

UNA HERRAMIENTA PARA LA RESTAURACIÓN DE AMBIENTES RIBEREÑOS DEGRADADOS DE LA CUENCA MATANZA-RIACHUELO: *LOTUS TENUIS* WALDST. & KIT. EN SIMBIOSIS CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Ileana García^{1*}, Cristian Weigandt², Alicia Fabrizio de Iorio² y Laura de Cabo¹

¹ Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia – CONICET, Argentina.

* E-mail: igarcia@macn.gov.ar

² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía, Argentina.

Recibido: 01/07/2022
Aceptado: 28/09/2022

RESUMEN

La fitorremediación implica la destrucción, inactivación o estabilización de contaminantes (e.g. metales pesados) por parte de las plantas –y microorganismos asociados a sus raíces–, y permite mejorar la calidad de los suelos. Se estudió la capacidad de *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. para absorber metales y asociarse con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rizobios nativos de suelos de la Cuenca Matanza-Riachuelo. Plantas de *L. tenuis* fueron cultivadas en invernáculo en suelos ribereños de Gral. Las Heras (S1), Marcos Paz (S2) y Avellaneda (S3) durante 50 días. La fertilidad, los metales totales (ME-T) y la densidad de esporas (DE) edáficas se cuantificaron presembrado y a cosecha de las plantas. Se midió biomasa del vástago y radical, pigmentos fotosintéticos, Cu, Cr, y Zn en vástago y raíz, colonización HMA y nodulación radical. Se calcularon factores de translocación (FT) y bioconcentración (FBC) de metales. El fósforo disponible aumentó de S1 a S3 y disminuyó en S2 y S3 luego del cultivo. ME-T y ME-DTPA fueron mayores en S3 que en S1 y S2; no difirieron al finalizar el cultivo. La DE disminuyó desde S1 a S3. La biomasa aumentó y los pigmentos disminuyeron de S1 a S3. La colonización HMA no difirió significativamente entre sitios. El número de nódulos g⁻¹ peso fresco radical fue 9,7 en S1, 67,6 en S2 y 41,8 en S3. En general, la concentración de metales fue mayor en raíz y el FBC disminuyó de S1 a S3. Ante contaminación edáfica por Cu, Cr y Zn, la estrategia de *L. tenuis* consistiría en regular la translocación de metales hacia vástago. La contaminación no afectaría la simbiosis con rizobios y HMA. Así, el cultivo de *L. tenuis* permitiría conservar la microbiota nativa, favoreciendo la posterior implantación de otras especies en suelos ribereños.

Palabras clave: leguminosa, metales, microorganismos del suelo, suelos ribereños.

A TOOL FOR THE RESTORATION OF DEGRADED RIVERSIDE ENVIRONMENTS OF THE MATANZA-RIACHUELO BASIN: *LOTUS TENUIS* WALDST. & KIT. IN SYMBIOSIS WITH ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

SUMMARY

Phytoremediation involves the destruction, inactivation or stabilization of contaminants (e.g. heavy metals) by plants –and microorganisms associated with their roots–, and allows to improving soil quality. The ability of *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. to absorb metals and associate with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and native rhizobia from soils of the Matanza-Riachuelo Basin was studied. *L. tenuis* plants were grown in a greenhouse on riparian soils of Gral. Las Heras (S1), Marcos Paz (S2) and Avellaneda (S3) for 50 days. Fertility, total metals (ME-T) and soil spore density (SD) were quantified pre-sowing and at plant harvest. Shoot and root biomass, photosynthetic pigments, Cu, Cr, and Zn in shoot and root, AMF colonization, and root nodulation were measured. Metal translocation (TF) and bioconcentration (BCF) factors were calculated. Available phosphorus increased from S1 to S3 and decreased in S2 and S3 after harvest. ME-T and ME-DTPA were higher in S3 than in S1 and S2; they did not differ at harvest time. The SD decreased from S1 to S3. Biomass increased and pigments decreased from S1 to S3. AMF colonization did not significantly differ among sites. The number of nodules g⁻¹ radical fresh weight was 9.7 in S1, 67.6 in S2 and 41.8 in S3. In general, the metal concentration was higher in roots than in shoots and the BCF decreased from S1 to S3. Faced with edaphic contamination by Cu, Cr and Zn, the strategy of *L. tenuis* would consist of regulating the translocation of metals towards the shoot. The contamination would not affect the symbiosis with rhizobia and AMF. Thus, the cultivation of *L. tenuis* would allow the conservation of the native microbiota, favoring the subsequent implantation of other species in riparian soils.

Key words: legume, metals, soil microorganism, riparian soils.

INTRODUCCIÓN

El Río Matanza-Riachuelo es uno de los más contaminados de Latinoamérica (Magni *et al.*, 2021). La Cuenca del Río Matanza-Riachuelo (CMR) comprende parte de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y 14 partidos de la provincia de Buenos Aires, con una población de aproximadamente seis millones de habitantes (el 14,6% de la población total de la Argentina). En la cuenca alta, la ganadería es la principal actividad económica y se registran vertidos de efluentes cloacales sin tratar. Las cuencas media y baja están altamente urbanizadas y presentan una importante actividad industrial y descargas de efluentes con alta carga de contaminantes orgánicos y metales pesados (Magdaleno *et al.*, 2014; Casares y de Cabo, 2018).

A diferencia de otros contaminantes, los metales presentan baja o nula degradación química y microbiológica. Algunos pueden ser micronutrientes esenciales para la biota, como el cobre (Cu) y el zinc (Zn), o no cumplir un rol fisiológico, como el plomo (Pb) y el cromo (Cr) (Alloway, 2012). Los metales tienden a acumularse en distintos órganos de plantas y animales y posteriormente puede ocurrir su biomagnificación (Zhang *et al.*, 2021). Cuando estos elementos están presentes en el ambiente en concentraciones superiores a los niveles guía, resultan tóxicos para los seres vivos. Actualmente, en la CMR se registran elevados niveles de Cr, Pb, Cu y Zn en sus riberas, así como fósforo (P) y nitrógeno (N) (Mendoza *et al.*, 2015; de Cabo *et al.*, 2019).

