

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO, ACTIVIDAD DE
HEMOPEROXIDASAS Y REMOCIÓN DE FENANTRENO DE LOS
CULTIVOS CELULARES DE *FOUQUIERIA SPLENDENS* Y *FOUQUIERIA*
FASCICULATA

Mauricio Herrera García

Angélica Ma. Rodríguez Dorantes*

Lab. Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, IPN, Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. CP 11340, México, DF

E-mail: anrodo2000@hotmail.com

L. Angélica Guerrero Zúñiga

Dirección de Seguridad y Medio Ambiente, Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central
Lázaro Cárdenas 152, CP 07730, México, DF

RESUMEN

El conocimiento del potencial metabólico de las plantas para transformar y degradar xenobióticos se ha generado a través del análisis de la respuesta de cultivos *in vitro* de células vegetales expuestos ante contaminantes, ya que éstos son considerados una herramienta útil para evaluar la fitotoxicidad, la tasa metabólica y la persistencia de los xenobióticos en las plantas.

El presente estudio contempló la evaluación de la remoción de fenantreno en cultivos de células en suspensión de dos especies de la familia Fouquieriaceae: *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata* y el efecto de la presencia de este contaminante a través de la viabilidad celular y la determinación de la actividad de un sistema enzimático. En los cultivos de células en suspensión de ambas especies, no se observó un daño por

la exposición a fenantreno; la remoción del contaminante por las células fue de un 40 a 90%, siendo mayor la capacidad de remoción de fenantreno en los cultivos celulares de *F. fasciculata* en comparación con los de *F. splendens* a los diferentes tiempos a los cuales fueron expuestos estos sistemas, y paralelamente se observó un efecto inductivo sobre la actividad enzimática de hemoperoxidasas que pudieran estar relacionadas con la posible transformación del contaminante.

Palabras clave: cultivos celulares; fenantreno; hemoperoxidasas.

ABSTRACT

Knowledge about the metabolic potential of plants to transform and degrade xenobiotics has been generated by analyzing responses of *in vitro* plant cell cultures to

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

contaminants, and these reactions have been considered a useful tool to evaluate the phytotoxicity, metabolic rates and persistence of xenobiotics in plants. The present study evaluated phenanthrene removal by suspension cell cultures of two species of Fouquieriaceae, *Fouquieria splendens* and *F. fasciculata*, focusing on the effect of the presence of this contaminant on cell viability and the activity of an enzymatic system.

The results in both cultures showed that there was no damaging effect by phenanthrene, between 40 to 90% of which was removed by the suspension cells. The cell cultures of *F. fasciculata* have more phenanthrene removal capacity compared to those of *F. splendens* at the different lengths of time of exposure to the contaminant.

An inductive effect of hemoperoxidase activity was observed simultaneously with phenanthrene removal; therefore, it is possibly related to transformation of the contaminant.

Key words: cell cultures, phenanthrene, hemoperoxidasas.

INTRODUCCIÓN

La biotransformación por los cultivos de células vegetales es considerada una herramienta importante en la modificación estructural de compuestos que en algunos casos poseen una actividad terapéutica y son de interés considerable en el campo de la química (Furuya *et al.*, 1998; Orihara *et al.*, 1991), así mismo, estos sistemas experimentales se han considerado útiles para el estudio de los mecanismos involucrados en la detoxificación de contaminantes orgánicos y de metales pesados (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004).

Las técnicas *in vitro* tales como el cultivo de células en suspensión o de raíces diferenciadas, han sido empleados para evaluar la fitotoxicidad, la tasa metabólica y la persistencia de los compuestos xenobióticos en las plantas (Chroma *et al.*, 2002; Estime & Rier, 2001; Fletcher *et al.*, 1987; Groegger & Fletcher, 1988; Kucerová *et al.*, 2001; Mackova *et al.*, 1997; Wilken *et al.*, 1995; Suresh & Ravishankar, 2004; Harms & Langerbartels, 1986), estos resultados se han comparado con aquellos obtenidos con plantas intactas crecidas bajo condiciones asépticas (Harms, 1992).

Se ha demostrado también la degradación de la nitroglicerina por cultivo de células vegetales de *Beta vulgaris* y de extractos celulares (Goel *et al.*, 1997) utilizando biorreactores para evaluar el proceso de fitorremediación a gran escala; tal es el caso de los trabajos de Knops *et al.* (1995) que emplearon un biorreactor para estudiar la degradación del 4-nitrofenol, empleando cultivos en suspensión de soya.

Czuba (1987) realizó un estudio en callos de *Daucus carota* y *Lactuca sativa* donde se evaluó la toxicidad del metil mercurio y en cultivos en suspensión de *Solanum nigrum* y de rosa, donde se demostró la capacidad transformadora de PCB's (bifenilos policlorados) (Campanella, 2000; Macková *et al.*, 1997).

La ventaja del empleo de estos sistemas sobre los sistemas convencionales con plantas, es que los resultados pueden obtenerse con mayor rapidez y con menor costo en el gasto de técnicas analíticas. Se han desarrollado también un buen número de estudios de biotransformación con cultivos celulares de plantas (Braemer *et*

al., 1987; Furuya *et al.*, 1998; Orihara *et al.*, 1992), que han permitido estudiar los sustratos susceptibles de biotransformación y entender los procesos de conversión de las plantas tales como la hidroxilación, reducción, oxidación y glicosilación (Hamada *et al.*, 1977; Hirata *et al.*, 1982; Naoshima *et al.*, 1989; Otani *et al.*, 2004).

El ensayo de hemoperoxidasas permite realizar una medición directa de la actividad de oxidasas a través de la peroxidación catalizada por proteínas hemo, las actividades de éstas podrían ser el resultado de un amplio intervalo de inducciones o inhibiciones, además de que poseen una ventaja aditiva; ya que las mediciones de las oxidasas específicas pueden fallar al detectar un efecto si la enzima seleccionada es insensible al contaminante que se monitorea. En este caso, se tiene la medición del sustrato por las funciones catalíticas del grupo prostético hemo, lo que permite de manera indirecta realizar la medición de la actividad total de peroxidadas (Connon *et al.*, 2003).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y se han reportado algunos efectos genotóxicos de ellos (Bjorseth *et al.*, 1979; Gao & Zhu, 2004; Günther & Jones, 1988; Haeseler *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2006).

Son considerados como contaminantes principales en suelos debido a su característica recalcitrante y propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y son una preocupación seria por su potencial de bioacumulación en la cadena alimenticia (Fujikawa *et al.*, 1993; Jian *et al.*, 2004; Morehead *et al.*, 1986; Nylund *et al.*, 1992).

