

ARSÉNICO EN AGUAS SUBTERRÁNEAS DE CASTILLA Y LEÓN Y SU IMPACTO EN SUELOS Y CULTIVOS DE ZANAHORIA

ARSENIC IN GROUNDWATER OF CASTILLA AND LEÓN AND ITS IMPACT ON SOILS AND CARROT CROPS

Paloma Mayorga¹, Amelia Moyano¹, Antonio García-Sánchez²

(1) Universidad de Valladolid, EUIA Soria, Campus Universitario Duques de Soria, 42004 Soria - España

(2) IRNA-CSIC, Dpto. de Química y Geoquímica Ambiental, C/ Cordel de Merinas 40-52, 37071 Salamanca - España
(e-mail: palomam@pvs.uva.es)

Recibido: 30/11/2013 - Evaluado: 10/02/2014 - Aceptado: 07/04/2014

RESUMEN

Se estudiaron durante tres años las aguas subterráneas en municipios de Valladolid y Segovia (España), detectándose concentraciones de As superiores a los 10 µg/l recomendados por la Organización Mundial de la Salud. El elevado pH y la alta concentración de bicarbonatos (medias de 8.3 y 210 mg/l respectivamente), favorecen la desorción del arseniato desde los sedimentos al agua. La evolución temporal mostró disminución de arsénico y aumento de nitratos, probablemente estos nitratos favorecieron la oxidación (química/microbiológica) del Fe (II), generándose FeOOH que adsorbería As. En zanahorias, la relación entre el factor de bioacumulación con el As soluble en suelo, muestra una acumulación muy eficiente cuando la media de As soluble en suelo es 44 µg/Kg y/o poco eficiente cuando la media es 130 µg/Kg, probablemente debido al doble sistema de transporte Pi/As, uno de alta afinidad operativo en bajas concentraciones y otro de baja afinidad operativo a altas concentraciones.

ABSTRACT

Groundwaters of two municipalities of Spain (Valladolid and Segovia) were studied during three years. Its results indicated that As concentrations in groundwater exceed WHO recommendation of 10 µg/l. The high Ph and high bicarbonate concentration (average of 8.3 and 210 mg/l, respectively) favor the arsenate desorption from sediments to water. Temporal evolution indicated an arsenic decrease and an increase in nitrates; maybe these nitrates favored (chemical / microbiology) Fe (II) oxidation, generating FeOOH to absorb As. In carrots, the relationship of the bioaccumulation factor with soluble As in soil indicates an efficient As accumulation when the average of soluble As in soil is 44 µg/Kg, and/or a low efficient As accumulation when the average is 130 µg/Kg. This relationship indicates a high-affinity transport operating at low concentrations and a low-affinity transport operating at high concentrations, probably due to the double system of Pi/As transport.

Palabras clave: arsénico; bioacumulación; contaminación; suelo
Keywords: arsenic; bioconcentration; contamination; soil

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento tóxico y ubicuo en la naturaleza, donde se encuentra en concentraciones traza y donde su movilidad depende de diversos procesos bióticos y abióticos. Este elemento se encuentra en un nivel prioritario entre los principales contaminantes del medio ambiente a escala global. La presencia de altos niveles en el agua, el suelo y los cultivos en muchas regiones del mundo, amenaza la salud humana (Kahlow *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2005; Farooqi *et al.*, 2007; Carbonell-Barrachina *et al.*, 2009). Aunque el agua es la principal vía de entrada en la cadena alimentaria humana, también el consumo de alimentos contaminados de origen vegetal y animal puede ser otra vía importante de captación. Las manifestaciones clínicas de la intoxicación crónica están asociadas con diversas formas de enfermedades de la piel y daños en órganos internos: alteraciones cardiovasculares, renales, circulatorias y respiratorias, en última instancia aparece el cáncer (Hossain, 2006). El inicio de la arsenicosis puede agravarse con la malnutrición y las deficiencias de micronutrientes u otras enfermedades relacionadas. Williams *et al.* (2009), informaron que el As podría perturbar el balance de micronutrientes en el arroz, limitando los niveles de Se, Zn y Ni.

El agua de bebida normalmente procede de aguas superficiales aunque también de aguas subterráneas, dependiendo de la disponibilidad local. El contenido de arsénico es muy variable, pero las mayores concentraciones se han encontrado en aguas subterráneas. En muchas partes del mundo, como Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungría, India, México, Taiwán, Estados Unidos etc., hay numerosas áreas con aguas subterráneas que tienen contenidos de arsénico mayores de 50 µg/l, superando las directrices de la Organización mundial de la Salud (OMS) de 10 µg/l para el agua de bebida (WHO, 1993).

Las especies solubles de arsénico en un sistema acuático natural, son controladas por la combinación del potencial redox, pH, reacciones de adsorción en la superficie mineral y la actividad microbiológica (Matisoff *et al.*, 1983). Hay diferentes mecanismos de movilización de As en las aguas subterráneas. Smedley y Kinniburgh (2002), señalan que la naturaleza anóxica de algunas aguas subterráneas reduciría al As (V) a As (III) y causaría la liberación del arsénico porque el As (III) es adsorbido menos fuertemente por los oxihidróxidos; sin embargo, bajo condiciones oxidantes predominaría el As (V) que se movilizaría a valores altos de pH. Nickson *et al.* (1998; 2000), McArthur *et al.*, (2001), Kneebone *et al.*, (2002), han descrito que la disolución reductora de los oxihidróxidos y la reducción de As (V) deben ser considerados como los mecanismos más probables para movilizar altas concentraciones de As en las aguas subterráneas de algunas regiones, estos procesos pueden ser coadyuvados por la acción de microorganismos (Ahman *et al.*, 1997; Cumming *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Zobrist *et al.*, 2000; Langner & Inskeep, 2000; Haas & Dichristina, 2002). Appelo *et al.* (2002), puntualizaron el efecto del desplazamiento por el anión bicarbonato de los arseniatos y arsenitos adsorbidos sobre la ferrihidrita debido a la competencia por los sitios de adsorción.

Otros aniones que ejercen influencia sobre la movilidad el As son los nitratos, en relación con la oxidación de Fe (II), estos nitratos promueven la aparición de partículas de Oxihidróxidos de hierro (FeOOH) que pueden adsorber As y también pueden generar la forma más oxidada, As (V), que es más reactivo en este proceso de adsorción que el As (III) (Senn & Hemond, 2002). Además, los procesos bióticos (desnitrificación) y abióticos de reducción del NO₃⁻, preservarían la reducción de Fe (III), promoviendo la estabilidad de la coprecipitación o adsorción de As en los FeOOH de los sedimentos. En una prueba realizada en Bangladesh, se demostró que los niveles de arsénico disuelto disminuían cuando se inyectaba nitrato en el acuífero, relacionándose este proceso con mecanismos de adsorción en FeOOH (Harvey *et al.*, 2002).

En el suelo, al igual que en los acuíferos, el contenido de óxidos de hierro, el pH, el Eh, la materia orgánica, y la actividad microbiana tienen efectos influyentes en la adsorción y la movilidad del As (Elkhatib *et al.*, 1984; O'Neill, 1995; Kumpiene *et al.*, 2007). Se ha descrito una buena relación entre el As soluble en agua del suelo y el arsénico en los cultivos (Woolson *et al.*, 1971; Deuel & Swoboda; 1972; Sadiq, 1986).

El arseniato, predominante en suelos oxidantes (Sadiq *et al.*, 1983; Haswell *et al.*, 1985), es la forma dominante en cuanto a la fitodisponibilidad en suelos aeróbicos y es un análogo del fosfato (Meharg & Macnair, 1992). Se ha publicado que el arseniato se absorbe en la raíz a través de los transportadores de fosfato en todas las especies de plantas ensayadas y posteriormente es reducido a arsenito (Meharg & Macnair, 1992; Wang *et al.*, 2002). El fosfato, incluso a baja concentración, puede desplazar al arseniato de las partículas del suelo aumentando así la disponibilidad y la fitotoxicidad; sin embargo, las grandes cantidades de fosfatos compiten con el arsénico por los transportadores en la superficie de la raíz disminuyendo así la absorción y por lo tanto la fitotoxicidad (Peterson *et al.*, 1981).

