significativa del largo de raíz, al igual que en S-16, S-21, R-51. Los tratamientos que no mostraron diferencias significativas ante la presencia de As fueron R-55 y el consorcio (M). Cabe destacar que R-55 produjo un largo de raíz mayor en presencia de As, aunque no llegó a diferenciarse estadísticamente (figura nº 30).

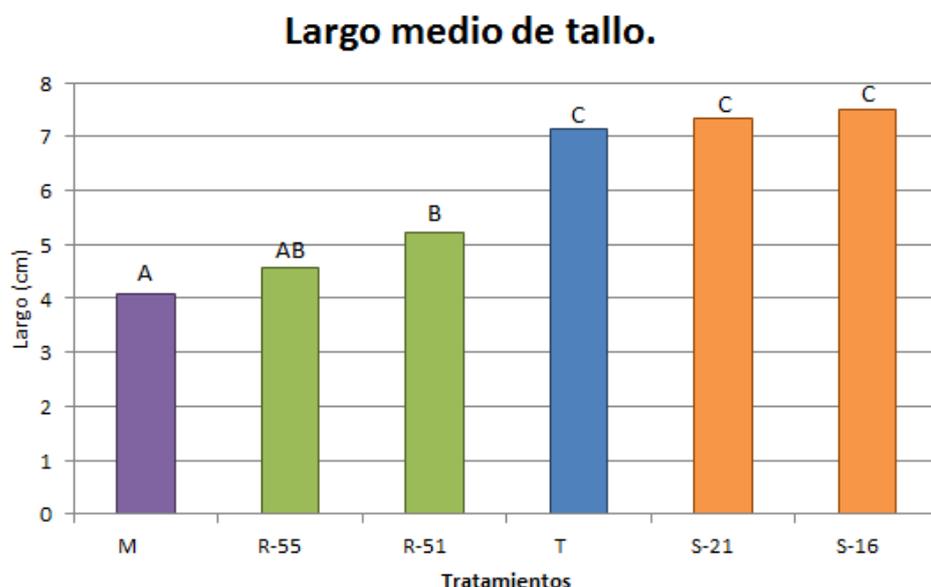
## Largo de raíz en función de la concentración de As.



**Figura 30:** Largo medio de raíces para los tratamientos: -M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del largo de raíz de las 7 plantas de cada tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) y As(-). E.E.: de 0,37 a 0,43. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

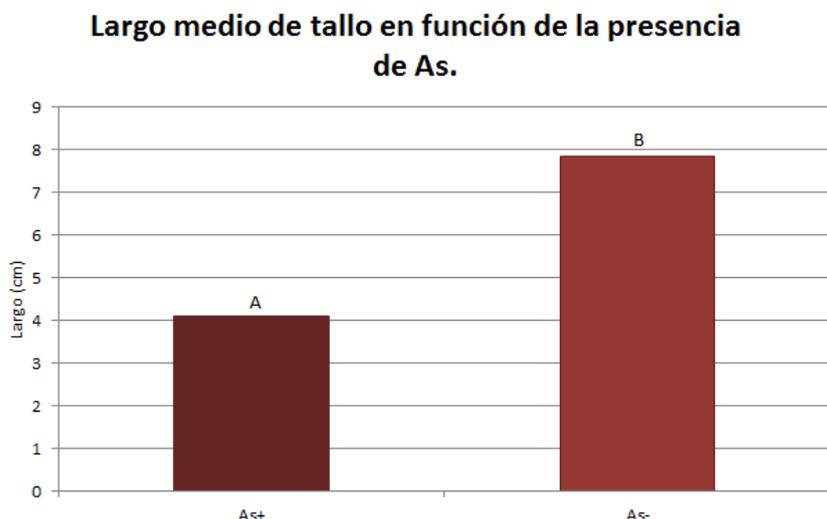
*Largo de tallo.*

Según las medias de largo de tallo obtenidas entre los tratamientos de cada bacteria, S-21, S-16 y el testigo presentaron los valores más altos y se diferenciaron significativamente del resto. El consorcio presentó los tallos más bajos (figura nº 31).



**Figura 31:** Largo medio de tallo para los diferentes trataminetos: M, mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R), R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S), S-21 y S-16; T, testigo. Representa la media del largo de tallo de las plantas de As(+) y As(-) para cada tratamiento (M E.E.: 0,35; R-55 E.E.: 0,34; R-51 E.E.: 0,35; S-21 E.E.: 0,37; S-16 E.E.: 0,36 y T E.E.: 0,36). \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

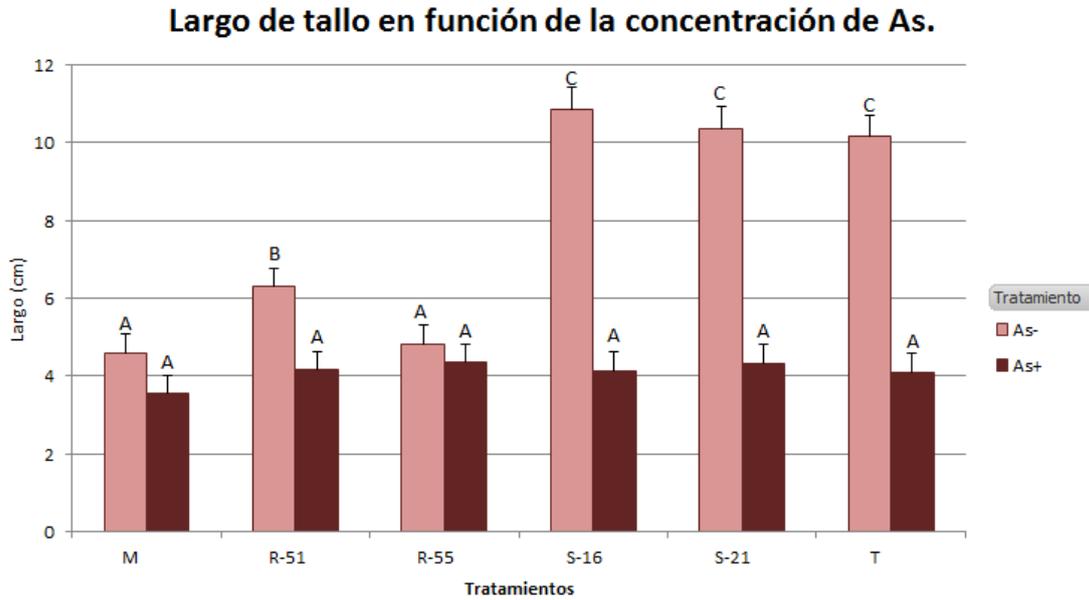
El largo de tallo en los tratamientos con As fueron significativamente menores a los testigos (figura nº 32).