Esta importancia ambiental, ha provocado que la EPA (Environmental Protection Agency) de Estados Unidos los incluya dentro de la lista prioritaria de contaminantes cuyos niveles en los efluentes industriales requieren de su monitoreo (Heitkamp & Cerniglia 1988; Jian *et al.*, 2004).

Estos compuestos también han sido poco estudiados desde el punto de vista como inductores de estrés y están constituidos por dos o más anillos bencénicos, lo que los hace altamente persistentes en el ambiente. Como ejemplos se incluyen al naftaleno, fenantreno y benzo (a) pireno, que contienen de dos a cinco anillos aromáticos, respectivamente.

Muchos de estos compuestos en el ambiente son generados durante la manufactura del petróleo; se presentan en asfaltos, llantas y otros productos de combustión incompleta (Alkio *et al.*, 2006). Debido a la alta hidrofobicidad de los HAP, se asume que se mantienen de manera fuertemente unida a las partículas del suelo y son difícilmente biodisponibles (Pilon-Smits, 2005), sin embargo, se conoce que las plantas pueden incorporarlos o tomarlos del suelo (Kuhn *et al.*, 2004; Samsøe-Petersen *et al.*, 2002).

De manera general, la detoxificación de xenobióticos en plantas implica su transformación, su conjugación y su secuestro en la vacuola o la pared celular (Mc Cutcheon & Schnoor, 2003).

Se ha visto que el benzo (a) pireno (Sandermann *et al.*, 1984) y el fluoranteno (Kolb & Harms, 2000) son capaces de ser metabolizados por cultivos celulares de diferentes especies de plantas.

No obstante esto, se sabe muy poco de los genes de plantas que están involucrados en la absorción de los HAP, su degradación y conjugación; así como los mecanismos de toxicidad de los mismos para plantas están muy poco estudiados, y tal parece que la fitotoxicidad depende del tipo de compuesto y de la especie de planta (Baek *et al.*, 2004; Wittig *et al.*, 2003).

Conjuntamente con estos mecanismos desconocidos en plantas, también el conocimiento sobre las respuestas al estrés y los mecanismos de defensa implicados se desconocen y se requiere saberlo para dar soporte a la tolerancia de las plantas a este tipo de compuestos.

El fenantreno es un hidrocarburo aromático policíclico que presenta tres anillos bencénicos fusionados; se produce por la combustión de combustibles fósiles, por procesos industriales y por eventos naturales como incendios forestales. No es mutagénico o carcinogénico para los humanos, sin embargo, se ha demostrado que es tóxico para organismos acuáticos (Kusk, 1981; Pipe & Moore, 1986; Savino & Tanabe, 1989).

El fenantreno se ha empleado como un compuesto modelo para el estudio de la biodegradación de los HAP dado que: *a*) se encuentra en altas concentraciones en muestras ambientales contaminadas con este tipo de compuestos, *b*) porque muchos de ellos contienen una característica estructural similar a la del fenantreno y que en ellas es carcinogénica y *c*) la regioespecificidad y estereoselectividad de las oxigenasas puede determinarse por medio de estudios metabólicos con fenantreno, debido a que es uno de los HAP más pequeños y posee dos regiones: una región "bahía" y una región "k" en su molécula (Bezael *et al.*, 1996).

El fenantreno ha sido seleccionado en algunos estudios (Flocco *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2001) y se ha empleado frecuentemente como un compuesto característico en estudios de biorremediación (Bouchez *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 2002; Kanaly & Hara-yama, 2000; Kulakow *et al.*, 2000; Ortega-Calvo & Saiz-Jiménez, 1998). No obstante que la biorremediación del fenantreno es un tema bien estudiado, la información concerniente al impacto de este compuesto en la fisiología de las plantas es escasa.

Este estudio consideró el manejo de un sistema *in vitro* de los cultivos de células en suspensión de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata* para la evaluación de su capacidad de remoción de fenantreno y su efecto sobre el crecimiento celular y la actividad de hemoperoxidasas, con la finalidad de comprender procesos relacionados con la presencia y la remoción de contaminantes orgánicos en cultivos celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta del material biológico

El material biológico proviene de una colecta realizada en el Jardín Botánico Exterior de la UNAM, del que se colectaron tallos de *Fouquieria splendens* y de *Fouquieria fasciculata*, tomando muestras de 20 cm que se cortaron de la planta madre, se transportaron al invernadero y se mantuvieron con aporte de agua directo, bajo condiciones controladas (temperatura +/-, 28°C/15°C y una humedad relativa de 35% en promedio, con fotoperiodo de 12:12), hasta el desarrollo de los brotes axilares para la obtención de los explantes foliares.

Obtención de tejido calloso de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*

Se tomaron fracciones de hoja de *F. splendens* y *F. fasciculata* que se lavaron con agua corriente y jabón; la obtención de tejido calloso se realizó bajo condiciones de esterilidad. Este material se transfirió a un vaso de precipitados de 250 mL para desinfectarse con 50 mL de hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos y se enjuagó con agua destilada con tres cambios de 5 minutos cada uno.

El material foliar se seccionó en fracciones de 1 cm², depositando de tres a cuatro fracciones foliares por frasco de cultivo que contenía 30 mL de medio sólido MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado por Franco & García (1995), con el 50% de sales minerales y ácido naftalenacético (ANA), 1 mg/mL y bencil aminopurina (BAP), 10 mg/mL.

Los frascos se incubaron bajo condiciones de iluminación con fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, a 28°C por 30 días, para la obtención de tejido calloso.

Establecimiento de los cultivos de células en suspensión de *F. splendens* y *F. fasciculata*

De los callos obtenidos se obtuvo 1 g de biomasa que se transfirió en condiciones de esterilidad a matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 25 mL de líquido MS con ¼ de sales minerales que contenía ácido naftalenacético (ANA, 1 mg / mL) y bencil aminopurina (BAP, 10 mg / mL); manteniéndose en oscuridad en cuarto de incubación a 36°C y en agitación continua en un Multi-Wrist Shaker (Lab-Line Instruments, Inc.) a 3.8 r.p.m. por 15 días, realizando subcultivos cada ocho días para el establecimiento de líneas celulares.

Exposición de los cultivos celulares a fenantreno

Para evaluar el efecto del fenantreno sobre las células de *F. splendens* y *F. fasciculata*, se realizaron experimentos en matraces Erlenmeyer de 50 mL, que contenían 25 mL de medio MS ¼ de sales minerales con ANA y BAP, con 1 mL de inóculo del cultivo celular madre, con las siguientes concentraciones de fenantreno: 1mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L, a partir de una solución patrón de fenantreno de 100 mg/10mL (en etanol al 95%) considerando los cultivos de células sin contaminante como testigo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se mantuvieron en oscuridad en cuarto de incubación a 36°C y en agitación continua en un Multi-Wrist Shaker (Lab-Line Instruments, Inc.) a 3.8 r.p.m. por 30 días, posteriormente se tomaron alícuotas de 3 mL cada 10 días para evaluar la remoción de fenantreno del medio de cultivo, la viabilidad celular, observaciones de las células y la obtención de la biomasa celular para la cuantificación de proteína total y la medición de la actividad de hemoperoxidasas.