La fitorremediación puede definirse como la destrucción, inactivación o estabilización de contaminantes por parte de las plantas y los microorganismos asociados a sus raíces y constituye una alternativa sustentable para la recuperación de ambientes deteriorados dado que permite reducir las concentraciones o efectos tóxicos de los contaminantes presentes (Shrirangasami *et al.*, 2020; Jach *et al.*, 2022). Por ello, la presencia de microorganismos que favorezcan el establecimiento y nutrición de las plantas constituye una alternativa eficiente para la recuperación de ambientes. En ese sentido, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen relaciones simbióticas con el 85% de las especies vegetales y permiten a las plantas aumentar la captación de agua y nutrientes a través de la conformación de una extensa red miceliana en el medio ambiente edáfico (Smith y Read, 2008; Parihar *et al.*, 2020). A su vez, las plantas colonizadas por HMA son capaces de retener metales en las raíces e hifas, lo cual disminuye su

translocación hacia el vástago. Esta inmovilización de metales en las estructuras fúngicas, sumado a una absorción de nutrientes, principalmente P, es uno de los mecanismos que contribuye a la tolerancia vegetal al ambiente edáfico contaminado (Miransari, 2017; Bhan-tana *et al.*, 2021).

Las plantas fitorremediadoras micotróficas son aquellas especies vegetales con la capacidad de mantener y propagar a las comunidades nativas de HMA aún en sitios contaminados y/o perturbados a fin de conservar al inóculo en el suelo. En tal sentido, *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. es una leguminosa naturalizada, tolerante a diversas condiciones de estrés (exceso y déficit hídrico, salinidad, sodicidad) (García *et al.*, 2008; García, 2021), que se encuentra presente en la CMR (Melnigani, 2017). Las plantas de *L. tenuis* establecen relación simbiótica con HMA y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (García *et al.*, 2008; Estrella *et al.*, 2009; Chippano *et al.*, 2021). Estudios previos reportaron que esta leguminosa es capaz de mantener a las comunidades de HMA tanto en tejido radical como en el suelo y presentar una respuesta micorrízica positiva inclusive ante el incremento de la disponibilidad de P en el suelo (García *et al.*, 2008; Chippano *et al.*, 2020; 2021).

Dadas las características de las plantas de *L. tenuis* y las asociaciones simbióticas que establece, resulta de interés evaluar su capacidad de retener metales presentes en suelos de la CMR, así como su rol en el mantenimiento de las comunidades nativas de HMA tanto en el sistema radical como en el medio ambiente edáfico. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron (i) determinar la capacidad de *L. tenuis* para absorber metales y (ii) caracterizar la asociación de las plantas de esta especie con HMA y rizobios nativos presentes en muestras de suelos de la CMR ubicados en Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda. La hipótesis de este trabajo es que *L. tenuis* es capaz de retener metales en tejido con la concomitante conservación de la colonización de HMA en sus raíces y en el medio ambiente edáfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

En invernáculo, se cultivaron plantas de *L. tenuis* en macetas de 1,6 l sin drenaje, que contenían muestras de suelo (850 g por maceta) extraídas de tres sitios de las riberas de la CMR que representan un gradiente de disturbio ambiental. Estos sitios se ubican en Gral. Las Heras (S1; cuenca alta, 34° 54' 15,40"S; 58° 56' 26,75" O), Marcos Paz (S2, cuenca media, 34° 55' 27, 21" S;

58° 43' 18,97" O) y Avellaneda (S3; cuenca baja, 34° 39' 31,44" S; 58° 22' 52,81" O) (Figura 1) y presentan un nivel de disturbio ambiental bajo, medio y alto, respectivamente. Para mayores detalles de los sitios seleccionados ver Mendoza *et al.* (2015) (sitios 1, 3 y 5).

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con seis repeticiones por sitio. Las muestras de suelo en S1, S2 y S3 se tomaron a una profundidad de 10 cm. Luego, se tamizaron con malla de 2 mm, homogenizaron e inmediatamente se analizaron y emplearon para el llenado de las macetas. Para obtener las plantas de *L. tenuis*, se sembraron semillas pregerminadas (ocho por maceta). Para ello, las semillas se esterilizaron con una solución de EtOH:H₂O₂ (1:1) por ocho minutos, se lavaron con agua desionizada estéril y colocaron en germinadores estériles durante 24 h. Las plantas se mantuvieron bajo un régimen de fluctuaciones en la temperatura media entre 30±4 °C (día) y 19±3 °C (noche), 65±15% humedad relativa, un fotoperíodo de 11 h y la intensidad lumínica fue 900-1300 μmol m⁻² s⁻¹ (días soleados) y 400-700 μmol m⁻² s⁻¹ (días nublados).

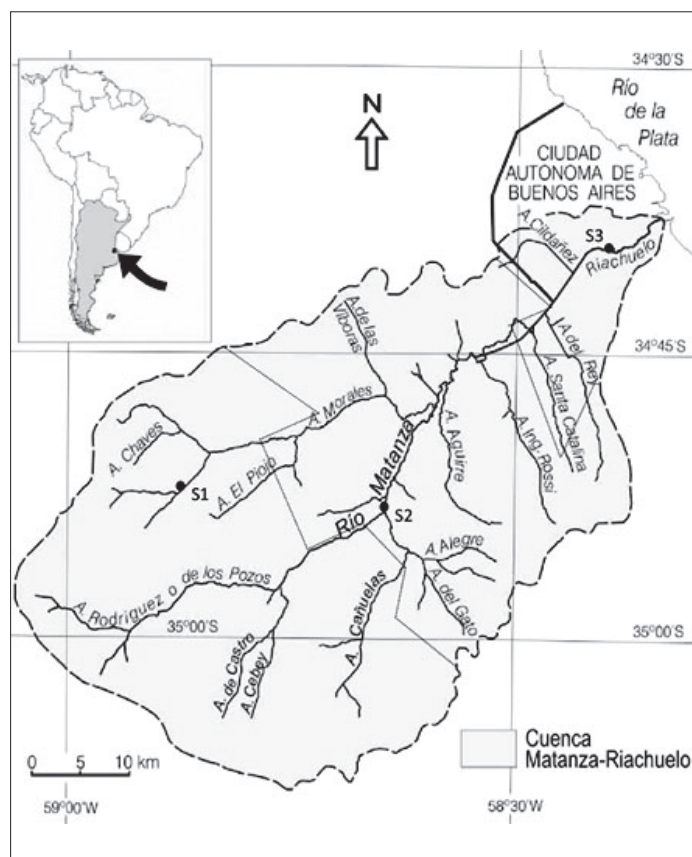


Figura 1. Mapa de la Cuenca del Río Matanza-Riachuelo (CMR), delimitación de las cuencas alta, media y baja (línea punteada) y detalle de los sitios de muestreo en Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda (S1, S2 y S3, respectivamente).