El arsenito se encuentra unido a proteínas quelantes como el tripéptido glutatión (molécula relacionada con la defensa ante el estrés oxidativo), el As (III) forma complejos As-tiol en las raíces y tallos de la especie *Brassica juncea* L. (Pickering *et al.*, 2000). Se ha observado en una amplia gama de especies vegetales como mecanismo de resistencia al As, que el arseniato sufre una reducción a arsenito y forma complejos con moléculas que contienen grupos tiol como metalotioneínas y fitoquelantes, además del glutatión reducido (GSH), para ser posteriormente secuestrado en las vacuolas (Pickering *et al.*, 2000; Schmöger *et al.*, 2000; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Meharg & Hartley-Whitaker, 2002; Zhang *et al.*, 2004). La defensa ante el estrés oxidativo, es un mecanismo que tienen las plantas para defenderse de factores de estrés externos, ésta se realiza con antioxidantes de bajo peso molecular, y antioxidantes enzimáticos.

Dentro de la familia de las umbelíferas, la zanahoria (*Daucus carota* L.) merece especial atención por su elevado consumo como alimento a escala global. El crecimiento de las raíces se produce en dos etapas: inicialmente hay una etapa de activa división celular que genera un crecimiento en longitud, con la producción y uso de hidratos de carbono y más tarde una segunda etapa de elongación celular con extensión en diámetro (engrosamiento), con acumulación de hidratos de carbono, agua y también sustancias potencialmente tóxicas tales como los compuestos de As (Yathavakilla *et al.*, 2008). Los rábanos (*Raphanus sativus* L.), que como las zanahorias tienen raíces pivotantes, presentan compuestos azufrados con As (III) en la raíz, el tallo y las hojas, lo cual indicaría que estos compuestos pueden jugar un papel importante en el transporte y almacenamiento de este elemento (Smith *et al.*, 2008).

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de las causas de la contaminación por arsénico de las aguas subterráneas de un sub-sector de la Cuenca Terciaria del Duero y su evolución temporal, así como el impacto en el suelo y plantas, a través de la identificación de factores de bioacumulación en vegetales utilizados para el consumo humano y detectar posibles riesgos para la salud.

MATERIAL Y MÉTODOS

El área objeto de estudio se encuentra en la Cuenca Terciaria del río Duero, provincias de Valladolid y Segovia (España) (Figura 1).

Geológicamente la sucesión miocena de este área, puede ser agrupada de manera informal en una serie de unidades estratigráficas denominadas de muro a techo: unidad de arcosas y paleocanales de arenas y gravas o facies Villalba de Adaja, unidad margosa o facies Dueñas, unidad lutítica o facies Tierra de Campos, unidad yeso-margosa o facies Las Cuestas y unidad de los carbonatos o facies los Páramos (IGME, 1982; Armenteros, 1991).

La unidad de arcosas y paleocanales de arenas y gravas tiene un espesor de hasta 60 m. La unidad margosa tiene un espesor de alrededor de 40 m y está formada por margas y arcillas. La unidad lutítica tiene un espesor de alrededor de 80 m y está formada por arcosas intercaladas con arcillas, arenas con limos, algunos paleocanales de arenas y gravas. La unidad yeso-margosa tiene un espesor de 80-100 m y está constituida por

limos, arcosas, areniscas, conglomerados y algunas capas de sedimentos calizos o de yeso. La unidad de los carbonatos está compuesta principalmente por rocas calizas y tiene un espesor de 10-20 m.

Los materiales cuaternarios son principalmente arenas eólicas de 5-15 m de espesor, existen también otros sedimentos aluviales dispuestos en terrazas.

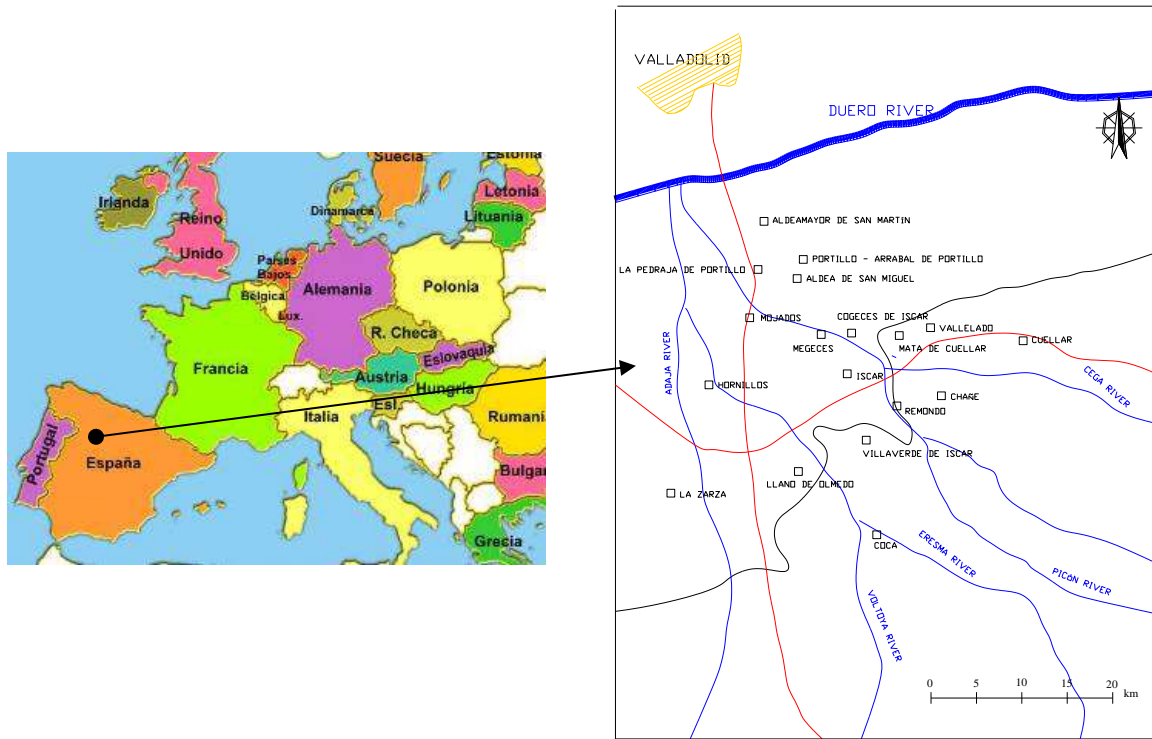


Fig. 1: Situación de la Cuenca Terciaria del Duero y municipios del área de estudio.

El basamento Precámbrico-Paleozoico consiste en rocas metamórficas pizarras arenosas, fillitas, y en menor cantidad bandas de pizarras negras, grauvacas, cuarcitas y conglomerados intercalados, también hay diversos tipos de granitos hercínicos con presencia de mineralización (Sn, W, S, As, etc.) en numerosas ocasiones, sobre todo hay que destacar la presencia de pirita en las pizarras negras (IGME, 1982).

La Cuenca del río Duero contiene quizás el más importante sistema de acuíferos de la Península Ibérica; se pueden subdividir en varios acuíferos regionales (IGME, 1980). En los terrenos cuaternarios hay varios acuíferos superficiales no confinados situados en las capas de arenas de 5-15 m de espesor ("Arenales"), muy permeables. Además, en algunas zonas del área de estudio, se encuentran otros acuíferos libres en calizas (fracturas y cavidades) del Mioceno Superior (facies "Los Páramos"). Los acuíferos más importantes son los más profundos (acuífero profundo multicapas) situados en arcosas y paleocanales de arenas y gravas, facies "Villalba de Adaja" (Mioceno Inferior y Medio), sus sedimentos alimentaban un sistema lacustre cuyo registro actual es la facies Dueñas.

Los acuíferos profundos se recargan con el agua de lluvia retenida temporalmente por los superficiales (430 Hm³/año) y por el flujo subterráneo desde los bordes paleozoicos del suroeste de la región (10 Hm³/año). El drenaje es al río Duero (235 Hm³/año). Estos acuíferos presentan problemas de sobreexplotación la captación es de 50 Hm³/año en los pozos superficiales y 155 Hm³/año en los profundos.

El clima de la región es mediterráneo continental con baja humedad, la precipitación anual es 500 mm muy irregular y normalmente ausente en julio y agosto. Durante la estación seca el balance hídrico es negativo.