Análisis morfológico de las células en suspensión bajo la presencia del contaminante y obtención de biomasa celular total

Durante este análisis se realizaron observaciones de los cultivos de células en suspensión de *F. splendens* y *F. fasciculata*, con las diferentes concentraciones de fenantreno, con tinción directa con azul de metileno y observaciones empleando un Microscopio *Nikon*, Labophot-2.

De las fracciones colectadas (3 mL) por cosecha para ambas especies, se obtuvo la biomasa celular centrifugando las alícuotas en centrífuga clínica por 10 minutos a

temperatura ambiente, recuperando el sobrenadante de esta primera centrifugación para cuantificar el fenantreno remanente. Al paquete celular se le adicionaron 3 mL de medio de cultivo MS $\frac{1}{4}$ de sales para lavar las células dos veces y resuspender finalmente las células en 3 mL de medio de cultivo.

Evaluación del porcentaje de viabilidad celular en los cultivos en suspensión bajo la presencia del contaminante

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la tinción con azul de Evans, un colorante no permeable con baja toxicidad para las células; esta técnica se ha empleado para determinar el número relativo de células muertas en cultivos de células en suspensión, esto mediante la cuenta de células muertas que se tiñen de manera selectiva con el azul y las células vivas que no presentan esta coloración (Song *et al.*, 1999).

La tinción consistió en adicionar 0.5 mL de solución de azul de Evans al 0.05 M a alícuotas de 0.5 mL del material celular de ambas especies, resuspendido en el medio de cultivo de cada muestra experimental y cada cosecha. Las muestras se centrifugaron a 3 000 r.p.m. por tres minutos a temperatura ambiente, se decantó el colorante y se lavaron las células dos veces con 0.5 mL de medio de cultivo MS $\frac{1}{4}$ de sales, hasta eliminar el exceso del colorante, se depositó una alícuota de cada una de las muestras teñidas en un portaobjetos excavado y se realizó la cuenta celular por triplicado, contando el número de células viables (no teñidas) y no viables (azules), tomando 20 campos por cada observación.

El porcentaje de viabilidad se determinó como el número de células viables dividido entre el número de células totales x 100.

Evaluación de la remoción del fenantreno en los cultivos en suspensión

Para evaluar la remoción de fenantreno en los cultivos de células en suspensión de las dos especies de fouquieriáceas, se cuantificó el compuesto remanente en el medio de cultivo, tomando 1 mL del medio recuperado por centrifugación para las tres cosechas de todos los experimentos de ambas especies, al que se le adicionaron 2 mL de benceno para la extracción del contaminante, dejando reposar por 10 minutos, para posteriormente separar la fase orgánica y evaporar el benceno y resuspender el material en 1 mL de metanol grado HPLC.

Las muestras se analizaron por espectroscopia de UV, registrándose las lecturas de absorbancia a 292 nm y se realizó también un análisis por cromatografía de alta resolución de líquidos (HPLC) con la finalidad de identificar al fenantreno y la posible aparición de compuestos relacionados con productos de transformación de éste; con la detección del contaminante a 254 nm y el empleo de un detector con arreglo de diodos para la obtención de los espectros de absorción de los compuestos resueltos en la cromatografía.

Para este análisis se empleó una columna HICHRON C-18 Hypersil, de 10 μ m x 4.6 mm x 25 cm, usando como fase móvil un gradiente final de metanol-agua (50 a 95% de metanol grado HPLC), con un corrimiento de 70 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

Determinación de la actividad de hemoperoxidasas de los cultivos de células en suspensión con presencia de fenantreno

La extracción de las proteínas totales celulares se realizó tomando el paquete celular lavado de las alícuotas de 3 mL de cada cosecha y para cada experimento, éste se resuspendió en 2 mL de regulador de fosfatos 50 mM, pH = 6.0 en frío, para homogeneizar las células en un homogeneizador de tejidos (potter). Se obtuvieron los extractos celulares y éstos se guardaron a 4°C para su cuantificación por el método convencional de Bradford (1976), y la determinación de la actividad de hemoperoxidasas de los extractos celulares de los cultivos de ambas especies se realizó empleando el método espectrofotométrico de la oxidación de tetrametilbencidina (TMBZ) (Connon *et al.*, 2003), depositando en tubos Eppendorf de 1.5 mL: 100 µL de muestra (extracto celular) + 1 mL de regulador de acetato de sodio 0.20 M pH = 5.3 + 100 µL de TMBZ (preparada en 2 mg/L de metanol, diluida en regulador de acetato de sodio 0.20 M pH = 5.3, a la concentración de 660 µg/mL) + 50 µL de peróxido de hidrógeno 0.17%. Los tubos se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se evidenció la actividad de estas

proteínas a través del desarrollo de la coloración azul característica de la oxidación de la tetrametilbencidina; se leyó la absorbancia a 652 nm para la determinación de la actividad específica de hemoperoxidasas (nM TMBZ oxidada/min/µg de proteína celular).

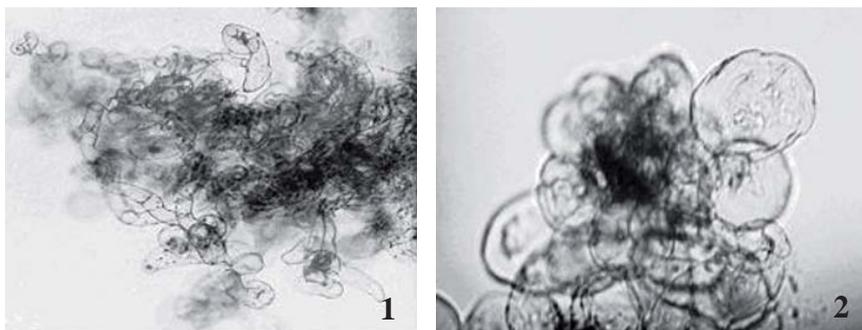
Análisis estadístico de los resultados

A todos los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey-Kramer de Comparación Múltiple, empleando el paquete estadístico GraphPad InStat, V2.03 (Aceves, 1993) y el paquete estadístico de Diseños Experimentales FAUANL.ver.1.4 (Olivares, 1989).