Las macetas se ubicaron en mesadas móviles lo que permitió rotarlas diariamente a fin de disminuir efectos de gradiente lumínico dentro del invernáculo. Las plantas fueron regadas diariamente con agua desionizada para mantener una humedad cercana al 80% de la capacidad de campo. Cincuenta días después de la siembra (plantas adultas) se cosecharon el vástago y las raíces en forma separada. Las raíces fueron lavadas con abundante agua de red hasta la eliminación de restos de suelo y posteriormente con agua destilada. Además, se tomaron muestras de suelo del centro de la maceta.

Determinaciones en muestras de suelo

Las muestras de suelo se separaron en dos porciones: una se destinó para la determinación de la densidad de esporas (ver Cuantificación de la densidad de esporas) y la otra porción para la medición de propiedades químicas y concentración de metales (ver Cuantificación de metales pesados). Dichas determinaciones se realizaron en las muestras de suelo previo a la siembra y luego de la cosecha de las plantas. Se determinó pH (1:2,5 suelo:agua), conductividad eléctrica (CE) (Jackson, 1964), contenido de materia orgánica (MO) (Richter y VonWistinghausen, 1981), N total (Bremner y Mulvaney, 1982), y P disponible (Kurtz y Bray, 1945).

Determinaciones en plantas de *L. tenuis*

La biomasa del vástago se secó en estufa a 70 °C durante 48 h hasta alcanzar peso constante y luego se pesó para determinar el peso seco. La biomasa radical se separó en dos porciones, una se secó en estufa a 70 °C durante 48 h hasta alcanzar peso constante para la determinación de peso seco y la otra se destinó a la caracterización de la morfología de colonización HMA (ver Cuantificación de la colonización de HMA y nodulación radical). La biomasa seca de vástago y raíces se empleó en la determinación de la concentración Cu, Cr y Zn (ver Cuantificación de metales pesados).

Cuantificación de la densidad de esporas en suelo

Las esporas de HMA se aislaron a través de una modificación de la técnica de tamizado húmedo seguida por centrifugación en gradiente de sacarosa (Daniels y Skipper, 1982). El recuento se llevó a cabo bajo lupa Nikon SMZ-U (Nikon Corporation, Tokio, Japón) con un aumento de 35x. La densidad de esporas se expresó como número de esporas por gramo de suelo seco.

Cuantificación de la colonización de HMA y nodulación en raíces de *L. tenuis*

Las raíces se cortaron en fragmentos de 1,5 cm y luego se procedió a su tinción según una modificación de la técnica de Phillips y Hayman (1970). La morfología de colonización de hongos MA se describió según McGonigle *et al.* (1990). Se tomaron 35 fragmentos de raíz por maceta (seis réplicas) y se observaron en microscopio óptico Olympus BX50 (Olympus optical CO., LTD, Tokio, Japón) bajo un aumento de 200x. Esta metodología permitió determinar el porcentaje de colonización micorrízica total, colonización por arbusculos, colonización por vesículas y colonización por hifa solamente. La estimación del número de puntos de entrada (PE) se midió cada 3 mm a lo largo de las raíces con un aumento de 200x (Amijee *et al.*, 1989). La medición se expresó como número de PE por mm de raíz colonizada. El número de nódulos de rizobios se estimó en la totalidad del sistema radical empleando una lupa binocular (7,5x).

Cuantificación de metales totales en suelo y plantas de *L. tenuis*

Previo a la medición de los metales totales (ME-T), Cu, Cr y Zn total, se realizó la digestión de las muestras de suelo y material vegetal. Cada muestra de suelo (0,5-1 g) o material vegetal (0,25-1 g) fue molida y colocada en un recipiente de vidrio o teflón. Luego se le aplicó una secuencia de ácidos concentrados de grado analítico (HNO₃:HClO₄:HF:HCl en proporción 10:2:5:10 para las muestras de suelo y HNO₃:HClO₄:HCl en proporción 10:2:5 para las muestras de material vegetal) y se digirió a 140 °C hasta obtener un volumen mínimo. La suspensión obtenida se llevó a 50 ml con agua bidestilada y se recogió en recipientes de polipropileno previamente lavados con HNO₃ al 10% y enjuagados con agua desionizada (Soltan y Rashed, 2003; Mishra y Tripathi, 2008). Los metales disponibles en suelo (ME-DTPA) se determinaron por el método de DTPA (Levei *et al.*, 2010) y se midieron por espectrofotometría de absorción atómica Perkin Elmer 1100B (Perkin Elmer, Inc. Waltham, MA, USA). Para cada metal se calcularon los factores de translocación (FT= concentración de metal en vástago/concentración de metal en raíz) y bioconcentración (FBC= concentración de metal en raíz/concentración de metal en suelo) (Mendoza *et al.*, 2015).

Análisis estadístico

La biomasa, el contenido de pigmentos fotosintéticos y metales pesados en tejido, la colonización HMA y la

nodulación en raíces se analizaron a través de ANOVA de una vía a fin de comparar valores medios entre sitios. Las variables medidas en muestras de suelo (metales totales y disponibles, propiedades químicas, densidad de esporas) se analizaron a través de ANOVA de dos vías, con sitio y tiempo como primer y segundo factor a fin de establecer si son afectadas por las plantas de *L. tenuis*. Las medias se compararon a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. La normalidad y homogeneidad de la varianza se verificaron previamente. Se utilizó el programa Infostat 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2019).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las determinaciones realizadas en muestras de suelo previo a la siembra mostraron que los suelos evaluados son moderadamente alcalinos y los sitios S2 y S3 salinos (Cuadros 1 y 2) (Mendoza *et al.*, 2015). Luego del crecimiento de *L. tenuis*, se observó una disminución del pH y CE. Los valores de MO y N total registrados fueron mayores en S3 y también superiores a los considerados como referencia en suelos no contaminados (Mendoza *et al.*, 2015). La disponibilidad de P se considera como baja en S1 y alta en S2 y S3, según la clasificación para suelos de la región pampeana de Buenos Aires (Sainz Rozas *et al.*, 2012). La concentración de ME-T y ME-DTPA aumentó en S3, y no se registraron diferencias en ME-T y ME-DTPA luego del crecimiento de *L. tenuis* (Cuadros 1 y 2). Según los niveles de contaminación en suelos establecidos por EPA (2008), S1 y S2 presentaron un nivel moderado de Cu-T (25-50 µg g⁻¹), y en S3 el nivel de Cu-T es considerado como altamente contaminante (>50 µg g⁻¹) (Cuadros 1 y 2). En relación al Cr-T y Zn-T, S1 se clasifica como no contaminado, S2 con una contaminación moderada y S3 como altamente contaminado (EPA, 2008). La fracción disponible del Cu representó un 10% para S1 y S2, y 27% para S3 en relación a la concentración total cuantificada. En el caso del Cr fue menor al 1% en todos los sitios. La fracción disponible del Zn representó 7%, 11% y 9% para S1 a S3, respectivamente (Cuadros 1 y 2).

