

**COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE FENANTRENO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RADICAL SUPERFICIAL DE CULTIVOS RADICALES (in toto e in vitro) DE *Cyperus elegans***

**L. Angélica Guerrero Zúñiga**

*Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, CP 07730, México, DF*

**Angélica Ma. Rodríguez Dorantes\***

*Lab. Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. CP11340, México, DF, e-mail: anrodo2000@hotmail.com*

y

**Ma. Aurora Gasca Rodríguez y Rogelio A. Benítez Ibarra**

*Central de Instrumentación de Espectroscopía, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. CP11340, México, DF*

*\*Becario de la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFAA-IPN)*

---

**RESUMEN**

Los sistemas radicales de las plantas pueden facilitar la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP S). Éstos pueden ser bioconcentrados en las raíces ya que tienden a ser lipofílicos e hidrofóbicos, y con ello éste puede ser el primer paso en un proceso de remoción con el empleo de plantas. Estos contaminantes una vez inmovilizados en las raíces pueden sufrir cambios estructurales a compuestos menos complejos o hasta derivados más simples, como un mecanismo importante para su detoxificación. El presente estudio consideró la evaluación de la actividad enzimática de fenoloxidasas de una especie de pantano *Cyperus elegans* de los sistemas radicales de plantas *in toto* y de cultivo de raíces (*in vitro*) expuestos a fenantreno, un hidrocar-

buro aromático policíclico considerado como uno de los HAP s más tóxicos en el ambiente, con la finalidad de analizar fisiológicamente estos sistemas radicales como posibles herramientas útiles en la remoción y transformación de contaminantes orgánicos. No obstante que la remoción de fenantreno por el sistema radical de *C. elegans* fue de 32%, se presentó un incremento en la actividad de enzimas radicales inducido por la presencia de éste; las que pudieran estar relacionadas con la separación de un compuesto que pudiera ser producto de la transformación del fenantreno, lo que sugiere que estos sistemas radicales constituyan una fuente de fenoloxidasas que participen directamente en la transformación de compuestos orgánicos, en particular con aromáticos policíclicos.

**Palabras clave:** cyperáceas, fenoloxidasas, fitorremediación.

#### ABSTRACT

The radical systems may concentrate polycyclic aromatic hydrocarbons, because these compounds are highly lipophilic and hydrophobic, and with it, it can take place the first step involved in a removal process assisted by plants. These contaminants once immobilized on roots can change their structures to simple compounds as an important mechanism for their detoxification. This study evaluated the fenoloxidasas activity of the radical system of a swamp species *Cyperus elegans*, from *in toto* and *in vitro* root cultures exposed to phenanthrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon highly toxic for environment, for the physiological analysis of these radical systems as a useful tools for the removal and transformation of organic contaminants. Although the remotion of phenanthrene by the radical systems of *C. elegans* was 32%, an increase of the activity of the radical enzymes was induced by the presence of this contaminant and it suggests that these radical systems would be possible sources of phenoloxidasas and might participate directly on the transformation of organic compounds, particularly with polycyclic aromatics.

**Key words:** cyperaceae, phenoloxidasas, phytoremediation.

#### INTRODUCCIÓN

El sistema radical puede bioconcentrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, ya que estos compuestos son altamente lipofílicos e hidrofóbicos y con ellos se puede efectuar el primer paso que implica

un proceso de remoción asistido con plantas, lo que ayuda a su biodegradación con la participación de enzimas intra y extracelulares radicales.

Se han caracterizado en el suelo algunas enzimas de origen vegetal a través de ensayos inmunológicos que han identificado la presencia de lacasas, deshalogenasas, nitrorreductasas, nitrinas y peroxidasas (Schnoor *et al.*, 1995).

Algunas de estas proteínas catalizan la oxidación de muchos compuestos aromáticos, como son mono y polifenoles, así como también aminofenoles que producen compuestos poliméricos como resultado de esta reacción; esto constituye un mecanismo de eliminación de éstos del suelo a través de su inmovilización y cambio en su nivel de toxicidad.

Poco se conoce sobre la actividad biológica potencial de la mayoría de los metabolitos con respecto al total de la biota vegetal; la mayor parte de la información relacionada con la interacción metabólica planta-xenobiótico se ha obtenido a partir de la investigación del metabolismo de los herbicidas contra malezas y con especies de cultivo (Bell, 1992) y los cultivos de células vegetales se han sugerido como sistemas *in vitro* para investigar los efectos tóxicos de los contaminantes y/o su transformación (Macková *et al.*, 2001; Chroma *et al.*, 2002; Santos de Araujo *et al.*, 2002; Flocco & Giulietti, 2003).

Se menciona que el empleo de estos sistemas posee ventajas que incluyen un mínimo mantenimiento, estandarización y manejo en condiciones estériles, así como que poseen la habilidad para manipular el estado fisiológico de las células, tejidos u órganos.

Estos sistemas también permiten el análisis rápido del metabolismo de los xenobióticos en plantas, ya que éstos no tienen la interferencia de microorganismos, la sorción rápida de los compuestos bajo estudio y la alta tasa de formación de metabolitos (Harmes, 1992).

