

# Efecto del arsénico sobre plantas forrajeras de importancia pecuaria en la Argentina\*

Effect of arsenic on forages with relevance for Argentina livestock

RODRÍGUEZ, M<sup>1,2</sup>; ALVAREZ GONÇALVEZ, CV<sup>1,2</sup>; FERNÁNDEZ CIRELLI, A<sup>1,2</sup> Y PÉREZ CARRERA, A<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA), CONICET-UBA. <sup>2</sup>Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Av. Chorroarín N° 280 C1427CWO. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN

En la Llanura Chacopampeana, Argentina, las especies forrajeras se encuentran expuestas al arsénico presente en el agua subterránea normalmente utilizada para riego. En este estudio se determinó el efecto del arsénico en la germinación de las semillas y en la biomasa aérea de alfalfa y ryegrass perenne. No se detectó un impacto significativo sobre el porcentaje de germinación en ninguna de las dos especies, pero sí sobre las longitudes de hipocótilo de alfalfa y en las longitudes radiculares de ambas especies. Se observó una disminución de la biomasa en presencia de arsénico pero esta fue no significativa. Estos resultados evidencian la importancia de profundizar el estudio de los efectos del arsénico y otros elementos traza asociados en el desarrollo de los forrajes, principal sustento de la producción ganadera.

Palabras clave: (As), (alfalfa), (ryegrass), (germinación), (toxicidad)

\*Premio Estímulo a la Investigación Científica 2014 (categoría alumnos), otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Correspondencia *e-mail*: ceta@fvet.uba.ar

Recibido: 14/12/2015

Aceptado: 21/03/2016

## SUMMARY

In the Chacopampean Plain, Argentina, forage species are exposed to arsenic present in groundwater used for irrigation. In this study, the effect of arsenic on seedling germination and on the biomass of alfalfa and perennial grass was determined. A non significant impact on the germination percentage in either species was detected; however, it was observed a negative effect on the hypocotyls length of alfalfa, and on the root lengths of both species. A decrease in biomass was observed in the presence of arsenic but this was not significant. These results demonstrate the importance of further study of the arsenic effects and the other trace elements on fodder development, mainstay of livestock production.

Keywords: (arsenic), (alfalfa), (grass), (germination), (toxicity)

## INTRODUCCIÓN

El adecuado manejo de las pasturas, y las prácticas tendientes a mejorar la calidad y el rendimiento de las mismas permite mejorar el crecimiento, desarrollo y producción animal, aumentando la rentabilidad de las actividades agropecuarias. Las leguminosas son utilizadas comúnmente como forrajes debido a su alto valor nutricional, su habilidad de fijar nitrógeno y su buena digestibilidad. Usualmente son cultivadas en combinación con gramíneas, ricas en fibras, para evitar complicaciones en el ganado debido al consumo excesivo de leguminosas, como pueden ser indigestiones o meteorismos espumosos. Las dos especies utilizadas en este trabajo, rye-grass perenne (*Lolium perenne* Var. *Horizon*) y alfalfa (*Medicago sativa*) fueron elegidas en base a su amplia utilización como forraje y su consumo preferencial por el ganado (Carrillo, 2003).

En la Llanura Chacopampeana, Argentina, la producción agrícola-ganadera es una de las actividades principales, y el agua subterránea es normalmente utilizada como agua de riego para cultivos y para aprovisionamiento del ganado. En algunas zonas de esta región la calidad del agua se ve alterada por la presencia de altos tenores salinos y elevados niveles de elementos traza entre los que se destaca principalmente el arsénico (As). Este se encuentra naturalmente presente en el medio ambiente, sobre todo en el agua subterránea, debido a los procesos de disolución a partir de los sedimentos loésicos

(Smedley et al., 2002). Se lo puede encontrar tanto en forma orgánica como inorgánica, siendo las segundas las especies principales encontradas en el agua y suelo. El As es un conocido elemento cancerígeno (Waalkes et al. 2004, Bhattacharjee et al., 2013; Cohen et al, 2013; Brocato et al., 2015), siendo las especies inorgánicas ( $As^{III}$  y  $As^V$ ) más tóxicas que las orgánicas (Bundschuh et al., 2008).