Los pozos muestreados se localizan en las provincias de Valladolid y Segovia. Se completa un total de tres campañas de muestreos (años 2001, 2003 y 2007), para ver la evolución temporal los aguas. Desde febrero a mayo de 2001 se muestrean 30 pozos (se seleccionaron finalmente 28 pozos). En el año 2003 se realiza el segundo muestreo, se eligen 35 pozos. Durante el año 2007 se realiza el tercer muestreo con un total de 30 pozos.

Análisis de las aguas

Las muestras de agua se recogieron en botes de polietileno esterilizados e "in situ" se separaron porciones de las muestras para el estudio de la concentración de hierro que fueron acidificadas con ácido clorhídrico al 1% para evitar la precipitación de los oxihidróxidos de hierro. También "in situ" se analizó pH, Eh, y conductividad eléctrica (CE). En el laboratorio se filtraron las aguas con filtro de 0.45 micras. El As se analizó con un espectrofotómetro de absorción atómica, Varian spectra AA-220 y generador de hidruros VGA-76, siguiendo el método de Jiménez *et al.* (1996). La precisión analítica fue determinada con BCR y material de referencia CRM-320 y US Geológicas Survey Referente G-I. La precisión del método fue valorada por ejecución de análisis de 10 veces para una muestra. La desviación estándar fue 5-10%.

Los nitratos fueron analizados por cromatografía iónica (Metrohm), los bicarbonatos por titulación y el Fe por espectrofotometría de absorción atómica.

Para los análisis microbiológicos del agua, alícuotas de las muestras de algunos pozos guardadas en contenedores estériles, se almacenaron a 4° C hasta su análisis, que se realizó en las 24 horas siguientes. Se filtraron 50 ml de agua en una membrana Millipore de 0.45 micras y los filtros se pusieron en la superficie de placas Petri con LB Agar (Miller, 1972) y Agar de cetrímide (Brown & Lowbury, 1965). Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas a temperatura de 26° C durante dos días, obteniéndose las colonias aeróbicas. Se realizaron test de rutina para la identificación de las colonias (tinción Gram. y citocromo oxidasa).

Para realizar el ensayo en invernadero, la muestra de suelo fue recogida en una parcela situada a (41° 20 36.33N 4° 28 44.89 W), en la localidad de Remondo, provincia de Segovia. Esta es una zona de agricultura intensiva situada en el área de estudio, afectada por la presencia de As en el agua de riego procedente de aguas subterráneas. La muestra de suelo correspondiente al horizonte Ap, se tomó en los primeros 20 cm de profundidad, este suelo está clasificado como Arenosol cámbico (Forteza Bonnin & García Rodríguez, 1988)

Análisis de propiedades del suelo

Para el análisis de las propiedades del suelo, las muestras de suelo fueron secadas a peso constante con circulación de aire a 50 °C, mezcladas, homogeneizadas y pasadas a través de un tamiz de 2 mm. Las fracciones menores de 2 mm fueron usadas para determinar las propiedades en suelo, el pH fue determinado potenciométricamente, el carbono orgánico (CO) y carbono inorgánico (carbonato cálcico) por un carmógrafo H. Wostoff. GMBH y la capacidad de intercambio catiónico por el método Chapman (Chapman, 1965).

Análisis del contenido de As de suelos y rocas

Las muestras de suelo y de rocas se molieron y homogeneizaron a partículas de menos de 0.1 mm para su análisis. Alícuotas de 0.1 g fueron digeridas con 5 ml de agua regia + 1 ml de HF usando un horno de microondas CEM MDS-2000 a presión de siete atmósferas durante 30 minutos. Las determinaciones de arsénico fueron realizados por espectrofotometría de absorción atómica usando un Varian spectra AA-220 y generador de hidruros VGA-76, siguiendo un método de Jiménez *et al.* (1996). La precisión analítica fue medida con material

de referencia BCR CRM-320 (sedimento de río) y U.S. Geological Survey Reference G-2 granito. Se valoró la precisión del método con el análisis de 10 veces la muestra. La desviación estándar relativa fue entre 5-10%.

Para realizar el análisis del arsénico soluble en agua: se mezclaron el suelo y el agua miliQ en proporción 1:10 y la solución fue agitada 24 horas usando un agitador rotatorio. La solución fue centrifugada a 3000 rpm y el sobrenadante fue recogido y filtrado con un filtro de 0.45 micras. La concentración de arsénico en el sobrenadante se determinó por espectrofotometría de absorción atómica.

Ensayo en invernadero

Para el ensayo en invernadero que se inició el 1/6/2008, se prepararon 21 tiestos con 4 kg de muestra de suelo cada uno y se sembraron 6 semillas de zanahoria (*Daucus carota* L. variedad comercial Nantesa). En función de los valores de pF (pF 4.2, Humedad = 2.68% y pF 2.7, Humedad = 14.79%) se regaron con un media de 200 ml/día). Se utilizaron 5 tiestos como control y el resto se regaron con aguas que contenían cantidades crecientes de As: 4 tiestos con 20 µg/l, 4 con 50 µg/l, 4 a 100 µg/l y 4 a 150 µg/l. El abonado se realizó en dos aplicaciones (los días 01/06/2008 y 19/08/2008), con las siguientes componentes y dosis respectivamente:

- NH_4NO_3 : 1.143 g; 0.171 g
- K_2HPO_4 : 0.503 g; 0.075 g
- K_2SO_4 : 0.245 g; 0.037 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.522 g; 0.078 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.304 g; 0.045 g

A los 30 días se hizo un clareo y se dejaron 4 plantas por tiesto. A los 131 días de iniciado el ensayo se realizó la recolección. Se obtuvieron un total de 61 muestras de tejido de raíz y 61 muestras de tejido de hojas.

Análisis de As en los tejidos vegetales

Para la determinación de As en tejidos de zanahorias, los tejidos vegetales se lavaron con agua, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron al aire a temperatura ambiente durante varios días y después se secaron en el horno a 60°C hasta peso constante. Posteriormente, se homogeneizaron y molieron a menos de 1 mm para el análisis. Alícuotas 0.5 g de muestra de raíz y de hojas, fueron digeridos con 2 ml de agua, 2 ml de agua oxigenada y 8 ml de HNO_3^- , usando un microondas CEM MDS-2000 a 9 atmosferas de presión durante 10 minutos y a 12 atmósferas de presión durante 15 minutos. Después de refrigerar el producto de la digestión fue pasado a través de un filtro Whatman nº 540, previamente lavado. Los tubos de digestión se lavaron tres veces pasando el agua a través del filtro y los materiales resultantes de la digestión fueron enriquecidos con H_2SO_4 (0.5 ml). Posteriormente, se procedió al calentamiento a 230°C durante 2-3 horas para la concentración por evaporación hasta 0.5 ml aproximadamente. Finalmente, se adicionaron 5 ml de ácido ascórbico 25%, 5 ml de ioduro potásico 25% y ácido clorhídrico 2 M hasta alcanzar un volumen de digerido de 25 ml (Hammel *et al.*, 2000). La concentración de As fue medida por duplicado utilizando un Varian spectra AA-220 con generador de hidruros VGA-76 AAS

La curva de calibración, mostró valores de $R^2 > 0.98$ en todos los casos. El análisis de un material de referencia certificado (hojas de maíz FD8 Comisión de la Comunidad Europea dentro de la agrupación de investigación ISPRA), no fue significativamente diferente del valor del certificado 0.77 ± 0.1 mg/kg). La mayor concentración de arsénico de los controles fue de 0.09 µg/l y el límite de detección de 0.07 µg/l.

El factor de bioacumulación (FB), fue calculado como la relación entre la concentración de arsénico en planta respecto la concentración de arsénico soluble en agua del suelo.

$\text{FB As} = [\text{As}_{\text{planta}} / \text{As}_{\text{solub suelo}}]$ ambos en µg por kilogramo.

http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

Los gráficos se realizaron con el programa de estadística SPSS 12.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de las aguas recolectadas, muestran que los valores medios de As más elevados corresponden a pozos profundos. En las aguas subterráneas estudiadas se observa que el rango de Eh varía de 135mV a 668mV (Tabla 1) y de acuerdo con el diagrama Eh-pH para el sistema As-agua la especie termodinámicamente estable es HAsO_4^{2-} (Masscheleyn *et al.*, 1991).

