



Casa abierta al tiempo  
**Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Expresión de la actividad enzimática de citocromo p450 en una planta  
(*Cyperus laxus*) fitorremediadora de suelos contaminados por hidrocarburos”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presentada por:

Sugey López Martínez

Comité Tutoral

<b>Mariano Gutiérrez Rojas</b>	Director
<b>Margarita E. Gallegos Martínez</b>	Asesor
<b>Laura J. Pérez Flores</b>	Asesor
<b>Enrique García Hernández</b>	Asesor

México, D. F.

Mayo 2008

Miembros del Comité Tutorial de la tesis “**Expresión de la actividad enzimática de citocromo p450 en una planta (*Cyperus laxus*) fitorremediadora de suelos contaminados por hidrocarburos**” realizada por Sughey López Martínez en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

[mgr@xanum.uam.mx](mailto:mgr@xanum.uam.mx)

Asesora: Margarita E. Gallegos Martínez

[gmm@xanum.uam.mx](mailto:gmm@xanum.uam.mx)

Asesora: Laura J. Pérez Flores

[ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)

Asesor: Enrique García Hernández

[egarcia@servidor.unam.mx](mailto:egarcia@servidor.unam.mx)

Los miembros del jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Expresión de la actividad enzimática de citocromo p450 en una planta (*Cyperus laxus*) fitorremediadora de suelos contaminados por hidrocarburos**” por Sugey López Martínez quien realizó la disertación pública el 23 de mayo del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa”.

Presidenta Dra. Laura J. Pérez Flores  
[ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)

---

Secretaria Dra. Margarita E. Gallegos Martínez  
[gmm@xanum.uam.mx](mailto:gmm@xanum.uam.mx)

---

Vocal Dr. Enrique García Hernández  
[egarcia@servidor.unam.mx](mailto:egarcia@servidor.unam.mx)

---

Vocal Dra. Tania Volke Sepúlveda  
[tv@xanum.uam.mx](mailto:tv@xanum.uam.mx)

---

Agradecimientos al CONACYT por los apoyos obtenidos al postgrado en Biología Experimental, UAM-I: clave: 309-0 y PNP-CONACyT-SEP clave: C/PFPN-2002-35-32, un agradecimiento al CONACYT por el apoyo recibido con la beca No. 162600, a la Universidad Autónoma Metropolitana y a PEMEX – Refinación por el financiamiento.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios y a la vida primero que nada por poder completar y concluir mis estudios, es un placer ser estudiante y poder aprender a compartir tanto la formación como la información.

Deseo que esto sea un esfuerzo común y un beneficio común para todas las personas cercanas y alejadas a la educación.

Gracias mi mas grande amor Diego quien con solo una sonrisa me recuerda que hay que seguir trabajando y al pequeñito ser que esta dentro de mi, gracias a Fernando quien ha estado presente a lo largo de todo este trabajo y me ha apoyado en los logros y fracasos.

Gracias Juanita y Juan mis queridos padres quienes me siguen enseñando el valor de la vida. A mis hermanos Tania, Berenice, Juan y sobrinos (Sahara, Camila, Viviana, Emiliano) quienes siempre están allí, con eso es más que suficiente para seguir en el camino, gracias a toda mi valiosa familia especialmente a Ignacio quien siempre estuvo al pendiente de mí.

Gracias a mis asesores Mariano, Laura, Margarita y Enrique quienes siempre han creído en mí y han confiado en mi trabajo. Y a Tania por su apoyo.

Gracias a Edith por su valiosa colaboración en este trabajo

Gracias a mis queridos compadres por la confianza la amistad y el afecto brindado durante esta experiencia Tere y Lázaro.

Gracias a mis amigos que han estado no solo en esta larga aventura por la educación Yola, Bety, Abel, Laura, Edith. Y a todos mis compañeros y amigos del laboratorio quienes son un gran equipo, incluyendo a Bety.

## CONTENIDO

Listado de abreviaturas	
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Revisión Bibliográfica	4
2.1. Técnicas de remediación de suelos contaminados	4
2.2. Biorremediación y fitorremediación	6
2.3. Mecanismos y fases de la fitorremediación	7
2.4. Interacciones planta microorganismos suelo contaminado	10
2.5. Etapas de la biotransformación de moléculas orgánicas xenobióticas	13
2.6. Citocromo P450	16
3. Antecedentes y definición del problema	18
4. Objetivos	20
5. Hipótesis	20
6. Estrategia general del trabajo	21
7. Métodos y Materiales	23
7.1. Experimentos con suelo	23
7.1.1. Suelo y unidades experimentales	23
7.1.2. Propagación y aclimatación de plantas	25
7.1.3. Ensayos de fitorremediación	25
7.2. Experimentos en un sistema modelo	25
7.2.1. Sistema modelo y contenedores experimentales	26
7.2.2. Propagación de plantas y ensayos de inducción de la actividad enzimática	26
7.2.3. Lavado de la raíz y determinación de microorganismos	27
7.2.4. Extracción de las fracciones microsomales y citosólicas	28
7.2.5. Cuantificación de proteínas	29
7.2.6. Determinación de actividad EROD CYP450	29

7.2.7. Estandarización de datos de actividad enzimática	30
7.3. Métodos analíticos	32
7.3.1. Análisis de hidrocarburos	32
7.3.2. Desasfaltenización y fraccionamiento de hidrocarburos	32
7.3.3. Determinación de carbono orgánico total	35
7.3.4. Determinación de granulometría	35
7.3.5. pH y humedad	35
7.4. Análisis estadístico	35
8. Resultados y Discusión	36
8.1. Caracterización de suelo experimental	36
8.1.1. Carbono orgánico total	37
8.1.2. Análisis granulométrico	38
8.2. Distribución y remoción de hidrocarburos	41
8.3. Lavado de raíz	48
8.4. Ensayos de la actividad enzimática en plantas creciendo en suelo contaminado	50
8.5. Ensayos de la actividad enzimática en plantas creciendo en suelo modelo	53
9. Conclusiones	59
10. Recomendaciones	60
11. Referencias bibliográficas	61

## Listado de abreviaturas

*C. laxus*: *Cyperus laxus*

CYP450: Citocromo P450

EROD: 7-etoxiresorufina O-deetilasa

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

COT: Carbono orgánico total

MSC: Mezcla de suelo contaminado

UA: Unidades de actividad

pkat: pico katales

DE: Desviación estándar

FLU: fluorescencia



## Resumen

*Cyperus laxus* Lam, se cultivó en un suelo contaminado con hidrocarburos y en un suelo modelo (agrolita) para determinar el efecto de hidrocarburos derivados del petróleo en la actividad EROD (7-etoxyresorufina O-deetilasa) citocromo P450 en raíces. La motivación para realizar este estudio se deriva del interés mundial reciente en la fitorremediación de suelos contaminados, así como de la falta de conocimientos de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la remediación. Por dichas razones es importante determinar la actividad EROD CYP450, que participa en la primera etapa de degradación de xenobióticos. La fitorremediación, es decir el uso de plantas para la degradación de compuestos xenobióticos, presenta desafíos que incluyen a los mecanismos de inducción enzimática que las plantas desarrollan frente a los hidrocarburos que contaminan un suelo. El alcance de la fitorremediación se evaluó en un suelo contaminado con diferentes contenidos de humedad. Se utilizaron unidades experimentales con 6.5 kilogramos de suelo contaminado (173 mg de HTP g<sup>-1</sup> de suelo seco). De lo anterior se obtuvo una tasa de remoción promedio de 3.46 mg HTP g<sup>-1</sup> de suelo seco (48%) en las unidades experimentales con 60% de humedad. También se determinó la remoción de diferentes fracciones de HTP en las muestras después de 24 meses de cultivo en condiciones de invernadero; la fracción más fácilmente degradada fue la de hidrocarburos alifáticos (60%), seguida por la fracción de hidrocarburos aromáticos (51%), y por último la fracción de hidrocarburos polares (24%). Los experimentos a corto plazo (hasta 13 días) con suelo modelo (agrolita) demostraron que hay dos actividades EROD CYP450 en raíces que contribuyeron al total detectado; el 60% de la actividad enzimática fue atribuida a la fracción citosólica y el 40% a la fracción microsomal. Los resultados de la actividad EROD CYP450 en la fracción microsomal de las raíces sugirieron que esta actividad se podría asociar al ciclo de reproducción de la planta (expresado como florecimiento). Los comportamientos similares entre la actividad enzimática y el florecimiento fueron más evidentes en presencia de hidrocarburos. La presencia de hidrocarburos indujo la actividad EROD CYP450 hasta 6.5 veces mayor que la

actividad obtenida sin hidrocarburos. Según nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo que intenta construir vínculos entre la presencia de los hidrocarburos en la rizosfera de la planta, el posible carácter inducible de la actividad EROD CYP450 en raíces y la capacidad del fitorremediación de *C. laxus* en suelos altamente contaminados por hidrocarburos.

### **Abstract**

Laboratory and greenhouse experiments with a plant (*Cyperus laxus* Lam) cultivated on hydrocarbon contaminated soil and spiked soil model were conducted to determine the effect of hydrocarbons on the cytochrome P450 EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) enzymatic activity in roots. The motivation for this study comes from the recent worldwide interest paid to phytoremediation of contaminated soils. This alternative technology presents challenges including the role of enzymatic induction mechanisms developed by plants when hydrocarbons are the specific contaminants in soil. The extent of phytoremediation at different contaminated soil moistures was measured using 6.5 kg contaminated soil pots (173 mg total petroleum hydrocarbons (TPH) g<sup>-1</sup> of dry soil). Average removal rate of 3.46 mg TPH g<sup>-1</sup>dry soil month<sup>-1</sup> with 60% soil moisture was observed. Hydrocarbon fractions removal was also determined: the aromatic fraction was 60% removed; aliphatic, 51%; and polar 24% after 24 months greenhouse culture. Short term experiments (up to 13 days) with spiked perlite demonstrated that two EROD activities in roots contributed to the total detected; 60% was attributed to the cytosolic and 40% to the microsomal. Results from CYP450 EROD-activity in roots microsomal fractions suggested that such activity could be associated to the plant reproduction life-cycle (denoted by flowering). The link between enzymatic activity and flowering was more evident in the presence than in the absence of hydrocarbons. Moreover, hydrocarbons induced CYP450 EROD-activity up to 6.5-fold. To our knowledge this is the first work trying to build links between the hydrocarbon-inducible character of CYP450 EROD-activity in roots and the phytoremediation ability of *C. laxus* in highly contaminated soils.

## 1. Introducción

Los problemas de contaminación a nivel mundial han crecido considerablemente en los últimos años. Día a día la contaminación de los suelos aumenta se necesitan mas soluciones para su remediación. Esta fue la motivación para trabajar en un problema de contaminación, que en este país es grave: la contaminación de suelos con hidrocarburos. Dicha contaminación provoca no sólo daños al ambiente sino también a la salud. En la revisión bibliográfica se presentan y describen las técnicas de remediación aplicadas a suelos contaminados, así como los mecanismos de la fitorremediación, abordando las interacciones de la planta con los microorganismos, el contaminante y el tipo de suelo. También se explican brevemente las etapas de transformación de las moléculas orgánicas xenobióticas. A partir de esta revisión surge el interés por estudiar una de las actividades enzimáticas iniciales en la transformación de moléculas exógenas, la actividad de 7-etoxiresorufina O-deetilasa (EROD por sus siglas en inglés) llevada a cabo por el citocromo P450.

En el capítulo de resultados se presenta la caracterización (Carbono orgánico total y análisis granulométrico) en cuanto a la distribución de los hidrocarburos en los modelos experimentales usados (unidades experimentales de cristal). Asimismo, se discuten los resultados de los ensayos de la actividad enzimática en plantas crecidas en el suelo contaminado y los ensayos de la actividad enzimática en plantas crecidas en el suelo modelo.

Estos resultados permitieron reunir conocimiento acerca de los mecanismos que la planta utiliza durante la fitorremediación de hidrocarburos incluyendo las interacciones que se llevan a cabo en el suelo entre la planta, los microorganismos y los xenobióticos. Este estudio contribuye a proponer soluciones sencillas a los grandes problemas de la contaminación y la eventual recuperación de suelos.

## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Técnicas de remediación de suelos contaminados**

La generación, utilización, distribución y derrames accidentales de diferentes moléculas orgánicas xenobióticas (herbicidas, insecticidas, acaricidas e hidrocarburos, entre otros) han ocasionado el deterioro del ambiente debido a la acumulación directa o indirecta en suelos, agua y aire. En términos generales, se puede decir que la velocidad de acumulación de contaminantes en el ambiente es mayor a la capacidad que tiene el planeta para remover estos compuestos orgánicos xenobióticos (Kvesitadze *et al.*, 2001). De aquí surge el interés por colaborar con la naturaleza para revertir el efecto de los contaminantes en los ecosistemas (Sanderman, 1992).

Las técnicas de remediación de suelos contaminados incluyen un amplio espectro de procedimientos que pueden realizarse “in situ” (en el sitio) o “ex situ” (fuera del sitio contaminado). En ocasiones una alta agresión al medio edáfico, provoca alteraciones posteriores a la remediación que impiden recuperar el uso anterior del suelo. Estas técnicas se clasifican según Elwes (1999) en cuatro tipos: a) técnicas de extracción, b) técnicas químicas, c) técnicas físicas y d) técnicas biológicas.

#### a) Técnicas de extracción:

(i) Lavado de suelos. El lavado del suelo se basa en una separación o reducción del volumen del contaminante. El rendimiento depende de la solubilidad de los compuestos contaminantes en la solución de lavado que se utilice. Normalmente se aplica “in situ”.

(ii) Aplicación de vacío a suelos. La aplicación de vacío promueve la extracción de los contaminantes y se utiliza para eliminar compuestos volátiles orgánicos y algunos inorgánicos como el mercurio (Domenech y Peral 2006).

(iii) Ventilación de suelos. La técnica de venteo es una modificación de la anterior, donde se combina el efecto de extracción con la inyección de aire, en este tipo de técnicas las características físicoquímicas del suelo pueden alterar la eficacia de la técnica (USEPA, 1995).

b) Técnicas químicas. Las principales son la oxidación y la deshalogenación. La oxidación se basa en la adición de oxidantes químicos al medio contaminado para convertirlos en compuestos inocuos, comúnmente encontrados en la naturaleza (USEPA, 1999). Los oxidantes que se aplican incluyen al peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, ozono y en menor grado, oxígeno disuelto en medios líquidos. Las aplicaciones más comunes en campo utilizan al reactivo de Fenton, donde el peróxido de hidrógeno se aplica con un catalizador de hierro que crea un radical libre hidroxilo, el cual facilita la oxidación de los compuestos orgánicos contaminantes. La deshalogenación se basa en la conversión de contaminantes que contienen halógenos (cloro y flúor) en sustancias menos tóxicas mediante reacciones químicas controladas que retiran o reemplazan los halógenos (Domenech y Peral 2006).

c) Técnicas físicas. Estas técnicas consideran la fijación y/o el encapsulamiento de los contaminantes. En general, su objetivo es almacenar e inmovilizar los contaminantes. El principal problema es evitar que los productos de transformación o lixiviados constituyan una nueva fuente de contaminación. Ejemplos de estos procesos son la solidificación con cal o cemento y los tratamientos térmicos como la vitrificación, que también se aplican para destruir compuestos orgánicos (Domenech y Peral 2006).

d) Técnicas biológicas. A pesar de que las técnicas biológicas no producen agresiones en el entorno, la dimensión de la contaminación y el tiempo requerido para la remediación, impiden que sean adecuadas para todos los casos. Las técnicas biológicas se han desarrollado desde hace un par de décadas, sobre todo a escala piloto, aunque en los últimos años se ha desarrollado a escala comercial, tanto en el

caso de suelos contaminados como en el caso de aguas o efluentes (USEPA, 1996; 1997). Para la aplicación de las técnicas biológicas se deben considerar las condiciones específicas del medio a descontaminar, evaluar las interacciones del suelo con el contaminante, de los microorganismos con los contaminantes y de los microorganismos exógenos con las poblaciones nativas de microorganismos del suelo (Telysheva *et al.*, 2002). A las técnicas biológicas para la remediación de suelos, también se les conoce como técnicas de biorremediación. La biorremediación de suelos contaminados puede realizarse con la ayuda de biofiltros, biorreactores o por compostaje (Suzuky y Yamaya 2005). También pueden adicionarse nutrimentos para mejorar la tasa de biodegradación natural (bioestimulación) o microorganismos más eficientes para la degradación (bioaumentación) (Lagrega, 1996).

## **2.2. Biorremediación y fitorremediación**

La biodegradación se refiere al proceso natural por el cual las bacterias u otros organismos vivos alteran y convierten moléculas orgánicas tóxicas en sustancias menos tóxicas como ácidos grasos y CO<sub>2</sub>. Algunos ejemplos recientes son: (i) la biodegradación del biofenol por *Sphingomonas* sp. (Kolvenbach *et al.*, 2007); (ii) la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales del petróleo a través de Alfalfa (Schwab *et al.*, 2006).

La biorremediación implica la transformación química de contaminantes, mediante el uso de microorganismos que satisfacen sus requerimientos nutricionales y de energía con los contaminantes, contribuyendo a la detoxificación del ambiente por la mineralización y/o co-metabolismo de dichos compuestos (USEPA, 1996). Para otros autores la biorremediación es la adición de microorganismos exógenos a los ambientes contaminados para acelerar el proceso natural de biodegradación (Senan y Abraham, 2004). Estos conceptos necesariamente conducen a la noción de una nueva opción biológica viable para colaborar con la naturaleza. Sin embargo, hace falta considerar otros elementos como el diagnóstico preciso del tipo de contaminante, la dimensión de la contaminación, así como el futuro uso del lugar

contaminado. Además, es conveniente establecer un diagnóstico sobre la posible incidencia de la contaminación en el agua subterránea. La evaluación de las opciones que se pueden utilizar para la biorremediación de suelos, debe hacerse con base en una serie de criterios, tales como la disponibilidad de la técnica, así como las ventajas y desventajas de cada una de ellas (Harvey *et al.*, 2002).