**Figura 32:** Largo medio de raíces. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,20 y As (-) E.E.: 0,21. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En el tratamiento testigo, la presencia de As produjo una disminución significativa del largo de tallo, al igual que en S-16, S-21, R-51. Los tratamientos que no mostraron diferencias significativas ante la presencia de As fueron R-55 y el consorcio; sin embargo, presentaron los valores más bajos en los tratamientos sin As. Ninguna bacteria ni el testigo se diferenciaron significativamente entre

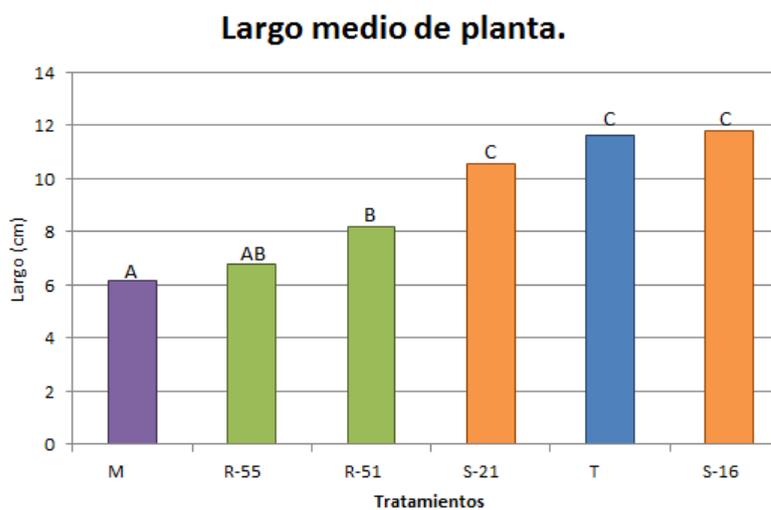
sí en el tratamiento con As para el largo de tallo, obteniendo valores entre 4,10 y 4,53 cm (figura nº 33).



**Figura 33:** Largo medio de tallo de los tratamientos: M, mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R), R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S), S-21 y S-16; T, testigo. Representa la media del largo de tallo de las 7 plantas de cada tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) y As(-). E.E.: de 0,48 a 0,55. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Largo de planta.

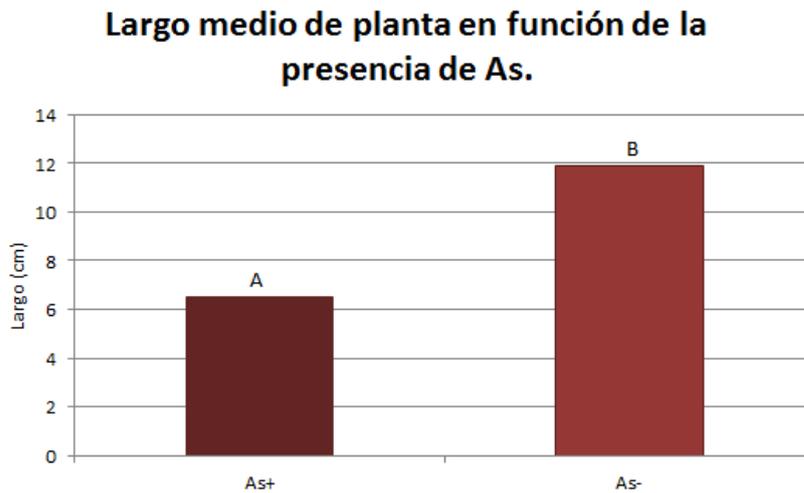
Según las medias de largo de la planta (suma de la medida de largo de tallo y raíz de cada planta) obtenidas entre los tratamientos de cada bacteria, S-21, S-16 y el testigo fueron las que presentaron los valores más altos y se diferenciaron significativamente del resto (figura nº 34).



**Figura 34:** Largo medio de plantas para los distintos tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del largo de las plantas de As(+) y As(-)

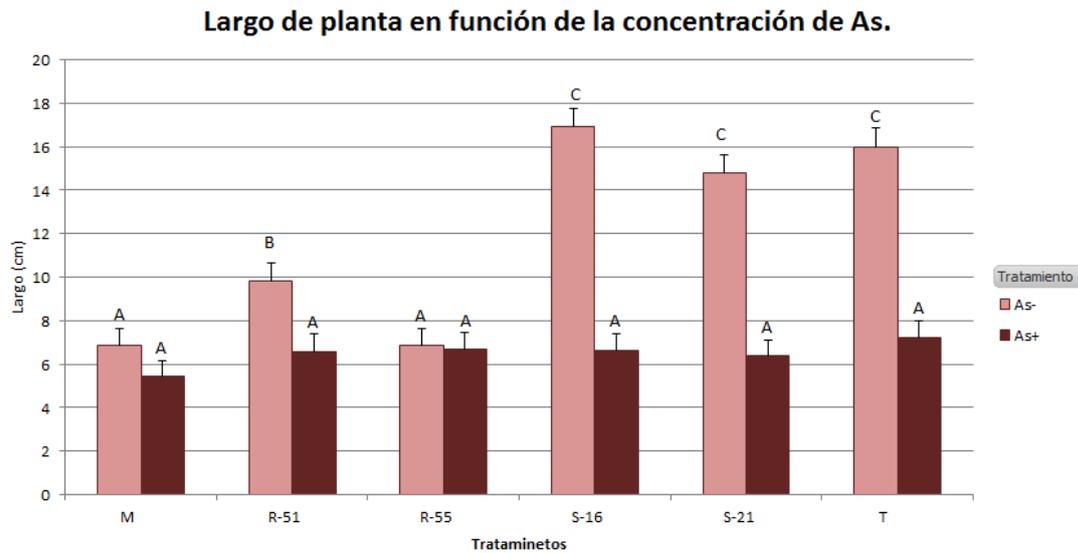
para cada tratamiento (M E.E.: 0,54, R-55 E.E.: 0,52, R-51 E.E.: 0,54, S-21 E.E.: 0,58, S-16 E.E.: 0,56 y T E.E.: 0,56). E.E.: 0,54. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

El largo de planta en los tratamientos con As es significativamente menor respecto al testigo (figura nº 35).



**Figura 35:** Largo medio de planta. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,31 y As (-) E.E.: 0,33. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

Como ocurrió con el largo de tallo en el tratamiento testigo, la presencia de As produjo una disminución significativa del largo medio de la planta, al igual que en S-16, S-21 y R-51. Los tratamientos que no mostraron diferencias significativas ante la presencia de As fueron R-55 y el consorcio; sin embargo, presentaron los niveles mas bajos en los tratamientos sin As. Ninguna bacteria ni el testigo se diferenciaron significativamente entre sí en el tratamiento con As para el largo de planta, obteniendo valores entre 5,44y 7,23 cm (figura nº 36).