Tabla 1: Resumen estadístico de Eh de las aguas

Propiedad	Año	Rango	Media	Desviación típica
Eh (mV)	1	135-281	198.7	38.3
	2	217-668	332.9	96.3
	3	144-241	201.8	22.8

El hierro disuelto en las muestras de agua es bajo 0.05-0.310 mg/l (Tabla 2), considerando el hierro disuelto como el hierro total que pasa a través del filtro 0.45 micras, el cual puede incluir hierro inorgánico, orgánico y coloidal (adsorbido a arcillas, FeOOH y materia orgánica).

Tabla 2: Resumen estadístico de la concentración de hierro de las aguas

Propiedad	Año	Rango	Media	Desviación típica
Fe (mg/l)	1	0.005-0.310	0.03	0.066
	2	0.005-0.300	0.03	0.050
	3	0.005-0.099	0.02	0.023

A las condiciones señaladas anteriormente, hay que añadir que no hay correlación significativa entre Fe y As. Por lo tanto, se puede concluir que en este ambiente óxico y con baja concentración de hierro, los iones de bicarbonato podrían ser la causa principal de la movilización de As desde los sedimentos al agua subterránea.

Van Geen *et al.* (1994), sugirieron que los aniones de carbonatos adsorbidos sobre la goethita reducen su capacidad de adsorción. Pansar-Kallio & Manninen (1997), constataron la habilidad del bicarbonato para extraer As de un suelo contaminado. Los resultados de Anawar *et al.* (2004), muestran que las soluciones de bicarbonato extraen el As adsorbido sobre arcillas, arenas y limos. La acción de los carbonatos en la adsorción sobre la superficie de los minerales, está asociada a reacciones de cambio de ligando con liberación de agua y/o OH^- que incrementaría el pH. A pH alto se ve favorecida la desorción de HAsO_4^{2-} por la competencia con HCO_3^- y OH^- . Por lo tanto un posible mecanismo de liberación del As sería: que en los acuíferos hay sedimentos que contienen cantidades altas de As adsorbido, cuando estos sedimentos entran en contacto con aguas con una gran cantidad de carbonato disuelto, el As puede ser movilizado por desplazamiento desde la superficie del mineral; este proceso estaría favorecido por concentraciones altas de OH^- , en un área de pH elevado (Dzombak & Morel, 1990). A un pH de 8, la adsorción de la ferrihidrita a una presión de CO_2 de 0.018 atm (200 mg/kg de bicarbonato) es aproximadamente 500 veces menor que sin la presencia CO_2 (Gustafsson, 2009). En la área de estudio analizada, la concentración de carbonatos es elevada en los datos de las tres campañas (Tabla 3). Esto mismo ocurre con la presencia de otros iones competitivos como fosfatos o silicatos.

Cuando la variable independiente es el pH se produce una desorción que crece exponencialmente en un ámbito cercano a 8.5 (Dzombak & Morel, 1990). En el área de estudio analizada en este trabajo, el pH tiene valores cercanos a 8 o superiores en las tres campañas (Figura 2).

Tabla 3: Resumen estadístico de la concentración de bicarbonatos de las aguas

Propiedad	Año	Rango	Media	Desviación típica
HCO ₃ ⁻ (mg/l)	1	59.0-378.0	178.4	71.1
	2	92.0-413.0	202.2	59.8
	3	45.3-386.0	177.5	94.7

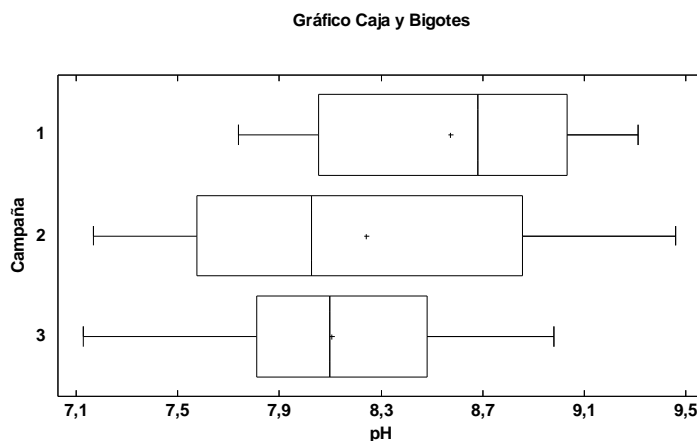


Fig. 2: pH de las aguas en las tres campañas

Los materiales de la Cuenca del Duero poseen contenidos de As que son relativamente bajos. El arsénico contenido en las muestras de rocas y sedimentos de las columnas estratigráficas estudiadas no es muy alto, con un rango entre 1.8 y 47.6 mg/kg. Los valores más altos (30.0-47.6 mg/kg) se encontraron en muestras de rocas opalinas con más de 3% de contenido Fe₂O₃ pertenecientes al Paleógeno, en algunas arcosas rojas del Mioceno Medio (facies Villalba de Adaja) y margas orgánicas de color negro pertenecientes a la facies Zaratán (facies palustre del Mioceno Medio) (Sahún *et al.*, 2004) con un contenido de As medio de 13-17 mg/kg, mientras que los valores más bajos fueron encontrados en las calizas (1.8-4.0 mg/kg del Mioceno Superior, facies Los Páramos).

Los procesos de liberación de As también pueden ser coadyuvados por determinados microorganismos que disuelven los FeOOH reduciendo el Fe⁺³. Esta movilización de As ha sido propuesta por Langner & Inskeep (2000) en la reducción de Fe por *Clostridium* sp y por Cumming *et al.* (1999) con *Shewanella algae* Strain Bry. Los resultados de los análisis microbiológicos muestran la presencia de colonias Gram⁻ y oxidasa⁺ incluidas en el género *Pseudomonas*. Estos microorganismos producen una serie de biomoléculas denominadas sideróforos que acomplejan fuertemente el Fe incrementando la disolución de los oxihidróxidos de Fe (Kalinowski *et al.*, 2000; Maurice *et al.*, 2000; Newman & Banfield 2002; Violante *et al.*, 2003). Este proceso podría liberar el As adsorbido en los oxihidróxidos de Fe. Por consiguiente además del As liberado por el bicarbonato, otro mecanismo de movilización podría ser la liberación del As de los óxidos de Fe inducido por moléculas quelantes producidas por microorganismos (*Pseudomonas*).

Sobre la evolución temporal del contenido de arsénico, se observan diferencias significativas a lo largo de los tres años estudiados. Los datos muestran una disminución del contenido de arsénico a lo largo de los 3 años (Tabla 4) y por otra parte, se observó un aumento del contenido de nitratos en el mismo periodo de tiempo (Tabla 5).

Tabla 4: Resumen estadístico de la concentración de arsénico de las aguas

Propiedad	Año	Rango	Media	Desviación típica
As ($\mu\text{g/l}$)	1	20-260	93	60
	2	3-187	48	45
	3	5-51	15	10

Tabla 5: Resumen estadístico de la concentración de nitratos de las aguas

Propiedad	Año	Rango	Media	Desviación típica
NO_3^- (mg/l)	1	1.0-218.0	41.0	59.4
	2	0.3-187.0	37.0	44.8
	3	7.0-423.0	81.9	93.8

Se observa asimismo, que las áreas con mayor contenido de As son las que tienen menor contenido de Nitratos (Figuras 3 y 4).

El arsénico adsorbido en los coloides del suelo aumenta en presencia de nitratos, esto puede ser propiciado porque la oxidación (química o microbiológica) del Fe (II) favorece la aparición de FeOOH, que son los compuestos más importantes en la adsorción de este elemento (Álvarez-Benedi *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2001; Smedley & Kinninburg, 2002; Senn & Hemond, 2002; Hoefl *et al.*, 2002; Rhine *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). Por otro lado, como se ha citado anteriormente, el contenido de hierro del agua varía entre 0.05 y 0.310 mg/l, este hierro es en realidad el total de Fe que pasa por un filtro de 0.45 micras y que puede incluir el Fe (III) y/o Fe (II) formando compuestos inorgánicos, orgánicos y coloidales (Bauer & Blodau, 2009). Esto podría representar una cantidad suficiente de hierro para adsorber las concentraciones de arsénico en el agua (Tabla 2).