Las plantas se hallan expuestas al As presente tanto en el agua de riego como en el suelo. Las formas inorgánicas son absorbidas a través de diferentes transportadores y son transformadas y movilizadas a otros tejidos de la planta. Varios estudios han reportado que el As afecta el crecimiento y la germinación de las plantas, causa estrés oxidativo, disminuye la absorción de fósforo, produce inhibición en la elongación radicular y una disminución tanto en la proliferación celular como en la producción de biomasa. También se observó disminución en el número de hojas, la altura de la planta y el porcentaje de germinación, diversos cambios morfológicos y alteración de la fotosíntesis (Carbonell-Barrachina et al. 1998; Miteva, 2002; Ahmed et al. 2006; Shaibur et al. 2008; Srivastava et al. 2009; Smith et al. 2009; Finnegan & Chen, 2012; Farnese et al. 2014; Pérez Carrera & Fernández Cirelli 2014). Múltiples estudios indican que estos parámetros dependen de varios factores como son las características del suelo, otros iones presentes en

el agua, la especie vegetal, su perfil genético, etc. (Rahman & Hasegawa, 2011; Rai et al, 2011, Smith et al. 2009; Iriel et al, 2015). A pesar de la importancia económica de las forrajeras, los efectos del As sobre las mismas no han sido estudiados en profundidad en las especies más utilizadas como alimento para el ganado. La presencia de As en el suelo y agua en áreas de producción ganadera podría afectar el crecimiento y las características nutricionales de los forrajes (Pérez Carrera & Fernández Cirelli, 2014) afectando la nutrición de los animales y disminuyendo la capacidad productiva de los mismos.

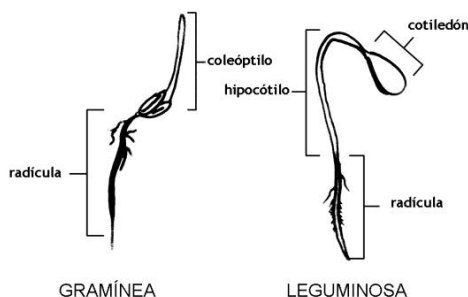
El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del As presente en el agua de riego sobre los parámetros de germinación y sobre la biomasa aérea en dos de las principales especies forrajeras utilizadas: ryegrass perenne (*Lolium perenne*) Var. *Horizon* y alfalfa (*Medicago sativa* L.).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizaron semillas de ryegrass perenne (*Lolium perenne* Var. *horizon*) y alfalfa (*Medicago sativa*) obtenidas a partir de un proveedor nacional de semillas comerciales. Su viabilidad fue confirmada antes del comienzo de las pruebas mediante un ensayo de germinación en el cual las semillas de cada especie alcanzaron alrededor de 90% de germinación al 5to día. Además se analizó la velocidad de germinación, observándose que alcanzaba una meseta a las 120hs (5 días), coincidiendo con el tiempo recomendado por normas internacionales (OECD 208, USEPA 600/3-88/029), y lo mencionado en la bibliografía, para la realización de los ensayos de toxicidad aguda.

Para determinar el efecto del As presente en el agua de riego en los parámetros de germinación, se sembraron semillas en presencia de distintas concentraciones de As (50, 100, 500, 1000 y 5000  $\mu\text{g/L}$ ). Para ello se utilizaron placas de Petri estériles y papel de filtro de 80 g/m<sup>2</sup>, 250 $\mu\text{m}$  de grosor, poros de 14 $\mu\text{m}$  y una permeabilidad de 14 l/s/m<sup>2</sup>. El experimento se llevó a cabo siguiendo una versión modificada del protocolo internacional EPA 600/3. El As utilizado fue arsenato de sodio heptahidrato ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) de Biopack (CAS# 10048-95-0), el cual fue disuelto para la preparación de una solución stock de alta concentración para la obtención de las distintas concentraciones utilizadas en el experimento. Las mismas se asemejan a concentraciones naturales de As halladas en el agua de riego en Argentina. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio al 2% m/v. Como control negativo se utilizó agua destilada.

En cada placa de Petri grupos de 25 semillas fueron colocadas sobre el papel de filtro y embebidas con 2.5ml de cada solución. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las placas fueron mantenidas en oscuridad y bajo condiciones ambientales controladas de humedad y a temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), por 5 días (120hs). Todas las semillas con una radícula mayor a 2mm fueron consideradas como germinadas. Las plántulas fueron fotografiadas con una cámara de alta resolución y el largo de sus radículas, hipocótilos y coleóptilo, según corresponda, fueron medidos mediante un software digital (Figura 1).