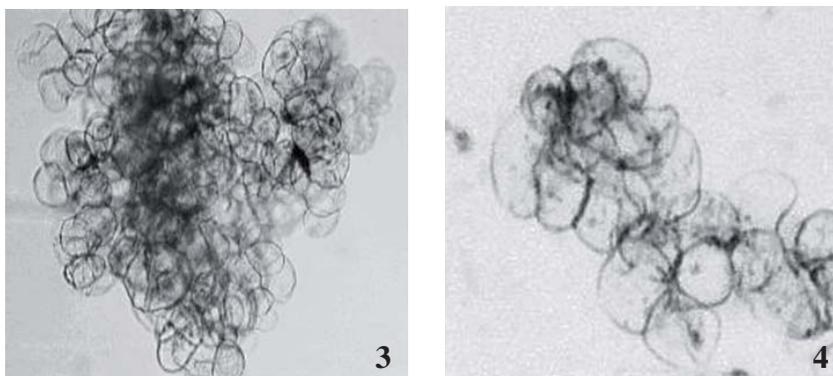
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del fenantreno sobre el crecimiento y morfología de los cultivos de células en suspensión de *F. splendens* y *F. fasciculata*

En cuanto a la morfología celular, no se observó alguna alteración en las poblaciones, resultado de lo que podría ser un caso de aneuploidia o poliploidia que se distinguiría por el alargamiento celular; ya que en todos los casos la apariencia de las células fue esférica (figs. 1 a 4).



Figs. 1 a 2. 1) Población celular en cultivos en suspensión de *F. splendens* (200x),
2) Detalle de células isodiamétricas de *F. splendens* (200x).

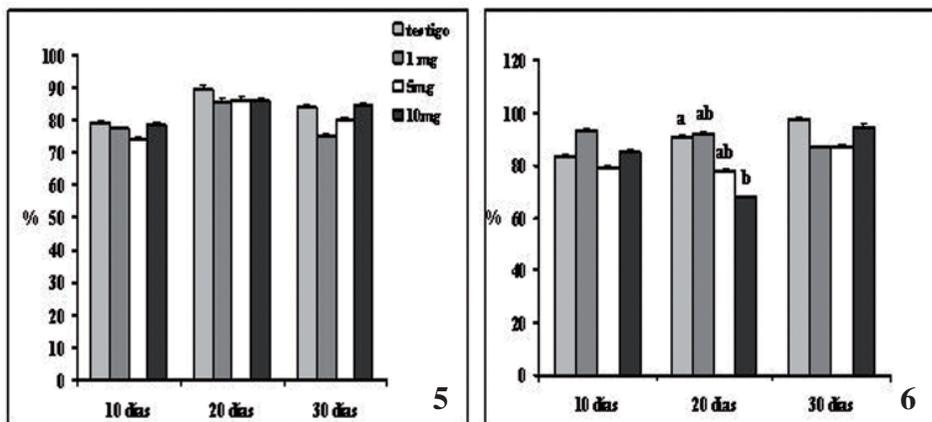


Figs. 3 a 4. 3) Formación de agregados celulares homogéneos con células esféricas de *F. fasciculata* (428x), 4) Detalle de células isodiamétricas de *F. fasciculata* (428x).

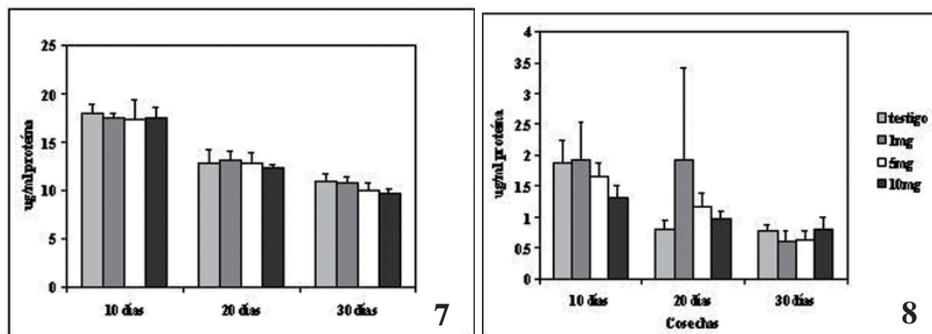
La tinción de Evans evidenció que el número de células no viables, identificadas por la coloración celular azul no fue abundante en el conteo realizado para todos los experimentos y cosechas; esto da una idea de la viabilidad de las células, mostrando que no se presentó un efecto dañino o muerte celular, lo que no representa finalmente que la división celular esté presente, ya que según lo observado por Smith *et al.* (1982) con la tinción no se distingue a las células que sean capaces de dividirse de aquellas que han perdido su potencial para dividirse. En términos de la viabilidad de las células de *F. splendens*, el porcentaje se mantuvo alrededor del 70 al 80% con una variación mínima entre los tratamientos testigo y de aquellos expuestos a fenantreno. Para el caso de *F. fasciculata*, la respuesta de las células fue muy similar a la obtenida en *F. splendens* (figs. 5 y 6). En ambos casos, se obtuvo una tolerancia al contaminante, lo que se manifestó con estos altos porcentajes de viabilidad, siendo la diferencia significativa solamente entre los tiempos de exposición para ambas especies.

En cuanto al crecimiento celular, medido a través de la cuantificación de la proteína total celular (figs. 7 y 8), éste, en todos los casos, salvo por la magnitud, mostró que se distinguen las diferentes etapas de crecimiento, la exponencial, la estacionaria y la de disminución del crecimiento o de muerte, que se manifestó en los 30 días totales medidos. Esta característica es propia del crecimiento de los cultivos de células en suspensión de esta familia de plantas (Rodríguez, 2006).

En este caso, la disminución en el contenido de proteína total celular no estuvo relacionada con el efecto directo del contaminante, ya que la relación de esta medición con el conteo celular, solamente reflejó el patrón de crecimiento celular. Para ambas especies, solamente se obtuvo una diferencia significativa en los diferentes tiempos de exposición ($p < 0.05$).



Figs. 5 y 6. Porcentaje de viabilidad de las células de los cultivos en suspensión de 10, 20 y 30 días: 5. *F. splendens* y 6. *F. fasciculata*. Las diferentes letras muestran la diferencia significativa entre los tratamientos con fenantreno en *F. fasciculata* para 20 días de exposición ($p < 0.05$).



Figs. 7 y 8. Cuantificación de proteína total celular de los cultivos en suspensión de 10, 20 y 30 días: 7. *F. splendens* y 8. *F. fasciculata*.