En el área de estudio, la superficie agrícola bajo riego se ha incrementado alrededor del 20% (JCYL AEDCYL, 2004; 2008), esto ha supuesto que la aplicación de nitrato, debido al uso generalizado e intensivo de fertilizantes nitrogenados, también se haya incrementado. Se ha demostrado que el nitrato, actúa como aceptor terminal de electrones en los sistemas acuáticos y promueve la formación de As (V) y Fe (III), incluso bajo condiciones de anoxia (Senn & Hemond, 2002). Según Höhn *et al.* (2006), en un estudio sobre el transporte de arsénico en un acuífero en el Cabo Cod Massachusetts (EE.UU.), la inyección de nitratos y oxígeno oxidó al hierro, y el arsénico (V) se unió a los oxihidróxidos de hierro recién formados. En una prueba en Bangladesh, donde se inyectaron nitratos en un acuífero, se demostró que los niveles de arsénico disuelto se habían reducido, probablemente como resultado de la adsorción en los FeOOH (Harvey *et al.*, 2002). Estudios de laboratorio han identificado bacterias que pueden realizar la oxidación de Fe (II) mediante la reducción de NO_3^- (Senn & Hemond, 2002), y pruebas de campo indican que el NO_3^- puede influir en el ciclo del Fe, el cual actúa como dador de electrones incluso en presencia de materia orgánica, formándose FeOOH (Postma *et al.*, 1991). El incremento de nitratos en aguas subterráneas (Branson *et al.*, 1975), podría haber favorecido la precipitación de los oxihidróxidos de hierro, donde el arsénico puede ser adsorbido, además el nitrato también puede inhibir la reducción Fe (III) en los sedimentos de los acuíferos, evitando la disolución los FeOOH y así promover la inmovilización del arsénico.

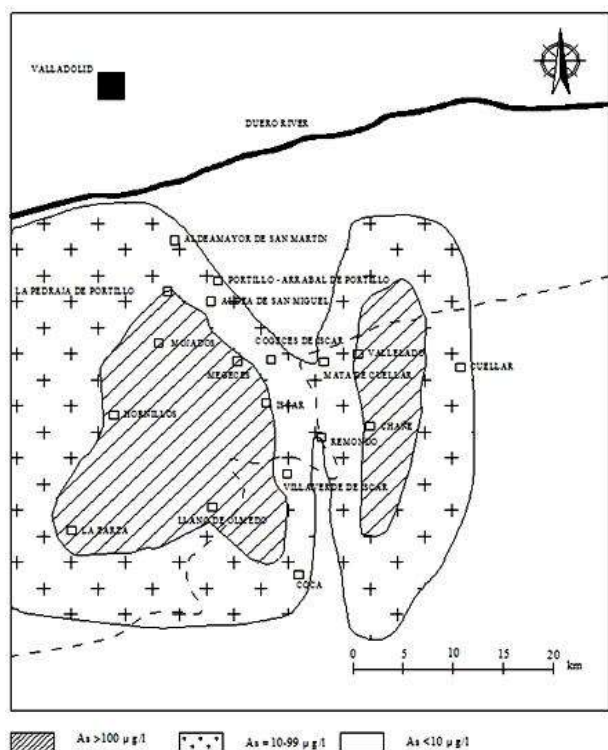


Fig. 3: Distribución de As

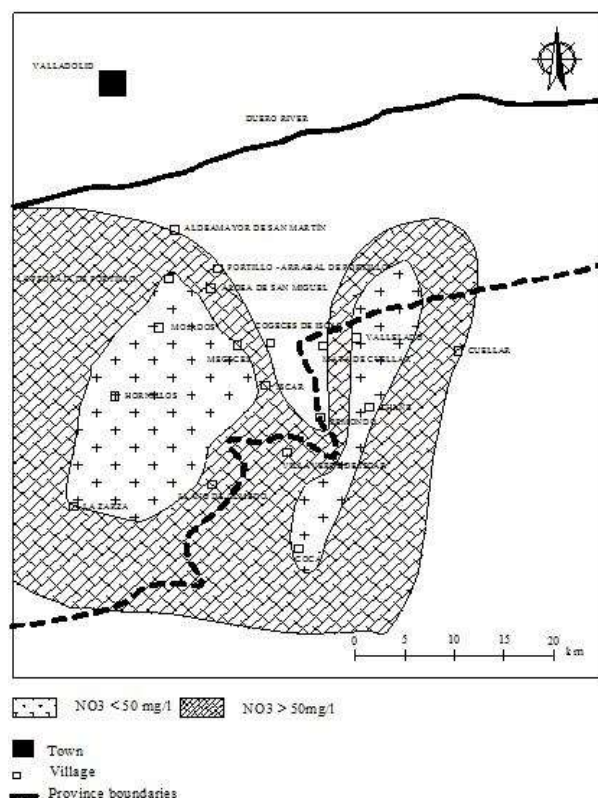


Fig. 4: Distribución de nitratos

Influencia del As en los cultivos

El suelo seleccionado para el ensayo de invernadero, es pobre en materia orgánica, P biodisponible, y presenta pH cercano a la neutralidad. El análisis granulométrico del suelo, indica textura arenosa, ya que la roca madre son arenas eólicas del Cuaternario y en consecuencia, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) es muy baja, 1.76 meq/100 g. El As soluble del suelo después de los ensayos, presentó variaciones dependiendo de su concentración en el agua de riego con valores de 28, 44, 130, 170 y 196 µg/kg para los tratamientos con concentraciones en el agua de riego de 0, 20, 50, 100 y 150 µg/l, respectivamente.

El contenido de arsénico de las muestras de raíces de zanahoria, regadas con agua con concentraciones de As de 100 y 150 µg/l, mostró resultados más elevados que los valores de referencia en vegetales (0.01-1 mg/kg de peso seco) (Kabata-Pendias & Pendias, 1992), superando los límites establecidos para los productos alimenticios (0.5 a 1 mg/kg de peso seco), estipulado por la legislación de muchos países, por ejemplo, Alemania, Reino Unido, India y los Países Bajos. A pesar de los niveles altos de As encontrados en la raíz de zanahoria, éstos son menores que los reseñados en zanahorias cultivadas en suelos contaminados con As (Grant & Dobbs, 1977; Helgesen & Larsen, 1998; Vela *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2003; Pendergrass & Butcher, 2006).

Los contenidos de arsénico en las muestras de zanahoria, mostraron diferencias significativas en los distintos tratamientos con concentraciones crecientes de As en el agua de riego, en cuanto a la acumulación de arsénico tanto en las hojas como en la raíz. No se encontraron alteraciones en el crecimiento o síntomas de toxicidad como decoloraciones o necrosis en las hojas. La relación entre la acumulación de As en tejidos y el contenido de arsénico en el agua de riego muestra, en general, que el almacenamiento de arsénico en las hojas y las raíces

es mayor cuando la concentración de arsénico en el agua de riego es más alta, habiendo una muy buenas correlaciones entre As en agua, As soluble en suelo, As en hojas y As en raíces (Figura 5 y Tabla 6), observándose también una mayor acumulación en las hojas que en las raíces.