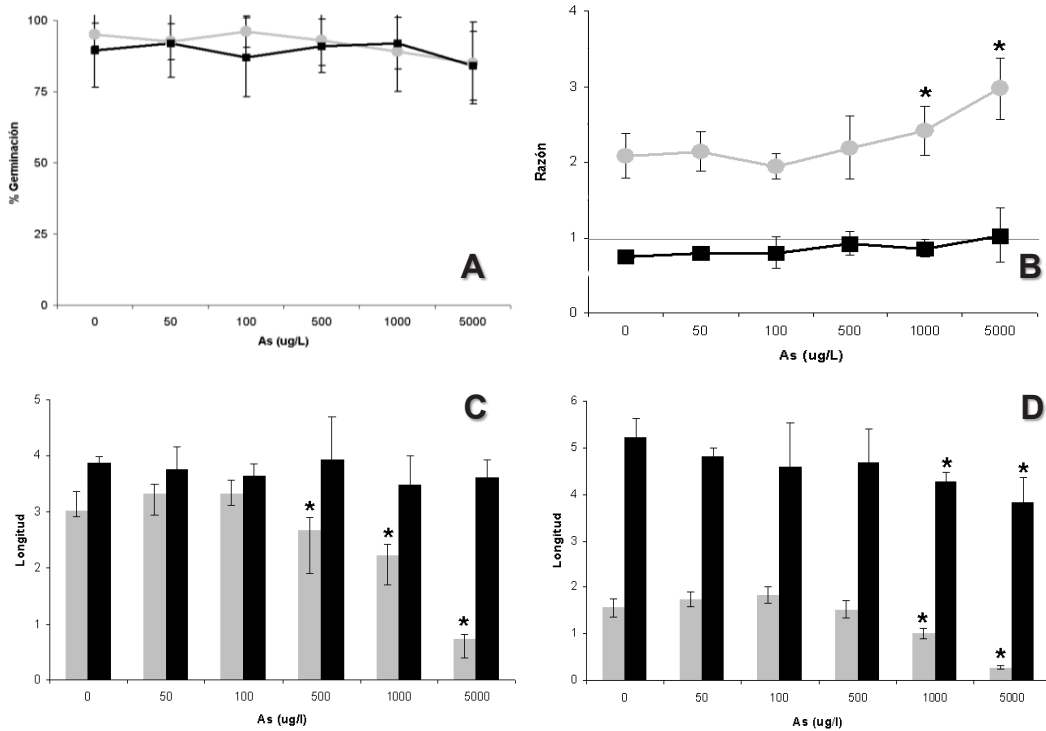
**Figura 1.** Esquema de una semilla germinada de gramínea y otra de leguminosa donde se muestran las secciones mensuradas de las plántulas.

Para la evolución de los efectos sobre la producción de biomasa se colocaron cantidades iguales de suelo comercial (proveniente de Escobar, Provincia de Buenos Aires, Argentina) en 6 reactores. Los mismos se dividieron luego al azar en dos grupos, y cada uno fue asignado a un tratamiento distinto (0 y 1 mg/L de As), de modo que todos los tratamientos se realizaran por triplicado. En cada uno se sembraron, a chorrillo las semillas según recomendaciones para cada especie, y en cantidades iguales en cada reactor. Los reactores fueron regados con agua destilada hasta la germinación de las semillas. Tras la aparición de los primeros brotes, las mismas fueron regadas con las soluciones preparadas para cada tratamiento. Durante toda la experiencia se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura natural, resguardadas de la lluvia.

Los experimentos fueron conducidos utilizando el diseño completamente aleatorizado (DCA). Todos los resultados fueron analizados mediante un sistema ciego. Se realizó un análisis de varianza (ADeVa) para determinar la significancia estadística de los resultados. Para el análisis de la germinación se utilizó la transformación de *arcsin* antes del ADeVa (Zar, 1996). Los cálculos estadísticos fueron realizados mediante el programa InfoStat®.

## RESULTADOS

Los porcentajes de germinación basales fueron 86% y 95% para alfalfa y ryegrass respectivamente. No se detectó un impacto significativo ( $p < 0.05$ ) del As sobre la germinación en ninguna de las dos especies para los distintos tratamientos utilizados en el ensayo (Figura 2A).



**Figura 2.** A) Porcentaje de semillas germinadas en función de la concentración de As. B) Relación largo del hipocótilo/largo de la radícula para alfalfa y relación largo del coleótilo/largo de la radícula para ryegrass perenne para los diferentes tratamientos. C) Longitud del hipocótilo para alfalfa y del coleótilo para ryegrass perenne en los diferentes tratamientos. D) Longitud radicular para alfalfa y ryegrass perenne en los diferentes tratamientos. Las barras muestran los intervalos de confianza y los asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control. Negro: ryegrass, Gris: alfalfa.