Una de las técnicas biológicas para la remediación de suelos es la fitorremediación, una tecnología emergente que se refiere al conjunto de métodos para degradar, metabolizar y/o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos, compuestos radioactivos y derivados del petróleo por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (Harvey *et al.*, 2002). Sin embargo, la aplicación de la fitorremediación tiene limitaciones respecto a otras técnicas: (i) depende de la profundidad de penetración de las raíces; (ii) la fitotoxicidad en áreas fuertemente contaminadas; (iii) los tiempos del proceso pueden ser muy prolongados, y (iv) la biodisponibilidad de los compuestos que limita su captación. Para superar estas limitaciones es indispensable comprender (i) los mecanismos de la fitorremediación, (ii) las fases que participan en la fitorremediación y (iii) las interacciones planta-microorganismos (Cunningham *et al.*, 1997).

### **2.3. Mecanismos y fases de la fitorremediación**

La detoxificación de contaminantes por fitorremediación ocurre a través de al menos uno de los siguientes mecanismos: fitoextracción, rizofiltración, fitoestimulación, fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación y rizodegradación.

La fitoextracción consiste en la absorción de contaminantes por las raíces y su acumulación en raíces, tallos o follaje. Este mecanismo ha sido ampliamente

estudiado en plantas que acumulan metales (Jian *et al.*, 1997) y, más recientemente, con materiales radioactivos (Dushenkov, 2003).

La rizofiltración se basa en la absorción o precipitación, a través de las raíces de plantas, de contaminantes que están en una solución alrededor de la zona de raíces. Es similar a la fitoextracción pero a diferencia de ésta, la rizofiltración se utiliza para tratar medios líquidos y no el suelo.

En la fitoestimulación o rizodegradación, las plantas generan exudados radiculares que estimulan el crecimiento de microorganismos nativos de la rizósfera capaces de degradar compuestos orgánicos xenobióticos. Por ejemplo, Pivetz *et al.*, (1997) ensayaron el crecimiento de diferentes especies en presencia de pentaclorofenol e hidrocarburos poliaromáticos. Joner y Leyval (2003) probaron la fitoestimulación mediante la adición de un flavonoide hidroxilado y una flavona sintética no hidroxilada, ambos metabolitos secundarios provenientes de álamos; encontrando que a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{mol/L}$  no permitían la mineralización de benzo(a)pireno marcado en ensayos con lodos provenientes de las raíces. Siciliano *et al.*, (2003) investigaron la capacidad de rizodegradación de hidrocarburos del petróleo por *Festuca arundinacea* demostrando que la máxima tasa de degradación fue de 38 mg de hidrocarburos/kg mes. Este resultado fue el doble de lo que se encontró en el testigo sin planta, y se observó la alternancia en la composición de las comunidades microbianas.

La fitoestabilización es un mecanismo que estabiliza compuestos xenobióticos. Permite reducir la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes evitando el transporte a capas subterráneas o a la atmósfera. Dec y Bollag (1994) demostraron que *Raphanus sp* desarrolla su sistema radicular en un año y que, durante el mismo tiempo, absorbe compuestos fenólicos que remueve hasta en un 90% del suelo.

La fitovolatilización se produce a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con contaminantes orgánicos solubles. Algunos contaminantes



pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmósfera. Los álamos, por ejemplo, volatilizan el 90% del tricloroetileno que absorben (Núñez *et al.*, 2004). Raíces de *Populus deltoides* fueron expuestas a una solución de tricloroetileno (70 mg/L) durante 26 días, observándose que el 90% del tricloroetileno fue volatilizado a través de las hojas (Orchard *et al.*, 2000). Con la misma planta se ha demostrado volatilización de metil terbutíl éter (MTBE) expuesto en las raíces (Aitchison *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2001; Rubin y Ramaswami, 2001).

La fitodegradación consiste en la transformación de contaminantes orgánicos a moléculas más simples. En determinadas ocasiones, los productos de la degradación le sirven a la planta para acelerar su crecimiento, en otros casos los contaminantes son solo biotransformados. Por ejemplo, Marjories *et al.*, (2001), Newman *et al.*, (1999) y Kassel *et al.*, (2002), encontraron que el álamo transformó tanto MTBE como tricloro etileno en acuíferos, que es una molécula mas sencilla.

Esta serie de biotransformaciones ocurre usualmente en la naturaleza, denominándose atenuación natural. En este sentido se ha observado que los niveles de contaminantes se reducen más rápidamente en suelos con plantas que en suelo sin planta. Por ejemplo, April y Sims (1990) demostraron que la biodegradación de varios contaminantes (HAP) se intensificó debido al crecimiento de pastos de pradera en los suelos contaminados con hidrocarburos. En otros estudios (Anderson y Coats 1994), se observó que la rizósfera contenía una población altamente diversificada de microorganismos, dos o tres veces más abundantes que lo observado en los suelos cercanos sin plantas.

Otros estudios recientes (Smith *et al.*, 2006) mencionan la relevancia de la germinación de plantas para determinar el potencial de la misma en la fitorremediación del suelo contaminado por hidrocarburos policíclicos aromáticos sin embargo también mencionan que los estudios de germinación por sí solo no pueden predecir el éxito del posterior crecimiento de la especie estudiada. Otros trabajos indican que la selección de plantas para la bioremediación de sitios contaminados, es

complicada por lo que se estudia si el potencial de fitorremediación puede ser heredable para hacer más eficiente la elección de una planta (Schwab *et al.*, 2006).

Una planta fitorremediadora realiza cualquiera de los mecanismos de detoxificación antes mencionados siguiendo tres fases: absorción, excreción y detoxificación de contaminantes.

- La absorción de contaminantes se realiza a través de las raíces y las hojas mediante la cutícula de la epidermis y los estomas, respectivamente (Watt y Evans 1999). Esta absorción ocurre en la rizodermis de las raíces jóvenes, que absorben los compuestos por ósmosis dependiendo de factores externos como la temperatura y el pH del suelo. Otros factores importantes que inciden en la penetración del contaminante son su peso molecular y su hidrofobicidad, los cuales determinan si estas moléculas atraviesan las membranas celulares de la planta. Después de cruzar la membrana, los contaminantes se distribuyen a través de toda la planta (Harvey *et al.*, 2002).
- Los contaminantes que se absorben por las raíces y se excretan por las hojas (fitovolatilización). Cuando las concentraciones de contaminantes son altas (100000ppm), sólo pequeñas fracciones (menos del 5%) se excretan sin cambios en su estructura química (Kvesitadze *et al.*, 2001).
- La detoxificación de los compuestos orgánicos se lleva a cabo por diferentes vías como son la oxidación, sustitución, conjugación entre otras.

#### **2.4. Interacciones planta-microorganismos-suelo contaminado**

La comunidad de la rizósfera esta constituida por una microbiota (bacterias, hongos y algas), por la micro y la mesofauna (protozoos, nemátodos, insectos y ácaros). La micro y la mesofauna, contribuyen significativamente en los procesos de descomposición con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizósfera. La rizósfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde las bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que responden a

los exudados radiculares; los microorganismos pueden causar un beneficio o una enfermedad a la planta y tienen un considerable potencial para la detoxificación. Entre las interacciones beneficiosas destacan las que tienen las plantas con bacterias que sintetizan factores de crecimiento útiles para la planta, como las fitohormonas; las simbiosis con bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y las establecidas con hongos (Walton *et al.*, 1994). Un caso particular, muy importante, es el que se refiere a las micorrizas, que es la interacción mutualista entre plantas y hongos. Esta interacción facilita la absorción de nutrimentos por la raíz al aumentar el volumen de absorción en el suelo.

La actividad microbiana de la rizósfera depende de factores específicos del sitio y de las plantas, como por ejemplo los referidos a la especie vegetal, su edad, vigor así como el tipo de suelo.

En la Figura 1 se muestra un modelo conceptual de las interacciones que existen entre el suelo, la planta (los mecanismos de fitorremediación) y los microorganismos, durante la biodegradación de moléculas orgánicas xenobióticas.

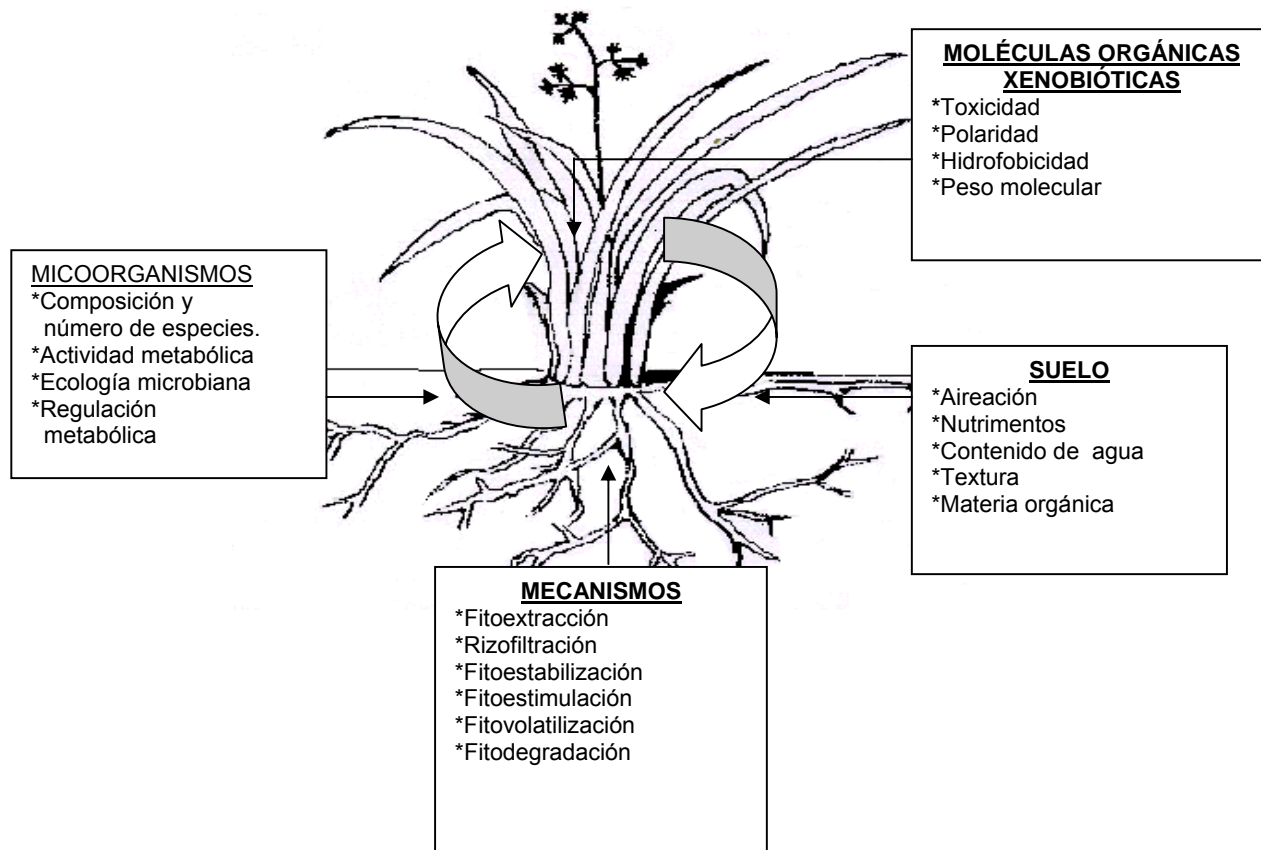


Figura 1. Interacciones que existen entre el suelo- planta- microorganismo-xenobiótico y mecanismos de fitorremediación

En el modelo, la planta inicia la detoxificación con la absorción de los contaminantes a través de las raíces. Dependiendo de la especie, la edad de la planta y la composición de los microorganismos de la rizósfera. Esta absorción responde a diferentes factores como la temperatura, el pH del ambiente nutricional y el tipo de suelo. Otro factor que también influye en la absorción de los contaminantes es la naturaleza química de los mismos (peso molecular, hidrofobicidad) (Anderson *et al.*, 1993). En todo estudio serio de fitorremediación de suelos contaminados de ser posible se deben considerar todos estos factores.

La pregunta que surgiría ahora es ¿Cuál es el destino de la molécula contaminante? La respuesta puede encontrarse mediante un análisis de las diferentes etapas a través de las cuales se transforma un compuesto orgánico xenobiótico en la naturaleza.

## **2.5. Etapas de la biotransformación de las moléculas orgánicas xenobióticas**

Como es bien sabido, plantas y animales están expuestos a diversos compuestos orgánicos xenobióticos potencialmente tóxicos (Anderson y Coats 1995). En animales, las moléculas orgánicas xenobióticas se metabolizan en el hígado, los contaminantes no polares y lipofílicos se transforman en moléculas más solubles que se excretan por la orina. En la década de los 30's, Williams (1959) estudió los mecanismos de detoxificación y escribió un libro llamado "Metabolismo de detoxificación de drogas, sustancias tóxicas y otros compuestos orgánicos". La aportación más importante que se propone en esta obra es que los compuestos exógenos se metabolizan en dos distintas etapas; la primera incluye la oxidación, reducción e hidrólisis y la segunda se conoce como la etapa de conjugación. Años después diferentes autores proponen tres etapas para el metabolismo de los compuestos orgánicos xenobióticos en animales. En la etapa I las enzimas oxidan, reducen o hidrolizan el sustrato, introduciendo un grupo reactivo que puede conducir a una subsiguiente conjugación que se lleva al cabo en la etapa II. En la etapa III se excretan los compuestos hidrofílicos vía la orina y las heces.

En el caso de la plantas su capacidad para absorber los contaminantes está determinada por el potencial de detoxificación que se lleva al cabo en tres etapas: la etapa I de transformación, la etapa II de conjugación y la etapa III de compartimentalización, en la cual ocurren reacciones en compartimentos celulares internos, dando lugar a procesos de almacenamiento en las vacuolas (Sanderman, 1992; Kvesitadze *et al.*, 2001; Schäffer *et al.*, 2002). A continuación se detallan las etapas de transformación de moléculas orgánicas xenobióticas en plantas.

**Etapas I.** En esta etapa se realizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, en que las moléculas orgánicas xenobióticas pierden parte de su estructura. En estas transformaciones se forman metabolitos polares e hidrosolubles. Para hacer estas transformaciones, las células cuentan con dos sistemas enzimáticos que tienen la función de introducir en el contaminante un átomo de oxígeno proveniente del oxígeno molecular (oxigenasas de función mixta). Estos dos sistemas son las amino-oxigenasas y los citocromos P450; ambos sistemas se encuentran localizados en el retículo endoplásmico. Entre las reacciones que ocurren en las plantas, la principal es la hidroxilación catalizada por monooxigenasas o subfamilias de citocromos P450; también se efectúan reacciones de desaminación, desulfuración, epoxidación, peroxigenación y reducción. Los citocromos P450 están formados por dos proteínas diferentes, una tiene función de reductasa y la otra es una hemoproteína con actividad de oxigenasa (Khatishashvili *et al.*, 1997; Varazashvili *et al.*, 2001b).

En función de la localización de las enzimas y de la transformación que llevan a cabo, las reacciones de oxidación se dividen en: (i) microsomales, (ii) citosólicas y (iii) mitocondriales. La oxidación de moléculas orgánicas xenobióticas puede llevarse a cabo a través de reacciones de oxidaciones consecutivas o simultáneas. Una de las enzimas más reportadas durante la oxidación de contaminantes es el citocromo P450 (Yang *et al.*, 2001; Kvesitadze *et al.*, 2001).

En general, las enzimas que participan en esta etapa requieren de grupos no polares en la molécula del contaminante. En procariotes, el citocromo P450 se ha detectado en formas solubles, mientras que en eucariotes se encuentra incorporado a la membrana celular (Pflugmancher y Sanderman, 1998). Se ha reportado que las plantas también contienen formas solubles intracelulares de la misma enzima, que promueven la detoxificación.

Para agilizar la oxidación de moléculas orgánicas xenobióticas en plantas, se han realizado modificaciones genéticas en centeno y maíz (Chapple, 1998),

demostrándose que las enzimas pueden ser inducibles por algunos contaminantes como herbicidas, plaguicidas, compuestos nitroaromáticos, compuestos aromáticos, HAP y dioxinas (Robineau *et al.*, 1998, Werck *et al.*, 2000). También se ha observado en jitomate, que algunos compuestos fenólicos son transformados por las enzimas de la etapa I (peroxidasas) (Adler *et al.*, 1994). Por ser la inicial, esta etapa es fundamental en el proceso de fitorremediación. Es decir, que una planta que sintetiza, en respuesta a algún compuesto orgánico xenobiótico, al menos una de las enzimas de esta etapa puede considerarse como potencialmente fitorremediadora.

La adaptación de las plantas a medios contaminados, implica en algunos casos la inducción de enzimas detoxificadoras. Algunos ejemplos de estas enzimas son: alcohol deshidrogenasas, aldehído deshidrogenasas, carbonil reductasas, glutatión peroxidasas, aldehído oxidasas, quinona reductasas, fenoloxidasas, peroxidasas, lacasas, monoxigenasas dependiente de P450, amino N-metiltransferasas, alcohol sulfotransferasas, entre otras (Jakoby y Ziegler, 1990; Varazashvili *et al.*, 2001a; Günter y Martinoia 2002; Harvey *et al.*, 2002).

**Etapa II.** En la conjugación la detoxificación continua mediante la unión de carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas al contaminante transformado en la etapa previa. Las enzimas de esta etapa se conocen como transferasas. Como resultado de esta transformación, la toxicidad del contaminante disminuye, ya que generalmente se incrementa su hidrofiliabilidad, generando así una mayor movilidad y promoviendo su depósito en las vacuolas. La conjugación se considera como el acto terminal de la fitoacumulación y puede ser una etapa intermedia en la transformación de los contaminantes. Un ejemplo de conjugación en *Howea forsteriana* y en *Spathiphyllum wallisii* v, es el caso de la enzima UDP glucuronosil transferasa (dependiente de UDP) que une glucosa-1-fosfato al benceno y al n-hexano (Schäffer *et al.*, 2002).