**Figura 36:** Largo medio de plantas para los trataminetos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del largo de las 7 plantas de cada tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) y As(-). E.E.: de 0,74 a 0,85. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En las variables largo de raíz, tallo y planta se puede apreciar el efecto significativo del tratamiento con As. Además S-21, S-16 junto con el testigo presentaron el mismo comportamiento para las tres variables. Por otro lado, R-55 y el consorcio que fueron los que no presentaron efectos por As para estas mismas variables.

### Número de hojas.

Según las medias del número de hojas obtenidas entre los tratamientos de cada bacteria, S-21, S-16 y el testigo fueron las que presentaron valores más altos diferenciándose significativamente del resto (figura nº 37).

### Nº medio de hojas.

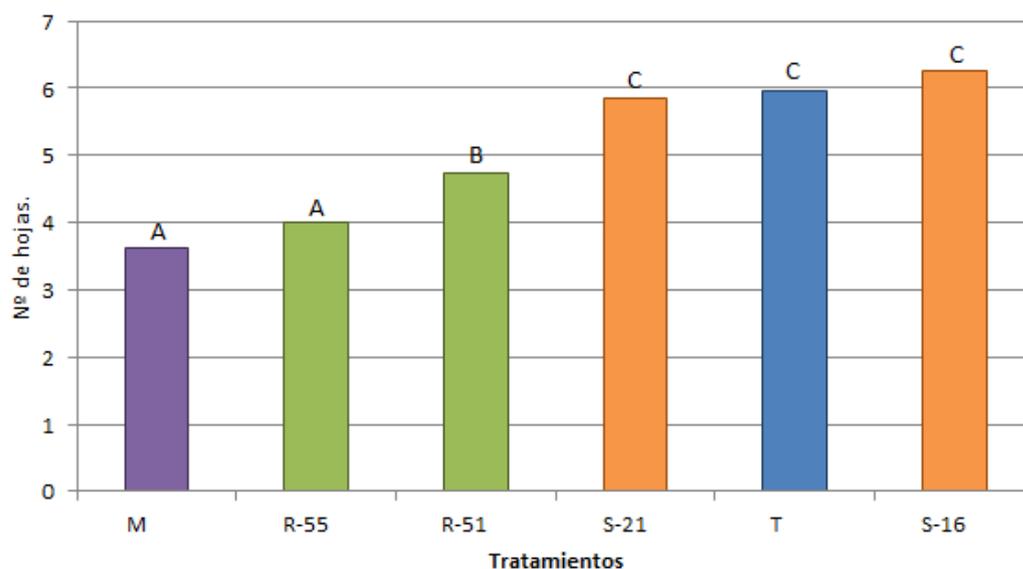


Figura 37: Nº medio de hojas para los tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del número de hojas de las plantas de As(+) y As(-) para cada tratamiento (M E.E.: 0,26; R-55 E.E.: 0,25; R-51 E.E.: 0,26; S-21 E.E.: 0,28; S-16 E.E.: 0,27 y T E.E.: 0,27). \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

El número de hojas en los tratamientos de As (+) es significativamente menor que el de As (-) (figura nº 38).

### Nº medio de hojas en función de la presencia de As.

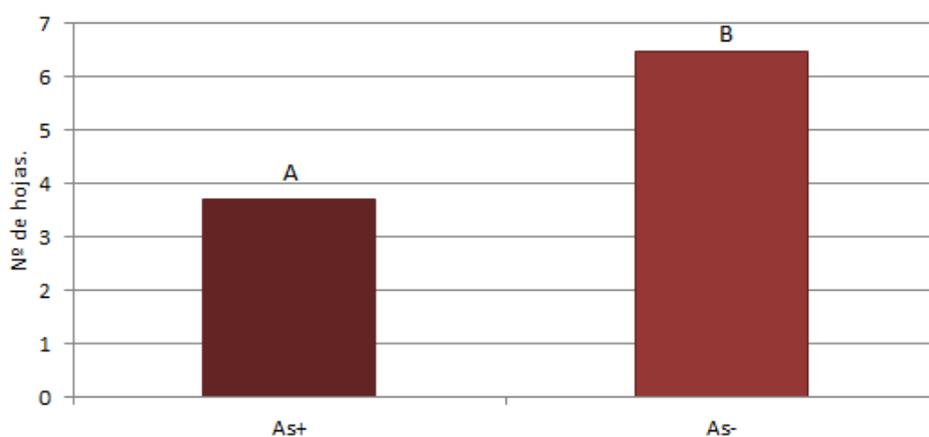
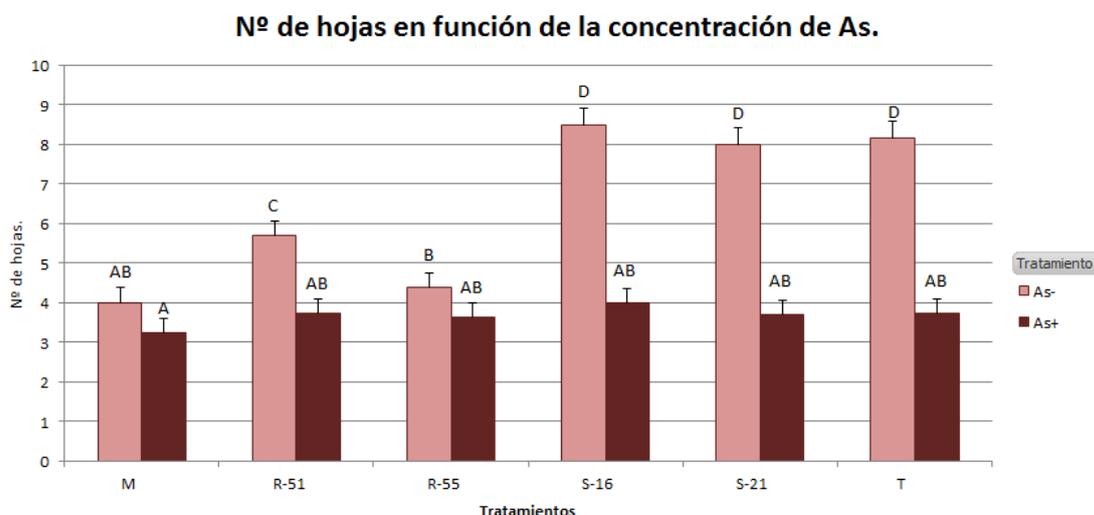