Aunque la producción de biomasa (Figura 2) fue afectada por el tipo de muestra de suelo (S1, S2 y S3), las plantas de *L. tenuis* retuvieron metales pesados en el tejido y establecieron relaciones simbióticas con las comunidades nativas de rizobios y HMA. La biomasa del vástago y raíz aumentó y la concentración de clorofila total y carotenos disminuyó desde el sitio no contaminado (S1) hasta los sitios con mayor grado de contaminación (S2 y

Cuadro 1. Propiedades químicas determinadas en muestras de suelo recolectadas en tres sitios (S1, S2 y S3) de la Cuenca Matanza-Riachuelo (CMR) antes y después del crecimiento de *Lotus tenuis*.

| Propiedad química | Tiempo | Sitio 1 | Sitio 2 | Sitio 3 |
|---|---------|---------|----------|-----------|
| pH (1:2,5) | inicial | 8,23 d | 7,80 bc | 7,88 c |
| | final | 8,14 d | 7,52 a | 7,74 b |
| Conductividad eléctrica (CE; dS m ⁻¹) | inicial | 3,31 b | 6,81 c | 7,12 c |
| | final | 1,68 a | 4,10 b | 3,44 b |
| Materia orgánica (MO; %) | inicial | 3,37 a | 2,31 a | 7,39 b |
| | final | 3,53 a | 2,76 a | 9,28 b |
| Nitrógeno (N; %) | inicial | 0,29 a | 0,30 a | 0,58 b |
| | final | 0,30 a | 0,30 a | 0,50 b |
| Fósforo (P; µg g ⁻¹) | inicial | 10,67 a | 26,95 d | 24,63 cd |
| | final | 9,97 a | 21,06 bc | 16,60 b |
| Metal total (µg g⁻¹) | | | | |
| Cu | inicial | 29,41 a | 43,63 a | 362,20 b |
| | final | 31,20 a | 43,84 a | 317,00 b |
| Cr | inicial | 16,88 a | 24,92 a | 707,40 c |
| | final | 17,53 a | 22,76 a | 552,40 b |
| Zn | inicial | 86,64 a | 142,50 a | 1731,00 b |
| | final | 113,3 a | 137,10 a | 1713,00 b |
| Metal disponible (µg g⁻¹) | | | | |
| Cu | inicial | 2,98 a | 4,02 a | 98,90 c |
| | final | 2,54 a | 3,93 a | 88,97 b |
| Cr | inicial | 0,12 a | 0,23 b | 0,37 c |
| | final | 0,14 a | 0,25 b | 0,39 c |
| Zn | inicial | 7,87 a | 18,26 b | 154,60 c |
| | final | 7,13 a | 16,94 b | 152,30 c |

Sitio 1, 2 y 3 refieren a Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,05$).

S3) (Figura 2, Cuadro 1). Es necesario destacar que ninguna planta denotó clorosis durante todo el ensayo, sin embargo, la disminución significativa de la concentración de clorofila y carotenos en las plantas crecidas en el suelo de S3 podría sugerir un efecto inhibitorio sobre la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Chandra y Kang, 2016).

Las concentraciones de Cu y Zn aumentaron en vástago ante el incremento de dichos metales en suelo (Figura 3a, c y Cuadro 1), a diferencia de la concentración de Cr en vástago, la cual se mantuvo constante en los tres sitios (Figura 3b). En general, las concentraciones de Cu en tejido entre 20 y 100 µg g⁻¹ resultan tóxicas para la mayoría de las plantas (Burkhead *et al.*, 2009;

Cruz *et al.*, 2022). En el presente trabajo, se registraron concentraciones de Cu en tejido radical comprendidas en el rango de toxicidad. Con respecto al Zn, en general, los niveles de Zn en las hojas que superan los 300-600 µg g⁻¹ se consideran tóxicos para las plantas (Long *et al.*, 2003). Sin embargo, la concentración de Zn en vástago de *L. tenuis* en los tres sitios no se encuentra dentro del rango de toxicidad. En relación al Cr, la concentración en vástago fue 10,3 µg g⁻¹ en promedio para los tres sitios. En tejido radical, la concentración de Cr fue 12,9 µg g⁻¹ en promedio para S1 y S2, y aumentó a 44,2 µg g⁻¹ en S3. Dada la elevada toxicidad de este metal, la estrategia de *L. tenuis* consistiría en acumular en vástago un nivel de Cr tolerable independientemente

Cuadro 2. Resultados del ANOVA de dos vías con sitio y tiempo como factores a evaluar sobre diferentes variables.

| Variable | Sitio (S) | | Tiempo (T) | | S x T | |
|---|-----------|-----|------------|-----|-------|-----|
| | F | P | F | P | F | P |
| pH (1:2,5) | 174,07 | *** | 53,89 | *** | 5,97 | ** |
| Conductividad eléctrica (CE; dS m ⁻¹) | 83,41 | *** | 165,74 | *** | 8,01 | ** |
| Materia orgánica (MO; %) | 88,46 | *** | 2,88 | ns | 0,74 | ns |
| Nitrógeno (N; %) | 60,23 | *** | 1,16 | ns | 1,90 | ns |
| Fósforo (P; µg g ⁻¹) | 64,79 | *** | 22,72 | *** | 4,45 | * |
| Cu total (µg g ⁻¹) | 536,96 | *** | 2,72 | ns | 3,12 | ns |
| Cr total (µg g ⁻¹) | 907,91 | *** | 14,98 | *** | 14,55 | *** |
| Zn total (µg g ⁻¹) | 8267,03 | *** | 1,03 | ns | 2,68 | ns |
| Cu disponible (µg g ⁻¹) | 21037,91 | *** | 69,30 | *** | 60,10 | *** |
| Cr disponible (µg g ⁻¹) | 398,37 | *** | 6,71 | * | 0,30 | ns |
| Zn disponible (µg g ⁻¹) | 12102,06 | *** | 2,82 | ns | 0,27 | ns |
| Densidad de esporas (n ^o g ⁻¹) | 361,70 | *** | 124,09 | *** | 77,24 | *** |

Valores de F y diferencias significativas: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ns, $P > 0,05$.