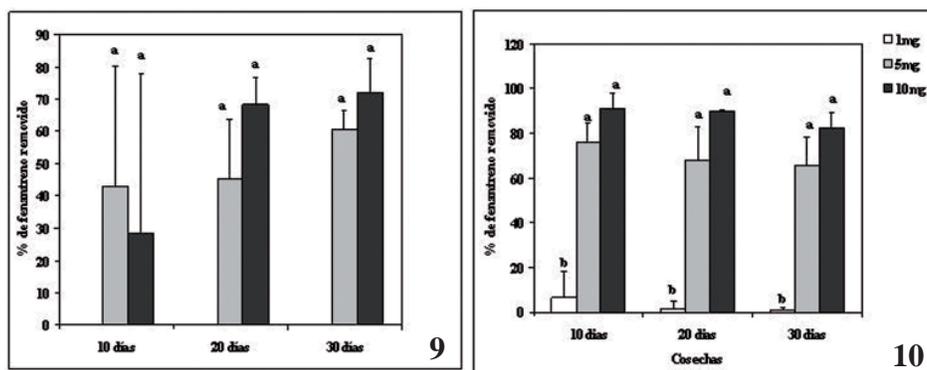
Remoción de fenantreno en cultivos de células en suspensión de *F. splendens* y *F. fasciculata*.

Los cultivos celulares metabolizan compuestos xenobióticos de manera similar a las plantas, sin las dificultades inherentes de la absorción y translocación de éstos en ellas (Laurent & Scalla, 1999); más aún, en condiciones asépticas de éstos, el metabolismo no está influenciado por la presencia de microorganismos.

La remoción de fenantreno obtenida, se evidenció mucho más en los experimentos con 5 y 10 mg/L de fenantreno; la falta de respuesta en la concentración de 1 mg/L en ambas especies, pudo deberse a la manipulación de las muestras, lo que se corroboró con los resultados obtenidos por el análisis de HPLC, al no identificarse la presencia del contaminante en las muestras analizadas.

La diferencia entre especies, mostró que en los cultivos de *F. splendens* se incrementó la remoción a medida que transcurrió el tiempo de exposición; aunque los valores de este proceso fueron menores que los obtenidos en los cultivos de *F. fasciculata* donde la cantidad del fenantreno removido fue mayor, pero solamente a los 10 días de exposición. La respuesta de remoción para las tres concentraciones de fenantreno analizadas (figs. 9 y 10) mostró una diferencia significativa en los tres tiempos, sobre todo entre los tratamientos con 1 y 10 mg/L de fenantreno; donde se obtuvo una remoción notable del contaminante por los cultivos celulares, sobre todo de *F. fasciculata*.

Cabe mencionar que es importante resaltar que por esta vía, dado que las células vegetales que crecen en los cultivos en suspensión, no desarrollan paredes celulares secundarias o capas protectoras, cada célula



Figs. 9 y 10. Remoción de fenantreno por los cultivos en suspensión de 10, 20 y 30 días: 9. *F. splendens* y 10. *F. fasciculata*. Las diferentes letras muestran la diferencia significativa entre los tratamientos con fenantreno entre los tiempos de exposición ($p < 0.05$).

entra en contacto directo en el medio de cultivo con el contaminante y los problemas que se asocian con la incorporación o toma del contaminante del suelo vía el sistema radical, pueden eliminarse. Como resultado entonces, se tiene que esto acelera la velocidad de remoción y la caracterización de la transformación o degradación de éste. Como ejemplo de esto se puede citar lo observado por Nepovim *et al.* (2004) sobre la degradación del TNT en cultivos en suspensión de *Rheum palmatum* y *Solanum aviculare*, donde los cultivos en suspensión permitieron analizar la distribución del TNT en el medio y sus productos metabólicos, así como los de Lucero *et al.* (1999) con *Datura innoxia* con otros compuestos nitrogenados explosivos.

La caracterización cromatográfica por HPLC de todas las muestras con y sin fenantreno, mostró una serie de compuestos separados, entre los dos y cuatro minutos, a los 38 minutos y a los 49 minutos en todos los sistemas para las dos especies, y solamente algunas variaciones en cuanto al porcentaje de fenantreno cuantificado (fig. 11) en algunos casos particulares de ambas especies, comparado con el fenantreno control. En este caso, con la fase móvil empleada en el análisis por HPLC, no se detectó la presencia de productos hidrofílicos producto de la posible hidroxilación de este compuesto no polar analizado, no obstante que se sugiere la posible reacción enzimática de oxidación que pudiera dar como producto la inserción de una molécula de oxígeno a un enlace C-H de la molécula xenobiótica (Sandermann, 1992, 1994), ya que las características espectrales del fenantreno removido por las células de ambas especies mostraron cambios en el comportamiento espectral del compuesto

a 255 nm, comparado con lo observado en el espectro de absorción del fenantreno puro, lo que puede estar relacionado con la transformación de éste por los sistemas celulares. La no detección de compuestos también puede atribuirse a la formación de metabolitos (ej. conjugados) o de residuos no extraíbles, los cuales en ciertas condiciones pueden ser derivados del compuesto parental (Bokern *et al.*, 1996).

Cabe mencionar que los resultados cromatográficos de los metabolitos resultantes en los cultivos de células vegetales como menciona Harms (1992), pueden extrapolarse a los obtenidos con la planta completa, donde en principio resultarían semejantes, no obstante que se presentan diferencias cuantitativas entre ambos sistemas.

Determinación de la actividad específica de hemoperoxidasas de *F. splendens* y *F. fasciculata* bajo la presencia del contaminante

Se tienen enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos que están relacionadas con enzimas del metabolismo secundario en plantas (Harms & Langebartels, 1986; Sandermann, 1994), dentro de ellas, las peroxidasas de plantas son enzimas ubicuas, versátiles catalíticamente hablando (Laurent, 1994; Stiborova & Anzenbacher, 1991; Zeigel, 1993) que participan en procesos metabólicos en las células vegetales y su concentración se incrementa bajo condiciones de estrés. Estas enzimas también se caracterizan por su baja especificidad y su alta afinidad por xenobióticos de diferente naturaleza química; esta característica asegura la participación activa de éstas en una amplia variedad de procesos detoxificadores (Kvesitadze *et al.*, 2001; Peakall, 1994).