Figura 38: Nº medio de hojas. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,15 y As (-) E.E.: 0,16. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En el testigo, la presencia de As produjo una disminución significativa del número de hojas, al igual que en S-16, S-21 y R-51. Los tratamientos que no mostraron diferencias significativas a As+ fueron R-55 y el consorcio; sin embargo, presentaron los niveles más bajos en los tratamientos As-

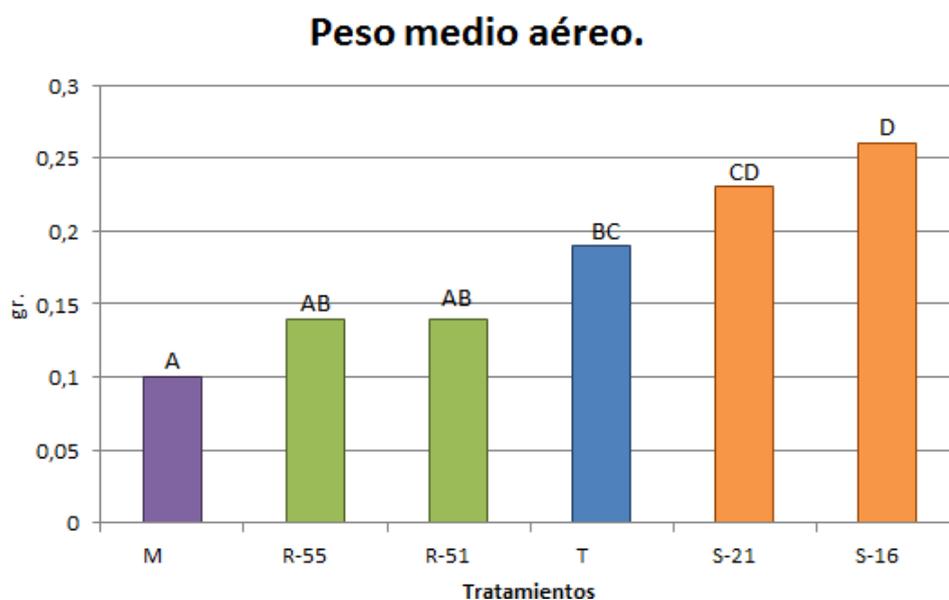
. No hubo diferencias significativas entre las diferentes bacterias y el testigo en el tratamiento As+ respecto al número de hojas, obteniendo valores de 3 a 4 hojas (figura nº 39).



**Figura 39:** Nº medio de hojas por tratamineto: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del número de hojas de las 7 plantas de cada tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) y As(-). E.E.: de 0,36 a 0,41. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Peso fresco de la parte aérea.

Las medias de peso fresco aéreo (tallo y hojas) obtenidas entre los tratamientos de las bacterias S-21, S-16 y el testigo presentaron mayor biomasa (expresados en gramos). Mientras que el peso fresco aéreo del tratamiento con la bacteria S-16 fue significativamente mayor respecto al testigo (figura nº 40).

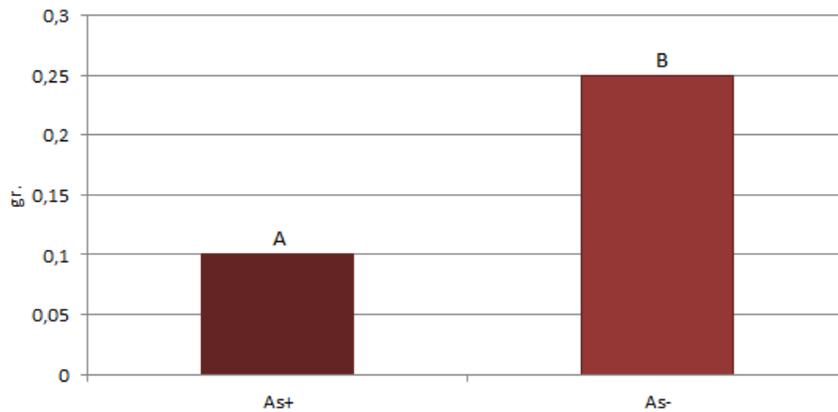


**Figura 40:** Peso fresco medio aéreo de los tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del peso fresco aéreo de las plantas de As(+) y As(-)

) para cada tratamiento (M E.E.: 0,02; R-55 E.E.: 0,02; R-51 E.E.: 0,02; S-21 E.E.: 0,02; S-16 E.E.: 0,02 y T E.E.: 0,02).  
\*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

El peso fresco aéreo en los tratamientos As+ resultó ser significativamente menor respecto a As- (figura nº 41).

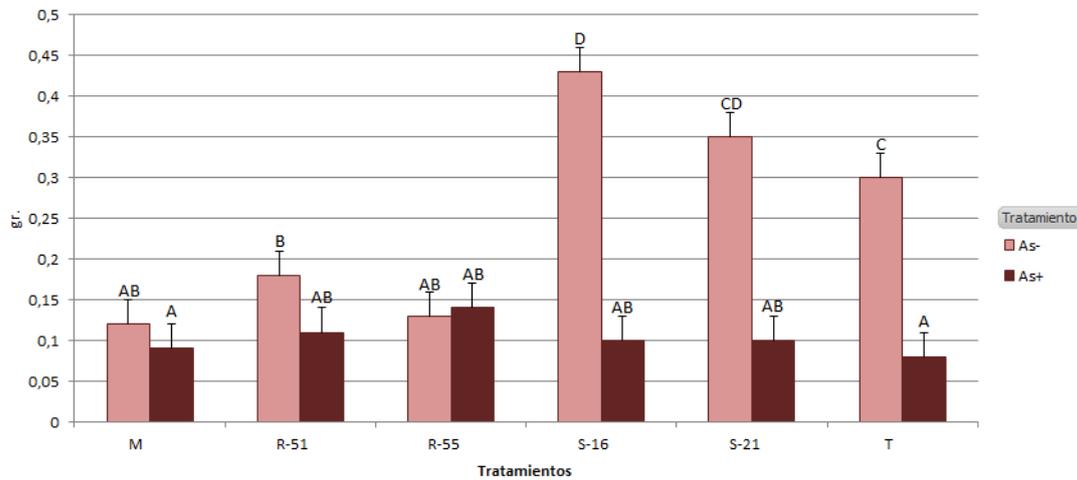
### Peso medio aéreo en función de la presencia de As.



**Figura 41:** Peso fresco medio de la parte aérea de las plantas. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,01 y As (-) E.E.: 0,01. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

En el tratamiento testigo, la presencia de As produjo una disminución significativa del peso fresco aéreo de la planta, al igual que en S-16 y S-21. Los tratamientos que no mostraron diferencias significativas ante As+ fueron R-51, R-55 y el consorcio. Cabe destacar que R-55 arrojó un peso mayor en presencia de As, aunque no llegó a diferenciarse estadísticamente. Las bacterias y el testigo no se diferenciaron significativamente entre sí en el tratamiento As+, obteniéndose valores entre 0,08 y 0,14 g (figura nº 42).