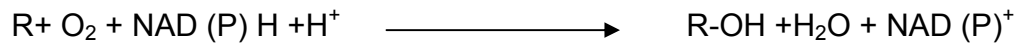
**Etapa III.** Compartimentalización. En esta etapa las moléculas conjugadas de contaminantes, quedan almacenadas en las vacuolas en donde pueden ser fácilmente sometidas a oxidaciones posteriores.

## **2.6. Citocromo P450**

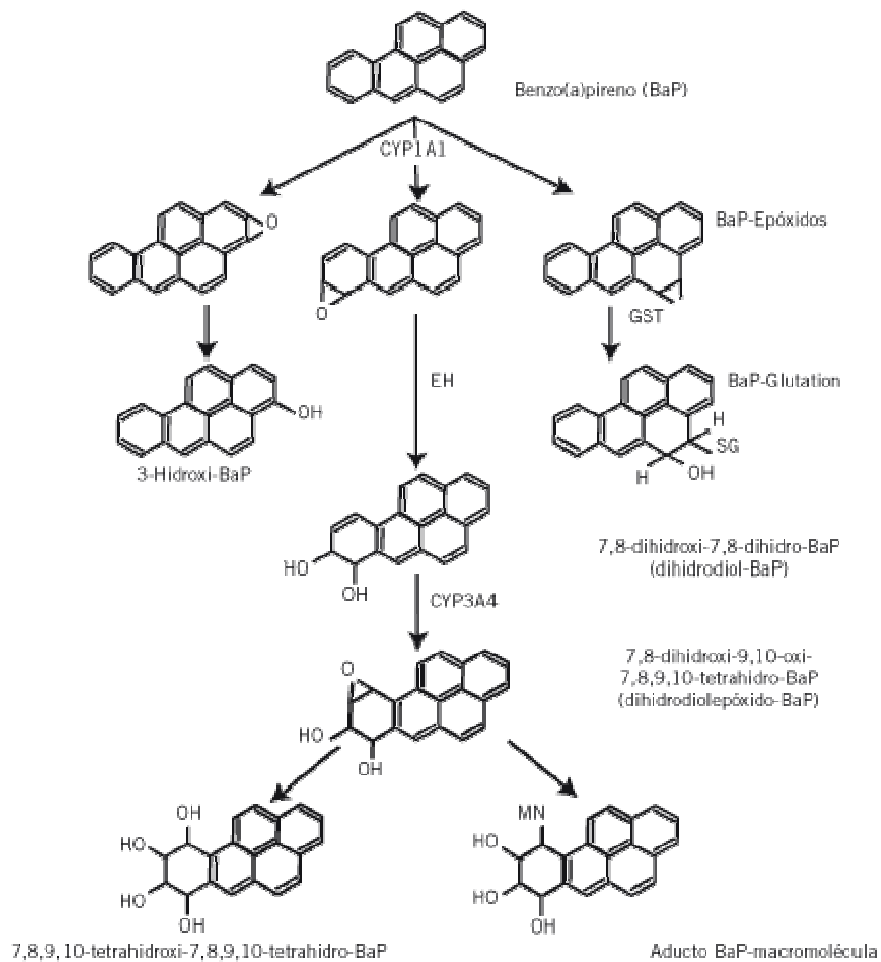
La identificación de las enzimas que participan en cada etapa y los mecanismos reguladores del metabolismo aún no están bien entendidos (Khatishashvili *et al.*, 1997). Por ejemplo, en la etapa inicial, la degradación del xenobiótico implica la hidroxilación o la epoxidación de anillos fenólicos, la desalquilación, metoxi o amino por sustitución y la deshalogenación reductiva (Hervey *et al.*, 2002); todas estas reacciones se llevan a cabo a través de diferentes enzimas como las monoxigenasas (citocromo P450 (CYP450)), peroxidasas y fenoloxidasas (Varazashvili *et al.*, 2001a). En las células procariotes el CYP450 se encuentra en forma soluble, mientras que en eucariotes, en particular en mamíferos, los CYP450 se encuentran en la membrana del retículo endoplasmático. Las plantas poseen formas de CYP450 tanto en el citosol como en los microsomas (Kvesitadze *et al.*, 2001). En alcachofas de *Jerusalén* se ha identificado una subfamilia, la CYP45076B1 (CYP76B1) (Werck-Reichhart *et al.*, 1990), que posee una actividad enzimática denominada 7-etoxiresorufina O-deetilasa. Esta actividad se ha detectado en diferentes plantas como tulipanes, papas, maíz trigo, aguacate, *etc.* Esta enzima es inducida por herbicidas del tipo de fenil ureas (Werck-Reichhart, 1990; Didierjean *et al.*, 2002) y otros xenobióticos como clortoluron e isoproturon. Todos los sustratos de CYP76B1 identificados, son moléculas aromáticas largas o fenilpropanoides, flavonoides e isoflavonoides. Las CYP76B1 catalizan la desalquilación de estos compuestos (Robineau *et al.*, 1998). Puede decirse que la actividad CYP76B en plantas es homóloga a la actividad del CYP4501A1 que se detecta en animales.

La reacción general del citocromo P450 es la siguiente, en la cual un átomo de oxígeno de la molécula de oxígeno, se incorpora al sustrato (en este caso al hidrocarburo).





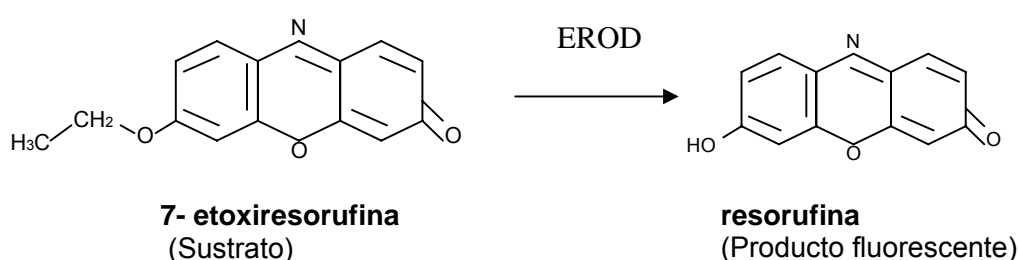
En la Figura 2. se observa un ejemplo de hidrocarburos aromático en diferentes transformaciones realizadas por diferentes familias de CYP450



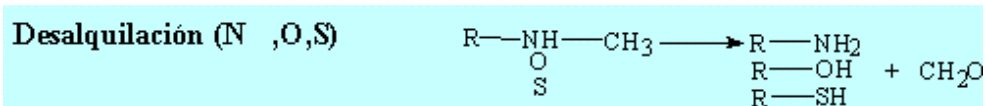
EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa

*Figura 2. Transformaciones de hidrocarburos aromáticos realizada a través de diferentes enzimas de la familia de CYP450*

La transformación detectada de la actividad enzimática de CYP450 en este trabajo fue la siguiente;



La actividad EROD CYP450 cataliza una desalquilación la cual se ejemplifica a continuación.



La enzima CYP4501A1 tiene actividad oxidasa capaz de oxidar xenobioticos lipofílicos absorbidos por los organismos. Para medir *in vitro* la actividad de CYP4501A1 (CYP1A1) se usa como sustrato a la 7- etoxiresorufina (Wilson *et al.*, 2005). En estudios de homología de genes en plantas no se ha detectado la presencia de CYP1A1.

Siendo el CYP450 una de las enzimas que participa en la etapa inicial en la degradación de hidrocarburos, en el presente trabajo se estudió si la actividad EROD CYP450 está presente y si se induce en presencia de hidrocarburos en una planta fitorremediadora.

### **3. Antecedentes y definición del problema**

Para que la fitorremediación sea exitosa se requiere del uso de plantas nativas de sitios contaminados (Escalante *et al.*, 2005). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se seleccionaron diversas especies, el criterio de su selección fue: (i) que sean resistentes a altas concentraciones de hidrocarburos, (ii) abundantes y (iii) nativas. Se analizó la capacidad fitorremediadora de las siguientes especies: *C. ligulatus*, *C. digitatus*, *C. laxus*, *Rinchosphora cyperoides*, *Equinochloa volonum*, (Gómez-Santos *et al.*, 2001), que crecen en un pantano tropical en Veracruz México, un sitio contaminado con hidrocarburos. En este estudio se seleccionó e identificó a *Cyperus laxus* por ser una planta predominante en el sitio y tolerante a altas concentraciones de HTP (200 g Kg<sup>-1</sup>) (Gallegos *et al.*, 2000); recientemente se demostró mediante bioensayos con suelo artificial, su capacidad fitorremediadora (Escalante *et al.*, 2005). También, se aislaron los microorganismos rizosféricos de *C. laxus*. En los cultivos de laboratorio se observó la degradación específica de diferentes reacciones de hidrocarburos por poblaciones microbianas específicas, principalmente alifática y aromática, del petróleo crudo Maya (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003). En este trabajo se continuó con los estudios de degradación con esta planta. Se realizaron bioensayos para determinar la concentración de hidrocarburos que tolera *C. laxus* para finalmente encontrar la tasa de remoción de hidrocarburos a través de la planta fitorremediadora en sistemas modelo. Se determinó la fracción removida de hidrocarburos por la planta y por los microorganismos. En los trabajos previos no quedó claro el cual es el mecanismo que la planta lleva a cabo para la remoción de hidrocarburos, por lo que se propuso como hipótesis central que la degradación de los hidrocarburos se debe a la presencia de enzimas inducibles en *C. laxus*.

#### **4. Objetivos**

##### **General**

Estudiar el efecto de la exposición a hidrocarburos contaminantes del suelo en la expresión de la actividad EROD CYP450 en las raíces de *Cyperus laxus*

##### **Específicos**

- 1.- Determinar las características de la mezcla de suelo a diferentes profundidades de las unidades experimentales.
- 2.- Determinar el efecto de la humedad del suelo en la remoción o transformación de diferentes fracciones de hidrocarburos por *C. laxus* y la fracción de la mezcla de hidrocarburos del suelo, que la planta remueve o transforma.
- 3.- Determinar si la actividad EROD CYP450 en las raíces de *C. laxus* es inducida por la presencia de hidrocarburos, y la relación con el ciclo de vida de la planta.

#### **5. Hipótesis**

La actividad EROD CYP450 en la raíz de *Cyperus laxus* Lam se induce por la presencia de hidrocarburos.

## **6. Estrategia general de trabajo**

En la Figura 3 se muestra la estrategia general de trabajo. En la columna del lado izquierdo se muestran las preguntas que se respondieron y en la columna derecha las variables de respuesta utilizadas para responder cada pregunta. Primero se determinó la fracción de la mezcla original de hidrocarburos que es preferencialmente transformada por la planta. Enseguida, se estudió la distribución de los hidrocarburos a lo largo de las unidades experimentales, y su posible relación con la distribución del carbono orgánico total y granulometría del suelo.

Otra parte del trabajo fue la puesta en marcha de las técnicas enzimáticas, particularmente la determinación de la actividad enzimática EROD CYP450 en la raíz de la planta, distinguiendo la actividad enzimática de la planta y de los microorganismos. Finalmente, se estudió la posible inducción de esta actividad en presencia de hidrocarburos, para tratar de entender si existe relación entre la capacidad fitoremediadora de *C. laxus* y la degradación de hidrocarburos.

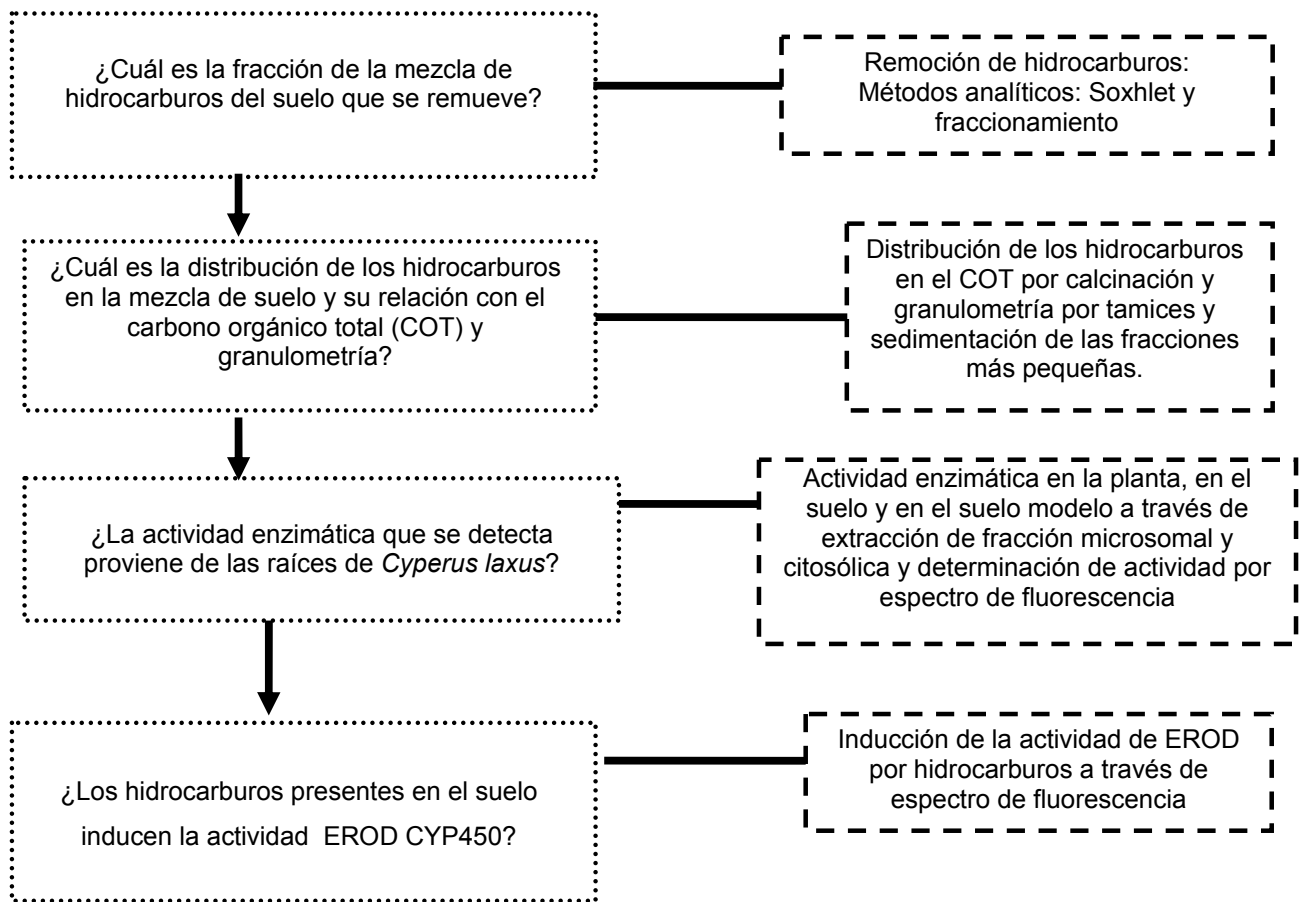


Figura 3. Estrategia general de trabajo

## **7. Métodos y Materiales**

### **7.1. Experimentos con suelo**

El suelo utilizado, se colectó en un sitio contaminado con hidrocarburos ubicado en Minatitlán, Veracruz, adyacente a la Refinería Lázaro Cárdenas de PEMEX. Para los experimentos de fitorremediación se extrajo suelo del sitio contaminado y se preparó una mezcla con tezontle para mejorar su porosidad, este suelo se mezcló y adicionó a contenedores de vidrio especialmente diseñados para visualizar el crecimiento de raíces y tomar muestras del suelo a diferentes profundidades. Las plantas utilizadas fueron colectadas en el sitio contaminado y se trasplantaron a las unidades experimentales después de un periodo de seis meses de aclimatación en el invernadero. Los ensayos de fitorremediación se realizaron durante 24 meses en suelo con diferentes condiciones de humedad.

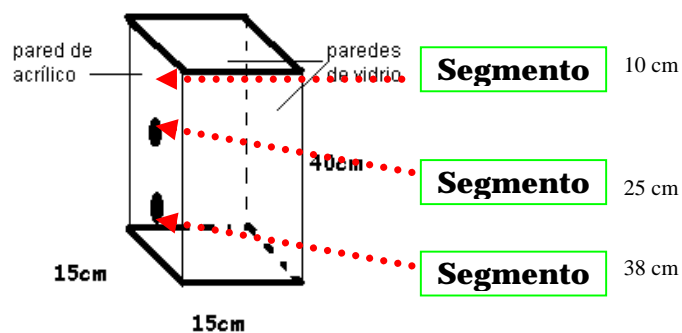
#### **7.1.1. Suelo y unidades experimentales**

Para las nueve unidades experimentales se prepararon 77 kg de mezcla de suelo, como se indica a continuación. El suelo del pantano ( $173 \pm 15$  mg de HTP  $\text{mg}^{-1}$  suelo seco) fue tamizado entre dos diferentes tamaños de malla  $4\phi$  (1.22 mm) y  $16\phi$  (0.105 mm). La mezcla se preparó adicionando 40% de suelo contaminado tamizado (0.105 – 1.22 mm), 40% de tezontle de (0.105 – 1.22 mm), y 20% de suelo contaminado fino ( $< 0.105$  mm). La adición de tezontle se realizó con el fin de obtener una porosidad adecuada en la mezcla del suelo. La mezcla se homogeneizó con una pala en una tina de tamaño apropiado. La mezcla inicial estaba constituida con 80% de suelo de tamaño  $\leq$  a 1.22 mm y  $\geq$  a 0.105 mm y 20% fracciones finas, de tamaño menor a 0.105mm.