Dentro del manejo de sistemas vegetales que participan en la transformación de contaminantes, se tiene la determinación de la actividad de peroxidasas radicales de *Eichhornia crassipes* y *Lycopersicon esculentum* L y su participación en la polimerización de compuestos fenólicos disueltos en cuerpos de agua contaminados, lo que minimiza su absorción al precipitarlos en la superficie radical (Adler *et al.*, 1994) y la caracterización de lacasas en *Populus deltoides*, cuyas raíces pueden absorber atrazina (un pesticida) y transformarla a compuestos menos tóxicos, que incluyen metabolitos de cadena corta (Schnoor *et al.*, 1995).

Este estudio consideró la evaluación de la actividad enzimática de fenoloxidasas en una especie de pantano *Cyperus elegans* de los sistemas radicales de plantas *in toto* y de cultivo de raíces (*in vitro*) expuestos a fenantreno, un hidrocarburo aromático policíclico considerado como uno de los HAP s más tóxicos del ambiente, con la finalidad de analizar fisiológicamente estos sistemas radicales como posibles herramientas útiles en la remoción y transformación de contaminantes orgánicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de las plántulas de *Cyperus elegans*

Las semillas empleadas provienen de una colecta de material vegetal de *Cyperus elegans* en el pantano Santa Alejandrina,

el cual está cercano a la refinería de Minatitlán en el estado de Veracruz, Ver., zona contaminada con hidrocarburos derivados del petróleo con un total de estos hidrocarburos del petróleo de 81 640 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco (IMP & UAM, 1997).

La germinación se realizó en germinadores con arena y agua destilada estéril a 36°C, en oscuridad. Posteriormente las plántulas se trasplantaron y mantuvieron para su crecimiento en cultivos hidropónicos en contenedores de vidrio ámbar de 500 ml, con 400ml de solución mineral: 0.20M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.50M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.15M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.26M CaCl<sub>2</sub>, 0.20M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.20M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.40M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.20M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.20M KNO<sub>3</sub>, 0.50M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.040M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.2 x 10<sup>-2</sup>M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.2 x 10<sup>-4</sup>M CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.3 x 10<sup>-3</sup>M ZnCl<sub>2</sub>, 4.4 x 10<sup>-4</sup>M MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6 x 10<sup>-6</sup>M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, EDTA and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: pH 6 y se mantuvieron bajo condiciones controladas en invernadero a 37/17°C y 56% de humedad relativa en promedio con fotoperiodo 12:12 por 60 días, para establecer posteriormente los cultivos *in vitro* de las raíces de *Cyperus elegans* y las plantas completas, para su exposición con fenantreno.

### Cultivo de raíces de *Cyperus elegans*

Se obtuvieron las raíces de las plantas de 60 días de crecimiento cultivadas en solución nutritiva, todas las actividades siguientes se desarrollaron bajo condiciones de esterilidad; éstas se cortaron, pesaron y depositaron en hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos para su desinfección, se enjuagaron con agua destilada estéril y se seccionaron cuidadosamente de ellas cinco ápices radicales de 10 mm de longitud que se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio White (1934).

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad a 30°C con agitación continua durante ocho días, para su exposición a fenantreno.

#### **Exposición de cultivos radicales *in vitro* de *Cyperus elegans* a diferentes concentraciones de fenantreno**

Los cultivos de los sistemas radicales obtenidos, se expusieron a 40, 60 y 90 ppm de fenantreno (grado HPLC, SIGMA Chemical Co.), a partir de una solución concentrada (100 mg/10 ml etanol al 95%) y con un cultivo sin fenantreno como testigo, todo esto bajo condiciones de esterilidad. La selección de la concentración de fenantreno empleada en estos experimentos tanto en condiciones *in vitro* como *in toto* proviene de ensayos previos realizados con ésta y otras especies que toleran un intervalo de concentraciones probadas, además de otros reportes donde la concentración de este contaminante fue de 50, 100 y 200 mg/L (Flocco *et al.*; 2002 y 2004) y de 7 a 500 ppm en suelo (Gao & Zhu, 2004). La exposición se realizó por 10 días con agitación continua para permitir la aireación de los cultivos y la dispersión de las partículas de fenantreno, no solubles en el sistema y al término se cuantificó la cantidad de biomasa radical total obtenida, la evaluación de la remoción del fenantreno y la actividad enzimática superficial radical de las fenoloxidasas.

#### **Exposición de los cultivos *in toto* de *Cyperus elegans* a fenantreno**

Se transfirieron plantas completas a contenedores de vidrio ámbar de 1 L de capacidad que contenían 900 ml de la solución mineral, a los que se les adicionó fenantreno (grado HPLC, SIGMA Chemical

Co.) a las mismas concentraciones que en los experimentos *in vitro*: 40, 60 y 90 ppm, a partir de la solución patrón de fenantreno (100 mg/10 ml etanol al 95%), exponiéndolos durante 10 días. Los cultivos hidropónicos con el contaminante se mantuvieron bajo condiciones de invernadero a 37/17°C y 56% de humedad relativa en promedio, con un sistema de burbujeo continuo mediante varillas de vidrio sumergidas en cada unidad hidropónica, conectadas a una bomba de aireación para proveer de aire a la solución, prevenir la deposición de fenantreno insoluble en el fondo y favorecer la intercepción de éste por los sistemas radicales y garantizar la distribución del compuesto en el sistema.