### Peso aéreo en función de la concentración de As.

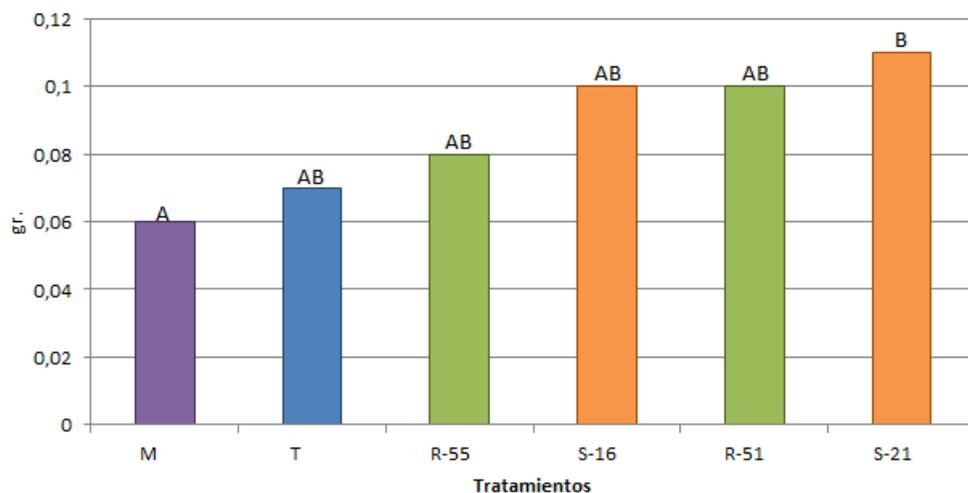


**Figura 42:** Peso fresco medio aéreo para los tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del peso aéreo de las 7 plantas de cada tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) E.E.:0,03 y As(-) E.E.: 0,03. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

### Peso fresco de raíz.

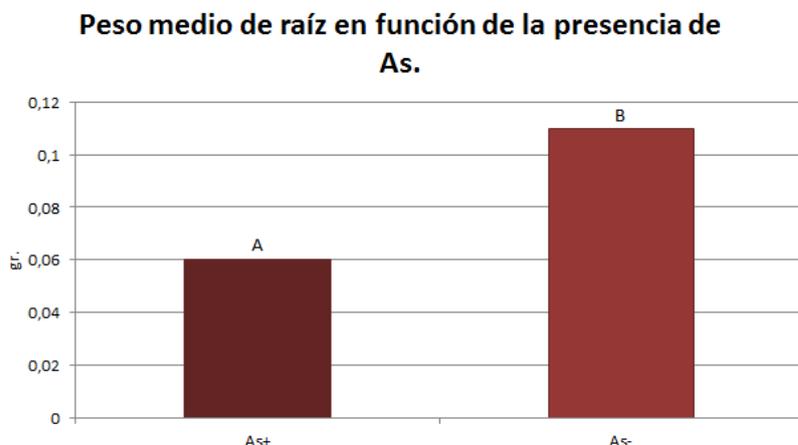
A partir de las medias de peso fresco radical obtenidas entre los tratamientos con cada bacteria, sólo el consorcio resultó ser significativamente menor de S-21. No hubo diferencias significativas entre R-51, R-55, S-21, S-16, el testigo y las restantes bacterias (figura nº 43).

### Peso medio de raíz.



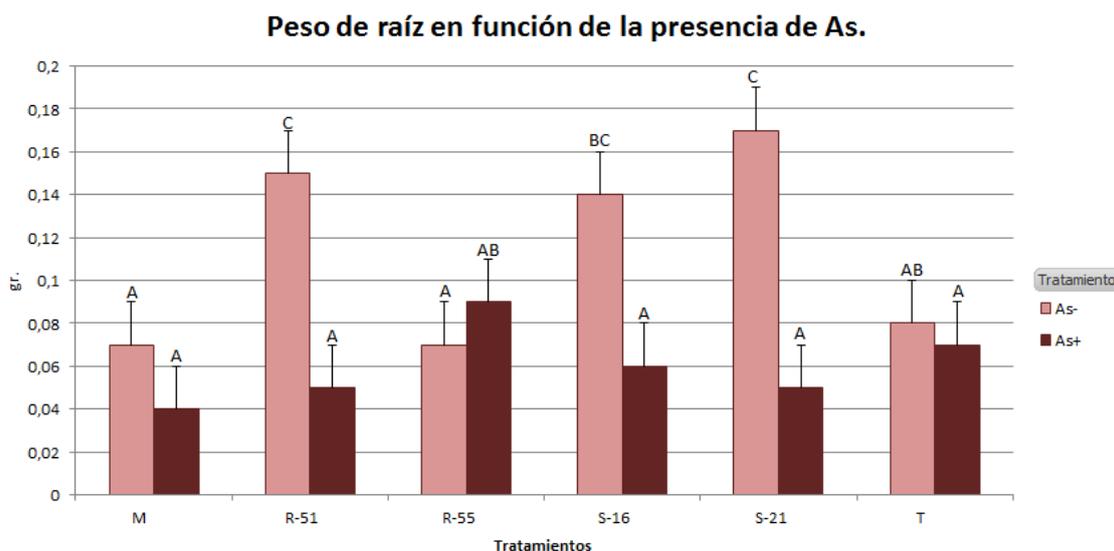
**Figura 43:** Peso fresco medio para los tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del peso radical de las plantas de As(+) y As(-) para cada tratamiento (M E.E.: 0,01; R-55 E.E.: 0,01; R-51 E.E.: 0,01; S-21 E.E.: 0,02; S-16 E.E.: 0,02 y T E.E.: 0,02). \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

El peso radicular en los tratamientos As+ resultó significativamente menor con respecto a As-. (Figura nº 44).



**Figura 44:** Peso fresco medio de las raíces de las plantas. Representa la media de todos los trataminetos (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en As (+) E.E.: 0,01 y As (-) E.E.: 0,01. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado.

S-21, S-16 y R-51 presentaron pesos de raíz significativamente menores en los tratamientos As+ en relación al tratamiento As-. Sin embargo, para las plantas inoculadas con estas bacterias los pesos de las raíces fueron significativamente mayores que los del testigo, el consorcio y R-55 en tratamientos As-. El testigo, consorcio y R-55 no presentaron efectos significativos por As+ en el peso de raíz. Cabe destacar, que R-55 arrojó un peso mayor en tratamientos As+, aunque no llegó a diferenciarse estadísticamente. Las bacterias y el testigo no se diferenciaron significativamente entre sí, en los tratamientos As+, respecto al peso radical, obteniéndose valores de 0,04 a 0,09 g. (figura nº 45).