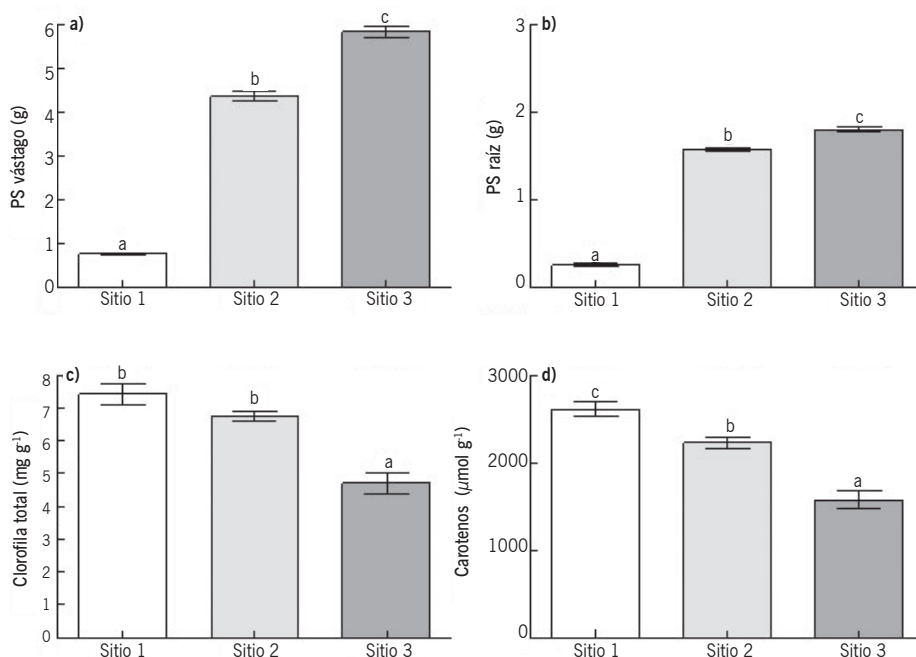


Figura 2. Biomasa seca del vástago (a) y sistema radical (b), concentración de clorofila total (c) y carotenos (d) en plantas de *Lotus tenuis* que crecieron en suelos de la Cuenca Matanza-Riachuelo (CMR). Sitio 1, 2 y 3 refieren a Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,05$).

del grado de contaminación edáfica. Las plantas de *L. tenuis* acumularon en tejido (vástago y raíz) una cantidad de Cr relativamente mayor a la concentración de 5,2 µg g⁻¹ de Cr en tejido reportada como crítica para la mayoría de las plantas superiores (Shanker *et al.*, 2005). Además, la concentración de metales en raíz fue mayor que en vástago en todos los sitios (Figura 3d, e,

f). El FBC para los tres metales disminuyó ante el incremento de la contaminación en el suelo (Figura 4 y Cuadro 1). El FT de cada metal disminuyó cuando la concentración en tejido radical aumentó en cada suelo analizado (Cu: $r = -0,78$, $P < 0,0001$; Cr: $r = -0,73$, $P < 0,001$; Zn: $r = -0,53$, $P < 0,05$). Es necesario destacar que los FT calculados en todos los casos fueron inferiores a uno, lo

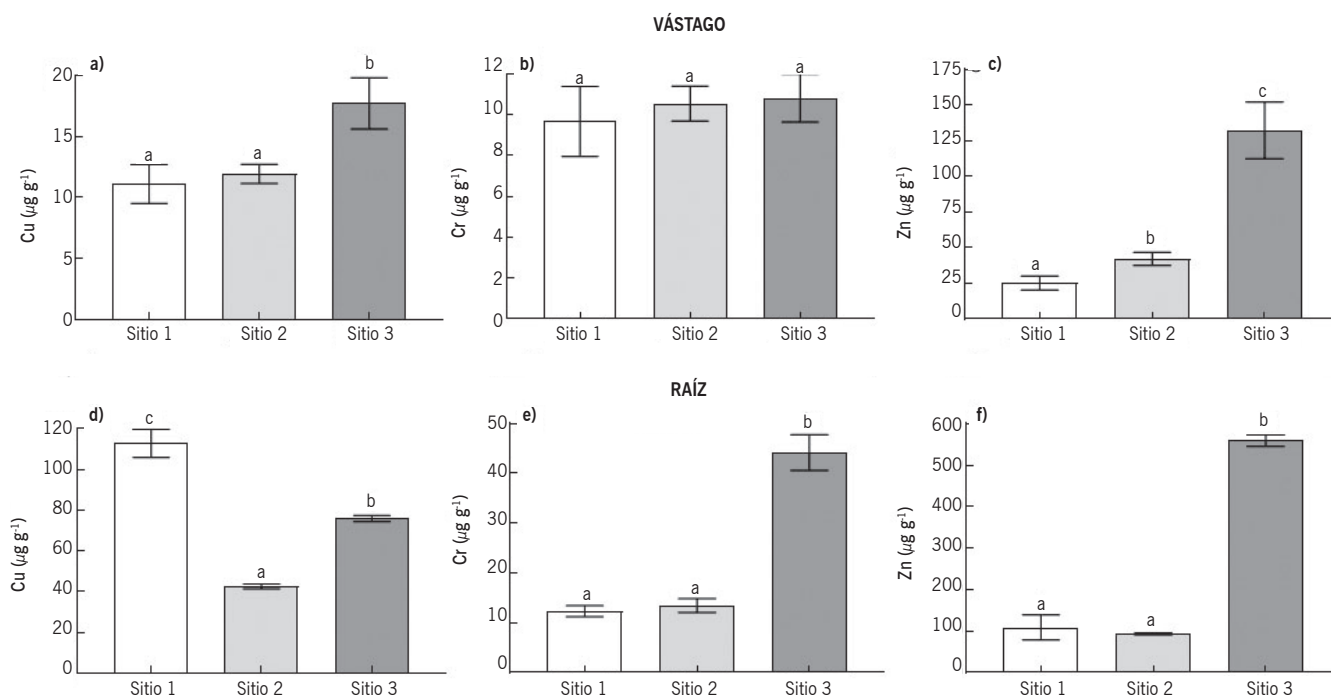


Figura 3. Concentración de Cu (a, d), Cr (b, e) y Zn (c, f) en plantas de *Lotus tenuis* Waldst. & Kit que crecieron en suelos de la Cuenca Matanza-Riachuelo (CMR). Sitio 1, 2 y 3 refieren a Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,05$).