Después de transcurrido el periodo de exposición a fenantreno, se obtuvo el peso de la biomasa total epigea (material foliar) e hipogea (material radical) para cada experimento, se evaluó la remoción de fenantreno y se separó el sistema radical para los análisis enzimáticos.

#### **Cuantificación del fenantreno removido por los cultivos radicales de *Cyperus elegans***

Después de la exposición de los sistemas radicales de *Cyperus elegans in toto e in vitro* a las diferentes concentraciones de fenantreno, se decantó el medio de cultivo o la solución nutritiva para determinar la cantidad total de fenantreno (soluble y en partículas). Para lo cual las raíces se sacudieron cuidadosamente dentro de la solución para liberar cualquier partícula(s) de fenantreno depositadas y no adsorbidas en las raíces.

Se realizó la cuantificación del fenantreno residual en el medio, mediante una extracción líquido-líquido con 10 ml de benceno

(SIGMA Chemical Co.) empleando un embudo de separación, agitando y dejando reposar por 10 minutos para separar y recuperar la fase orgánica, este proceso de extracción se realizó dos veces con una recuperación eficiente del fenantreno remanente presente en el medio. También se realizó la extracción de fenantreno de extractos radicales, los cuales se obtuvieron tomando una fracción de la biomasa radical total y moliendo ésta en mortero con 5 ml de benceno, para después colocar la suspensión en un embudo de separación, dejando reposar por 10 minutos y separando la fase orgánica que contenía el fenantreno.

Cabe mencionar que en los experimentos *in toto*, solamente se consideró la cuantificación de la biomasa radical debido al contacto directo con el contaminante, además de que el fenantreno, por su tamaño molecular y sus características lipofílicas, no se transloca al resto de la planta.

Se guardó la fase orgánica para cuantificar el fenantreno por espectroscopía UV y previamente al análisis por cromatografía de alta presión de líquidos (HPLC), todas las muestras de los extractos en benceno de todos los experimentos, se concentraron en rotavapor (40°C/ 82 rpm) y se resuspendieron en 2 ml de metanol concentrado grado HPLC.

Para el análisis de HPLC se usó una columna HICHRON C-18 Hypersil, de 25 cm x 4.6 mm, utilizando como fase móvil un gradiente de metanol-agua (50: 50), con un corrimiento de 70 minutos (velocidad de flujo: 1 ml/min), con un detector de UV para determinar la cantidad de fenantreno residual así como también la presencia de posibles productos de transformación de este compuesto a 254 nm.

#### **Determinación de la actividad enzimática de fenoloxidasas radicales**

Para realizar la determinación de la actividad de lacasas y peroxidasas en la superficie radical de estas plantas, se seccionaron cinco extremos apicales de un centímetro de longitud, de raíces frescas para cada ensayo llevando a cabo la medición de la siguiente manera:

#### **Determinación de la actividad enzimática de lacasas**

Se implementó el método de Guerrero (2000), donde las puntas de raíces se colocaron directamente en las celdas del espectrofotómetro y se adicionaron 2 ml de catecol 20 mM disuelto en regulador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8; la reacción se efectuó a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 450 nm, a los 10 minutos. Se transformaron las lecturas de As 450 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar del catecol ( $\epsilon_{450} = 2.211 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para determinar la actividad enzimática específica de las lacasas superficiales de la raíz, con relación a la cantidad de catecol oxidado.

Para ajustar el espectrofotómetro se utilizó como testigo una celda con 2 ml de catecol 20 mM en regulador de fosfato de potasio 20 mM, pH 6.8.

#### **Determinación de la actividad enzimática de peroxidasas**

La determinación de la actividad de estas enzimas empleó 2 ml de regulador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.0, 32 µl de guaiacol 0.2 M y 26 µl de peróxido de hidrógeno 0.03 M, la reacción se realizó a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 436 nm a los 5 minutos. Se transformaron las lecturas

de As 436 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar del guaiacol ( $e_{436} = 6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para determinar la actividad enzimática específica de las peroxidasas de la superficie radical, con relación a la cantidad de guaiacol oxidado.

Para ajustar el espectrofotómetro se utilizó como testigo una celda con 2 ml de regulador de fosfato de potasio 0.1 M, 32  $\mu\text{l}$  de guaiacol 0.2 M y 26  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno 0.03 M. Para la expresión de la actividad enzimática específica de ambas fenoloxidasas por área radical ( $\text{cm}^2$ ) y por gramo de peso fresco radical se aplicó el método de Hendry (Guerrero, 2000) que se basa en la medición de la actividad enzimática con base en los cambios de absorbancia en el tiempo.

#### **Análisis microscópico de las raíces expuestas a fenantreno**

Este análisis se realizó con el objeto de registrar algún cambio evidente en la superficie de las raíces, después de haberse expuesto a fenantreno.

Los fragmentos de raíz empleados se enjuagaron previamente con agua destilada y se montaron en gelatina glicerada colorida para su observación en el microscopio estereoscópico Stemí SVII, Zeiss.