Una vez homogeneizada la mezcla del suelo, se tomó una muestra (30 g) en la que se determinaron los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) a través de soxhlet (ver sección 6.3.1.). Posteriormente, se pesaron 6.5 kg de la mezcla del suelo

contaminado (MSC) y se hidrató homogéneamente hasta obtener 30% de humedad. La mezcla de suelo húmedo (6.5 kg peso seco) se vació a cada contenedor y se dejó reposar durante 24 h.

Para observar el crecimiento de las raíces, se diseñó una unidad experimental (15 x 15 x 40 cm) con tres paredes de vidrio y una de acrílico donde se encuentran los orificios para el muestreo (Figura 4). La unidad esta provista de dos orificios para muestreo y se divide en tres segmentos, el primero (I) comprende los primeros 10 cm de profundidad (las muestras fueron tomadas por la parte de arriba hasta los 10 cm de profundidad), el segmento (II) constituye al primer orificio ubicado a los 25 cm de profundidad del contenedor y el segmento (III) constituye al segundo orificio del contenedor ubicado a los 38 cm de profundidad ( las muestras se tomaron por el orificio), para mensualmente determinar los HTP, humedad y pH del suelo. El diseño rectangular permitió a las raíces extenderse hacia abajo. Se usó vidrio en lugar de plástico para evitar que los hidrocarburos del suelo se adhirieran a las paredes. Se usaron columnas reforzadas con aluminio en las orillas para mayor resistencia de la unidad (Figura 4).



*Figura 4. Unidades experimentales utilizadas en los experimentos de fitorremediación*



### **7.1.2. Propagación y aclimatación de plantas**

Para los experimentos de fitorremediación se utilizaron plantas nativas del sitio contaminado con su suelo original (planta madre) aclimatadas durante seis meses bajo condiciones de invernadero. Para la propagación de las plantas, se separaron tres módulos de la planta madre para sembrarlos en 6.5 kg base seca de MSC con 30% de humedad para cada unidad experimental. Las plantas se mantuvieron hasta que los nuevos módulos lograron las mismas dimensiones que las de la planta que las originó. Esta segunda aclimatación se prolongó hasta por seis meses. Como control, se dejó un conjunto de tres módulos en el suelo original ( $75 \pm 8$  mg HTP  $g^{-1}$  da suelo seco) para comparar el efecto del estrés por herida al separar los módulos y el estrés por el incremento en la concentración de hidrocarburos (de 75 a 173 mg HTP  $g^{-1}$  de suelo seco).

### **7.1.3. Ensayos de fitorremediación**

Después de los seis meses de aclimatación, la humedad inicial del suelo en las unidades experimentales se ajustó a: 10, 30 y 60%, adicionando agua hasta una marca previamente establecida en las unidades experimentales y determinando humedad cada quince días. Durante los ensayos de fitorremediación, el suelo se muestreó por triplicado (a través de los orificios mencionados en la sección 6.1.1.) y a diferentes profundidades, para monitorear el pH, el contenido de humedad y los hidrocarburos totales del petróleo. Después de diferentes tiempos de cultivo (1, 5, 9, 12, 15, 20 meses), las plantas fueron extraídas cuidadosamente para cuantificar el número de inflorescencias, tallos y determinar las longitudes de raíces y tallos.

## **7.2. Experimentos en un sistema modelo**

Para determinar la actividad EROD CYP450, en raíces de *C. laxus*, las semillas fueron sembradas y crecidas en turba para su posterior transferencia al suelo modelo (agrolita). Este suelo modelo fue contaminado con HTP extraídos del

suelo original con 30% de humedad. Las plantas se expusieron a la misma concentración inicial de HTP (5 o 7 mg g<sup>-1</sup> de agrolita seca), se muestrearon a diferentes tiempos (sección 7.2.2) para extraer las fracciones citosólica y microsomal de las raíces. Finalmente, se determinó la actividad EROD CYP450 por fluorescencia.

### **7.2.1. Sistema modelo y contenedores experimentales**

La agrolita fue utilizada como una matriz inerte para simular el suelo y para la determinación de la actividad enzimática. La agrolita se tamizó para obtener un tamaño de partícula entre 1.19 y 4.76 mm se lavó con agua y se seco al aire libre. La agrolita fue contaminada artificialmente con los HTP extraídos previamente por Soxhlet (hexano:acetona, 1:1 V/V; 24 h) del suelo original (Sección 6.3.1.), hasta obtener concentraciones de 5 y 7 mg de HTP g<sup>-1</sup> de agrolita seca para la determinación de la inducción de la enzima (EROD – CYP450). Los HTP fueron disueltos en una solución de hexano y fueron distribuidos homogéneamente en la agrolita; el disolvente fue eliminado a temperatura ambiente y la agrolita seca contaminada fue distribuida en 12 contenedores rectangulares de cristal (10 x 20 x 15 cm, con 0.3 kg de agrolita seca para cada segmento); otros 12 contenedores de cristal idénticos fueron llenados con agrolita limpia, como controles.

### **7.2.2. Propagación de las plantas y ensayos de inducción de la actividad enzimática**

Las semillas de *C. laxus* fueron germinadas y cultivadas por seis meses en turba. Se utilizaron plantas de seis y doce meses de edad crecidas en turba y transferidas a agrolita limpia, lavada y tamizada para aclimatizarlas por una semana. Después de la aclimatación, se transfirieron tres plantas por contenedor al sistema modelo con y sin hidrocarburos. Las plantas fueron incubadas (312 h; la humedad de la agrolita fue 30%) bajo condiciones de invernadero (25-30°C, humedad relativa de 70-95% y periodos de luz natural de 11 a 12 horas/dia); se agregaron cada semana

10 mL por contenedor de solución Long-Ashton modificada. La solución contenía en mg L<sup>-1</sup>: KNO<sub>3</sub>, 808; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 944; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 184; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 368; y 1 mL de solución mineral (mg L<sup>-1</sup>): MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2.23; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.29; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3.10; NaCl, 5.90, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.088 y FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02.

La actividad enzimática se puede medir ya sea por el consumo de sustrato o por la generación de producto este último es el caso de este trabajo y la inducción es la valoración de la respuesta a un agente inductor. Para determinar la inducción las plantas se expusieron a una mezcla de hidrocarburos a una concentración de 7 mg g<sup>-1</sup>, durante tiempos de exposición de 24, 48, 72, 84, 96, 108, 120 y 144 horas (Andersson y Förlin, 1992).

### **7.2.3. Lavado de la raíz y determinación de microorganismos**

Para corroborar que la actividad de la enzima provenía de la raíz de la planta y no de los microorganismos asociados en la rizosfera se realizaron cinco lavados (50 mL cada uno) de la raíz con diferentes tratamientos: Tween 0.2% p/v, hipoclorito de sodio 5% p/v y agua corriente. En los últimos tres lavados se realizó un conteo en placa y se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) por mL de solución de lavado. Esto es con el objetivo de demostrar que los lavados que se realizaron fueron suficientes para la eliminación de microorganismos y que la actividad enzimática provenía únicamente de la planta.

La cuenta en placa de microorganismos se refiere al número de células viables o fragmentos miceliares presentes en una muestra, capaces de crecer sobre una fuente nutritiva. El procedimiento se realizó por diluciones en serie y subsiguiente plaqueo (Alef y Nannipieri, 1995). El número de microorganismos

se reporta como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron agar soya y tripticaseína (AST, Bioxon®) y agar papa dextrosa (PDA, Bioxon®).

Para las diluciones seriadas, se colocaron 9 mL de solución isotónica en tubos de ensayo previamente esterilizados, adicionándole al primer tubo una alícuota de 1 mL de muestra, se realizaron 10 diluciones sucesivas. Las cajas con medios (PDA y AST) se inocularon con 100 µL de las diluciones seriadas y con la ayuda de una varilla de vidrio se distribuyeron en toda la caja. Las cajas fueron incubadas a 30°C y cada 24 horas se observó el crecimiento y se contó el número de colonias formadas hasta las 72 h.

#### **7.2.4. Extracción de las fracciones microsomas y citosólicas**

Para determinar la actividad EROD CYP450 primero se obtuvieron extractos de las fracciones microsomal y citosólica, mediante el método descrito por Gramss y Rudeschko (1998). La raíz de *Cyperus laxus* (25 a 30 g de peso fresco de raíz) se maceró con nitrógeno líquido en un mortero. Las raíces pulverizadas se homogeneizaron con una solución amortiguadora (pH 6.5) que contenía: 0.1 M fosfato de sodio, 20% (p/v) de glicerol, 14 mM DL ditiotreitól (DTE), 20 mM de ácido ascórbico, 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) insoluble, 1 mM de EDTA, 1mM de PMSF (Pflugmancher, 1998). Posteriormente, el extracto se filtró, se centrifugó a 10,000 x g por 30 min a 4°C, se removió la pastilla y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 100,000 x g por 60 min a 4°C, se recuperó la pastilla (fracción microsomal) y el sobrenadante que contiene la fracción citosólica. La fracción microsomal se resuspendió con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.02 M y DTE 5 mM ajustado a pH 7.

### **7.2.5. Cuantificación de proteína**

La proteína se cuantificó por medio del método de Bradford, (1976) en los extractos microsomal y citosólico. Se realizó una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA) Sigma-Aldrich, partiendo de una solución stock con una concentración de 0.5 mg/ml y se determinó la absorbancia (595 nm) de la curva patrón y de las muestras problema.

### **7.2.6. Determinación de actividad EROD CYP450**

Para cuantificar la actividad enzimática de EROD CYP450 se utilizó un espectrometro de fluorescencia (marca ISS Mod. K2, series 086). Se colocó en la celda de reacción la fracción microsomal o la fracción citosólica, que contenía entre 5 y 30 µg de proteína y volumen diferente, de solución amortiguadora de ensayo para alcanzar 2 mL de volumen final en la celda de reacción (pH 7.6) compuesto, de fosfato de sodio, 0.1 mM; cloruro de magnesio, 2.5 mM; cloruro de potasio, 100 mM; etoxiresorufina, 1.0 mM y NADPH, 5 mM como cofactor (Boulenc. *et al.*, 1992)

En el fluorómetro se obtuvo la intensidad de fluorescencia (del producto) con respecto al tiempo (20 min). La longitud de onda para la excitación fue 530 nm y la longitud de onda de emisión fue de 585 nm con un ancho de banda de 5 nm.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que se requiere para formar un pmol de resorufina en un minuto a 37°C a pH 7.6.

$$1 \text{ unidad de actividad} = \frac{\Delta \text{FLU}/\text{min} \times \text{factor de dilución de la muestra (pmol/ml-min)}}{(\text{FLU}/\text{pmol}) \times (\text{volumen de reacción [ml]})}$$

FLU= fluorescencia

### **7.2.7. Estandarización de datos de actividad enzimática**

Para estandarizar todos los datos de actividad enzimática medidos como la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo (10 min) y obtener tendencias claras, se utilizó el programa ORIGIN 6.0 para la suavización de los datos para mejorar el coeficiente de correlación hasta obtener una confianza estadística mayor a 0.90. El programa ORIGIN esta adaptado a necesidades científicas con multi-hojas de trabajo, otorgando calidad a gráficos, ofreciendo herramientas de análisis e importación de datos. La Figura 5 que se presentan a continuación es un ejemplo proveniente de los resultados obtenidos y se muestran para ilustrar el tratamiento de todos los datos de actividad enzimática de los experimentos. En la Figura 5a se muestra el espectro de fluorescencia obtenido inicialmente sin filtrar los datos. Se puede observar que aunque el conjunto de datos graficados tiene una tendencia creciente, el coeficiente de correlación es muy bajo. Después de aplicar la suavización (smoothing) de los datos el resultado se muestra en la Figura 5b. Esta suavización se basa en obtener los promedios (adjacent averagin) toma el promedio de ciertos números de datos (5) alrededor de cada uno de los puntos de datos y reemplaza el numero real de la lectura con promedios, esto es con la finalidad de obtener pendientes claras y reduce la dispersión de los datos.

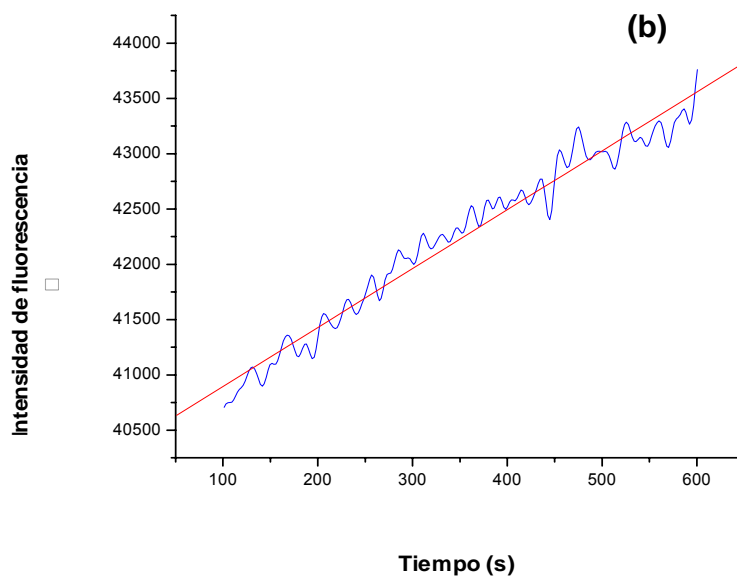
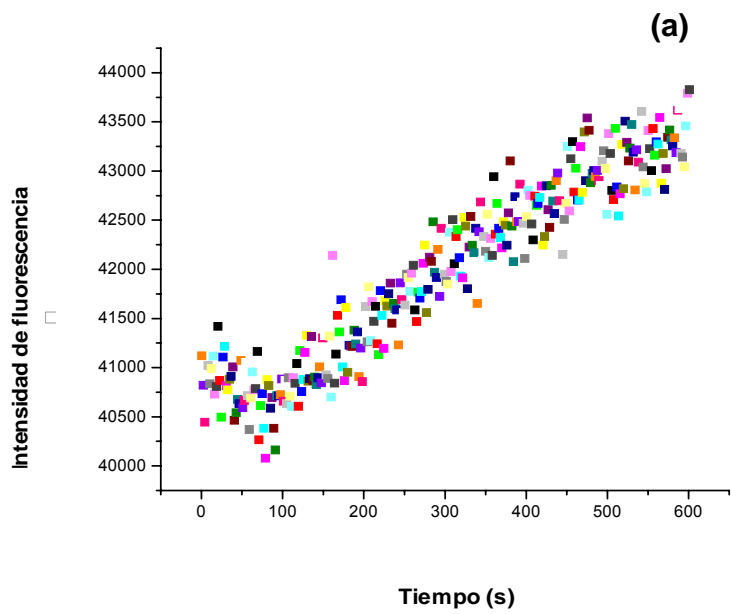


Figura 5. Espectro de fluorescencia antes de la aplicación del filtro (a) y después de la aplicación del filtro (b).

Los resultados ajustados que se muestran en la Figura 5b producen un coeficiente de correlación de 0.907 con este tipo de ajuste se obtuvieron las pendientes para todos los datos.

Todos los datos experimentales incluyen el ruido (y amplia dispersión) en diverso grado. El ruido puede ocultar características importantes como picos, valles, picos o anchos, o hacer el cálculo de otras funciones. Origin permitió suavizado de datos por a través de una herramienta llamada promedio adyacente, esencialmente toma el promedio de un cierto número (que usted especifica), de datos de puntos alrededor de cada punto en sus datos y que sustituye con un nuevo valor medio.

### **7.3. Métodos analíticos**

#### **7.3.1. Análisis de hidrocarburos**

Para la determinación de los hidrocarburos presentes y removidos, se utilizó el método 3540 de la EPA, mediante el cual se puede cuantificar la concentración de compuestos orgánicos insolubles y poco solubles en agua, extrayendo los compuestos volátiles y no volátiles de los sedimentos (las tomas de muestra del suelo se describen en la sección 6.1.1.). El procedimiento consistió en mezclar 30 g de suelo (peso seco) con 30 g de sulfato de sodio anhidro (Baker Analyzed, grado reactivo), se colocaron en un cartucho de celulosa (Whatman 33 x 80 mm), dentro del sistema Soxhlet y se adicionaron 160 mL de mezcla acetona:hexano (1:1 v/v) (Baker, grado reactivo) dejando en reflujo de 18 a 24 horas. En una charola de aluminio se recuperó el solvente con el hidrocarburo, el solvente se evaporó al vacío hasta alcanzar peso constante y se determinó la concentración de HTP por diferencia de peso (USEPA, 1995).

#### **7.3.2. Desasfaltenización y fraccionamiento de hidrocarburos**

Para determinar la fracción de la mezcla de hidrocarburos que fue biotransformada, se separó la fracción de asfaltenos de la mezcla de hidrocarburos, precipitándolos con n-hexano frío. Para esto, se utilizaron las muestras de hidrocarburos extraídas del suelo de acuerdo método descrito en la en la sección 6.3.1. Se tomó aproximadamente 1 g de muestra y se colocó en un vaso de



precipitado adicionándole 20 mL de hexano frío, con ayuda de una espátula se mezcló para incorporar el solvente a la muestra, esta resuspensión de hidrocarburos en el solvente se filtró al vacío (papel Whatman # 41 se pesó hasta alcanzar peso constante), colectando el filtrado para su posterior fraccionamiento y el extracto retenido en el papel filtro es la fracción de asfaltenos (Versan *et al.*, 1998). Se realizaron de tres a cuatro lavados con hexano frío en papel filtro, posteriormente, el solvente se eliminó por evaporación a temperatura ambiente y los papeles filtro se pesaron. Cada análisis se realizó por triplicado.

Las fracciones aromáticas, alifáticas y polares fueron separadas y obtenidas por cromatografía de columna (Wang *et al.*, 1994). Se utilizaron columnas de sílica gel pre-tratadas con una dimensión de 10 mm x 100 mm, la sílica gel se activó secándose en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Se utilizó como fase estacionaria la sílica gel y como fase móvil los cuatro solventes orgánicos (hexano, benceno, metanol y acetona). Para el análisis se emplearon columnas de vidrio con llaves de paso así como viales previamente pesados, la técnica se describe en detalle a continuación.