La reducción en el porcentaje de germinación ha sido documentada en varias especies vegetales (Talukdar et al, 2011; Upadhyaya et al, 2014), pero el impacto del As sobre este parámetro no fue observado en este estudio. Esto sugiere que tanto *M. sativa* como *R. perenne* pueden germinar bien bajo el riego con agua con un amplio rango de concentraciones de As.

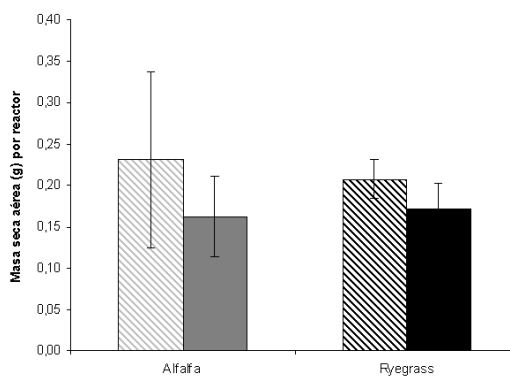
La toxicidad del As para las radículas e hipocótilos de estos forrajes fue evidenciada mediante la disminución de sus longitudes. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con una tendencia decreciente en las longitudes en función del aumento de las concentraciones de As en el caso de la alfalfa, pero no se observaron diferencias en ryegrass (Figura 2C).

El análisis de la variación de la elongación del hipocótilo en alfalfa muestran que se produce una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a partir de los 500  $\mu\text{g/L}$  respecto del control. En contraste, el ryegrass aparenta ser menos sensible pues no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control en relación a la elongación del coleóptilo para ninguno de los tratamientos.

Con respecto al efecto sobre la elongación radicular, la alfalfa mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el control a partir de los 1000  $\mu\text{g/L}$ . En este parámetro ryegrass perenne mostró el mismo comportamiento, observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con concentraciones iguales o superiores a 1000  $\mu\text{g/L}$  (Figura 2D).

Las relaciones entre el largo del hipocótilo y el largo de la radícula (LH/LR) para la alfalfa, y entre el largo del coleóptilo y el largo de la radícula (LC/LR) para ryegrass, fueron determinadas como otro indicador de toxicidad en las dos especies. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para ryegrass. La alfalfa mostró una tendencia a aumentar su relación LH/LR con el aumento de las concentraciones de As a las cuales fue expuesta, observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el control a partir de los 1000  $\mu\text{g/L}$  (Figura 2B).

En las experiencias de siembra en suelo, llevadas a cabo con y sin exposición a As, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aunque se registró una disminución en la producción de biomasa de ambas especies (Figura 3).



**Figura 3.** Masa seca de alfalfa (gris) y ryegrass perenne (negro) obtenida de los reactores. Encolor plano plantas expuestas a As. En rayado plantas control. Las barras muestran los intervalos de confianza.

Estudios anteriores en nuestro laboratorio utilizando alfalfa (Pérez Carrera & Fernández Cirelli, 2014) han mostrado que el aumento de la concentración de As en el suelo también aumenta su concentración en las hojas, tallos y raíces, y que la misma varía entre cosechas, demostrando

su transferencia hacia el forraje. Mascher et al (2002) en otra especie de leguminosa, trébol rojo, observaron que se producía una reducción significativa en el crecimiento de los brotes ante la exposición a altas concentraciones de As y que dicho efecto era mayor en los hipocótilos que en