#### **Análisis estadístico de los resultados**

A los resultados de cuantificación de biomasa radical, porcentaje de fenantreno removido y actividad enzimática, se les aplicó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), empleando el paquete estadístico de Diseños Experimentales FAUNL, véase 1.4 (Olivares, 1989). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis de la remoción de fenantreno por los cultivos radicales *in vitro* e *in toto* de *Cyperus elegans***

En cuanto al crecimiento radical de *Cyperus elegans*, la cantidad de biomasa hipogea obtenida en el tiempo de exposición a fenantreno, fue ligeramente mayor en los cultivos expuestos a fenantreno con respecto al testigo en ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, esto no representa un efecto notorio sobre la masa radical, ya que las diferencias estadísticas tanto en los cultivos *in vitro* como *in toto* no reflejaron una diferencia significativa entre los tratamientos con fenantreno y el testigo; no obstante que sí se presenta una diferencia significativa entre las dos condiciones experimentales ( $p < 0.05$ ). Cabe mencionar que la respuesta obtenida en los cultivos radicales *in toto*, fue mayor dadas las características de la planta completa; en el otro caso (cultivo *in vitro*) prácticamente el alargamiento de las raíces obtenido no reflejó un crecimiento sustancial en esta especie bajo tales condiciones (fig. 1).

### **Remoción de fenantreno por el sistema radical *in vitro* e *in toto* de *Cyperus elegans***

El porcentaje de fenantreno removido por esta especie fue bajo en este tiempo de exposición (10 días) ya que solamente se obtuvo un 6 y 8% de remoción en los experimentos con 60 ppm y de 32 a 27% en los experimentos de 90 ppm en los cultivos *in vitro* e *in toto* respectivamente; mientras que en ambas condiciones de cultivo en el experimento con 40 ppm no hubo remoción, quedando el contaminante en el medio de cultivo (casi el total de las 40 ppm) (fig. 2),

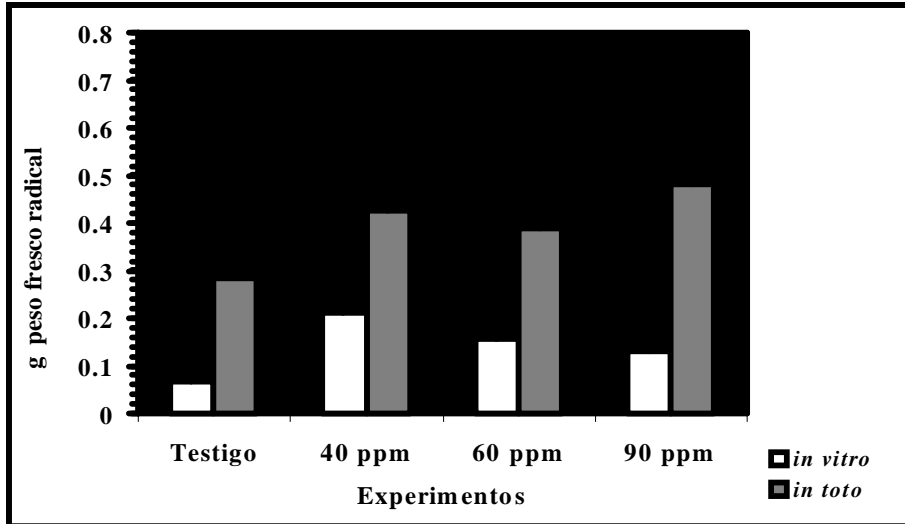


Fig. 1. Biomasa radical de *Cyperus elegans*, *in toto* e *in vitro* expuestas a fenantreno, sin diferencias significativas entre los experimentos; pero sí entre las dos condiciones de cultivo.