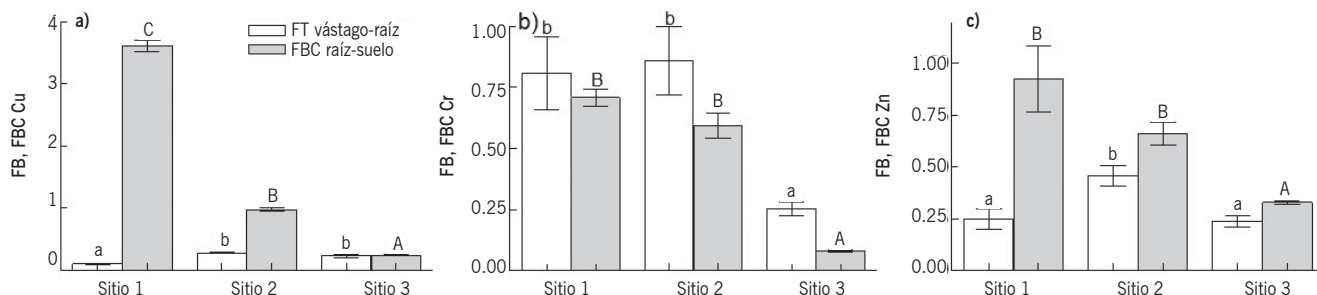


Figura 4. Factor de translocación (FT, vástago: raíz) y factor de bioconcentración (FBC, raíz: suelo) para Cu (a), Cr (b) y Zn (c) en plantas de *Lotus tenuis* que crecieron en suelos de la Cuenca Matanza-Riachuelo (CMR). Sitio 1, 2 y 3 refieren a Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda, respectivamente. Diferencias significativas entre medias para los distintos sitios se indican con letras diferentes, minúsculas en el caso de FT y mayúsculas para FBC ($P < 0,05$).

cual indicaría que, ante el incremento de la contaminación, el mecanismo de tolerancia se centra en el control de la absorción de metales por parte del tejido radical junto con minimizar la posterior translocación de metales hacia el vástago de forma tal de proteger al tejido fotosintético (Figuras 3 y 4). Estos hallazgos son coincidentes con los publicados en distintas leguminosas tanto herbáceas como leñosas (Pajuelo *et al.*, 2011; Basílico *et al.*, 2018; Jach *et al.*, 2022).

La colonización micorrícica total fue de 56%, 66% y 57% para S1, S2 y S3, respectivamente (Figura 5a). Estos valores son similares a los registrados previamente en las raíces de *L. tenuis* en suelos de sitios no contaminados (García y Mendoza, 2008; Castillo *et al.*,

2013). En cuanto al desarrollo intrarradical de las diferentes estructuras fúngicas se destaca una elevada proporción de la colonización dada por arbusculos y por hifas independientemente del sitio (Figura 5a). Si bien no se estimó el porcentaje de arbusculos o hifas intrarradicales viables, dado que la colonización micorrícica total está formada principalmente por ambos tipos de estructuras podemos proponer que se desarrolla una simbiosis funcionalmente activa entre *L. tenuis* y las tres comunidades de HMA nativas de la CMR. Otra de las estructuras características de la colonización micorrícica son las vesículas, las cuales constituyen estructuras de reserva que contienen lípidos y una numerosa cantidad de núcleos (Smith y Read, 2008). En este

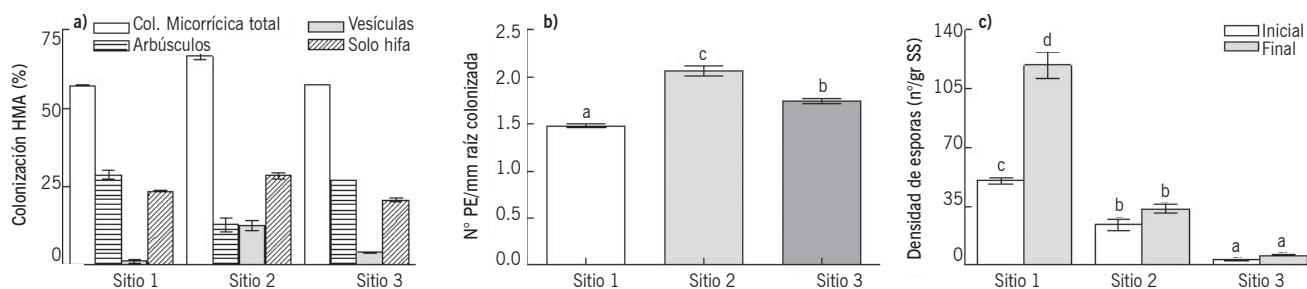


Figura 5. Morfología de colonización por hongos MA (a), número de puntos de entrada (PE) por mm de raíz colonizada (b) y densidad de esporas (c) asociadas a plantas de *Lotus tenuis* que crecieron en suelos de la Cuenca Matanza-Riachuelo (CMR). Sitio 1, 2 y 3 refieren a Gral. Las Heras, Marcos Paz y Avellaneda, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P < 0,05$).