**Figura 45:** Peso fresco medio de raíces para los tratamientos: M: mezcla de las 4 bacterias; Bacterias de raíz (R): R-55 y R-51; Bacterias de rizósfera (S): S-21 y S-16; T: testigo. Representa la media del peso radical de las 7 plantas de cada

tratamiento (M, R-55, R-51, S-21, S-16 y T) en condiciones de As(+) y As(-). E.E.: 0,02. \*Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el análisis realizado

## DISCUSIÓN.

La hipótesis de que las bacterias tolerantes a  $As^{III}$  con capacidad de promover el crecimiento vegetal, son capaces de reducir los efectos fitotóxicos del As sobre el crecimiento de plantas de vid, no se cumplió. Sin embargo, las bacterias seleccionadas mostraron un amplio potencial en las características evaluadas individualmente.

La composición de los medios de cultivo seleccionados para las pruebas de potencial PGPR, afectó la tolerancia a As de las bacterias estudiadas. De esta manera, bacterias que llegaron a tolerar 30 mM de As en medios ricos que ofrecían un óptimo nutricional (LB), al ser probadas en medios de menor contenido nutricional sus tolerancias se vieron reducidas.

En general, los parámetros y los procesos bioquímicos estudiados en las bacterias disminuyeron ante la presencia de As, a excepción de la producción de sideróforos en bacterias de rizósfera, que fue en aumento junto con la concentración de  $As^{III}$ . Esto, sugeriría un mecanismo de tolerancia adquirido por las bacterias S-21 y S-16, donde los sideróforos bacterianos aumentarían la tolerancia a la toxicidad por metales pesados. Debido a que estos tienen como función reducir las concentraciones del metal en estado libre (Schalk et al. 2011). Así mismo, son capaces de mejorar la captación de Fe, elemento que participa en la activación de la transcripción de la enzima oxidasa  $As^{III}$  (Ghosh et al. 2015). A su vez, la toma de Fe favorece la FBN, como se explicó anteriormente (Berraho et al. 1997).

Las concentraciones analizadas en el proceso de selección de bacterias, fueron alrededor de 100 veces mayores a las registradas en suelos con contenido de As. Por lo que, bacterias capaces de tolerar y mantener la eficiencia hasta 2 mM de As, serían una herramienta relevante y a tener en cuenta para reducir los efectos fitotóxicos del As en plantas. Sin embargo, tolerancias mayores a las encontradas en el suelo, dan al microorganismo propiedades de plasticidad que le permiten sobrevivir a eventos puntuales que sean capaces de elevar el contenido de As en el suelo.

Respecto a lo obtenido en el ensayo *in vitro*, la hipótesis del gradiente de estrés de Bertness y Callaway (1994), permite dar algunas explicaciones. Esta hipótesis establece que en las distintas comunidades existe un balance de interacciones positivas y negativas, dependiendo del nivel de estrés biótico o abiótico al cual estén expuestos. De esta manera, en ambientes estresantes ( $As^+$ ), predominan las relaciones positivas facilitadoras, en donde al menos uno de los organismos se ve favorecido por la interacción no trófica. En sentido inverso, en ambientes no estresantes ( $As^-$ ), predominan las relaciones negativas de tipo competitivas. Por lo que se podría explicar parcialmente, la escasa promoción del crecimiento de las plantas por parte de las bacterias en ambientes no estresantes.

Particularmente en los tratamientos  $As^-$  (ambiente no estresado), donde plantas y microorganismos, se encontrarían en un óptimo fisiológico, no propiciaría una interacción positiva entre ellas, por el contrario, competitiva. En el caso de la interacción planta-bacteria de rizósfera, como S-16 y S-21, se pudo evidenciar una coexistencia, mientras que en la interacción planta-bacteria endofítica (aisladas de raíz), R-51 y R-55, resultaron ser más competitivas. Además, las bacterias de rizósfera generaron más biomasa que el testigo, pudiendo deberse a la producción de fitohormonas (Salomon et al. 2014).

Por otro lado, los tratamientos As<sup>+</sup> (ambiente estresado), no se visualizó una interacción facilitadora que mostrara beneficios para las plantas. Esto puede deberse a que los procesos en las bacterias se producen cuando el elemento que promueven, se encuentra no disponible o escaso, tanto para FBN (Reed et al. 2011), como para solubilización de fosfatos (Beltrán 2014) y producción de sideróforos (Lemanceau et al. 2009, Frioni 2005). De esta manera, como se puede ver en la figura nº 46 las plantas del ensayo se encontraban en una zona de suficiencia u óptima, en la cual, tales concentraciones de nutrientes no implican necesariamente un aumento en los rendimientos (Barbazán 1998). Este concepto también es aplicable a las bacterias, que no requirieron de la activación de procesos fisiológicos ni la interacción simbiótica con las plantas para obtener nutrientes. Otro aspecto a tener en cuenta, es que la presencia de metales pesados dificulta los procesos simbióticos (Broos et al. 2005, Heckman et al. 1987), no pudiendo visibilizar efectos positivos de las bacterias endofíticas es decir las aisladas de raíz, R-51 y R-55.



Figura 46: Rendimiento en función de la concentración de nutriente en la planta. Concentraciones críticas de deficiencia y toxicidad. Fuente: Barbazán 1998.

Si bien las cuatro bacterias realizan FBN, solubilizan fosfatos y producen sideróforos, el mecanismo preponderante recae sobre este último. En primer lugar, porque el N y el P se encuentran disponibles en el medio de cultivo *in vitro* y segundo porque el Fe<sup>+2</sup> del medio se encuentra como FE-EDTA, las bacterias por medio de sideróforos captan con mayor facilidad el Fe<sup>+2</sup> quelado (Joyce y Buyer 1991). Los sideróforos, además de su alta afinidad por el Fe<sup>+2</sup> pueden acomplejarse con otros iones divalentes: Cd<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup> o trivalentes, Mn<sup>+3</sup>, Co<sup>+3</sup>, Al<sup>+3</sup>, como así también con As<sup>III</sup> y As<sup>V</sup> (Schalk et al. 2011, Ahemed et al. 2014, Nair et al. 2007). Además las bacterias de rizósfera, S-21 y S-16, produjeron más contenido de sideróforos a medida que aumentaba la concentración de As, por lo que se podría establecer un mecanismo de tolerancia más eficiente a diferencia de las endofíticas, R-51 y R-55, cuya producción de sideróforos se vio disminuida ante la presencia de As.