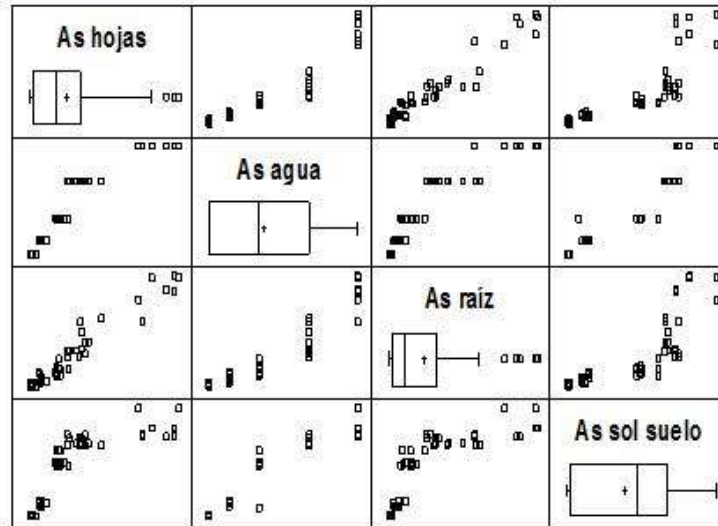


Fig. 5: Análisis multivariado: As agua, As soluble suelo, As hojas, As raíz

Tabla 6: Coeficiente de correlación, tamaño de muestra, valor de P

	As agua	As soluble suelo	As hojas	As raíz
As agua		0,9451 (56)	0,9361 (56)	0,9226 (56)
		<0.05	<0.05	<0.05
As sol suelo	0,9451 (56)		0,8279 (56)	0,8168 (56)
	<0.05		<0.05	<0.05
As hojas	0,9361 (56)	0,8279 (56)		0,9672 (56)
	<0.05	0.05		<0.05
As raíz	0,9226 (56)	0,8168 (56)	0,9672 (56)	
	<0.05	<0.05	<0.05	

Sin embargo, se observa una elevada disminución de la correlación cuando se relaciona el factor de bioacumulación y el As soluble en suelo, tanto en las hojas como en las raíces (Figuras 6 y 7), los datos muestran que ambos órganos presentan una acumulación muy eficiente de arsénico en suelos con una concentración media de As soluble de 44 µg/Kg y/o poco eficiente en suelos con una concentración de As soluble de 130 µg/Kg , tanto en raíces como en hojas.

La absorción de As en zanahorias presenta una cinética similar a la absorción del Pi (Fósforo inorgánico) con un sistema de transporte de alta afinidad que opera a bajas concentraciones en la solución del suelo, y un sistema de baja afinidad a altas concentraciones (Clarkson, 1984; Ullrich-Eberius *et al.*, 1984; McPharlin & Bielecki, 1987, Ullrich-Eberius *et al.*, 1989; Meharg & MacNair, 1992; Furihata *et al.*, 1992).

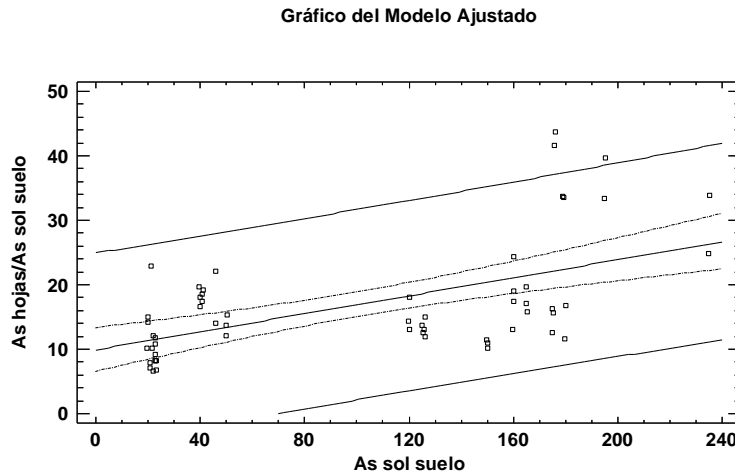


Fig. 6: Relación As soluble en suelo/ Factor de bioacumulación, en hojas $R= 0.55$, $P<0.05$

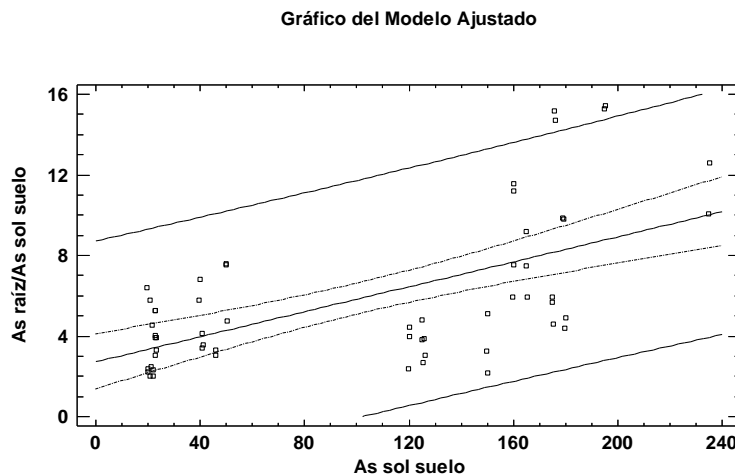


Fig. 7: Relación As soluble en suelo/ Factor de bioacumulación en raíz. $R= 0.6$ $P<0.05$

La concentración de Pi disponible en el suelo utilizado es de 8.3 mg/kg, si se estima que menos de un 10% del Pi disponible está en la solución del suelo (Bushman *et al.*, 2009; Mengel *et al.*, 2001), la concentración de Pi en solución podría ser $<10 \mu\text{g/l}$ y producirse transporte de alta afinidad. En relación con el As, es posible que cuando la concentración de As soluble sea cercana a 44 $\mu\text{g/Kg}$, la cantidad de As en la solución del suelo esté cercana a la gama de transportadores de alta afinidad. Por el contrario, en el caso de una concentración As soluble en suelo alrededor de 130 $\mu\text{g/Kg}$, el As en la solución del suelo podría estar más cercano al rango de concentración para los transportadores de baja afinidad, lo que podría explicar la menor eficiencia en la absorción. A pesar de que el fosfato inhibe la absorción de arsénico por las plantas debido a la competencia entre ellos (Meharg *et al.*, 1994; Cox *et al.*, 1996; Pickering *et al.*, 2000), su influencia podría ser despreciable debido a la muy baja concentración de P respecto al As.

En cuanto a la mayor concentración de As en las hojas que en la raíz (Figura 8), hay que destacar que la zanahoria es una planta bienal. Durante el primer año las hojas producen sustancia de reserva que se almacena en la raíz primaria y durante el segundo año las hojas vuelven a brotar desde la raíz y el alimento acumulado se usa para alargar el tallo e iniciar la floración. El hecho de que la primera roseta de hojas, que servirá para realizar la fotosíntesis sólo durante el primer año, contenga mayor cantidad de As que la raíz, donde se encuentran las reservas que proporcionarían la energía para la reproducción, parece indicar un mecanismo de protección de la zanahoria del proceso reproductivo.

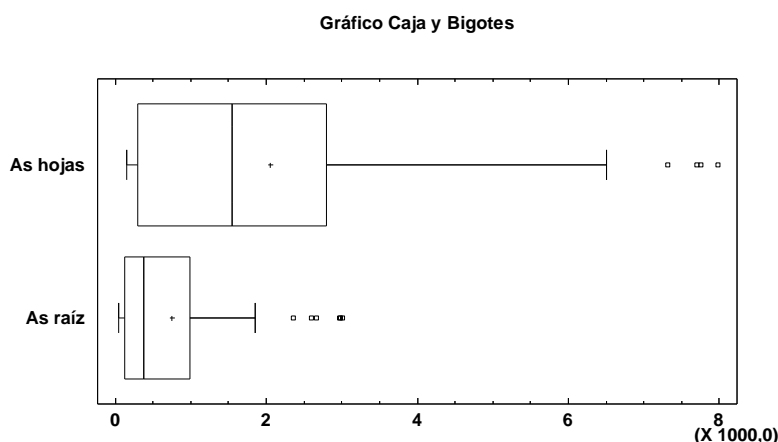


Fig. 8: As en hojas y As en raíces

CONCLUSIONES

Las aguas subterráneas presentan concentraciones de As anómalas que superan los 10 µg/l. El agua tiene un alto contenido de bicarbonato disuelto que puede movilizar el As por desplazamiento de las superficies minerales, ya que el bicarbonato puede competir con el arseniato por los sitios de absorción en los FeOOH presentes en el acuífero. La desorción del arseniato está favorecida a pH alto y es coadyuvada por la presencia de determinados microorganismos. En la evolución temporal se observa que un alto contenido de nitratos en el agua subterránea, puede dar lugar a la oxidación de Fe (II), que conduce a la formación de FeOOH, que pueden adsorber el arsénico disuelto, lo que puede causar una disminución del contenido de As en el agua paralelamente al aumento de la concentración de nitratos.

En cuanto al impacto del As sobre suelos y cultivos, la raíz y las hojas de zanahoria mostraron una muy eficiente acumulación de As cuando el contenido medio de As soluble en suelo era de 44 µg/Kg, mientras que cuando la concentración era de 130 µg/Kg se observó una menor eficiencia en la acumulación, siendo la afinidad del As por las hojas mayor que el de las raíces.