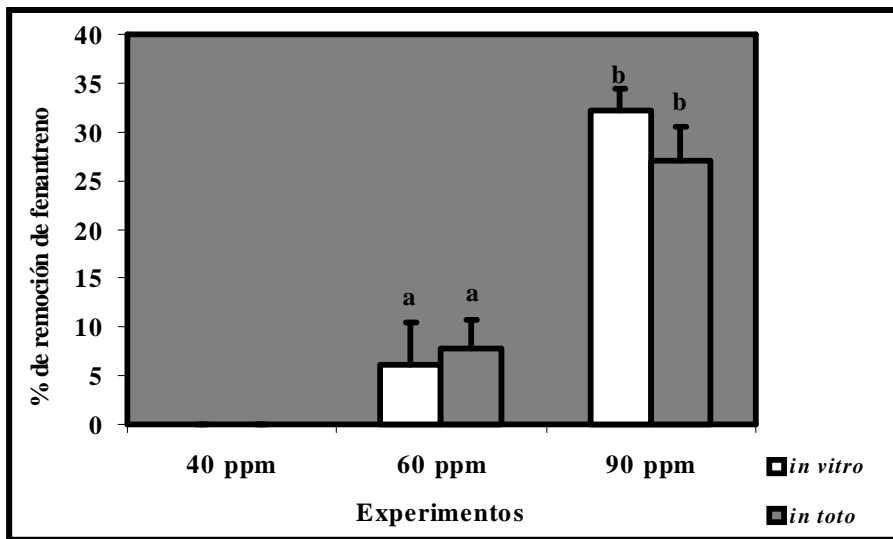
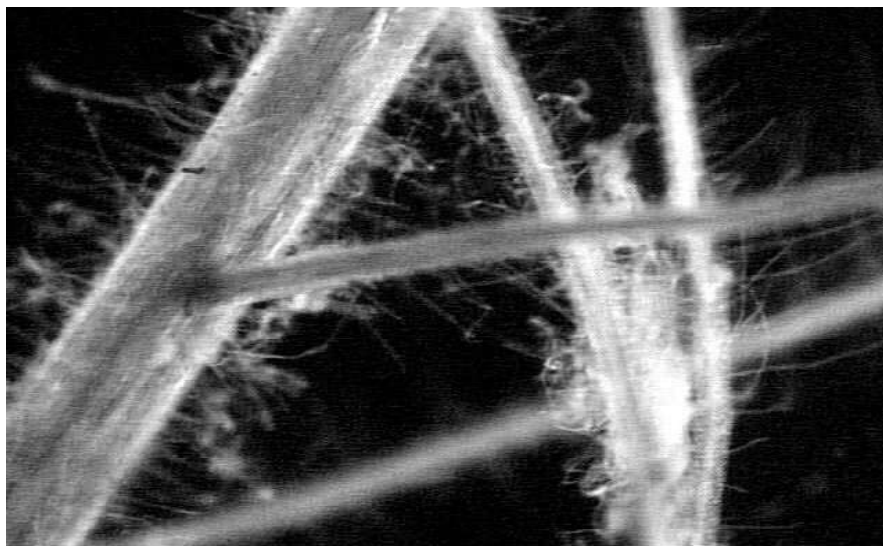


Fig. 2. Porcentaje de fenantreno removido por el sistema radical de *Cyperus elegans*, las diferentes letras señalan las diferencias significativas encontradas entre los experimentos con fenantreno para las dos condiciones: *in vitro* e *in toto* ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Raíces de *Cyperus elegans*, cultivo *in toto*, testigo sin fenantreno, técnica de campo oscuro (66 x).



**Fig 4.** Raíces de *Cyperus elegans* cultivo *in toto*, expuestas a 60 ppm de fenantreno, donde se observa la masa del contaminante adherido a la superficie radical, técnica de campo oscuro (66 x).



esto pudo deberse a problemas en la extracción del contaminante, ya que se observó una turbidez en el medio, lo que interfirió directamente en la cuantificación del mismo. Es importante mencionar que no obstante que la magnitud del porcentaje de remoción (menos del 50%) así como la cantidad de biomasa radical fueron bajas, la cantidad de fenantreno removido estuvo asociado con el desarrollo radical a mayor concentración de fenantreno, siendo significativa la diferencia entre los experimentos de 60 y 90 ppm ( $p < 0.05$ ) para las dos condiciones: *in vitro* e *in toto*, presentándose una interacción hidrofóbica entre el contaminante y el sistema radical (figs. 3 y 4), donde las propiedades lipofílicas de los componentes de las paredes y membranas celulares de las raíces, el tamaño del compuesto y sus características hidrofóbicas, permitieron que el fenantreno se concentrara en la superficie radical. Este evento confirma los patrones característicos que presentan los hidrocarburos policíclicos aromáticos de ser compuestos lipofílicos, hidrofóbicos y con una alta tendencia a concentrarse sobre las raíces (Schwab *et al.*, 1998).

#### **Caracterización cromatográfica por HPLC del fenantreno extraído de los cultivos radicales de *Cyperus elegans***

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) del medio de cultivo y del extracto radical mostraron la detección de los picos característicos de fenantreno, entre ellos el más prominente a los 35 minutos de retención, y en particular en el extracto radical de 90 ppm, un pico a los 25 minutos 40 segundos, no comparable a los picos característicos del fenantreno, ya que estos compuestos se separaron durante la

primera fase del gradiente metanol-agua y que no se presentó en las muestras testigo (fig. 5). Se sugiere que su estructura posee diferente polaridad a la del fenantreno, que se podría tratar de un compuesto nuevo (fig. 6).

#### **Evaluación de la actividad enzimática de fenoloxidasas radicales superficiales de los experimentos de los cultivos radicales *in vitro* e *in toto* de *Cyperus elegans***

Es difícil separar las respuestas primarias relacionadas con la inhibición del crecimiento radical de respuestas secundarias que se obtienen como consecuencia del daño de los sistemas radicales. Cambios en la actividad enzimática y las pozas metabólicas en respuesta al estrés, son particularmente útiles para proporcionar una detección temprana de las alteraciones primarias en plantas.

Los parámetros fisiológicos y diagnósticos que se evalúan, proporcionan investigación sobre la respuesta de xenobióticos en plantas, y permiten revelar mecanismos que confieran tolerancia; los cambios fisiológicos específicos están relacionados con el modo de acción de un compuesto, lo que permite cuantificar el efecto de éste, no obstante que también las respuestas metabólicas a un estrés fisiológico general pueden ser útiles como indicadores del efecto de xenobióticos (Sprecher & Stewart, 1995). Una de estas respuestas es la activación o incremento en la síntesis de enzimas oxidativas (peroxidasas, superóxido dismutasas, catalasa, glutatión reductasa, polifenol oxidasas) las cuales con frecuencia se presentan en respuesta a varias condiciones de estrés en plantas (Cakmak & Marschner, 1992).