#### Empacado de las columnas

En el fondo de las columnas se colocó un trozo de fibra de vidrio, se adicionaron 2 g de sílica gel, previamente activada y ligeramente compactada a cada columna, en la parte superior se colocó un trozo de fibra de vidrio y 0.5 g de sulfato de sodio anhidro.

#### Formación del gel e incorporación de la mezcla

Se adicionaron 25 mL de hexano a la columna y se eluyó, el hexano se recirculó en la columna hasta que la sílica quedó transparente. Finalmente, en un vaso de precipitados previamente pesado, se solubilizaron 0.2 g de la muestra de

hidrocarburos sin asfaltenos en 15 mL de hexano dicha mezcla se adicionó a la columna y se eluyó.

### Elusión

La separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos se basa en su solubilidad diferencial en los distintos solventes, las eluciones se realizaron en el orden siguiente:

- a) Hexano. Se colocó la muestra de los hidrocarburos sin asfaltenos en la parte superior de la columna, se colectaron las fracciones (eluciones de 15 mL) hasta que la mancha amarilla se observó en la parte inferior de la columna.
- b) Hexano – benceno. Se realizó una elusión de 15 mL con la mezcla. hexano-benceno (1:1 v/v.)
- c) Benceno. Se adicionaron volúmenes de 15 mL hasta que la banda amarilla abandonó por completo la columna.
- d) Benceno- acetona. Se realizó una elusión con 15 mL de una mezcla benceno-acetona (1:1 v/v).
- e) Acetona – metanol. Se realizó una elusión con 15 mL de una mezcla acetona-metanol (1:1 v/v.)

Las fracciones de hidrocarburos (alifáticas, aromáticas y polares) se recuperaron en viales de 25 mL. La fracción eluida con hexano corresponde a hidrocarburos alifáticos, las fracciones eluidas con la mezcla hexano –benceno y benceno corresponden a la fracción de hidrocarburos aromáticos. La fracción de hidrocarburos polares se eluye con acetona-metanol. Los solventes de los viales se evaporaron en la campana de extracción y se colocaron en un desecador por 24 h, posteriormente, se pesaron para el cálculo de la proporción de cada fracción.

### **7.3.3. Determinación de carbono orgánico total**

Para determinar la relación entre la carbono orgánico total (COT) y los hidrocarburos en el suelo de las unidades experimentales, se utilizó la técnica de Walkley y Black, (1965), cuyo procedimiento se basa en la determinación del carbono orgánico por calcinación a  $450 \pm 50$  °C. Este método no puede diferenciar entre la MOT y los hidrocarburos en el suelo debido a las altas temperaturas alcanzadas.

### **7.3.4. Determinación de granulometría**

Para relacionar el tamaño de partícula con la concentración de hidrocarburos en el suelo contenido en las unidades experimentales, se determinó el tamaño de partícula por medio de tamizado para la fracción más gruesa, y pipeteado para las fracciones más finas. Este método se utiliza para calcular la velocidad de sedimentación a partir de la ecuación de la ley de Stokes, de acuerdo con las modificaciones de Galehouse (1971).

### **7.3.5. pH y humedad**

El pH fue medido en 1 g de suelo seco resuspendido en 10 mL de agua destilada mezclado por 10 min mediante un potenciómetro (Conductronic pH 130). La humedad fue determinada gravimetricamente en 5 g de suelo usando una termobalanza (Ohaus MB45).

## **7.4. Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias significativas en los resultados se utilizaron las pruebas estadísticas ANOVA y prueba de Tuckey con un intervalo de confianza de 95%. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y los resultados presentados corresponden a la media ( $\pm$  desviación estándar (DE)) de tres determinaciones.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Caracterización de suelo

En la Figura 6 se muestra el contenido de cada una de las fracciones de hidrocarburos en el suelo contaminado con diferentes contenidos de humedad (10, 30, 60%).

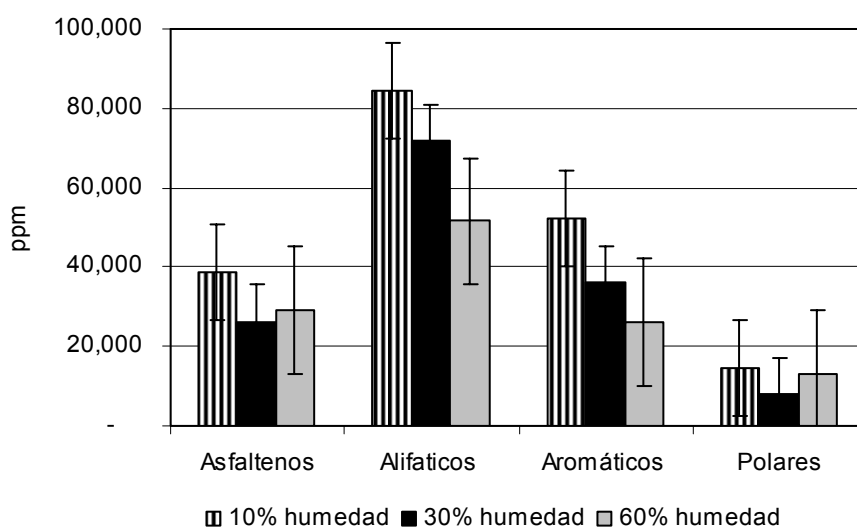


Figura 6. Composición inicial de las fracciones de hidrocarburos en la mezcla de suelo

Esta determinación se realizó al inicio de la aclimatación, es decir, seis meses antes del inicio de los experimentos. Como se observa, no hubo diferencias significativas en la composición de las fracciones de hidrocarburos en el suelo inicial, excepto en el caso del tratamiento con 60% de humedad, en donde la fracción alifática fue significativamente más baja que con 10% de humedad.

### **8.1.1. Carbono orgánico total e hidrocarburos**

Con el objetivo de conocer una de las características más importantes del suelo en el que la planta nativa crece, se determinó el carbono orgánico y los hidrocarburos que contenía la mezcla de suelo contaminado (MSC). La materia orgánica suministra energía y nutrimentos para todas las formas de vida en el suelo. Los niveles mayores a 5% de materia orgánica total se consideran propios de un suelo muy rico (Darwich, 1998). En suelos contaminados por largos períodos (suelos intemperizados), los contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos debido a las interacciones (por ejemplo, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) que se producen entre los contaminantes y la materia orgánica del suelo (Jonge *et al.*, 1997). La biodisponibilidad, y por tanto la tasa de degradación, frecuentemente están limitados por procesos fisicoquímicos, como la sorción y desorción de los contaminantes hacia y desde la matriz de suelo, la difusión en la fase sólida y la disolución de contaminantes en la fase líquida (Bosma *et al.*, 1997). La materia orgánica contenida en el suelo es un primer factor estructural de la interacción entre los contaminantes orgánicos y las partículas del suelo (Bhandari *et al.*, 2000). De acuerdo con McBride (1994), los compuestos no polares o débilmente polares que tienen mayor afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas del suelo, ácidos húmicos, en donde las fuerzas de Van der Waals o cualquier atracción hidrofóbica; son la base de la unión. De esta manera el contenido de materia orgánica en un suelo contaminado determina, de cierto modo, la biodisponibilidad de los contaminantes.

La mezcla de suelo inicial (sección 7.1.1.) contenía un 19% de carbono orgánico que incluye a los hidrocarburos. En la Tabla 1 se muestra la distribución del contenido de carbono orgánico total en las unidades experimentales en suelos contaminados con diferente contenido de humedad, después de 24 meses de cultivo con las plantas.

Tabla 1. Contenido de carbono orgánico total y HTP en los diferentes segmentos de las unidades experimentales con diferentes contenidos de humedad después de 24 meses de cultivo

Contenido de humedad (%)	*Carbono orgánico total (%)	* Carbono orgánico total (%)	* Carbono orgánico total (%)
	Segmento I	Segmento II	Segmento III
10	19 ± 1.25	15 ± 1.03	11 ± 2.03
30	19 ± 1.35	15 ± 2.05	11 ± 1.78
60	19 ± 2.01	15 ± 1.06	15 ± 2.01

\*El contenido de carbono orgánico más hidrocarburos en la mezcla inicial fue de 19%

En la Tabla 1 se observa que no hubo diferencias significativas entre la COT de cada tratamiento por efecto del contenido de humedad, con un intervalo de confianza del 95%; pero si se observan diferencias para cada uno de los segmentos conforme la profundidad aumenta. La tendencia fue a disminuir la COT conforme la profundidad aumentó.

Con esta técnica no se puede distinguir entre la carbono orgánico del suelo y el carbono orgánico procedente de los hidrocarburos, por lo que el análisis se utilizó únicamente para observar las diferencias entre las unidades experimentales con distintos contenidos de humedad, a diferentes profundidades y todos con respecto a la composición del carbono orgánico inicial (19%) que fue decreciendo conforme aumentaba la profundidad a través del tiempo.

### **8.1.2. Análisis Granulométrico**

Con el fin de obtener mas información de las características de la MSC se estimó el tamaño de partícula, el cual es importante y determinante para la biodisponibilidad de los hidrocarburos, ya que mientras más pequeña es la partícula (i.e. arcillas) la interacción con los hidrocarburos es mayor. El contenido de arcilla se correlaciona con una mayor área superficial específica y capacidad de intercambio catiónico, influyendo en la adsorción de iones (Carmody *et al.*, 2006). De acuerdo

con Wu *et al.* (2006), entre los factores que influyen en la interacción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) con el suelo, se encuentran la asociación con las partículas pequeñas y las interacciones electrostáticas del tipo de Van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes de agua (Martínez y López, 2001).

En nuestro trabajo, la mezcla del suelo inicial contenía en promedio 80% de partículas de tamaño entre 0.105 y 1.22 mm (fracción gruesa), y 20% de partículas menores a 0.105 mm.

Las partículas son clasificadas por sus tamaño las gruesas son de tamaño entre 2 a 0.05 mm, de tamaño medio es entre 0.05 a 0.002 mm y las partículas mas finas son menores a 0.002 mm.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis granulométrico del suelo de las unidades experimentales con diferente contenido de humedad, después de 24 meses de cultivo con las plantas. Se observó que hay diferencias significativas entre los tratamientos y se observan diferencias conforme la profundidad aumenta para cada uno de los tratamientos. La tendencia fue que a mayor contenido de humedad mayor contenido de partículas más finas (menores a 0.002 mm). Dos años después de experimentos se observó en las unidades con 60% de humedad que la fracción arenosa descendió de un 80% a 40% en promedio y la fracción fina aumentó (de 21 a 49%) casi al doble del contenido inicial.

Tabla 2. Análisis granulométrico de suelo en los diferentes segmentos de las unidades experimentales con diferentes contenidos de humedad después de 24 meses de cultivo

Humedad (%)	Tamaño de partícula (mm)	Segmento I	Segmento II	Segmento III
10	2 a 0.05	70.44 ±1.17	63.57 ±1.14	65.55 ±1.56
	0.05 a 0.002	20.43 ±1.26	28.28 ±1.88	24.25 ±1.22
	Menores a 0.002	9.12 ±1.58	8.14 ±1.35	10.2 ±1.11
30	2 a 0.05	53.73 ±1.25	58.31 ±1.54	57.17 ±1.32
	0.05 a 0.002	25.3 ±1.11	26.52 ±1.22	34.29 ±1.45
	Menores a 0.002	20.96 ±1.26	15.16 ±1.32	8.53 ±1.26
60	2 a 0.05	42.97 ±1.52	39.88 ±1.22	41.35 ±1.24
	0.05 a 0.002	34.97 ±1.62	30.52 ±1.45	32.35 ±1.17
	Menores a 0.002	22.06 ±1.12	29.60 ±1.25	26.30 ±1.12

En las unidades experimentales con 30% de humedad, la fracción gruesas (de 2 a 0.05 mm) disminuyó de 80 a 50% y las fracciones finas (de 0.05 a 0.002 mm y menores de 0.002) aumentaron. Se puede resaltar que el único contenedor que presentó la misma distribución inicial de partículas (80% de fracción gruesa y 20% de finas) es el contenedor con 10% de humedad en el que también se observó un menor crecimiento de las plantas; esto se puede explicar por el crecimiento vertical y descendente de las raíces. El crecimiento de las raíces tiende a fraccionar a las partículas grandes del suelo y en la distribución final predominan los tamaños pequeños de partículas de suelo (Testa, 1994). Estos resultados concuerdan con los de Gutiérrez y Zavala (2001), quienes hacen mención del fraccionamiento del suelo a



fracciones con tamaño de partícula más pequeña (menores a 0.002 mm), aumentando de 21 hasta 49%. Corroborando que el crecimiento de las plantas a lo largo del tiempo contribuye con el fenómeno de partición del suelo. También mencionan que existe una relación estrecha entre los rasgos hidromórficos (contenidos de humedad y tamaño de partícula) y los hidrocarburos intemperizados en un suelo arcilloso.

## **8.2. Distribución y remoción de hidrocarburos**

En la Figura 7 se muestran los resultados de la determinación de hidrocarburos en el suelo de las unidades experimentales a los distintos contenidos de humedad (10, 30 y 60%) y a diferentes niveles del contenedor: segmento I (superficial), segmento II (medio), segmento III (fondo).

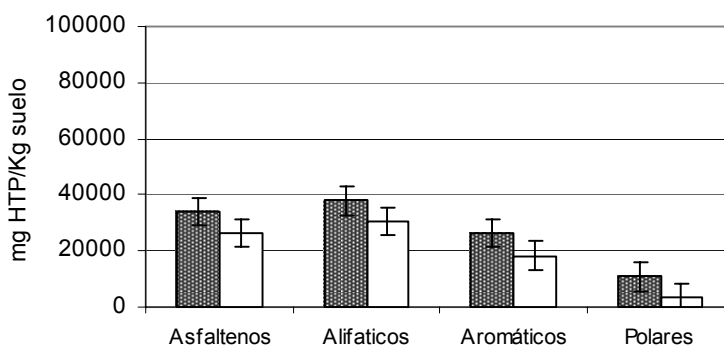
Se encontró que en el contenedor con 10% de humedad no hubo remoción significativa de ninguna de las fracciones de hidrocarburos correspondientes al segmento I (Figura 7(a)) ya que no se observaron diferencias significativas entre el tiempo inicial y el final, en el segmento II, en donde si hubo diferencias significativas de la fracción alifática (remoción de 34%) (Fig. 7(b)), lo mismo ocurrió con el segmento III (remoción de 48%) para la misma fracción (Fig. 7c).

En la Figuras 8 se muestra el consumo de las distintas fracciones de hidrocarburos en función de la profundidad de muestreo en las unidades experimentales con 30% de humedad. La remoción de hidrocarburos en estas unidades experimentales fue notoria, particularmente para el caso de la fracción alifática (promedio de remoción de 49%) y aromática (promedio de remoción de 34%), en los tres segmentos (Fig. 8a, 8b, 8c). Con excepción de la fracción aromática para el segmento II que no se observan diferencias significativas.

En el caso de las unidades con 60% de humedad, se observa en la Figura 9 la remoción de las fracciones alifáticas y aromáticas se incrementó casi al doble (Fig.

9a, 9b, 9c) con respecto a las unidades experimentales con otros 10% de humedad y se encontraron diferencias significativas en la remoción de las fracciones de alifáticos (promedio de remoción de 61%) y aromáticos (promedio de remoción de 50%).

(a)



(b)

Fracciones

(c)

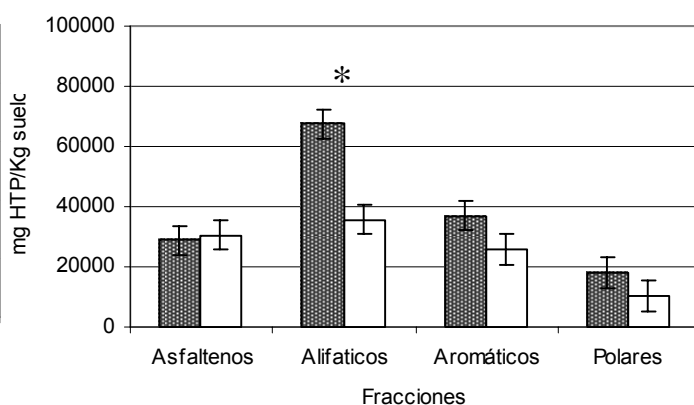
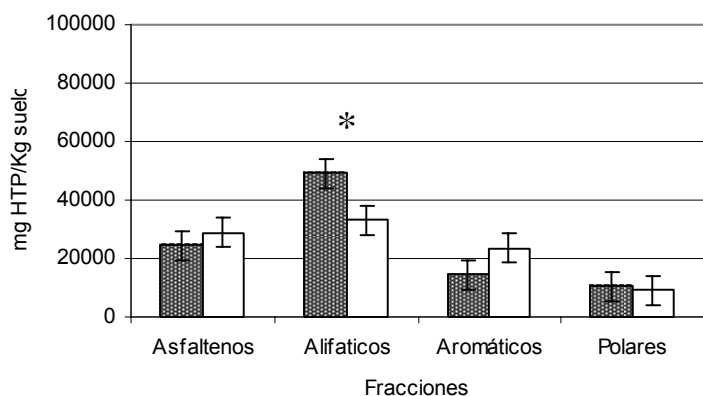
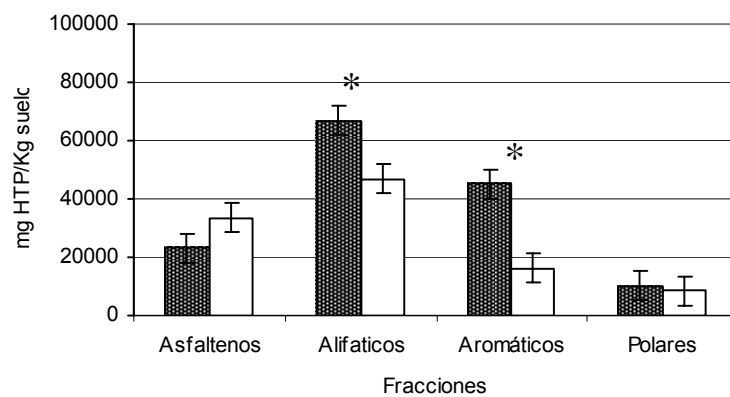
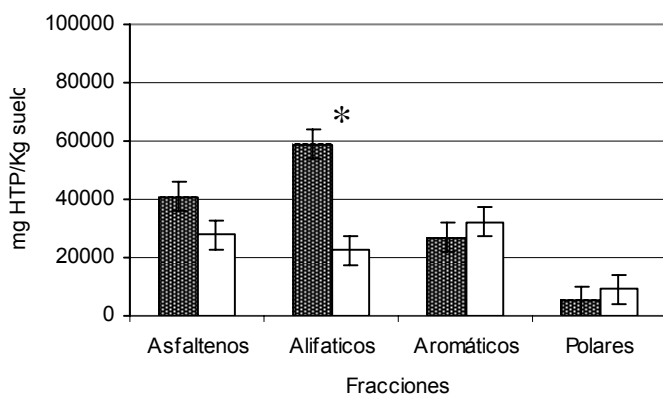


Figura 7. Remoción y distribución de hidrocarburos después de 24 meses de cultivo en las unidades experimentales con 10% de humedad: (a) segmento I; (b) segmento II; (c) segmento III. Tiempo inicial =  $T_0$  (■); tiempo final =  $T_f$  (□). El tiempo inicial  $T_0$  corresponde después de seis meses de aclimatación y  $T_f$  es el tiempo final después de dos años de cultivo.