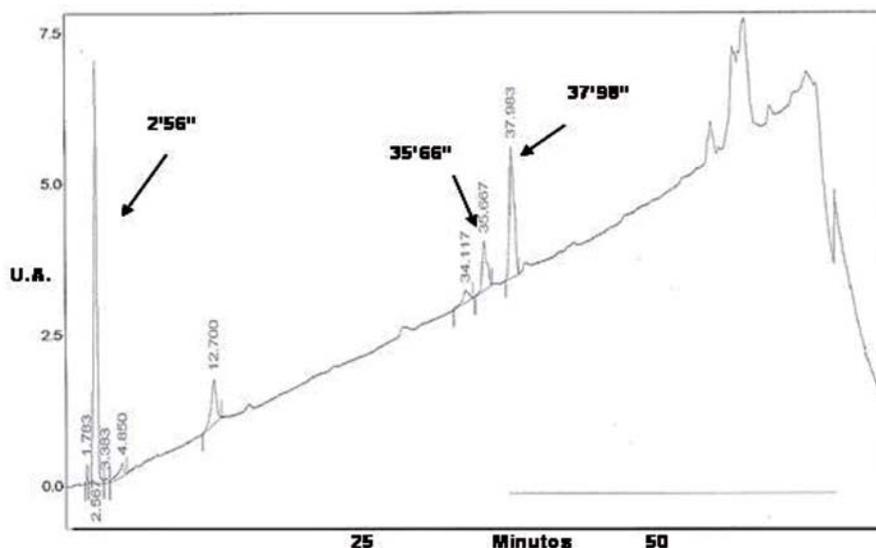


Fig. 11. Cromatograma del medio de cultivo de las células en suspensión de *F. splendens* de 20 días con 5 mg/L de fenantreno.

En este caso de estudio, la actividad de hemoperoxidasas resultó susceptible ante la presencia del contaminante: en los cultivos celulares de *F. splendens* disminuyó la actividad a medida que se incrementó la concentración del fenantreno en el sistema; mientras que para *F. fasciculata* la actividad aumentó en el tiempo, independientemente del experimento con y sin fenantreno (figs. 12 y 13).

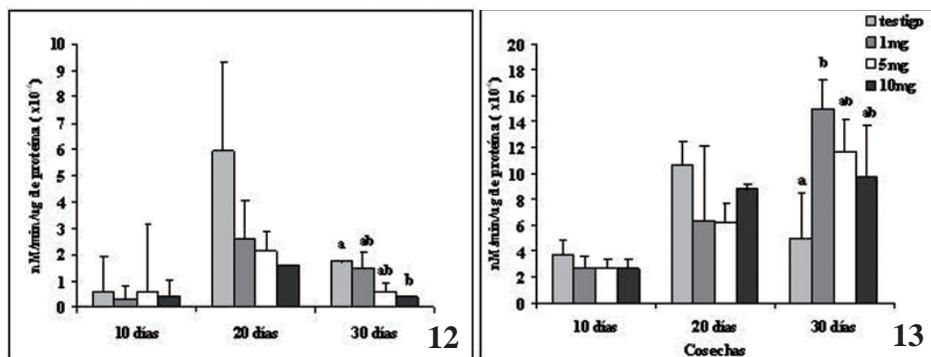
La inducción de hemoperoxidasas representa una homeostasis o respuesta compensatoria ante la exposición a un contaminante, lo que puede inducir mecanismos de detoxificación a través de la oxidación y/o transformación del contaminante (Connon *et al.*, 2003).

Este tipo de enzimas (monooxigenasas) están asociadas con los mecanismos de resistencia en algunos sistemas de detoxifi-

cación (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003; Hemingway & Ranson, 2000), lo que sugiere que el incremento en la actividad de éstas pudiera estar relacionado con la oxidación del fenantreno por las células de los cultivos de estas dos especies.

CONCLUSIONES

El comportamiento de los cultivos de células en suspensión de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*, no mostró un daño por la exposición ante fenantreno, además de promover la remoción del contaminante entre un 40 y 90% de las concentraciones consideradas, lo que se observó con la disminución en la concentración del contaminante en el medio de cultivo después de cada tiempo de exposición de las células ante el fenantreno; en particular, la capacidad de remoción de fenantreno evaluada para



Figs. 12 y 13. Actividad de hemoperoxidasas de los cultivos en suspensión de 10, 20 y 30 días: 12. *F. splendens* y 13. *F. fasciculata*. Las diferentes letras muestran la diferencia significativa entre los tratamientos con fenantreno entre los tiempos de exposición y los experimentos ($p < 0.05$).

los cultivos de células en suspensión de *F. fasciculata* fue mayor a la de *F. splendens*, determinada a los diferentes tiempos de exposición de estos sistemas, estos cultivos celulares podrían entonces estar asociados directamente con la remoción del contaminante por la adsorción o la incorporación de éste y la subsecuente metabolización o almacenamiento del mismo dentro de las células, además de que se presentó un efecto inductivo sobre la actividad enzimática de hemoperoxidasas que pudiera estar relacionado con la posible transformación del contaminante, ya que se ha demostrado que algunas enzimas de plantas son capaces de la oxidación de compuestos aromáticos mono y policíclicos, y estas enzimas podrían constituir la vía principal de detoxificación de estos compuestos, por lo que se sugiere que la naturaleza de estas enzimas (las hemoperoxidasas) pudieran tener un rol de este tipo, además de que los niveles de estos sistemas enzimáticos pueden alterarse por condiciones de estrés del ambiente y con ello, considerarse como biomarcadores no específicos de la contaminación ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Abisaí García Mendoza por su invaluable ayuda y colaboración en la colecta del material biológico, y al Jardín Botánico Exterior de la UNAM por la disposición de la adquisición del material biológico.

El segundo autor agradece a la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN el apoyo financiero otorgado al Proyecto SIP: 20060749 para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Aceves, J., 1993. GraphPad Software. GraphPad InStat, V2.03.
- Alkio, M., T.M. Tabuchi, X. Wang & A. Colón-Carmona, 2006. "Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive

- response-like symptoms". *J. Exp. Bot.*, **56**: 2983-2994.
- Baek, K.H., H.S. Kim, H.M. Oh, B.D. Yoon, J. Kim & I.S. Lee, 2004. "Effects of crude oil, oil components and bioremediation on plant growth". *J. Environ. Sci. Heal. A.*, **39**: 2473-2484.
- Bezael, L., Y. Hadar, P.P. Fu, J.P. Freeman & C.E. Cerniglia, 1996. "Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*". *App. Environ. Microbiol.*, **62**: 2547-2553.
- Bjorseth, A., A. Glunde & A. Lindskog, 1979. "Long-range transport of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Atmos. Environ.*, **13**: 45-53.
- Bokern, M., M. Nimtz & H.H. Harms, 1996. "Metabolites of 4-n-nonylphenol in wheat cell suspension cultures". *J. Agri. Food Chem.*, **44**: 1123-1127.
- Bouchez, M., D. Blanchet & J.P. Vandercastelle, 1995. "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations : inhibition phenomena and cometabolism". *App. Microbiol. Biotechnol.*, **43**: 156-164.
- Bradford, M., 1976. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Braemer, R., Y. Tsoutsias, M. Hurabielle & M. Paris, 1987. "Biotransformation of quercetin and apigenin by a cell suspension culture of *Cannabis sativa*". *Planta Med.*, **53**: 225-226.
- Campanella, B., 2000. "Impact of root exudates on bioavailability of hydrophobic organic pollutants". Inter Cost Workshop on Bioremediation. COST ACTION 831: 15-18 Nov., Sorrento, Italy.
- Chareonviriyaphap, T., P. Rongnoparut, P. Chantarumpom & M.J. Bangs, 2003. "Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand". *J. Vector Ecol.*, **28**: 108-116.
- Chroma, L., M. Mackova & P. Kucerov, 2002. "Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs". *Acta biotechnol.*, **22**: 35-41.
- Connon, R., R.E. Dewhurst, M. Crane & A. Callaghan, 2003. "Haem peroxidase activity in *Daphnia magna*: a biomarker for sub-lethal toxicity assessments of kerosene-contaminated groundwater". *Ecotoxicology*, **12**: 387-395.
- Czuba, M., 1987. "Methyl mercury toxicity in plant cultures: modification of resistance and demethylation of resistance and demethylation by light and/or 2,4 dichlorophenoxy acetic acid". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **13**: 191-201.
- Estimé, L. & J.P. Rier, 2001. "Disappearance of polychlorinated biphenyls when incubated with tissue cultures of different plant species". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66**: 671-677.
- Fletcher I.S., A.W. Groeger & J.C. McFarlane, 1987. "Metabolism of 2-chlorobiphenyl by suspension cultures of Paul's Scarlet Rose". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**: 960-965.

- Flocco, C.G., A. Lobalbo, M.P. Carranza, M. Bassi, A.M. Giuletti & W. P. Mac Cormack, 2002. "Some physiological, microbial and toxicological aspects of the removal of phenanthrene by hydroponic cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.)". *Int. J. Phytoremed.*, **4**: 169-186.
- Franco, R.J. & M.T. García, 1995. "Ensayo demostrativo sobre la propagación de violeta africana *Saintpaulia ionantha* Wendl. por cultivo de tejidos". *Ann. Esc. Nac. Cienc. Biol. México*, **40**: 107-115.
- Fujikawa, K., F.L. Fort, K. Samejima & Y. Sakamoto, 1993. "Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test". *Mutat. Res.*, **290**: 175-182.
- Furuya, T. Y. Asada, Y. Matura, S. Mizobata & H. Hamada, 1998. "Biotransformation of β - thujaplicin by cultured cells of *Eucalyptus perriana*". *Phytochemistry*, **46**: 1355-1358.
- Gao, Y.Z. & L.Z. Zhu. 2004. "Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils". *Chemosphere*, **55**: 1169-1178.
- Goel A., G. Kumar, G.F. Payne & S.K. Dube, 1997. "Plant cell biodegradation of a xenobiotic nitrate ester, nitroglycerin". *Nat. Biotechnol.*, **15**: 174-177.
- Golan-Goldhirsh, A., D. Barazani, A. Nepovim, P. Soudek, S. Smrcek, L. Dufkova, K. Sarka, Y. Kim, P. Schröder & T. Vanek, 2004. "Plant response to heavy metal and organics pollutants in cell culture and at whole plant level". *J. Soil Sediment.*, **4**: 133-140.
- Groeger, A.W. & J.S. Fletcher, 1988. "Influence of increasing chlorine content on the accumulation and metabolism of polychlorinated biphenyls by Paul's Scarlet Rose cells". *Plant Cell Rep.*, **7**: 329-332.
- Günther, W.F. & G.E. Jones, 1988. "Two stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures". *App. Environ. Microbiol.*, **54**: 929-936.
- Haeseler, F., D. Blanchet, V. Druelle, P. Werner, J.P. Vandecastelle, 1999. "Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: bioremediation potential and pollutant mobility". *Environ. Sci. Technol.*, **33**: 4379-4384.
- Hamada H., H. Yasumune, Y. Fuchikami, T. Hirata, I. Sattler, H.J. Williams & A.I. Scott, 1997. "Biotransformation of geraniol, nerol and (+) – and (-)-carvone by suspension cultured cells of *Catahranthus roseus*". *Phytochemistry*, **44**: 615-621.
- Harms H.H., 1992. "In vitro systems for studying phytotoxicity and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants". *Pestic. Sci.*, **35**: 277-281.
- Harms, H. & C. Langebartels, 1986. "Standardized plant cell suspension test systems for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics". *Plant Sci.*, **45**: 157-165.

- Harvey, P.J., B.F. Campanella, P.M.L. Castro, H. Harms, E. Lichtfouse, A.R. Schäffner, S. Smrcek & D. Wreck-Reichhart, 2002. "Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenol". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **9**: 29-47.
- Heitkamp, M.A. & C.E. Cerniglia, 1988. "Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below and oil field". *App. Environ. Microbiol.*, **54**: 1612-1614.
- Hemingway, J. & H. Ranson, 2000. "Insecticide resistance in insect vectors of human disease". *Ann. Rev. Entomol.*, **45**: 371-391.
- Hirata T., H. Hamada, T. Aoki & T. Suga, 1982. "Stereo selectivity of the reduction of carvone and dihydrocarvone by suspension cells of *Nicotiana tabacum*". *Phytochemistry*, **21**: 2209-2212.
- Jian, Y., L. Wang, P.F. Peter & H.T. Yu, 2004. "Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list". *Mutat. Res.*, **557**: 99-108.
- Kanaly, R.A. & S. Harayama, 2000. "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria". *J. Bacteriol.*, **182**: 2059-2067.
- Knops M., J. Schphan & B. Schmidt, 1995. "Biotransformation of 4-nitrophenol by a fermenter grown cell suspension culture of soybean (*Glycine max*): isolation and identification of conjugates". *Plant Sci.*, **109**: 215-224.
- Kolb, M. & H. Harms, 2000. "Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants". *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**: 1304-1310.
- Kucerová, P., C. in der Wiesche, M. Wolter, T. Macek, F. Zadrazil & M. Macková, 2001. "The ability of different plant species to remove polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls from incubation media". *Biotech. Lett.*, **23**: 1355-1359.
- Kuhn, A., H.J. Ballach & R. Wittig, 2004. "Studies in the biodegradation of 5 PAHs (phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene and benzo (a) pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings". *Environ. Sci. Pollut. R.*, **11**: 22-32.
- Kulakow, P., A. Schwab & M.N. Banks, 2000. "Screening plant species for growth on weathered petroleum hydrocarbon-contaminated sediments". *Int. J. Phytoremed.*, **2**: 297-317.
- Kusk, K.O., 1981. "Comparison of the effects of aromatic hydrocarbons on laboratory alga and natural phytoplankton". *Bot. Mar.*, **24**: 611-613.
- Kvesitadze G., M. Gordeziani, G.K. Khatishvili & J.J. Ramsden, 2001. "Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation". *J. Biol. Phys. Chem.*, **1**: 49-57.
- Laurent, F.M.G., 1994. "Chloroaniline peroxidation by soybean peroxidases". *Pestic. Sci.*, **40**: 25-30.