**Fig. 5.** Cromatograma del extracto radical del experimento testigo, cultivo *in toto* de *Cyperus elegans*.



**Fig. 6.** Cromatograma del extracto radical del experimento con 90 ppm de fenantreno, cultivo *in toto* de *Cyperus elegans* y patrones de fenantreno, fenantrol y fenatroquinona.

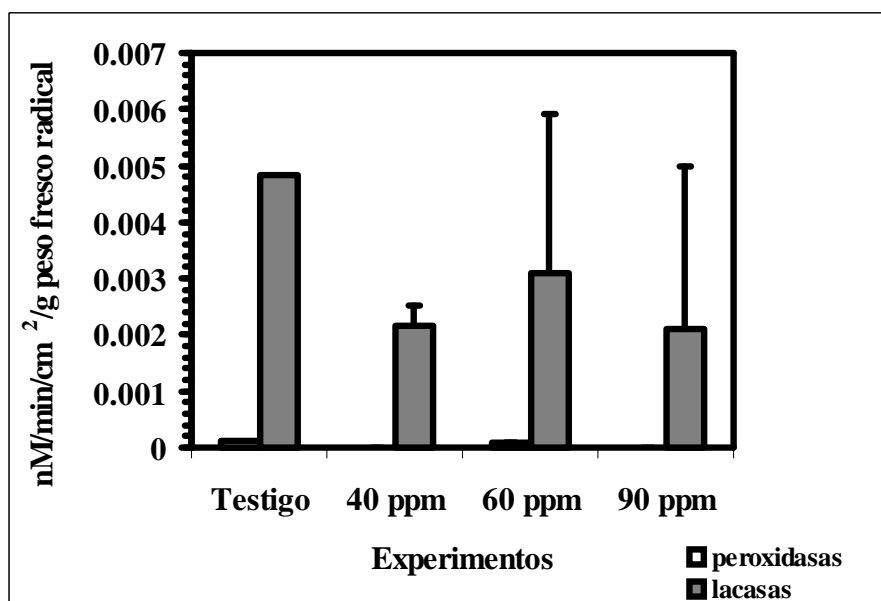
Las peroxidasas son enzimas que juegan un papel importante en la fisiología de las plantas participando en la regulación del crecimiento celular y la expansión y desarrollo vegetal; son fácilmente medibles y dan una evidencia temprana de la respuesta de plantas ante estrés biótico y abiótico (Gaspar *et al.*, 1985; de Souza *et al.*, 2002).

En este trabajo se evaluó la actividad de dos fenoloxidasas: lacasas y peroxidasas, cuya actividad fue diferente no solamente dependiendo de la enzima, sino también del sistema radical empleado.

En los experimentos *in vitro*, la actividad de las peroxidasas superficiales radicales

resultó mucho menor y fue casi imperceptible comparada con la de lacasas; lo que pudo estar relacionado con las características constitutivas de las enzimas presentes en estas raíces además de que las condiciones y desarrollo de estos sistemas radicales es diferente; ambas enzimas disminuyeron en su actividad ante la presencia del contaminante (fig. 7), cabe mencionar que se presentó diferencia significativa entre las dos enzimas de acuerdo con la actividad medida ( $p < 0.05$ ).

En los sistemas radicales *in toto*, la actividad de peroxidasas fue mayor que la de lacasas, además de que en este caso se evidenció de manera notoria que la presencia del contaminante incrementó la actividad de las



**Fig. 7.** Actividad de peroxidasas y lacasas radicales de *Cyperus elegans in vitro*, sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos por enzima ( $p < 0.05$ ).

peroxidasas en por lo menos dos veces más que la actividad de los sistemas radicales sin fenantreno; lo que resultó inverso para el caso de lacasas (fig. 8). No se obtuvo una diferencia significativa en la actividad enzimática de peroxidasas en los experimentos expuestos a fenantreno, mientras que sí se presentó en el caso de lacasas, además de que la comparación entre los sistemas enzimáticos para las raíces de las plantas completas, sí mostró una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Se menciona que las enzimas de plantas de la familia del Citocromo P450, son capaces de oxidar compuestos aromáticos mono y policíclicos, y estas enzimas podrían constituir la vía principal de detoxificación de **estos compuestos** (Korte *et al.*, 2000), no obstante esto, se ha sugerido la participación de peroxidasas en la detoxificación de algunos compuestos aromáticos (Pletsch, *et al.*, 1999; Santos de Araujo *et al.*, 2002; Kucerová *et al.*, 1998), además de que estas enzimas se emplean frecuentemente como biomarcadores no específicos de contaminación ambiental (Lyte & Lyte, 2001) respondiendo a la acción de estrés abiótico dado por la presencia de químicos orgánicos que son altamente tóxicos para la planta.