Los metales a excepción del Fe<sup>+2</sup>, son capaces de estimular o inhibir la producción de sideróforos en las bacterias. Una posible explicación sería que los sideróforos libres en el medio se reducirían en presencia de otros metales, como resultado de la formación de complejos, se estimularía una producción adicional de sideróforos al medio. Cabe aclarar que este efecto sobre la síntesis de sideróforos, no influiría la producción de OMPs (Schalk et al. 2011). En el estudio realizado por Nair et al. (2007) se encontró que el orden de acomplejamiento de los metales con los sideróforos

bacterianos es como sigue:  $\text{AsO}_4^{-2} = \text{AsO}_2^{-} > \text{Fe}^{+3}$  por lo que los sideróforos bacterianos tienen potencial para acomplejar As.

En Mendoza, existen estudios que demuestran la colonización de raíces de *Vitis vinífera* cv. Malbec por bacterias PGPR (Salomón et al. 2014). Asimismo, en un estudio de Funes Pinter et al. (2016) se observa que bacterias PGPR, tolerantes a As disminuyeron cuadros de fitotoxicidad en plantas de vid *in vitro*.

## CONCLUSIÓN.

Es necesario realizar futuros estudios que permitan dilucidar los mecanismos y la dinámica en la interacción del triplete: planta-bacteria-As para poder extrapolar con éxito estos resultados a nivel de campo. Las bacterias responden a las características buscadas de tolerancia a  $As^{III}$  y a atributos que permiten promover el crecimiento vegetal en plantas. Por lo tanto, no son recursos a descartar.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Adjimani J., Asare P., 2015. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. Toxicology reports. Pp. 721-728.
- Aguado G., Moreno-Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya E., Preciado-Ortiz E., 2012. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 N° 1, pp 9 – 21.
- Ahemad M., Kibret M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University–Science. Vol. 26, pp 1-20.
- Ahmed E., Holmstrom J., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology. Vol. 7N° 3, pp 196–208.
- Albores A., Quintanilla B., Razo L., Cebrián M., 1997. Introducción a la toxicología ambiental. Cap. 15 Arsénico. Metepec. pp 247-261.
- Ali S., Vidhale N., 2013. Bacterial Siderophore and their Application: A review. International journal of current microbiology and applied sciences. Vol. 2, N° 12, pp. 303-312. ISSN: 2319-7706.
- Alvarez J., Bolado S., Cancillo I., Calvo C., 2003. Dinámica de adsorción – desorción de arsénico (V) en suelos de cultivo en Castilla y León. Estudios de la Zona No Saturada del Suelo. Vol. 6, pp 331-338.
- Baath I., 1989. Effects of heavy metal in soil on microbial processes and populations. Water, air and soil pollution. Vol. 47, pp. 335-379.
- Bagg A., Neilands J., 1987. Molecular Mechanism of Regulation of Siderophore-Mediated Iron Assimilation. Microbiological reviews, Vol. 51, N°. 4, pp 509-518.
- Barbazán M., 1998. Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Universidad de la República de Montevideo.
- Beltrán M., 2014. Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Vol.15, pp. 101-113.
- Berraho E., Lesueur D., Diem H., Sasson A., 1997. Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium. World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 13, pp 501-510.
- Bertness M.D., Callaway R., 1994. Positive interactions in communities. Tree. Elsevier Science. Vol. 9 n° 5.
- Broos K., Beyens H., Smolders E., 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biol Biochem. Vol. 37, pp 573–579.

Carbonell A., Burló F., Mataix J., 1995. Arsénico en el sistema suelo-planta. Significado ambiental. Universidad de Alicante. Ed. Espagrafic. ISBN: 84-7908-192-9.

Cassán F., Lucangeli C., Bottini R., Piccoli P., 2001. Azospirillum spp. Metabolize [17,17-2H2] Gibberellin A20 to [17,17-2H2] Gibberellin A1 in vivo in dy Rice Mutant Seedlings. Plant Cell Physiol 42, 763-767.

Cervantes C., Espino A., Acebedo F., León I., Rivera M., Avila M., 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. Revista latinoamericana de microbiología. Vol. 48, Nº 2, pp 203-210.

Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli F, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia CN, Piccoli P., 2014. Azospirillum brasilense ameliorates the response of Arabidopsis thaliana to drought mainly via enhancement of ABA levels. Physiol. Plant., doi:10.1111/ppl.12221.

Colombo C., Palumbo G, He J., Pinton R. y Cesco S., 2014. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. Journal of Soils and Sediments. Vol. 14, Nº 3. ISSN 1439-0108.

Das S., Jean J., Kar S., Chou M., Chen C., 2014. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. Journal of Hazardous Materials.

Davenport J., Pollard A., Sullivan T., 2015. Siderophores to increase iron availability. Proceedings of the western nutrient management conference. Vol. 11.

Diby P., Sudha N., 2008. Stress adaptations in a Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. Journal of basic microbiology. Vol. 48, pp. 378-384.

Döbereiner J. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. Cap. 7 meios de culturas e soluções utilizadas, pp. 49- 50. Ed. Embrapa- spi, Brasilia.

Frioni L., 2005. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República, Uruguay. ISBN: 9974-0-0290-7.

Funes Pinter M.I., Salomon V., Berli F., Bottini R., Piccoli P., 2016. Characterization of the As (III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to *in vitro*-grown grapevine. Applied soil ecology. Vol. 109, pp 60-68.

García J., García A., Ramos B., Gutierrez J., Lucas J., 2015. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. Journal of plant physiology. Vol. 188, pp 72-79.

Ghosh P., Rathinasabapathi B., Teplitski M., Lena M., 2015. Bacterial ability in AsIII oxidation and AsV reduction: Relation to arsenic tolerance, P uptake, and siderophore production. Chemosphere Vol. 138, pp 995–1000.

Gobierno de Chile, 2004. Cap 7. Análisis de regulaciones internacionales sobre criterios de protección de calidad de suelo en relación a metales pesados. pp 174-186.