- Laurent F. & R. Scalla, 1999. "Metabolism and cell wall incorporation of phenox-acetic acid in soybean cell suspension culture". *Pestic. Sci.*, **55**: 3-10.
- Lucero M.E., W. Mueller, J. Hubstenberger, G.C. Phillips & M.A. O'Connell, 1999. "Tolerance to nitrogenous explosives and metabolism of TNT by cell sus-pensions of *Datura innoxia*". *In Vitro Cell Dev. Plant.*, **35**: 480-486
- Macková M., T. Macek, J. Burkhard, J. Ocenasková, K. Demnerová & J. Pazvarova, 1997. "Biodegradation of polychlorinated biphenyls by plant cells". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **39**: 317-325.
- Mc. Cutcheon, S.C. & J.L. Schnoor, 2003. "Overview of phytoremediation and control of wastes": In: Mc. Curcheon S.C. & J.L. Schnoor (eds.) *Phytore-mediation: transformation and control of contaminants*. New Jersey, John Willey & Sons, Inc.
- Moody, J.D., J.P. Freeman, D.R. Doerge & C.E. Cerniglia. 2001. "Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1". *App. Environ. Micro-biol.*, **67**: 1476-1483.
- Morehead, N.R., B.J. Eadie, B. Lake, P.D. Landrum & D. Berner, 1986. "The sorption of PAH onto dissolved orga-nic matter in lake Michigan waters". *Chemosphere*, **15**: 403-412.
- Murashige, T. & A. Skoog., 1962. "A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue". *Physiol. planta-rum*, **15**: 473-497.
- Naoshima Y., Y. Akabake & F. Watanabe, 1989. "Biotransformation of ace-toacetic esters with immobilized cells of *Nicotiana tabacum*". *Agric. Biol. Chem.*, **53**: 545-547.
- Nepovim A., M. Hubálek, R. Podlipna, S. Zeman & T. Vanek, 2004. "In vitro degradation of 2,4,6 trinitoluene using plant tissue cultures of *Solanum avicu-lare* and *Rheum palmatum*". *Eng. Life Sci.*, **4**: 46-49.
- Nylund, L., P. Heikkila, M.P.L. Hameila, K. Linnainmaa & M. Sorsa, 1992. "Geno-toxic effects and chemical composition of four creosotes". *Mutat. Res.*, **265**: 223-226.
- Olivares, S. E., 1989. Paquete de diseños experimentales FAUNL. Versión 1.4. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L. México.
- Orihara Y., H. Miyatake & T. Furuya, 1991. "Triglucosylation on the biotransfor-mation of (+) menthol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*". *Phytoche-mistry*, **30**: 1843-1845.
- Orihara Y., T. Huruya, N. Hashimoto, Y. Deguchi, K. Tokoro & T. Kanishawa, 1992. "Biotransformation of isoeugenol and eugenol by cultured cells of *Eu-calyptus perriniana*". *Phytochemistry*, **31**: 827-831.
- Ortega-Calvo, J.J. & C. Saiz-Jiménez, 1998. "Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil". *App. Environ. Microbiol.*, **64**: 3123-3126.

- Otani Sh., Y. Kondo, Y. Asada, T. Furuya, H. Hamada, N. Nakajima, K. Ishihara & H. Hamada, 2004. "Biotransformation of (+)-catechin by plant cultured cells of *Eucalyptus perriana*". *Plant Biotechnol.*, **21**: 407-409.
- Peakall, D.B., 1994. "The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction". *Ecotoxicology*, **3**: 157-160.
- Pilon-Smits, E., 2005. "Phytoremediation". *Ann. Rev. Plant Biol.*, **56**: 15-39.
- Pipe, R.K. & M.N. Moore, 1986. "An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme B-glucuronidase in digestive cells of the periwinkle *Littorina littorea*". *Aquat. Toxicol.*, **8**: 65-76.
- Rodríguez D.A., 2006. "Análisis molecular y fisiológico de la respuesta al estrés hídrico de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*". Tesis de Doctorado, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, DF.
- Samsøe-Petersen, L., E.H. Larsen, P.B. Larsen & P. Bruun, 2002. "Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils". *Environ. Sci. Technol.*, **36**: 3057-3063.
- Sanderman, H., 1992. "Plant metabolism of xenobiotics". *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 82-84.
- , 1994. "Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept". *Pharmacogenetics*, **4**: 225-241.
- Sandermann, H., D. Scheel & T. Trenck, 1984. "Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals". *Ecotox. Environ. Safe*, **8**: 167-182.
- Savino, J.F. & L.L. Tanabe, 1989. "Sublethal effects of phenanthrene, nicotine and pinane on *Daphnia pulex*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**: 778-784.
- Smith, B.A., M. L. Reider & J. S. Fletcher, 1982. "Relationship between vital staining and subculture growth during the senescence of plant tissue cultures". *Plant physiol.*, **70**: 1228- 1230.
- Song, J., I. Kanazawa, K. Sun, T. Murata & K.K. Yokoyama, 1999. "Color coding the cell death status of plant suspension cells". *BioTechniques*, **26**: 1060-1062.
- Stiborova M. & P. Anzenbacher, 1991. "What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochrome P-450 or peroxidase?". *Gen. Physiol.*, **10**: 209-216.
- Suresh, B. & G.A. Ravishankar, 2004. "Phytoremediation a novel and promising approach for environmental clean-up". *Crit. Rev. Biotechnol.*, **24**: 97-124.
- Wilken A., C. Bock, M. Bockern & H. Harms, 1995. "Metabolism of different PCB congeners in plant cell cultures". *Environ. Chem. Toxicol.*, **14**: 2017-2022.
- Wittig, R., H.J. Ballach & A. Kuhn, 2003. "Exposure of the roots of *Populus nigra* L. c.v. Loenen to PAHs and its

- effect on growth and water balance". *Environ. Sci. Pollut. R.*, **10**: 235-244.
- Xu, S.Y., Y.X. Chen, W.X. Wu, K.X. Wang, Q. Lin & X. Q. Liang, 2006. "Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation". *Sci. Total Environ.*, **363**: 206-215.
- Zeigel, B.Z., 1993. "Plant peroxidases-an organismic perspective". *Plant Growth Regul.*, **12**: 303-312.