(a)



(b)



(c)

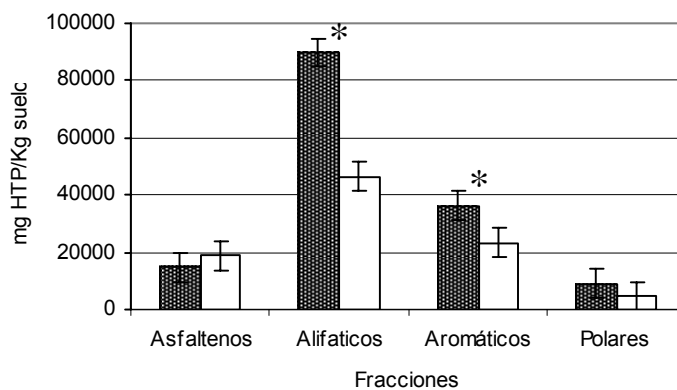
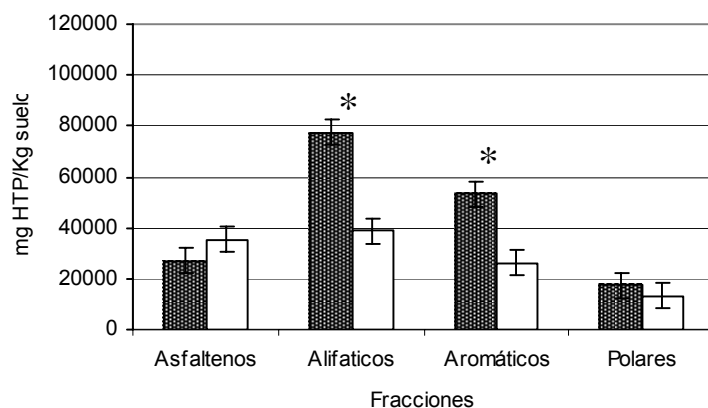
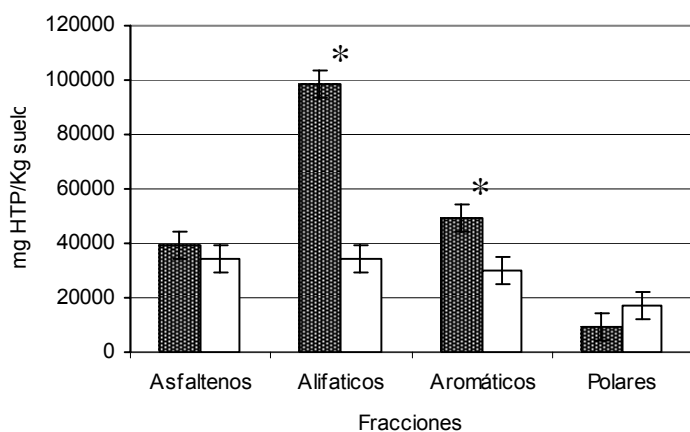


Figura 8. Remoción y distribución de hidrocarburos después de 24 meses de cultivo en las unidades experimentales con 30% de humedad: (a) segmento I; (b) segmento II; (c) segmento III. Tiempo inicial, To (■); tiempo final, Tf (□).

(a)



(b)



(c)

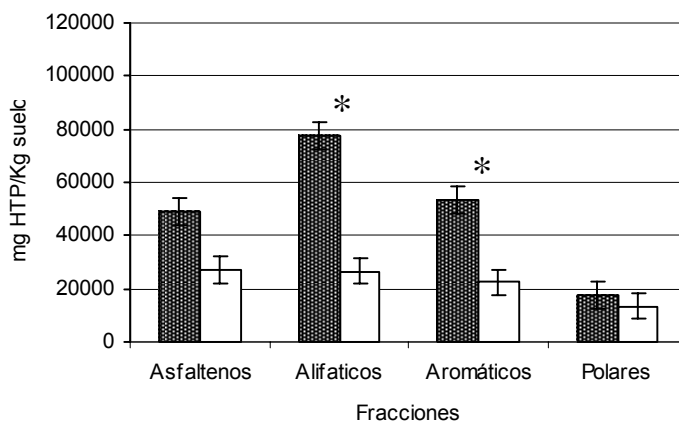


Figura 9. Remoción y distribución de hidrocarburos después de 24 meses de cultivo en las unidades experimentales con 60 % de humedad: (a) segmento I; (b) segmento II; (c) segmento III. Tiempo inicial, To (■); tiempo final, Tf (□).

En general, como se observa en las figuras 7, 8, y 9, la remoción y distribución de hidrocarburos puede explicarse por algunos de los fenómenos que ocurren en los ecosistemas, como el intemperismo del suelo, los procesos de partición de las rocas y de sedimentación que arrastran a los hidrocarburos incluyendo a los microorganismos hacia el fondo de las unidades experimentales. El crecimiento vertical y descendente de la raíz hacia el fondo también contribuye a este proceso

llevándose a la fauna microbiana a zonas más profundas del suelo. Por otra parte, los compuestos, como los asfaltenos, se comportan de una manera distinta a las demás fracciones de hidrocarburos en presencia de niveles elevados de agua debido a su estructura química; una parte es secuestrada por las partículas pequeñas del suelo (arcillas) y otra es arrastrada hacia la superficie más expuesta del contenedor. Por los mismos fenómenos citados (intemperismo y sedimentación). Esto podría explicar la distribución de los hidrocarburos y sus fracciones a lo largo de las unidades experimentales (Bedair y Al-Saad 1992).

La fitorremediación de compuestos orgánicos está basada en el efecto benéfico de las raíces en la degradación. Una serie de cambios ocurren en el suelo en la presencia de raíces tales como cambios en la composición e incremento en la actividad microbiana. El factor clave en el cambio de las comunidades microbianas es la disponibilidad de los sustratos orgánicos en zonas próximas a las raíces (Joner y Leyval, 2003). Macek *et al.*, (2000) encontraron evidencias que indican que a través de la liberación de exudados por las raíces de las plantas, se estimula la actividad enzimática microbiana y/o la movilidad de hidrocarburos, creando una relación simbiótica (entre las plantas y los microorganismos), de manera que estos pueden ser captados y removidos con mayor facilidad.

Los HTP son mezclas complejas compuestas por fracciones alifáticas, aromáticas, polares y asfaltenos de estas, el grupo alifático se considera como el más biodegradable por los microorganismos (Prince, 2002). Por esta razón, se evaluó la remoción de las diferentes fracciones después de 24 meses de tratamiento con 60% de humedad. Para asegurar que la remoción de estas dos fracciones (alifáticas y aromáticas) fuera real y no un efecto del método de muestreo, se analizaron muestras de los tres segmentos axiales encontrándose valores similares de remoción. Díaz-Ramírez *et al.*, (2003) usando mezclas de microorganismos aislados de la rizosfera de *C. laxus* y como fuente de carbono solo compuestos alifáticos (10 000 mg L<sup>-1</sup>) o una mezcla aromático-polar (5 000 mg L<sup>-1</sup> 2:1), encontraron que el 47% de hidrocarburos alifáticos y el 6% de la mezcla inicial

aromático-polar, fue biodegradado en 45-días en cultivos líquidos. En nuestro trabajo, las plantas favorecieron la remoción de la fracción alifática y aromática de hidrocarburos, no se observó remoción de la fracción de asfaltenos y la degradación de la fracción de hidrocarburos polares tampoco fue clara, después de períodos de tiempo largos (dos años) de incubación.

Se ha reportado que los organismos capaces de utilizar hidrocarburos como sustrato, tienen enzimas que pertenecen al grupo de las monoxigenasas (Kvesitadze *et al.*, 2001). Estas enzimas incorporan, como primer paso, un átomo de oxígeno del oxígeno molecular ( $O_2$ ) para producir los alcoholes y los epóxidos correspondientes de los compuestos alifáticos y aromáticos, respectivamente. Otras enzimas (hidrogenasas, peroxidasas y oxigenasas, entre otras) pueden continuar las diversas y particulares trayectorias de la asimilación de estos compuestos (Schäffer *et al.*, 2002).

En la Tabla 3 se muestra la remoción y la tasa de remoción promedio de hidrocarburos por *C. laxus* en ensayos de 24 meses, bajo condiciones de invernadero. En todas las unidades experimentales la humedad fue monitoreada para mantener condiciones constantes de 10, 30 y 60%. La remoción de HTP fue de 8, 34 y 48% para 10, 30, y 60% de humedad, respectivamente. La mayor remoción de hidrocarburos fue de 83 mg HTP  $g^{-1}$  suelo seco y la tasa de remoción fue de 3.46 mg HTP  $g^{-1}$  suelo seco  $mes^{-1}$ , obtenida en las unidades experimentales con 60% de humedad.

Tabla 3. Remoción de HTP por plantas de *Cyperus laxus* crecidas en suelo contaminado con hidrocarburos con suelo con diferentes contenidos de humedad después de 24 meses de cultivo en el invernadero.

Contenido de humedad en el suelo	Remoción promedio	Tasas de remoción promedio
(%)	mg HTP g <sup>-1</sup> suelo seco	mg HTP g <sup>-1</sup> suelo seco mes <sup>-1</sup>
10*	13.84*	0.58*
30	58.84 ± 1.45*	2.45 ± 0.15*
30 <sup>a</sup>	1.00 ± 1.50	0.042 ± 0.12
60	83.06 ± 1.33*	3.46 ± 0.25*

<sup>a</sup> Testigo sin planta.

\* Valores que son significativamente diferentes ( $p < 0.5$ ) con respecto al testigo sin planta

*Excepto el contenedor con 10% de humedad (una unidad experimental), todos los resultados y sus desviaciones estándar se derivan de tres unidades experimentales*

Los resultados anteriores indican que el contenido de humedad del suelo juega un papel importante en la remoción de hidrocarburos por *C. laxus*. El agua es un medio de transporte en diferentes direcciones (horizontal, vertical, principalmente), para sustancias hidrofílicas y polares, como es el caso de los alcoholes, seguido por los hidrocarburos aromáticos y finalmente los alifáticos (Tölgyessy, 1993).

Escalante *et al.*, (2005), usando agrolita como soporte inerte, reportaron que la máxima capacidad de remoción de hidrocarburos por *C. laxus* (0.75 mg HTP g<sup>-1</sup> agrolita seca mes<sup>-1</sup>) se obtuvo con 30% de humedad. Estos resultados, comparados con los obtenidos en el presente estudio con el mismo contenido de humedad, sugieren que *C. laxus* es capaz de remover 3.2 veces más hidrocarburos en suelo (ver Tabla 3) que en un sistema modelo (agrolita). Las diferencias pueden ser explicadas por las siguientes causas: (i) que en el suelo existen microorganismos nativos que probablemente interactúen con las plantas para la eliminación de los

hidrocarburos, tales microorganismos nativos no existen en la agrolita; y (ii) que en este trabajo las plantas fueron propagadas vegetativamente, transplantadas y aclimatadas antes de iniciar los ensayos de fitorremediación, mejorando así posiblemente los resultados de remoción en comparación con los resultados obtenidos con semillas directamente germinadas en suelos contaminados.

### **8.3. Lavado de raíz**

El lavado de las raíces se realizó con el fin de eliminar todos los microorganismos asociados a la raíz de *C. laxus* y así poder determinar la actividad enzimática proveniente únicamente de la raíz de la planta. El objetivo fue descartar la posibilidad de determinar actividad enzimática exógena, como la microbiana. Se decidió evaluar tres diferentes tratamientos de lavado de raíces mediante la cuantificación de los microorganismos en las aguas de los lavados después de cada tratamiento. Los resultados de la cuantificación de microorganismos en las aguas de los lavados se muestran en la Tabla 4. Se observó que el tratamiento con cloro es el más efectivo para eliminar los microorganismos asociados a la raíz de *C. laxus*.

Aunque el tratamiento más eficiente fue con cloro, se realizaron cinco lavados con agua corriente para que la adición de cloro no se convirtiera en otra variable de estrés para la planta y deterioro celular, en el momento de la determinación de la actividad enzimática. Finalmente, para demostrar que la presencia de microorganismos que contenía el agua del quinto lavado, no aportaban proteína soluble, se concentró la muestra del último lavado, por liofilización y se observó que no contenía cantidades detectables de proteína que pudieran contribuir en actividad enzimática; por lo que se concluyó que la actividad EROD CYP450 detectada proviene únicamente de la raíz de *C. laxus* y no de los microorganismos asociados de la rizosfera.



Tabla 4. Cuantificación de hongos (A) y bacterias (B) en los lavados para los distintos tratamientos de las raíces de *C. laxus*

A) Hongos

Tratamiento	No. de lavado	Promedio *UFC	**DE
Cloro	1	20	14
	3	10	0
	5	0	0
Detergente (Tween)	1	2250	70
	3	1560	77
	5	500	0
Agua (corriente)	1	265	221
	3	180	99
	5	115	70

B) Bacterias

Tratamiento	No. de lavado	Promedio *UFC	**DE
Cloro	1	1990	14
	3	940	14
	5	135	21
Detergente (Tween)	1	3480	35
	3	2810	14
	5	2100	7
Agua (corriente)	1	3190	14
	3	1320	91
	5	1200	70

\*UFC, unidades formadoras de colonias

\*\*DE, desviación estándar.

#### **8.4. Ensayos de actividad enzimática en plantas creciendo en suelo contaminado**

Se decidió utilizar la 7-etoxiresorufina como el sustrato para la enzima EROD CYP450 de *C. laxus*. Se consideró que la actividad EROD CYP450 podría ser análoga a la subfamilia CYP4501A1 (CYP1A1) reportada en animales (Wilson *et al.*, 2005) o al CYP76B1 detectado previamente en plantas *Helianthus tuberosus* y soya (Robineau *et al.*, 1998; Siminszky *et al.*, 1999); es decir, una actividad enzimática de 7-etoxiresorufina O-deetilasa (EROD). Con el objetivo de correlacionar la remoción de hidrocarburos en las unidades experimentales con una actividad enzimática proveniente de la planta, se realizaron diferentes ensayos de actividad EROD CYP450 en las raíces de *C. laxus*. Los estudios enzimáticos se realizaron en plantas crecidas en suelos contaminados con HTP durante los experimentos de fitorremediación.

En la Figura 10(a) se presenta la actividad EROD CYP450, expresada en unidades de actividad específica, en la fracción microsomal de las raíces de *C. laxus* crecidas tanto en suelo contaminado con hidrocarburos como en suelo sin hidrocarburos. En las fracciones microsomales, se observaron diferencias significativas entre las actividades EROD CYP450 de las raíces crecidas con y sin hidrocarburos, con una actividad específica promedio 6.5-veces mayor en presencia de hidrocarburos que en ausencia de los mismos, sugiriendo que esta actividad EROD CYP450 se indujo en presencia de hidrocarburos.

Robineau *et al.* (1998), demostraron que la presencia de moléculas orgánicas (herbicidas) indujeron la expresión de la enzima CYP76B1 en alcachofas Jerusalem (*Helianthus tuberosus*), determinada por fluorometría como actividad EROD CYP450. Es importante notar que en la Figura 10(a) se presenta un comportamiento oscilatorio característico descrito por dos máximos y tres mínimos durante los 36 meses de los experimentos. Estos resultados oscilatorios sugieren que la actividad EROD CYP450 podría estar relacionada con el ciclo de vida de la planta. Para relacionar la actividad

enzimática con el desarrollo de la planta, en la Figura 10(b) se muestran los resultados cuantitativos de las determinaciones de actividad enzimática con respecto a la presencia de inflorescencias y módulos durante experimentos a largo plazo en suelos contaminados con HTP.

El número promedio de inflorescencias por planta exhibió diferencias significativas durante el desarrollo del experimento, mientras que el número promedio de módulos por planta no resultó significativamente diferente a lo largo del experimento a excepción de los dos mínimos encontrados en los 12 y 20 meses de cultivo.