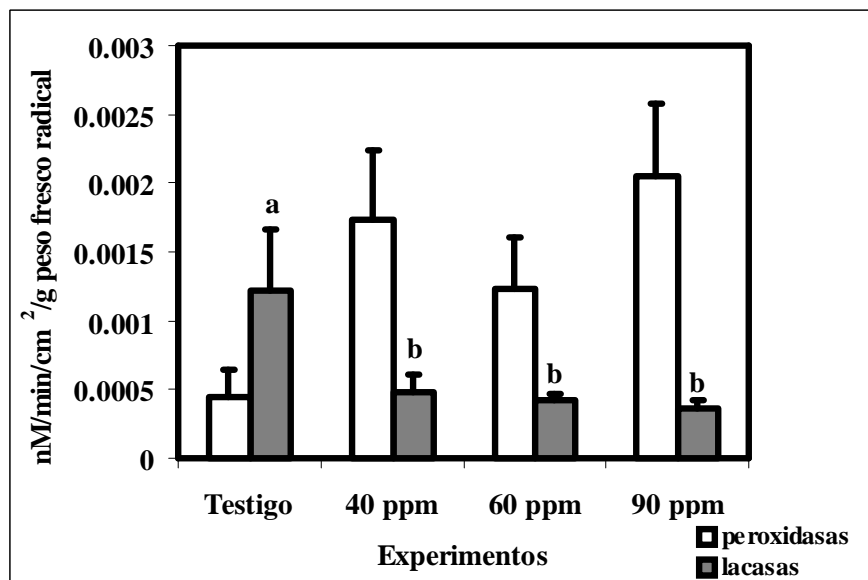
El caso particular de Flocco *et al.* (2002) que evaluaron la actividad de peroxidasas de los extractos radicales de plantas de alfalfa expuestas a fenantreno en cultivos hidropónicos donde la concentración empleada de este contaminante (50 mg/L) afectó el estado fisiológico de las plantas evidenciado a través del decremento en el índice de crecimiento, el contenido de clorofila y una reducción significativa en la actividad de estas enzimas, asociados a un efecto tóxico del contaminante para esta especie; mientras que en los resultados

reportados por Santos de Araujo *et al.* (2002) realizados con raíces transformadas de zanahoria, expuestas a pirogalol, 2-aminofenol, p-cresol, catecol, 2-4 diclorofenol y guaiacol, la actividad de peroxidasas de los extractos radicales se incrementó después de la adición de estos compuestos aromáticos. En nuestro caso, la naturaleza de los sistemas empleados demostró que en los cultivos *in vitro* de esta especie, el estado de las raíces fue importante para la respuesta obtenida. Cabe mencionar que estos experimentos no fueron con raíces transformadas, sólo fueron cultivos obtenidos de raíces de la planta madre que se dejaron en un medio mineral con hormonas vegetales y prácticamente fueron considerados como sistemas inmovilizadores del contaminante, sin la participación de toda la planta.

La respuesta de los sistemas radicales *in toto* de *C. elegans*, mostró que la planta completa dio una respuesta integral ante la presencia del contaminante, que resultó más representativa y con una variabilidad relativamente menor a la medida en las raíces *in vitro*; cabe mencionar que ésta puede relacionarse con la respuesta individual y autónoma de cada raíz dadas las condiciones de cultivo donde se mantuvo su proliferación. Obteniéndose también una diferencia significativa para la actividad de peroxidasas entre las condiciones *in vitro* e *in toto*.

Este estudio consideró la evaluación de la actividad de dos tipos de fenoloxidasas y la naturaleza de la respuesta dependió de la susceptibilidad y situación constitutiva de las enzimas radicales superficiales: peroxidasas y lacasas.

Se hace mención a que la aplicación de plantas completas ricas en peroxidasas



**Fig. 8.** Actividad de peroxidasas y lacasas radicales de *Cyperus elegans*, *in toto*, las diferentes letras señalan las diferencias significativas encontradas únicamente entre los experimentos con fenantreno y el testigo para lacasas ( $p < 0.05$ ).

para el tratamiento de suelos y agua contaminados es recomendable como lo reportan Adler *et al.* (1994), por lo que, como lo sugieren Santos de Araujo *et al.* (2002), la investigación debe orientarse sobre otras enzimas catabólicas como lacasas, tirosinasas y otras fenoloxidasas útiles en la transformación de xenobióticos.

#### CONCLUSIONES

*Cyperus elegans* resultó ser una especie cuya capacidad de remoción de fenantreno por sus raíces no fue tan significativa, ya que constituyó un 32 y 27% en los sistemas radicales *in vitro* e *in toto* respectivamente; así mismo, el efecto que causó la exposición a fenantreno, no fue perjudicial para el desarrollo radical para ambas condiciones de cultivo.

En cuanto a la actividad enzimática radical superficial, la actividad de lacasas fue mayor en los cultivos *in vitro*, mientras que la actividad de peroxidasas lo fue en los cultivos *in toto*; la naturaleza de estos sistemas radicales evidenció la susceptibilidad de los primeros de manera significativa.

La separación por el análisis de HPLC de un compuesto particular en los extractos radicales de los cultivos *in toto* para la concentración más alta de fenantreno, mostró la probabilidad de que existiera una transformación del fenantreno, quizá por la oxidación de alguno de sus anillos. Para ello, falta constatar si las enzimas inducidas (peroxidasas) en los experimentos de los cultivos radicales *in toto* con el fenantreno, participarían en ello.