- Gram L., 1996. The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 25, pp 199-205.
- Guerinot M., Yi Y., 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiology*. Vol. 104, pp. 815-820.
- Heckman J.R., Angle J.S., Chaney R.L., 1987. Residual effects of sewage sludge on soybean II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. *J Environ Qual*. Vol 16, pp 117–124.
- Islam F., Yasmeen T., Ali Q., Ali S., Arif M., Hussain S., Rizvi H., 2014. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 104, pp 285-293.
- Jacobs L.W.; Keeney D.R., Walsh L.M., 1970. Arsenic residue toxicity to vegetable crops grown on plainfield sand. *Agron. J*. Vol. 62, pp. 588-91.
- Joyce L., Buyer J., 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular plant-microbe interactions*. Vol.4, Nº 1, pp 5-13.
- Khan M., Zaidi A, Wani A., Oves M, 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett*. Vol. 7, pp 1–19.
- Lemanceau P., Expert D., Gaymard F., Bakker P., Briat J., 2009. Role of Iron in Plant–Microbe Interactions. *Advances in botanical research*, Vol. 51, pp.491-549. ISBN: 978-0-12-374834-8.
- Mandal B., Suzuki K., 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. Pp. 201-235.
- Mandal S., Pati B., Das A., Ghosh A., 2008. Characterization of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic: isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. *Journal Gen. Appl. Microbiol*. Vol. 54, pp. 93-99.
- Mayor R., 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *R. Rev. Instituto de Medicina Tropical*. Vol. 5 Nº 2, pp. 23-29.
- Milagres AMF., Machuca A., Napoleaõ D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* Vol. 37, pp 1-6.
- Murashige y Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* Vol. 15, pp 473-497.
- Nair A., Juwarkar A., Singh S., 2007. Production and Characterization of Siderophores and its Application in Arsenic Removal from Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*. Vol. 180, pp 199–212.
- Nautiyal SC. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 170, pp 265- 275.

Navarro J., Aguilar I., Lopez J., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas, Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente. Asociación española de ecología terrestre*. Vol.16 (2), pp 10-25.

Nielsen F.H., 1991. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: current knowledge and speculation. *FASEB J*. Vol. 5, pp. 2661-2667.

O'Reilly J., Watt M., Shaw R., Marcilla A., Ward N., 2010. Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina. *Environmental Geochemistry and health*. Vol. 32, pp 491-515.

Piccoli P, Bottini R., 1994. Effects of C/N relationships, N content, pH, and time of culture on growth and gibberellin production of *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis* 17, 229-236.

Rajkumar M., Freitas H., 2007. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 3491-3498.

Rajkumar M., Ae N., Freitas H., 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. Vol. 77, pp 153–160.

Reed S., Cleveland C., Townsend A., 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. Vol. 42, pp. 489–512.

Salomon M.V., Bottini R., Souza Filho G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M., Piccoli P., 2014. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiol. Plant*. ISSN 0031-9317.

Sarabia M., Pedraza R., Martinez M., 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. Vol. 12, pp. 65-71.

Schalk I., Hannauer M., Braud A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*. Vol. 13 N°11, pp 2844–2854.

Schwarzenbach R., Egli T., Hofstetter T., Gunter U., Wehrli B., 2010. Global water pollution and human health. *Rev. Environ. Resour*. Vol.35, pp. 36-109.

Schwyn B., Neilands B., 1987. Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. Vol. 160, pp 47-56.

Sprent J., Sutherland J.M., M. de Faria, Dilworth M., Corby H., Becking J., Materon J., Drozd J., 1987. Some aspects of the biology of nitrogen-fixing organisms. *Philosophical Transactions of the royal society*. Vol. 317, pp. 111-129.

Tabak H., Lens P., Van Hullebusch E., Dejonghe W., 2005. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides—1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. Vol. 4, pp 115–156.

Tarback E., Lutgens F., 2010. Ciencias de la tierra. Una introducción a la geología física. Octava edición. Ed. Pearson. Vol. 1. ISBN 978-84-8322-665-0.

Uthus E.O., 1994. Arsenic essentiality and factors affecting its importance. In: Chappell W.R, Abernathy C.O, Cothorn C.R. eds., Arsenic Exposure and Health. Northwood, UK: Science and Technology Letters. pp. 199-208.

Violante A., Pigna M., 2002. Competitive Sorption of Arsenate and Phosphate on Different Clay Minerals and Soils. Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 66, pp. 1788–1796.

Walsh L., Keeney D., 1975. Behavior and phytotoxicity of inorganic arsenicals in soils. Arsenical pesticides, Chapter 3.

World Health Organization, 2006. Guidelines for drinking-water quality. First addendum to third edition. Volume 1, Recommendations. ISBN 92 4 154696 4.

Wuana R., Okieimen F., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. International scholarly research network. ISRN Ecology. Article ID 402647, pp 1-20.

## ANEXO

### Fijación de N<sub>2</sub>. Medio NFB.

Cada droga se agregó en el orden en que aparecen en la lista y se disolvió a cada a medida que se incorporaron:

Tabla 8: Preparación para 1L de medio NFB.

Droga	Dosis para 1 L
Ácido málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solución de micronutrientes	2 mL
Solución azul de bromotimol	2 mL
Solución de Fe-EDTA	4 mL
Solución de vitaminas	1 mL
K(OH)	4,5 g

Las soluciones fueron preparadas según las siguientes tablas:

Solución de Micronutrientes.

Droga Dosis para 200 mL

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,24 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,28 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 g
MnSO <sub>4</sub>	0,235 g

Solución azul de bromotimol.

Droga Dosis para 100 mL

K(OH)	1,12 g
Azul de bromotimol	0,5 g

Solución Fe-EDTA al 1,64 %.

Droga Dosis para 100 mL

FeSO4	0,56 g
EDTA disódica	0,75 g

Solución de Vitaminas.

Droga Dosis para 100 mL

Biotina	10 mg
Piridoxal- HCl	20 mg

Cuando se llega a la incorporación de la solución de bromotimol el medio adquiere una coloración anaranjada y al finalizar la preparación se obtiene un color verde musgo. Posteriormente se enrazó con agua destilada hasta llegar al litro de medio. Se ajusta el pH a 6,8-6,5 con Na(OH) y se incorpora el agar al 1,5 % para luego autoclavar a 1 atm por 20 min y dosificar en las placas de Petri.

### Solubilización de fosfatos.

Una vez preparado el medio se lleva a autoclave a 1 atm por 20 min.

Droga Dosis para 1 L

Glucosa	20 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g

### Producción de Sideróforos.

El medio consiste en la preparación de cuatro soluciones

Solución Nº 1:

9,1 mg de CAS en 7,5 mL de agua destilada.

Solución N° 2:

Droga Dosis

Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O (1 mM)	1,5 mL
HCl (10 mM)	1,5 mL

Solución N° 3:

11mg HDTMA en 6 mL de agua destilada.

Solución N° 4:

4,536 g de PIPES en 112,5 mL de agua destilada.

**Ensayo *in vitro*.**

Droga	Dosis para introducción para 1L	Dosis para repique para 1 L
Sacarosa	30 g	30 g
Solución Macronutrientes 10x	100 mL	50 mL
Solución Micronutrientes 10x	100 mL	50 mL
Solución Fe-EDTA	10 mL	5 mL
Vitaminas	1 mL	1 mL
Solución ANA	-	1 mL