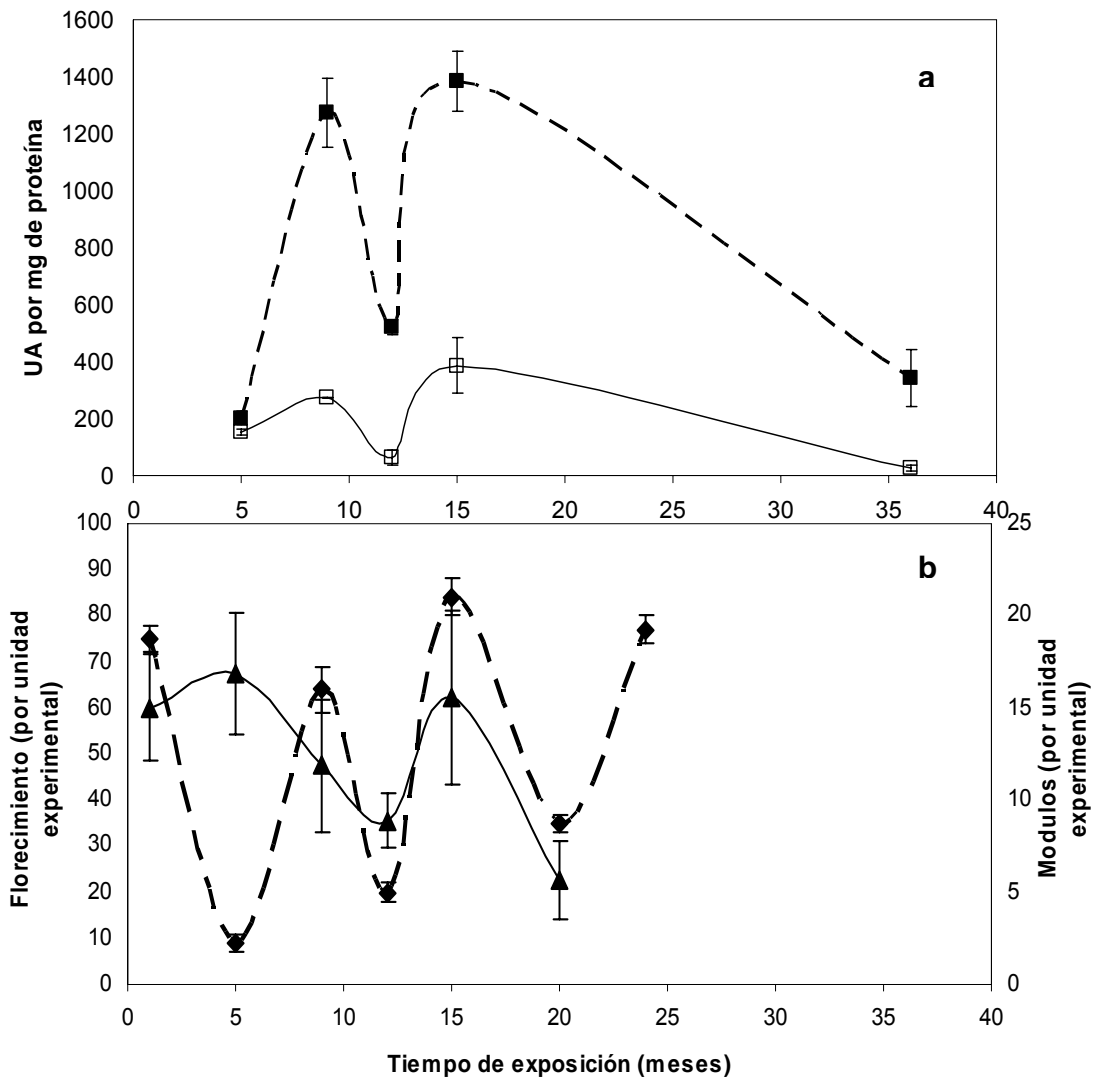


Figura 10. (a) Actividad enzimática específica EROD CYP450 en la fracción microsomal obtenida de la raíz de *Cyperus laxus* en suelo con (- ■-) y sin (- □-) HTP; y (b) el promedio de el número de inflorescencias (- ◆-) y módulos (- ▲-) por planta crecida en suelo con HTP.

El comportamiento de la actividad enzimática mostró una trayectoria oscilatoria de tiempo-frecuencia más o menos clara, que sugiere una relación positiva con la reproducción sexual de las plantas, definida a través de la floración. La presencia de módulos vegetativos, también sugieren que la actividad enzimática podría estar asociada a la reproducción. El acoplamiento entre la actividad

enzimática y la floración fue más evidente en presencia que en ausencia de hidrocarburos. Petkova-Andonova *et al.*, (2002), aislaron al citocromo P450<sub>92B1</sub> (CYP<sub>92B1</sub>) de petunias híbridas y observaron que esta enzima se expresaba solamente durante el desarrollo de la flor. A pesar de la relación clara entre la actividad EROD CYP450 y la floración que se observa en nuestro trabajo, se requiere mucho más investigación para entender su significado y los posibles mecanismos implicados.

Estos resultados sugieren que la disminución de la humedad afectó el crecimiento de las plantas y por lo tanto su capacidad de remoción, esto fue evidente en el caso del contenedor con 10% de humedad.

#### **8.5. Ensayos de actividad enzimática en plantas creciendo en suelo modelo agrolita**

Ante una situación de estrés por compuestos tóxicos, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos y mecanismos alternativos para acelerar la eliminación de dichos compuestos xenobióticos que generan el estrés. Se trata de una serie de enzimas no integradas a las vías del metabolismo energético o intermediario de la planta y cuyos sustratos son los mismos compuestos xenobióticos. La función de las enzimas es convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables al medio que rodea la planta. El papel de estas enzimas es clave para la supervivencia celular. De no existir tales vías metabólicas, una vez en el interior del organismo, los xenobióticos tenderían a acumularse perturbando el equilibrio celular, provocando alteraciones funcionales e incluso la muerte celular.

Los experimentos que se describen a continuación, se realizaron en suelo modelo y en tiempos cortos, se desarrollaron para tratar de establecer vínculos entre la presencia de los hidrocarburos y la inducción de la actividad EROD CYP450, microsomal y citosólica, con respecto al tiempo de cultivo. En la Figura 11(a) se

muestra la actividad EROD CYP450 en las fracciones microsomal y en la Figura 11(b) se presenta la actividad de la fracción citosólica, con respecto al tiempo de cultivo.

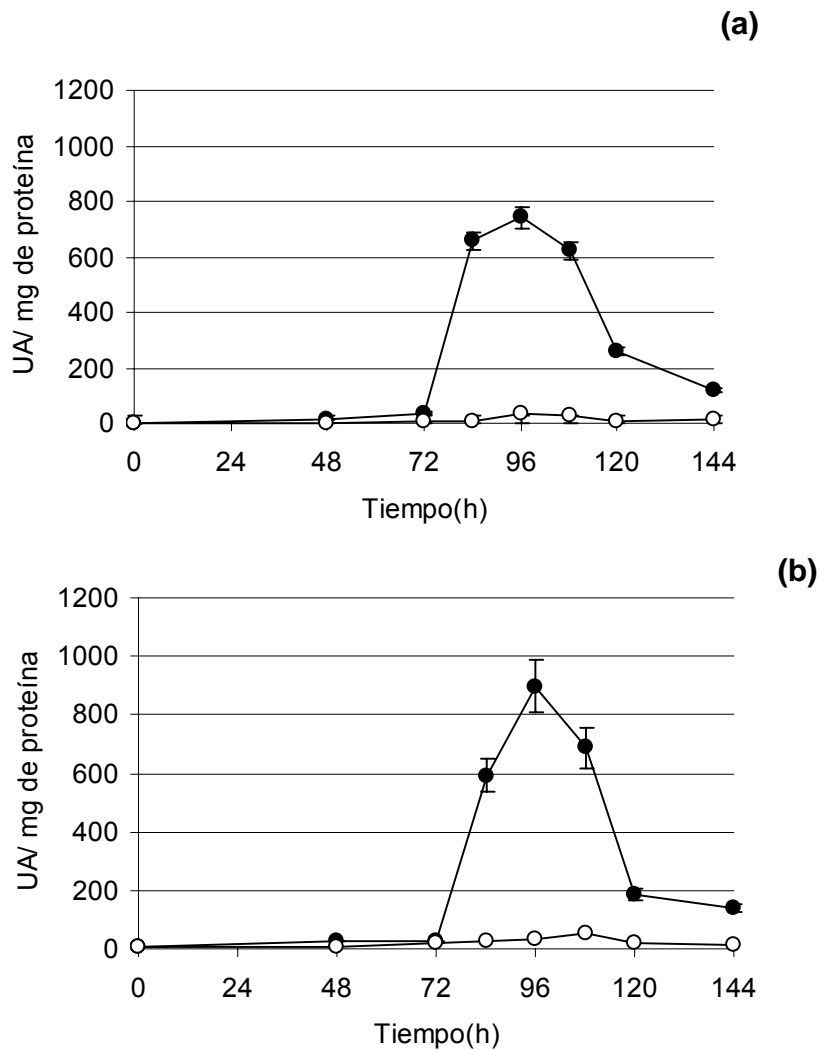


Figura 11. (a) Actividad EROD CYP450 en la fracción microsomal y (b) actividad EROD CYP450 en la fracción citosólica. Los círculos cerrados (-●-) indican actividad específica (unidades de actividad = UA) en presencia de hidrocarburos y los círculos abiertos (-○-) la actividad específica en ausencia de hidrocarburos.

Se observa que ambas actividades tienen comportamientos similares: se registró una mayor actividad en presencia que en ausencia de hidrocarburos. En

presencia de hidrocarburos se observó un máximo a las 96 h de cultivo y la actividad máxima se conservó durante solo 24 h.

Robineau *et al.* (1998) observaron que la actividad EROD CYP450 en la fracción microsomal de alcachofas (*Helianthus tuberosus*) se expresa a las 46 h de exposición a benzo(a)pireno. En nuestros resultados se observó una actividad basal mínima en ausencia de hidrocarburos (menos del 10% de la actividad máxima). Sin embargo, debido a los cortos tiempos de cultivo, con este experimento no se puede confirmar que la actividad enzimática se induzca en presencia de hidrocarburos. Para corroborar estos datos, se realizó un experimento de 312 h de exposición a hidrocarburos. En este nuevo experimento también se incrementó la concentración inicial de contaminantes (7 mg de HTP g<sup>-1</sup> de agrolita seca) y se incluyeron más puntos de muestreo alrededor de las 96 h. Este experimento de tiempo más prolongado confirmó la presencia y el incremento de la actividad enzimática que se puede observar en la Figura 12

En la Figura 12(a) se muestra la actividad EROD CYP450 de la fracción microsomal y en la Figura 12(b) se presenta la actividad de la fracción citosólica, con respecto al tiempo de cultivo. Ambas actividades enzimáticas presentan patrones de comportamiento similar. Puesto que en el control no se detectó actividad enzimática, se asumió que el estrés inicial por el corte de la raíz no afectó.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Werck-Reichhart *et al.* (1990), ellos lavaron las plantas (*H. tuberosus*), y obtuvieron los extractos celulares inmediatamente después del corte evaluando el estrés provocado por la herida como promotor de la inducción de CYP450. Este grupo observó que el estrés por herida no causa inducción de esta actividad EROD CYP450. En las Figuras 12(a) y 12(b) se observa una mayor actividad en presencia que en ausencia de hidrocarburos. En las dos fracciones ensayadas, en presencia de hidrocarburos, se observó un pequeño pico a las 96 h que coincide con estudios previos y un máximo

de actividad a las 288 h de cultivo lo cual confirmó el carácter inductivo de EROD CYP450 en presencia de hidrocarburos.

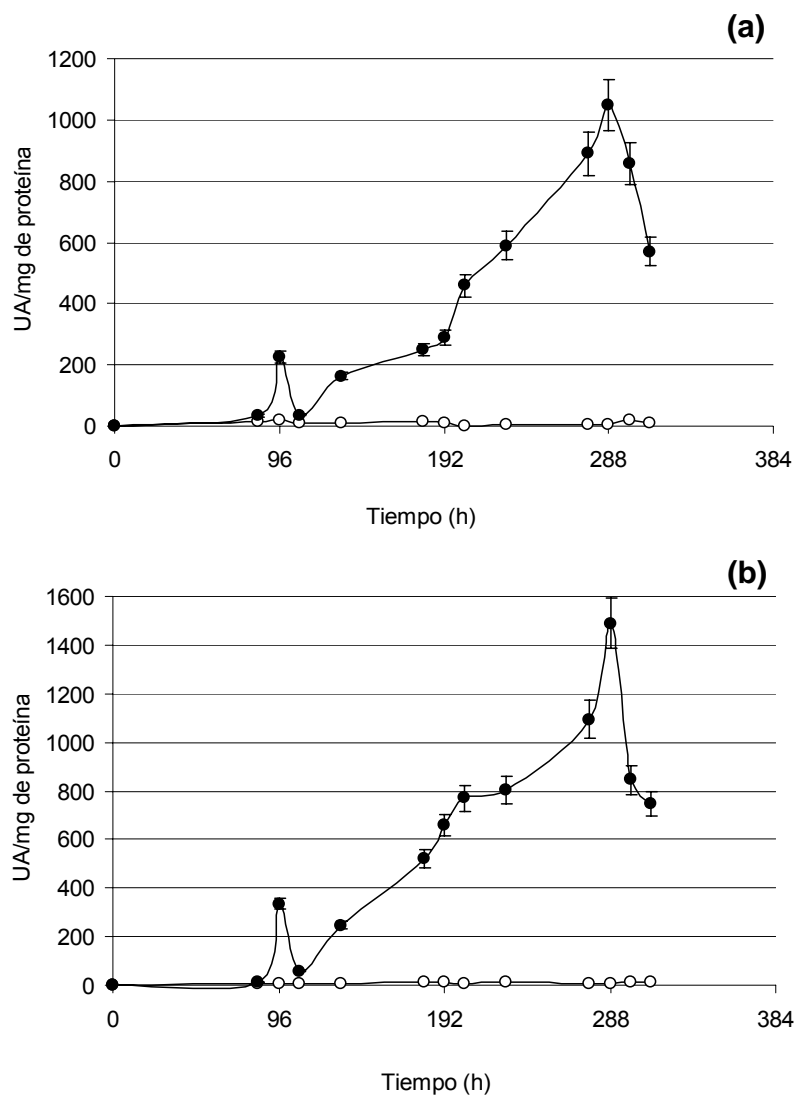


Figura 12 (a) Actividad EROD CYP450 en la fracción microsomal, (b) actividad EROD CYP450 en la fracción citosólica. Los círculos cerrados (-●-) indican actividad específica en presencia de hidrocarburos y los círculos abiertos (-○-) actividad específica en ausencia de hidrocarburos



En la raíz de *Cyperus laxus*, la actividad de la fracción citosólica es mayor (60%) que la actividad de la fracción microsomal. Esto podría confirmar la teoría de Kvesitadze *et al.* (2001), que explica que el incremento de la actividad en la fracción citosólica puede contribuir a la biorremediación de la planta en compuestos xenobióticos.

Con el objeto de mostrar la actividad total obtenida en ambas fracciones (citosólica y microsomal) y poder compararla con lo reportado en otros trabajos, en la Figura 13, se presentan los resultados resumidos, obtenidos de las cinéticas enzimáticas de EROD CYP450 en las dos fracciones, con y sin hidrocarburos.

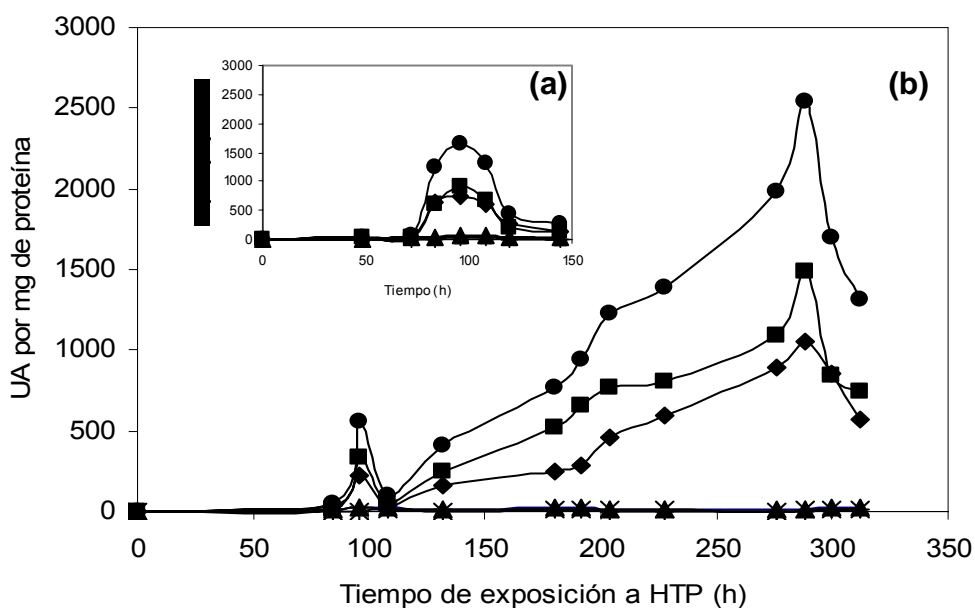


Figura 13. Variación de la actividad específica (UA) por mg de proteína: fracción citosólica en presencia de hidrocarburos (■); fracción microsomal en presencia de hidrocarburos (◆), suma de las dos fracciones en presencia de hidrocarburos (●). UA de la fracción citosólica sin hidrocarburos (\*); fracción microsomal sin hidrocarburos (+) y suma de las dos fracciones sin hidrocarburos (▲). La concentración inicial de HTP fue de: (a)  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de agrolita seca y (b)  $7 \text{ mg g}^{-1}$  de agrolita seca.