las radículas. Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente estudio.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de los resultados observados en el presente estudio se evidencia que el efecto del As sobre el desarrollo del forraje es diferente según la especie. La alfalfa mostró mayor sensibilidad que el ryegrass ante la exposición al As. En ambas especies se observó un efecto más agudo en la porción radicular. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por otros autores (Shaibur et al. 2008; Srivastava et al. 2009; Smith et al. 2009; Shri et al, 2009). A pesar de evidenciarse una reducción de la biomasa por exposición al As en las plantas cultivadas en suelo, las diferencias no fueron significativas. El presente trabajo muestra la importancia de profundizar el estudio de los efectos del As y otros elementos traza asociados en el desarrollo de los forrajes, principal sustento de la producción ganadera, y de la transferencia hacia el forraje como posible exposición del ganado al As.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos aires y al CONICET por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed S.F.R.; Killham K.; Alexander I. Influences of arbuscular fungus *Glomus mosseae* on growth and nutrition of lentil irrigated with arsenic contaminated water. *Plan soil*. 2006: 258, 33-41.
- Bhattacharjee, P., Banerjee, M., & Giri, A. K. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environment international*, 2013: 53, 29-40.
- Brocato, J., Chen, D., Liu, J., Fang, L., Jin, C., & Costa, M. A Potential New Mechanism of Arsenic Carcinogenesis: Depletion of Stem-Loop Binding Protein and Increase in Polyadenylated Canonical Histone H3. 1 mRNA. *Biol Trace Elem Res*, 2015: 116, 72-81.
- Bundschuh, J., Litter, M., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H., Jean, J.S., Liu, C.W., López, D., Armienta, M.A., Guilherme, L., Cornejo, L., Gómez Cuevas, A., Cumbal, L. and Toujaguez, R. 'One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries', *Sci Total Env*, 2012: 429, 2-35.
- Carbonell-Barrachina A.A.; Burlo, F.; Mataix, J. Response of bean micronutrient nutrition to arsenic and salinity. *J Plant Nutr*, 1998, 21, 1287-1299.
- Carrillo, J. Manejo de pasturas. Ediciones INTA. 2003. Buenos Aires.
- Cohen, S. M., Arnold, L. L., Beck, B. D., Lewis, A. S., & Eldan, M. Evaluation of the carcinogenicity of inorganic arsenic. *Crit Rev Tox*, 2013: 43(9), 711-752.
- EPA 600/3 - Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites, pg 84 (EPA 600/3 - 88/029 PB88 235 510/As ERL-COR-495).
- Farnese, F.S.; Alves, J.O.; Gusman, G.S.; Leao, G.A.; Silveira, N.M.; Silva, P.E.M.; Ribeiro, C.; Cambraia, J. (2014). Effects of adding nitroprusside on arsenic stressed response of *Pistia stratiotes* L. under hydroponic conditions. *Int J Phytorem*, 16, 123-137.
- Finnegan, P. M., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Fron Physio*, 3.
- Iriel, A., Dundas, G., Cirelli, A. F., & Lagorio, M. G. (2015). Effect of arsenic on reflectance spectra and chlorophyll fluorescence of aquatic plants. *Chemosphere*, 119, 697-703.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., & Bergmann, H. (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, 163(5), 961-969.
- Miteva, E. (2002). Accumulation and effect of arsenic on tomatoes. *Com Soil Scie Plant An*, 33, 1917-1926.
- Pérez Carrera, A.L.; Fernandez Cirelli, A. (2014). Arsenic biotransference to alfalfa (*Medicago Sativa*). *Int J Environ Health*, 7 (1), 31-40.
- Rahman, M. A., & Hasegawa, H. (2011). Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. *Chemosphere*, 83(5), 633-646.

16. Rai, A., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Shri, M., Kumar, S., ... & Tuli, R. (2011). Arsenic tolerances in rice (*Oryza Sativa*) have a predominant role in transcriptional regulation of a set of genes including sulphur assimilation pathway and antioxidant system. *Chemosphere*, 82(7), 986-995.
17. Shaibur, M.R.; Kitajima, N.; Sugewara, R.; Kondo, T.; Alam, S.; Imamul Huq, S.M.; Kawai, S. (2008). Critical toxicity of arsenic and elemental composition of arsenic induced chlorosis in hydroponic Sorghum. *Water Air Soil Poll*, 191, 279-292.
18. Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Mallick, S., Misra, P., ... & Tuli, R. (2009). Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotox Environ Safe*, 72(4), 1102-1110.
19. Smedley, P.L. and Kinniburgh, D. (2002) 'A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters', *Appl Geochem*, Vol. 17, pp.517-568.
20. Smith, S.E.; Christophersen, H.M.; Pope, S.; Smith, F.A. (2010). Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil*, 327, 1-21.
21. Srivastava, M.; Ma, L.Q.; Singh, N.; Singh, S. (2005). Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *J Exp Bot*, 56, 1335-1342.
22. Talukdar, D. (2011). Effect of arsenic-induced toxicity on morphological traits of *Trigonella foenum-graecum* L. and *Lathyrus sativus* L. during germination and early seedling growth. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(2), 116-123.
23. Upadhyaya, H., Shome, S., Roy, D., & Bhattacharya, M. K. (2014). Arsenic Induced Changes in Growth and Physiological Responses in *Vigna radiata* Seedling: Effect of Curcumin Interaction. *American Journal of Plant Sciences*, 5(24), 3609.
24. Waalkes, M.P.; Liu, J.; Ward, J.M.; Diwan, B.A. (2004). Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology*, 198, 31-38.
25. Zar, J.A. (1996). *Biostatistical analysis*. Third edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 943.