trabajo, la colonización por vesículas fue baja en todos los sitios, sugiriendo que la simbiosis entre las comunidades de HMA y *L. tenuis* puede tolerar las distintas características de los suelos ensayados. El número de PE registrado en las raíces de *L. tenuis* fue mayor en S2 y S3 que en S1 (Figura 5b). Además, esta variable se correlacionó positivamente con la colonización micorrícica total ($r = 0,81$, $P < 0,0001$). En los tres sitios analizados, la colonización micorrícica total podría atribuirse a la interacción entre las tasas de crecimiento del hongo dentro de la raíz, de las raíces dentro del suelo y del desarrollo de nuevas unidades de colonización micorrícica en el sistema radical de *L. tenuis* independientemente del grado de contaminación de cada suelo. Esto concuerda con el patrón previamente registrado en pastizales no contaminados por García y Mendoza (2008). La densidad de esporas (DE) fue mayor en S1 en comparación con S2 y S3 tanto antes como después del crecimiento de *L. tenuis* (Figura 5c y Cuadro 2). En este sentido, se registró un incremento del recuento de esporas en S1 luego del crecimiento de *L. tenuis* y en S2 y S3 se observó una tendencia hacia el ascenso de esta variable pero las diferencias no fueron significativas. La DE correlacionó negativamente con el número de PE ($r = -0,62$, $P < 0,0079$). Además, la disminución de la DE ante el incremento de la contaminación se asoció con valores de PE mayores a los registrados en el sitio no contaminado (S1). Estos resultados indicarían una alta eficiencia de la comunidad de HMA nativa de la CMR para colonizar las raíces de una especie micotrófica como es *L. tenuis*. Otro aspecto a tener en cuenta es que, si bien la acumulación de biomasa fue mayor con el incremento de los niveles de P y N en el suelo, la mayor disponibilidad de P no inhibió la formación de nuevas unidades de colonización, así como el desarrollo intrarradical de la colonización. Estos resultados

también destacan la alta adaptación de la comunidad nativa de HMA y a *L. tenuis* como una buena opción para el mantenimiento de dicha comunidad dado que sus raíces son colonizadas con niveles de P en el suelo considerados como suficientes para el crecimiento vegetal e inhibitorios de la colonización HMA (Chippiano *et al.*, 2021).

En relación con la simbiosis con bacterias fijadoras de N atmosférico, el promedio del número de nódulos por gramo de peso fresco radical registró diferencias significativas entre sitios ($P < 0,001$) y fue 9,7 para S1, 67,6 para S2 y 41,8 para S3. El incremento registrado en S2 y S3 se asociaría con el aumento de la disponibilidad de P en el suelo y concuerda con registros previos tanto en *L. tenuis* como en otras leguminosas (Mognaghan *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2016). La mayor disponibilidad de P en ambos sitios podría facilitar su asimilación por parte del sistema radical de *L. tenuis*, pudiendo ser transportado hacia los nódulos y usado, posteriormente, por los rizobios en procesos metabólicos que consumen altos niveles energéticos como es el caso de la fijación de N atmosférico (Sa e Israel, 1991; Hernández *et al.*, 2009). Sin embargo, es necesario destacar que el nivel de N en suelo en el S3 fue mayor que en S1 y S2. Este resultado podría indicar una regulación de la nodulación en función del nivel de N dado que el número de nódulos fue menor en S3 en comparación con S2.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que *L. tenuis* es capaz de retener metales en el tejido y conservar la colonización de HMA en sus raíces y el medio ambiente edáfico. Este trabajo indica que el cultivo de *L. tenuis* en simbiosis con HMA podría constituir una herramienta que permitiría la fitorremediación y restauración de suelos contaminados de la

Cuenca Matanza-Riachuelo. Los resultados de este trabajo constituyen la primera evidencia de la tolerancia de esta leguminosa, así como el desarrollo de la asociación con HMA y rizobios, ante contaminación por metales y se plantea como una posible alternativa para el desarrollo de futuros planes de restauración de sitios degradados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina (PICT 2017-2638) y por CONICET (PIP 2017-2019 KA7 112 201701 00082 CO). Los autores agradecen a Fernanda Sansalone por la asistencia brindada en el desarrollo del ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alloway, B. J. (Ed.). (2012). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. Vol. 22. Berlin, Alemania: Springer Science & Business Media.
- Amijee, F., Tinker, P.B. y Stribley, D.P. (1989). The development of endomycorrhizal systems. VII. A detailed study of the effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytologist*, 111, 435-446.
- Basílico, G., Faggi, A. y de Cabo, L. (2018). Phytoremediation potential of native Fabaceaeas of contaminated soils. En: Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G. y Newman, L. (Eds.). *Phytoremediation: management of environmental contaminants*. Vol. 6. (pp. 169-178). Springer Nature Switzerland AG.
- Bhantana, P., Rana, M.S., Sun, Xc., Moussa, M.G., Saleem, M.H., Syaifudin, M., Shah, A., Poudel, A., Pun, A.B., Bhat, M.A., Mandal, D.L., Shah, S., Zhihao, D., Tan, Q. y Hu, C-X. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi and its major role in plant growth, zinc nutrition, phosphorous regulation and phytoremediation. *Symbiosis*, 84, 19-37.
- Bremner, J.M. y Mulvaney, C.S. (1982). Nitrogen total. En: Black, C.A. (Ed.). *Methods in soil analysis: agronomy*. Madison, Wisconsin, Estados Unidos: American Society of Agronomy, Inc. 595-624 p.
- Burkhead, J.L., Gogolin Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M. y Pilon, M. (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182(4), 799-816.
- Casares, M.V. y de Cabo, L. (2018). Análisis de tendencias de variables indicadoras de calidad de agua para el Riachuelo (Cuenca Matanza-Riachuelo, Argentina). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34 (4), 651-657.
- Castillo, C., Acuña, H., Zagal, E. y Inostroza, L. (2013). Phosphorus absorption and use efficiency by *Lotus* spp. under water stress conditions in two soils: a pot experiment. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73 (1), 31-40.
- Chandra, R. y Kang, H. (2016). Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest Science and Technology*, 12 (2), 55-6.
- Chippano, T., García, I., Cofré, N. y Mendoza, R. (2020). Forage biomass yield and arbuscular mycorrhizal symbiosis in a legume and C3 and C4 grasses under increasing soil phosphorus availability. *Crop and Pasture Science*, 71(10), 907-915.
- Chippano, T., Mendoza, R., Cofré, N. y García, I. (2021). Divergent root P uptake strategies of three temperate grassland forage species. *Rhizosphere*, 17, 100312.
- Cruz, F.J.R., Ferreira, R.L.D.C., Conceição, S.S., Lima, E.U., de Oliveira Neto, C.F., Galvão, J.R., Lopes, S.D. C. y de Jesús Matos Viegas, I. (2022). Copper toxicity in plants: nutritional, physiological, and biochemical aspects. En: *Plant response mechanisms to abiotic stresses*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105212>
- Daniels, N. y Skipper, H. (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: Schenck, N.C. (Ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul, MI, Estados Unidos: American Phytopathology Society. 29-35 p.
- De Cabo, L.I., Faggi, A., Miguel, S. y Basílico, G. (2019). Rehabilitación de las riberas de un sitio de la cuenca baja del río Matanza-Riachuelo. *Biología Acuática*, 33, 005.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2019). *InfoStat Versión 2019*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de: <http://www.infostat.com.ar>
- Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O.A. y Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of Rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Applied Environmental Microbiology*, 75, 1088-1098.
- García, I. (2021). *Lotus tenuis* and *Schedonorus arundinaceus* co-culture exposed to defoliation and water stress. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias UNCuyo*, 53(2), 100-108.
- García, I. y Mendoza, R. (2008). Relationships among soil properties, plant nutrition and arbuscular mycorrhizal fungi-plant symbioses in a temperate grassland along hydrologic, saline and sodic gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 359-371.
- García, I., Mendoza, R. y Pomar, M.C. (2008). Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 304, 117-131.
- Hernández, G., Valdés-López, O., Ramírez, M., Goffard, N., Weiller, G., Aparicio-Fabre, R., Fuentes, S.I., Erban, A., Kopka, J., Udvardi, M.K. y Vance, C.P. (2009). Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus stressed common bean plants. *Plant Physiology*, 151, 1221-1238.
- Jach, M.E., Sajnaga, E. y Ziaja, M. (2022). Utilization of legume-nodule bacterial symbiosis in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Biology*, 11, 676.
- Jackson, M.L. (1964). *Soil chemical analysis*. Englewood Cliffs, NJ, Estados Unidos: Prentice Hall.
- Kurtz, L.T. y Bray, R.H. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59, 39-45.