Finalmente, este ensayo mostró que la relación entre la dinámica de remoción, el metabolismo del fenantreno y la actividad *in situ* de peroxidasas y lacasas por los sistemas radicales de *Cyperus elegans* de la planta completa y los cultivos de raíces, constituyen una investigación que marca el punto de partida en el conocimiento de sistemas radicales de especies que crecen en zonas contaminadas que pudieran ser consideradas como columnas inmovilizadoras de compuestos, como superficies con enzimas asociadas a ellas que transformen y confinen xenobióticos en la superficie radical y con ello constituir herramientas biotecnológicas para la remoción de contaminantes.

#### AGRADECIMIENTOS

El segundo autor agradece a la Dirección de Posgrado e Investigación del IPN, el apoyo financiero otorgado al Proyecto CGPI: 20041251, para la realización de este trabajo.

#### LITERATURA CITADA

- Adler, P.A., R. Aurora, A. El Ghaouth, D. M. Glenn & J.M. Solar, 1994. Biorremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.*, **23**: 1113-1117.
- Bell, R. M., 1992. *Higher plant accumulation of organic pollutants from soils*. Rep. No. EPA/600/R-92/138, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Cakmak, I. & H. Marschner., 1992. Magnesium deficiency and high intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, **98**: 1222-1227.
- Chroma, L., M. Macková, P. Kucerova, C. inder Wiesche, J. Burkhard, & T. Macek., 2002. Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnol.*, **22**: 35-41.
- De Souza P.I.R., V.M.C. Alves, S.N. Parentoni, A.C. de Oliveira, F.F. Teixeira, J.W. Mac Adam & A.A.C. Purcino, 2002. Change in root apical protein and peroxidase activity in response to aluminum in tolerant and sensitive maize inbred lines. *Braz. J. Plant Physiol.*, **14**: 219-224.
- Flocco, C. G., A. Lobalbo, M. P. Carranza, M. Bassi, A. M. Giuletti, & W. Mac Cormack, 2002. Some physiological, microbial and toxicological aspects of the removal of phenanthrene by hydroponic cultures of alfalfa *Medicago sativa* L. *Inter. J. Phytorem.*, **4**: 169-186.
- Flocco, C.G. & A.M. Giuletti, 2003. Hairy root cultures as an *in vitro* root model for phytoremediation research. In: *Phytoremediation of organic compounds*. Proceedings of the Second European Bioremediation Conference, Chania, Creta, Grecia.
- Flocco, C. G., S.D.Lindblom & E.A.H. Pilon Smits, 2004. Overexpression of enzymes involved in glutathione synthesis enhances tolerance to organic pollutants in *Brassica juncea*. *Inter. J. Phytorem.*, **6**: 1-16.
- Gao, Y. & L. Zhu, 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, **55**: 1169-1178.

- Gaspar T.H., C. Penel & H. A. Greppin, 1985. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.*, **64**: 418-423.
- Guerrero, Z.L.A., 2000. *Evaluación del efecto de un suelo contaminado con hidrocarburos, sobre el crecimiento y metabolismo de tres especies de ciperáceas*. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México, D.F.
- Harmes, H.H., 1992. *In vitro*-systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. *Pestic. Sci.*, **35**: 277-281.
- I.M.P. & UAM-I, 1997. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el Pantano Santa Alejandrina, Minatitlán, Ver. Reporte Técnico, México.
- Korte, F., G. Kvesitadze, D. Ugrekheldze, M. Gordeziani, G. Khatishvili, O. Buadze & F. Coulston, 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **47**: 1-26.
- Kucerová, P., L. Polachova, T. Macek, J. Burkhard, J. Pazlarova, K. Demnerová & M. Macková. 1998. Transformation of PCBs by plant cell cultures and relation to the production of plant peroxidases. *Internat. Biodeterior. Biodegrad.*, **42**: 245-250.
- Lyte, J.S. & T.F. Lyte, 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environ, Toxicol. Chem.* **20**: 63-68.
- Macková, M., L. Chroma, P. Kucerová, J. Burkhard, K. Demnerová & T. Macek, 2001. Some aspects of PCB metabolism by horseradish cell. *Inter. J. Phytorem.*, **3**: 401-414.
- Olivares, S. E., 1989. *Paquete de diseños experimentales FAUNL*. Versión 1.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. México.
- Pletsch, M., B. Santos de Araujo & B.V. Charlwood, 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances*, **17**: 679-687.
- Santos de Araujo, B., B.V. Charlwood & M. Pletsch, 2002. Tolerance and metabolism of phenol and chloro derivatives by hairy root cultures of *Daucus carota* L. *Environ. Pollut.*, **117**: 329-335.
- Schnoor, J.L., L.A. Licht, S.C. McCutcheon, N.L. Wolfe & L.H. Carreira, 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. and Tech.*, **29**: 319-323.
- Schwab, A. P., A. A. Al-Assi, & M. K. Banks, 1998. Adsorption of naphthalene onto plant roots. *J. Environ. Qual.*, **27**: 220-224.
- Sprecher S.L. & A. B. Stewart, 1995. Triclopyr effects on peroxidase activity in target and nontarget aquatic plants. *J. Aquat, Plant Manage*, **33**: 43-48.
- White, P.R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, **9**: 583-600.