Se conocen pocos trabajos sobre la actividad EROD CYP450 en plantas y menos todavía relacionados con la enzima que se extrae de la fracción citosólica. Por tal motivo, a continuación se compara solo la actividad EROD CYP450 en la fracción microsomal y en unidades de pkat por mg de proteína en vez del UA específica. Didierjean *et al.*, (2002) encontraron en alcachofa Jerusalem en presencia del inductor aminopirina, que los valores de actividad EROD CYP450 fueron  $7.4 \text{ pkat} \pm 0.41$  por mg de proteína en 48 h. En este trabajo, la actividad de EROD CYP450 fue muy similar en orden de magnitud ( $3.75 \text{ pkat} \pm 0.26$  por mg de proteína) a las 96 h. Sin embargo, la actividad inducida EROD CYP450 más alta en nuestro trabajo se registró a las 288 h y fue de  $17.45 \pm 0.42$  pkat por mg de proteína ( $1040 \pm 25.2$  UA por mg de proteína). Estos resultados sugieren que en *C. laxus* la actividad EROD CYP450, es inducida por la presencia de hidrocarburos contaminantes.

## 9. Conclusiones

No se observó correlación entre la concentración de hidrocarburos con el carbono orgánico total y tampoco con la granulometría del suelo.

En los cultivos con 60% de humedad se obtuvo la mayor remoción de hidrocarburos (48%); siendo las fracciones de hidrocarburos alifáticos (60%) y aromáticos (50%) las que la planta removió o transformó preferentemente.

Se demostró que la exposición a hidrocarburos del petróleo indujo un aumento en la actividad EROD CYP450 en *C. laxus Lam.* Esta actividad se encontró presente tanto en la fracción microsomal (40%) como en la citosólica (60%) de las raíces de *Cyperus laxus*.

Se observó una relación positiva y de trayectoria oscilatoria entre la actividad enzimática de EROD CYP450 y la floración. Aun se requiere más investigación para entender su significado y los posibles mecanismos implicados.

## **10. Recomendaciones**

La fitorremediación es una tecnología que se utiliza para el mejoramiento de sitios contaminados con diferentes xenobióticos por lo cual se necesitan aún muchos estudios para esclarecer los diferentes mecanismos que utiliza la planta frente a los contaminantes. Por ejemplo, falta investigar los mecanismos de detoxificación de las plantas, las diferentes enzimas que participan así como los intermediarios que se forman.

Las interacciones entre la planta y los microorganismos no son claras, aún se desconocen las diferentes relaciones ecológicas que las plantas establecen, no solo para su sobrevivencia sino también para la degradación de moléculas exógenas.

Hace falta más información experimental para demostrar que la actividad de la enzima EROD CYP450 es clave en la remoción de hidrocarburos y por lo tanto en la fitorremediación.

Con respecto a la actividad EROD CYP450, se conocen diferentes subfamilias del citocromo P450 que han sido bien estudiadas en animales, pero en plantas aun faltan estudios que esclarezcan en que reacciones del metabolismo participan estas enzimas. En lo particular, para asegurar que la actividad EROD CYP450 pertenece a la subfamilia CYP45076B1 se recomienda identificarla con técnicas de biología molecular.

La recomendación más importante es tratar de aplicar toda la información generada en el laboratorio a los sitios contaminados para encontrar las mejores soluciones particulares para la remediación de dichos sitios.

## 11. Referencias Bibliográficas

- Adler, P., Rajeev, A., El Ghaouth, D., Glenn, M. y Solar, J. (1994). Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.* 23, 1113-1117.
- Aitchison, E., Kelley, S., Alvarez, P. y Schnoor, J. (2000). Phytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environ. Res.* 72, 313-321.
- Alef, K., y Nannipieri, P. (1995). Methods in applied soil microbiology and biochemistry, pp. 150-180. Ed. Academic Press, USA
- Anderson, T., Guthrie, E. y Walton, B. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630-2636.
- Anderson, T. y Coats, J. (1994). Bioremediation through rhizosphere technology. En: ACS Symposium Series. American Chemical Society Washington, Vol. 563, pp 204-215.
- Anderson, T. y Coats, J. (1995). Screening rhizosphere soil samples for the ability to mineralize elevated concentrations of atrazine and metolachlor. *J. Environ. Sci. Heal.* 30, 473-484.
- Andersson, T. Y Forlin, L. (1992) Regulation of cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat Toxicol* 24, 1-20.
- April, W. y Sims, R. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20, 253-265.
- Bedair, H., M. y Al-Saad., H., T. 1992. Dissolved and Particulate Adsorbed Hydrocarbons in Water of Shatt Al-Arab River, Iraq. *Water, Air, Soil Pollution.* 61:397-408.
- Bhandari A., Novak J.T., y Dove D.C. (2000). Effect of soil washing on petroleum-hydrocarbon distribution on sand surfaces. *J. Hazard Subst Res.* 2, 1-13.
- Bosma, T., N., P., Middeldorp, P., J., M., Schraa, G., y Zender, A., J., B., (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31, 248-252.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 59, 277–282.
- Boulenc, X., Bourrie, M., Fabre, I., Roque, C., Joyeux, H., Berger, Y., y Fabre, G. (1992). Regulation of cytochrome P450 1A1 gene expression in a human intestinal cell line, CACO-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3,1471-1478.
- Carmody, O., Fros, R., Xi Yunfei y Kokot, S. (2006) Adsorption of hydrocarbons on organo-clays—Implications for oil spill remediation. *J Colloid Interface Sci.* 305, 17-24.
- Chapple, C. (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Plant Mol. Biol.* 49,311-43.
- Cunningham, S., Shann, J., Crowley, D., y Anderson T. (1997). Phytoremediation of contaminated soil and water. En: E. L. Kruger, T. A. Anderson, and J. R. Coats, Eds. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. Washington, DC: American Chemical Society, 2-17 pp.
- Darwich, N. (1998). Manual de fertilidad de suelos y uso de fertilizantes. Ed. Talleres Gráfica. Arnedinho. 182 pp.
- Dec, J. y Bollang, J. (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1132-1139.
- Díaz-Ramírez, I. J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M. y Favela, Torres-E. (2003). Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can. J. Microbiol.* 49, 755-761.
- Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Sze-Mei, C., Schaller, H., Daniel, P., O’Keefe, D., P., y Werck-Reichhart, D. (2002). Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a Cytochrome P450 enzyme from Jerusalem Artichoke. *Plant Physiol.* 130, 179–189.
- Domenech, X. y Peral, J. (2006) *Química ambiental de sistemas terrestres*. Ed. Reverté España pp. 237

- Dushenkov, S. (2003). Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil*. 249, 167 – 175.
- Elwes, J. (1999). Principios de Biorrecuperación, Ed. Mac Graw Hill, México, 275 pp.
- Escalante, E., Gallegos, M., Favela, T., y Gutiérrez-Rojas, M. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* 59, 405-413.
- Gallegos, M., Gómez, S., Gonzáles, C., Montes de Oca, G., Yáñez, T., Zermeño, E., y Gutiérrez-Rojas, M. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Sci. Technol.* 42, 377-384.
- Galehouse, J. S. (1971). Procedures in sedimentary petrology sedimentation analysis. Willey-Interscience. New York, 69-94.
- Gómez-Santos, A., Gallegos-Martínez, M. y Gutiérrez-Rojas, M. Especies vegetales de sitios contaminados potencialmente remediadoras. 2001. Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioingeniería. Veracruz, Ver. 10-15 de septiembre.
- Gramss, G. y Rudeschko, O. (1998) Activities of oxidoreductase enzymes in tissue extracts and sterile root exudates of three crop plants, and some properties of the peroxidase component. *New Phytol.* 138, 401- 409.
- Günter, N., y Martinoia, E. (2002). Closter roots an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 4, 162-167.
- Gutiérrez, C. y Zavala, C. (2001). Rasgos hidromorficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra.* 20,101-111.
- Harvey, P., Campanela, B., Castro, P., Harms, H., Lichtfouse, E., Schöffner, A., Smrcek, S., y Werck, D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 9, 29-47.
- Hong, M., Farmayan, W., Dortch, I. y Chiang, C. (2001). Phytoremediation of MTBE from a groundwater plume. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1231-1239.
- Jakoby, W. y Ziegler, D. (1990). The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* 34, 20715-20718.

- Jian Wei, W., Chen, J., William, R. y Cunningham, R. (1997). Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31, 800-805.
- Joner E. J., y Leyval C. (2003). Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371-5.
- Jonge, H., Freijer, J. I., Verstraten, J. M., y Westerveld, J. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31, 771-775.
- Kassel, G., Ghoshal, D. y Goyal, A. (2002) Phytoremediation of trichloroethylene using hybrid poplar. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 8, 3-10.
- Kelley, S., Aitchison, E., Deshpande, M., Schnoor, J. y Alvarez, P. (2001). Biodegradation of 1,4-dioxane in planted and unplanted soil: Effect of bioaugmentation with *amycolata* sp.CB1190. *Water Res.* 35, 3791-3800.
- Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. y Korte, F. (1997). Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 118-122.
- Kolvenbach, B., Schlaich, N., Raoui, Z., Prell, J., Zühlke, S., Schäffer A., Guengerich, F., P., y Corvini, P. F. (2007). Degradation Pathway of Bisphenol A: Does ipso Substitution Apply to Phenols Containing a Quaternary -Carbon Structure in the *para* Position?. *Appl Environ Microbiol.* 73, 4776–4784.
- Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G. Sadunishvili y Ramsden, J. (2001). Some aspects of the enzymatic basics of phytoremediation. *J. Biol. Phys. Chem.* 1, 49-57.
- Lagrega, M. (1996). Gestión de residuos tóxicos tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Ed. Mc Graw Hill, México, 182 p.
- McBride, M. B. (1994). Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press Oxford Kingdom. USA. 416. p.
- Macek, T., Macková, M., y Ká, J. (2000). Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol. Adv.* 18, 23–34.



- Marjories, S., Hong, F. W., Farmayan, J. I. y Chen, Y. C. (2001). Phytoremediation of MTBE from a Grounwater plume. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1231-123.
- Martínez, E., y López, S. (2001). Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana.* 19, 9 -17.
- Miya, K. y Firestone, K. (2001). Bioremediation and biodegradation. *J. Environ. Qual.* 30, 1911-1918.
- Morrill, L., G., Mahilum, B.C. y Mohiuddin, S., H. (1982). Organic compounds in Soils: Sorption, Degradation and Persistence, Ann Arbor Science, 326p.
- Newman, L., Wang, X., Muiznieks, I., Ekuan, G., Ruszaj, M., Cortellucci, R., Domroes, D., Karscig, G., Newman, T., Crampton, R., Hashmonay, R., Yost, M., Heilman, P., Duffy, J., Gordon, M. y Strand, S. (1999). Remediation of trichloroethylene in an artificial aquifer with trees: A controlled field study . *Environ.Sci. Technol.* 33 :2257-2265.
- Núñez, L., Meas, V., Ortega B. y Olguin, J. (2004). Fitorremediación fundamentos y aplicaciones. *Ciencia.* 69-82.
- Orchard, J., Doucette, J., Chard, K., y Bugbee, B. (2000). Uptake of trichloroethylene by hybrid poplar trees grown Hydroponically in flow-through plant growth chambers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 895-903.
- Pflugmancher, S. y Sanderman, H. (1998). Cytocrome P450 monoxigenases for fatty acids and xenobiotic in marine macroalgae. *Plant Physiol.* 117, 123-128.
- Pivetz, B., Cochran, R. y Huling, S. (1997). Phytoremediation of PCP and PAH-contaminated soil. In 12th Annual Conference on Hazardous Waste Research Abstracts Book, May 19-22, Kansas City, Mo. 145p.
- Petkova-Andonova, M., Imaishi, H., y Ohkawa, H. (2002). CYP92B1, A Cytochrome P450, Expressed in Petunia Flower Buds, That Catalyzes Monooxidation of Long-Chain Fatty Acids”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1819-1828.
- Prince, R. C. (2002). Bioremediation: an overview of how microbiological processes can be applied to the cleanup of organic and inorganic environmental pollutants. In: Encyclopedia of Environmental Microbiology. Ed. G Bitton. John Wiley & Sons. New York. 977-983pp.

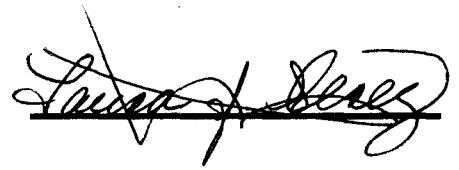
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L. y Werk-Reichhart, D. (1998). The chemical inducible plant Cytochrome CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and others xenobiotics. *Plant Physiol.* 118, 1049-1056.
- Rubin, E. y Ramaswami, A. (2001). The potential for phytoremediation of MTBE. *Water Res.* 35, 1348-1353.
- Sanderman, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Plant. Sci.* 1, 82-84.
- Schäffer, A., Messener, F., Langebartels, C. y Sanderman, H. (2002). Genes and enzymes for in- plant phytoremediation of air waste and soils. *Acta Biotechnol.* 22, 141-152.
- Schwab, P., Banks, M., K., y Kyle, W., A. (2006). Heritability of phytoremediation potential for the alfalfa cultivar *riley* in petroleum contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollut.* 177, 239- 249.
- Senan, R. y Abraham, T. (2004). Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *Biodegradation.* 4, 275-280
- Siciliano, S., Germida, J., Banks, K. y Creer, C. (2003). Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 483-489.
- Siminszky, B., Corbin, F., T., Ward, E., R., Fleischmann, T., J., y Dewey, R., E. 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96; 1750-1755
- Smith, M., J., Flowers, T., H., Duncan, H., J., y Alder, J. (2006) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ. Pollut.* 141,519- 525.
- Stokes, G. G., 1851. On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Transactions of Cambridge Philosophical Society* 9, 8 –106.
- Suzuki, T., y Yamaya, S. (2005). Removal of hydrocarbons in a rotating biological contactor with biodrum. *Process Biochem.* 40, 3429–3433.

- Telysheva, G., Dizhbite, T., Lebedeva, G., Rossinskaja, G., Jurkjane, V., Treikale, O., Yiesturs, U. y Daugavietis, M. (2002). Lignin- based products stimulating soil phytoremediation. *Acta Biotechnol.* 22, 167-173.
- Testa, M., S. 1994. Geological Aspects of Hazardous Waste Management. Lewis Publishers. USA. pp835.
- Tölgyessy, J. (1993). Chemistry and Biology of Water, Air and Soil Environmental Aspects. Elsevier. Czechoslovakia. 858p.
- USEPA. (1995). Soil vapor extraction (SVE) enhancement technology resource guide: air sparging, bioventing, fracturing, thermal enhancement. EPA 542-B-95-003.
- USEPA. (1996). Bioremediation of hazardous waste site: practical approaches to implementation. EPA 625-K-96-00.
- USEPA. (1997). Aerobic biodegradation of BETEX in aquifers material; Environmental Reserch Brief. EPA 600-S-97-033.
- USEPA. (1999) The hazardous waste clean-up Information (CLU-IN) World Wide Web Site EPA-542-F-99-002.
- Varazashvili, T., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Pruidze, M., Ananiashvili, T., Zaalishvili, G. y Gordeziani., M. (2001a). Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. *J. Biol. Phy. Chem.* 1, 85–88.
- Varazashvili, T., Zaalishvili, G., Kurashvili, M., Pruidze, M. y Gordeziani. M. (2001b). Participation of the plant monooxygenase system in adaptation to environmental stress. *J. Biol. Phy. Chem.* 1, 38–42.
- Versan, M., Karacan, Ö., y Pamir, R. (1998). Kinetic analysis of oxidation behaviour of crude oil SARA constituents. *Energ. Fuel.* 12, 580-588.
- Walton, B., Hoylman, A., Pérez, M. y Anderson, T. (1994). Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. ACS symposium Am. Chem. Soc. Series 563. American Chemical Society, Washington, DC.
- Walkley, A. y Black, C., A. (1965). Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy: 1372-1375.

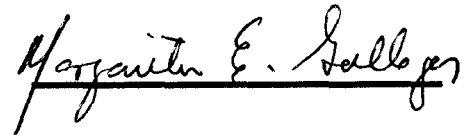
- Wang, Z., Fingas, M., y Li, K. (1994). Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic, aromatic and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, Part I. *J. Chromatogr. Sci.* 32, 361-365.
- Watt, M. y Evans, J. (1999). Proteoid roots physiology and development. *Plant Physiol.* 121, 317-323.
- Werck-Reichhart, D., Gabriac, B., Teutsch, H., y Durst, F. (1990). Two cytochrome P450 isoforms catalyzing O-dealkylation of ethoxy-coumarin and ethoxyresorufin in higher plants. *Biochem. J.* 270, 729-735.
- Werck, D., Hehn, A. y Didierjean, L. (2000). Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 116-123.
- Wilson, J. Y., Cooke, S. R., Moore, M. J., Martineau, D., Mikaelian, I., Metner, D. A., Lockhart, W. L., y Stegeman, J. J. (2005). Systemic effects of arctic pollutants in beluga whales indicated by CYP1A1 expression. *Environ. Health Perspect.* 113, 1594-1599.
- Williams, R. (1959). Detoxification Mechanisms, New York, N.Y. *Drug Metabolism Reviews.* 14, 559-607.
- Wu, S., P., Tao, S., y Liu, W., X. (2006). Particle size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in rural and urban atmosphere of Tianjin, China. *Chemosphere.* 62, 357- 367.
- Yang, X., Margolies, D., Zhu, K. y Buschman, L. (2001). Host plant- induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticide in the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Entomological Society of America.* 94, 381-387

Los miembros del jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis **“Expresión de la actividad enzimática de citocromo p450 en una planta (*Cyperus laxus*) fitorremediadora de suelos contaminados por hidrocarburos”** por Sugey López Martínez quien realizó la disertación pública el 23 de mayo del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa”.

Presidenta Dra. Laura J. Pérez Flores  
[ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)



Secretaria Dra. Margarita E. Gallegos Martínez  
[gmm@xanum.uam.mx](mailto:gmm@xanum.uam.mx)



Vocal Dr. Enrique García Hernández  
[egarcia@servidor.unam.mx](mailto:egarcia@servidor.unam.mx)



Vocal Dra. Tania Volke Sepúlveda  
[tvse@xanum.uam.mx](mailto:tvse@xanum.uam.mx)