REFERENCIAS

- Ahmann D., Krumholz L. R., Hemond H. F., Lovley D.R., Morel F.M.M. (1997). Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed. *Environmental Science Technology* 31, 2923-2930.
- Álvarez-Benedí, J., Bolado Rodríguez, S., Cancillo Carro, I. & Calvo Revuelta, 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. VI. 331-338.

3. Anawar, H.M., Akai, J. & Sakugawa, H. (2004). Mobilization of arsenic from subsurface Sediments by effect of bicarbonate ions in groundwater. *Chemosphere*, 54, 753-762.
4. Appelo, C.A.J., Van der Weiden M.J.J., Tournassat, C., Charlet, L. (2002). Surface complexation of ferrous iron and carbonate on ferrhydrite and the mobilization of arsenic. *Environmental Science Technology*, 36, 3096-3103.
5. Armenteros, I. (1991). Contribución al conocimiento del Mioceno lacustre de la Cuenca Terciaria del Duero. Sector centro-oriental, Valladolid-Peñafliel-Sacramencia-Cuellar. (Contribution to the knowledge of the lake Miocene of the Tertiary Duero Basin. East and central sector, Valladolid- Peñafliel-Sacramencia-Cuellar). *Acta Geol. Hispánica*, 26, 97-131.
6. Bauer, M. & Blodau, C. (2009). Arsenic distribution in the dissolved colloidal and particulate size fraction of experimental solutions rich in dissolved organic matter and ferric iron. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 73, 529-542.
7. Branson, R.L., Pratt, P.F., Rhoades, J.D. & Oster, J.D. (1975). Water quality in irrigated watersheds. *J. Environ. Qual.*, 4, 33-40.
8. Bushman, L., Lamb, J., Randall, G., Rehm, G. & Schmitt, M. (2009). The nature of phosphorous in soils. Phosphorous in agriculture environment. University of Minnesota. <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC6795.html>
9. Brown, V.I. & Lowbury, E.J.L. (1965). Use of improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.*, 18, 725-756.
10. Carbonell-Barrachina, A.A., Signes-Pastor, A.J., Vazquez-Araffljo, L., Burlo, F. & Sen Gupta, B. (2009). Presence of arsenic in agricultural products from arsenic-endemic areas and strategies to reduce arsenic intake in rural villages. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 531-541.
11. Chapman, H.D. (1965). Cation exchange capacity, in Methods of soil analysis. Soil Sci. Soc. Am, Madison, USA.
13. Clarkson, D.T, (1984). Calcium Transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Environ.*, 7, 449-456.
14. Cox, M.S., Bell, P.F. & Kovar, J.L. (1996). Differential tolerance of canola to arsenic when grown hydroponically or in soil. *J. Plant Nutr.*, 19, 1599-1610.
15. Cumming, D.E., Caccabo, F., Fendorf, S. & Rosenzweig, R.F. (1999). Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe III- reducing bacterium *Sewanella alga* BrY. *Environmental Science Technology*, 33, 723-729.
16. Deuel, L.E. & Swoboda, A.R. (1972). Arsenic solubility in a reduced environment. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36, 276-78.
17. Dzombak, D.A. & Morel, F.M.M. (1990). Surface complexation modelling. Hydrous ferric oxide. John Wiley, New York.
18. Elkhatib, E.A., Bennett, O.L. & Wright, R.J. (1984). Kinetics of arsenite sorption in soils. *Soil Sci. Soc. Am.*, 48, 758-762.
19. Farooqi, A., Masuda, H. & Firdous, N. (2007). Toxic fluoride and arsenic contaminated water in Lahore and Kasur districts, Punjab, Pakistan and possible contaminant sources. *Environmental Pollution*, 145, 839-849.

20. Forteza Bonnin, J. & García Rodríguez, A. (1988). Castilla y León. Mapa de suelos de Castilla y León: Consejería de Obras Públicas y Ordenación del Territorio. Editor Junta de Castilla y León, Dirección General del Medio Ambiente y Urbanismo.
21. Furihata, T., Suzuki, M. & Sakurai, H. (1992). Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol.*, *33*, 1151-1157.
22. Grant, C. & Dobbs, A.J. (1977). The Growth and Metal Content of Plants Grown in Soil Contaminated by a Copper/Chrome/Arsenic Wood Preservative. *Environ. Pollut.*, *14*, 213-226.
23. Gustafsson, J.P. (2009). Modelling metal sorption in soils. In: Modelling of pollutants in complex environmental systems, Vol. 1 (ed. G. Hanrahan), pp. 145-176. ILM Publications, St. Albans, UK.
24. Haas J.R. & Dichristina T.J. (2002). Effects of Fe(III) chemical speciation on dissimilatory Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens*. *Environmental Science Technology*, *36*, 373-380.
25. Hammel, W., Debus, R. & Steubing, L. (2000). Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere*, *41*, 1791-1798.
26. Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W., Schat, H. & Meharg, A.A. (2001). Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol.*, *126*, 299-306.
27. Harvey, C.F., Swartz, C.H., Badruzzaman, A.B.M., Keon-Blute, N., Yu, W., Ali, M.A., *et al.* (2002). Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh. *Science*, *298* (5598), 1602-1606.
28. Haswell, S.J., O`Neill, P. & Bancroft, K.K.H. (1985). Arsenic speciation in soil-pore waters from mineralized and unmineralized areas of South-West England. *Talanta*, *32*, 69-72
29. Helgesen, H. & Larsen, E.H. (1998). Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil. *Analyst (London)*, *123/5*, 791-796.
30. Hoefft, S.E., Lucas, F., Hollibaugh, J.T. & Oremland, R.S. (2002). Characterization of microbial arsenate reduction in anoxic bottom waters of Mono Lake, California. *Geomicrobiology Journal*, *19*, 23-40.
31. Höhn, R., Isenbeck-Schröter, R., Kent, D.B., Davis, J.A., Jakobsen, R., Jann, *et al.* (2006). Test with As (V) under variable redox conditions controlling arsenic transport in the presence of elevated ferrous iron concentrations. *Journal of Contaminant Hydrology*, *88* (1-2), 36-54.
32. Hossain, M.F. (2006). Arsenic contamination in Bangladesh. An overview. *Agric. Ecosyst. Environ.*, *113*, 1-16.
33. IGME (1980). Investigación Geología de la Cuenca del Duero. Sistema Nº 8 y 12. (Duero Basin Geological Investigation. System Nº 8 and 12). Grafic. Ibergesa, Madrid.
34. IGME (1982). Mapa Geológico de España, E. 1:50.000. Hoja 400 (Geological Map of Spain, E. 1:50.000. Nº400). Portillo.
35. Jiménez, O., Rodríguez, N. & García-Sánchez, A. (1996). Determination of total arsenic and selenium in soils and plants by AAS with HG and FIA coupled techniques. *J. of AOAC International*, *79*, 764-768.
36. Jones, C.A., Langner H.W., Anderson, K., McDermott, T.R. & Inskeep, W.P. (2000). Rates of microbial mediated arsenate reduction and solubilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, *64*, 600-608.

37. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería- JCYL AEDCYL. (2004). Anuario de Estadística Agraria de Castilla y León. Valladolid.
38. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería- JCYL AEDCYL. (2008). Anuario de Estadística Agraria de Castilla y León. Valladolid.
39. Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1992). Trace elements in soils and plants., 2nd edn. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
40. Kahlowan, M.A., Majeed, A. & Tahir, M.A. (2002). Water Quality Status in Pakistan. Pakistan Council of Research in Water Resources (PCRWR), Ministry of Science & Technology, Government of Pakistan.
41. Kalinowski, B.E., Lierman, L.J., Givens, S. & Brantley, S.L. (2000). Rates of bacteria promoted solubilization of Fe from minerals: review of problems and approaches. *Chemical Geology*, 169, 357-370.
42. Kneebone, P.E, O`Day, P.A, Jones, N. & Hering, J. G. (2002). Deposition and fate of arsenic in arsenic-enriched reservoir sediment. *Environmental Science Technology*, 36, 381-386.
43. Kumpiene, J., Montesinos, I., Lagerkvist, A. & Maurice C. (2007). Evaluation of the critical factors controlling stability of chromium, copper, arsenic and zinc in iron-treated soil. *Chemosphere*, 67, 410-417.
44. Langner, H.W. & Inskeep, W.P. (2000). Microbial reduction of arsenate in the presence of ferrihydrite. *Environmental Science Technology*, 34, 3131-3136.
45. Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D. & Patrick, W.H. Jr (1991). Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environmental Science Technology*, 25, 1414-1419.
46. Matisoff, G., Khourey, C.J., Hall, J.F., Varnes, A.W. & Strai, W.H. (1983). The nature and source of arsenic in northeastern Ohio ground water. *Ground Water*, 20, 446-456.
47. Maurice, P.A., Lee, Y.J. & Hersman, L.E. (2000). Dissolution of Al-substituted goethites by an aerobic *Pseudomonas mendocina* var. bacterium. *Environmental Science Technology*, 34, 1363-1374.
48. McArthur, J.M., Ravenscroft, P., Safiullah, S. & Thirlwall, M.F. (2001). Arsenic in groundwater: Testing pollution mechanisms for sedimentary aquifers in Bangladesh. *Water Research*, 37, 109-117.
49. McPharlin, I.R. & Bielecki, R.C. (1987). Phosphate uptake by *Spirodela* and *Lemna* during early stages of phosphate deficiency. *Aust. J. Plant Physiol.*, 14, 561-572.
50. Meharg A.A., Naylor J. & Macnair, M.R. (1994). Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *J. Environ. Qual.*, 23, 234-238.
51. Meharg, A.A. & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. *New Phytol.*, 154, 29-43.
52. Meharg, A.A. & Macnair, M.R. (1992). Suppression of the high-affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.*, 43, 519-524.
53. Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H. & Appel, T. (2001). Principles of Plant Nutrition, 5th edition, Kluwer Academic Publishers.

54. Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetic. Cold Spring Harbor, New York.
55. Mukherjee, A., Sengupta, M.K., Hossain, M.A., Ahamed, S., Lodh, D., Das, B., *et al.* (2005). Are some animals more equal than others? *Toxicology*, *208* (1), 165-169.
56. Newman, D.K. & Banfield, J.F. (2002). Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, *296*, 1071-1077.
57. Nickson, R., McArthur, J., Burgess, W., Ahmed, K.M., Ravenscroft, P. & Rahman, M. (1998). Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature* *395*, 338-338.
58. Nickson, R.T., McArthur, J.M., Ravenscroft, P., Burgess, W.G. & Ahmed, K.M. (2000). Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and west Bengal. *Applied Geochemistry*, *15*, 403-413.
59. O'Neill, P. (1995). Arsenic. In Heavy Metals in Soils (B. J. Alloway, Ed.). Blackie Academic & Professional, London.
60. Pansar-Kallio, M. & Manninen, P.K.G. (1997). Speciation of mobile arsenic in soil samples as a function of pH. *Science of Total Environment*, *204*, 193-200.
61. Pendergrass, A. & Butcher, D.J. (2006). Uptake of lead and arsenic in food plants grown in contaminated soil from Barber Orchard, NC. *Microchemical Journal*, *83*, 14-16.
62. Peterson, P.J., Girling, C.A., Benson, L.M. & Zieve, R. (1981). Metalloids. In: Lepp, N.W. (Ed.). Effect of Heavy Metal Pollution on Plants, vol. 1. Applied Science, London, 299-322.
63. Pickering, I.J., Prince, R.C., George, M.J., Smith, R.D., George, G.N. & Salt, D.E. (2000). Reduction and coordination of arsenic in indian mustard. *Plant Physiol.*, *122*, 1171-1178.
64. Pizarro, I., Gómez, M.M., Cámara, C. & Palacios, M.A. (2003). Distribution of arsenic species in environmental samples collected in Northern Chile. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *83* (10), 879-890.
65. Postma, D., Boesen, C., Kristiansen, H. & Larsen, F. (1991). Nitrate reduction in an unconfined sandy aquifer: water chemistry, reduction processes, and geochemical modeling. *Water Resour. Res.*, *27*, 2027-2045.
66. Rhine, E.D., Chadhain, S.M.N., Zylstra, G.J. & Young, L.Y. (2007). The arsenite oxidase genes (aroAB) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *354*, 662-667.
67. Sadiq, M., Zaida, T.H. & Mian, A.A. (1983). Environmental behaviour of arsenic in soils. *Water Air and Soil Pollution*, *20*, 369-377.
68. Sadiq, M. (1986). Solubility relationships of arsenic in calcareous soils and its uptake by corn. *Plant Soil*, *91*, 241-247.
69. Sahún, B., Gómez, J.J., Lillo, J. & Del Olmo, P. (2004). Arsénico en aguas subterráneas e interacción agua-roca: un ejemplo en la Cuenca Terciaria del Duero (Castilla y León, España). *Rev. Soc. Geol. De España*, *17*, 137-155.
70. Schmöger, M.E.V., Oven, M. & Grill, E. (2000). Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol.*, *122*, 793-801.
71. Smedley, P.L. & Kinniburgh, D.G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, *17*, 517-568.
- http://www.excedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

72. Smith, P.G., Koch, I., Kenneth, J. & Reimer, K.J. (2008). Uptake, transport and transformation of arsenate in radishes (*Raphanus sativus*). Environmental Sciences Group, Royal Military College, P.O. Box 17000 Station Forces, Kingston, ON, Canada. K7K7B4 *Science of the total environment*, 390, 188 -197.
73. Senn, D.B. & Hemond, H.F. (2002). Nitrate controls on Iron and Arsenic in urban lake. *Science*, 296, 2373-2376.
74. Sun, W., Sierra, R. & Field, J.A. (2008). Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments. *Water Research* 42 (17), 4569-4577.
75. Ullrich-Eberius, C.I.A., Novacky, A. & Van Bel, A.J.E. (1984). Phosphate uptake in Lemna gibba G1: energetics and kinetics. *Planta*, 161, 46-52.
76. Ullrich-Eberius, C.I., Sanz, A. & Novacky, A.J. (1989). Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in Lemna gibba G1. *J. Exp. Bot.* 40, 119-28.
77. Van Geen, A., Robertson, A.P. & Leckie, J.O. (1994). Complexation of carbonate species at the goethite surface: Implications for adsorption of metal ions in natural waters. *Environmental Science Technology*, 58, 2073-2086.
78. Vela, N.P., Heitkemper, D.T. & Stewart, K.R. (2001). Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry. *Analyst*, 126, 1011-1017.
79. Violante, A., Barberis, E., Pigna, M. & Boero, V. (2003). Factors affecting the formation, nature, and properties of iron precipitation products at the soil-root interface. *J. of Plant Nutrition*, 26, 1889-1908.
80. Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J. & McGrath, S.P. (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris Vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol*, 130, 1552-1561.
81. Weber, K.A., Picardal, F.W. & Roden, E.E. (2001). Microbially catalyzed Nitrate-dependent oxidation of biogenic solid-phase Fe (II) compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1644-1650.
82. WHO (1993). Guidelines for drinking-water quality, WHO, Geneve. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq2v1/en/
83. Williams, P.N., Islam, S., Islam, R., Jahiruddin, M., Adomako, E., Solieman, A.R.M., *et al.* (2009). Arsenic limits Trace Mineral Nutrition (Selenium, Zinc, and Nickel) in Bangladesh Rice Grain. *Environmental Science & Technology*, 43, 8430-8436.
84. Woolson, G.A., Axley, J.H. & Kearney, P.C. (1971). The Chemistry and Phytotoxicity of Arsenic in Soil: I. Contaminated fields soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 35, 938-943
85. Yathavakilla, S.K.V., Fricke, M., Creed, P.A., Heitkemper, D.T., Shockey, N.V. & Schwegel, C., *et al.* (2008). Arsenic speciation and identification of monomethylarsonous acid and monomethylthioarsonic acid in a complex matrix. *Anal. Chem.*, 80 (3), 775-782.
86. Zhang, W., Cai, Y., Downum, k.R. & Ma, L.Q. (2004). Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environ. Pollut.* 131, 337-345.
87. Zobrist, J., Dowdle, P.R., Davis, J.A. & Oremland, R.S. (2000). Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environmental Science Technology*, 34, 4747-4753.