- Levei, E.A., Miclean, M., Şenilă, M., Cadar O., Roman, C. y Micle, V. (2010). Assessment of Pb, Cd, Cu and Zn availability for plants in Baia Mare mining region. *Journal of Plant Development*, 17, 139-44.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Method in Enzymology*, 148, 350-382.
- Long, X.X., Yang, X.E., Ni, W.Z., Ye, Z.Q., He, Z.L., Calvert, D.V. y Stoffella, J.P. (2003). Assessing Zinc thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34 (9-10), 1421-1434.
- Magdaleno, A., de Cabo, L., Arreghini, S. y Salinas, C. (2014). Assessment of heavy metal contamination and water quality in an urban river from Argentina. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 18(1), 113-120.
- Magni, L.F., Castro, L.N. y Rendina, A.E. (2021). Evaluation of heavy metal contamination levels in river sediments and their risk to human health in urban areas: a case study in the Matanza-Riachuelo Basin, Argentina. *Environmental Research*, 197, 110979.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L. y Swan, J.A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.
- Melignani, E. (2017). Pautas para la remediación y recuperación de áreas sujetas a contaminación mixta de cuencas urbanas y periurbanas de llanura. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Mendoza, R.E., García, I.V., de Cabo, L., Weigandt, C.F. y de Iorio, A.F. (2015). The interaction of heavy metals and nutrients present in soil and native plants with arbuscular mycorrhizae on the riverside in the Matanza-Riachuelo River Basin (Argentina). *Science of the Total Environment*, 505, 555-564.
- Mendoza, R., García, I., Depalma, D. y Fernández López, C. (2016). Competition and growth of a grass-legume mixture fertilised with nitrogen and phosphorus: effect on nutrient acquisition, root morphology and symbiosis with soil microorganisms. *Crop and Pasture Science*, 67 (6), 629-640.
- Miransari, M. (2017). Chapter 7: arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal tolerance in plants. En: Wu, Q. S. (Ed.). *Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants*. Singapore: Springer Nature Pte Ltd. 147-161 p.
- Mishra, V.K. y Tripathi, B.D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*, 99(15), 7091-7097.
- Monaghan, R.M., Hedley, M.J., Di, H.J., McDowell, R.W., Cameron, K.C. y Ledgard, S.F. (2007). Nutrient management in New Zealand pastures-recent developments and future issues. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50, 181-201.
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Lafuente, A. y Caviedes, M.Á. (2011). Legume-Rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. En: Khan, M., Zaidi, A., Goel, R. y Musarrat, J. (Eds.). *Biomanagement of metal-contaminated soils. Environmental Pollution*. Vol 20. Dordrecht, Holanda: Springer.
- Parihar, M., Chitara, M., Khatri, P., Kumari, A., Mishra, P.K., Rakshit, A. y Jatav, S.S. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi: abundance, interaction with plants and potential biological applications. En: *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture*. (pp. 105-143). Singapore: Springer.
- Philips, J.M. y Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 156-161.
- Richter, M. y Von Wistinghausen, E. (1981). Unterscheidbarkeit von humusfraktionen in boden bei unterschiedlicher bewirtschaftung. *Z Pflanzenernähr Bodenkd*, 144, 395-406.
- Sa, T-M. y Israel, D.W. (1991). Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant Physiology*, 97, 928-935.
- Sainz Rozas, H., Echeverría, H. y Angelini, H. (2012). Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región pampeana y extra pampeana argentina. *RIA*, 38, 33-9.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. y Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31, 739-53.
- Shrirangasami, S.R., Rakesh, S.S., Murugaragavan, R., Ramesh, P.T., Varadharaj, S., Elangovan R. y Saravanakumar, S. (2020). Phytoremediation of contaminated soils-A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(11), 3269-3283.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3a ed. Londres: Academic Press.
- Soltan, M.E. y Rashed, M.N. (2003). Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Advances in Environmental Research*, 7 (2), 321-334.
- United States Environmental Protection Agency-EPA. (2008). *U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 2008 Report on the Environment (ROE)*. Recuperado de: <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/9043>.
- Zhang, H., Zhao, Y., Wang, Z. y Liu, Y. (2021). Distribution characteristics, bioaccumulation and trophic transfer of heavy metals in the food web of grassland ecosystems. *Chemosphere*, 278, 130407.