



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

---

UNIDAD I ZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CITOCROMO  
P4501A1 EN UNA PLANTA (*Cyperus laxus*) FITORREMEDIADORA DE  
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS”

TESIS QUE PRESENTA

HIDROBIÓLOGA SUGEY LÓPEZ MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

TUTOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

COTUTORA

Dra. Margarita E. Gallegos Martínez

ASESORES INTERNOS

Dra. Laura J. Pérez Flores

M en B. Erika Escalante Espinosa

ASESOR EXTERNO

Dr. Enrique García Hernández

México, D.F.

Diciembre 2003

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del patrón de programas de postgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-O; y actualmente se encuentra en el padrón de programas del PIFOP- CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca- crédito otorgada por CONACYT con número 162600

EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CITOCROMO  
P4501A1 EN UNA PLANTA (*Cyperus laxus*) FITORREMEDIADORA DE  
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

TESIS QUE PRESENTA LA

Hidrobióloga: Sugey López Martínez

Para optar el grado de:

Maestra en Biología Experimental

TUTOR

Dr. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALPA

## COMITÉ TUTORAL

Tutor

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
Laboratorio de Residuos Sólidos  
Departamento de Biotecnología  
UAM-I

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

Co-tutor

Dra. Margarita E. Gallegos Martínez  
Laboratorio de Ecosistemas Costeros  
Departamento de Hidrobiología  
UAM-I

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

Asesores Internos

Dra. Laura J. Pérez Flores  
Laboratorio  
Departamento de Ciencias de la Salud  
UAM-I

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

M en B. Erika Escalante Espinosa  
Laboratorio de residuos Sólidos  
Departamento de Biotecnología  
UAM-I

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

Asesor Externo

Dr. Enrique García Hernández  
Instituto de Química  
UNAM

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

Este trabajo esta dedicado a:

Mis amados padres por el hecho de darme la vida, por el apoyo recibido, por estar presentes a lo largo de todos mis estudios:

Juanita Y Juan Manuel

A mis hermanos Tania, Berenice y Juan por apoyarme y hacerme feliz.

A mis hermosas sobrinas que me inspiran a seguir adelante.

A El que con su esencia y luz alumbra mi camino sin dejarme un instante sola.

A toda la familia Martínez y Castillo: Gudelia, Leticia, Jorge, Carmen, Javier por creer en mi.

A la familia López especialmente a Elda e Ignacio por su apoyo.

A la familia Alvarado del Prado especialmente a Jesús, Angelina y Miguel.

A mis amigos incondicionales Abel, Laura, Laura Maricela, Yolanda, Norma, Cristina, y Juanito, Lupita, Marcela, por creer en mi y apoyarme siempre.

A Herbey Fernando por estar presente en esta faceta de mi vida, por el apoyo brindado y el amor.

“ El arte de estudiar mas que una actitud teórica o comparativa es una expresión creativa, producida del espíritu”

## Agradecimientos:

A la Dra. Laura Pérez, a la M. En C Beatriz, al Dr. Andrés por el equipo y el apoyo brindado, especialmente a la M en Q. Edith por su valiosa colaboración en la parte experimental y amistad.

A CONACyT por la beca otorgada.

A todos los integrantes del laboratorio ; Adriana, Nancy, Liliana, Ana, Tania, Alex Idefonso y Ulises.

Especial mente al director de esta tesis por el apoyo, aprecio y consejos por su capacidad de ver en mi algo especial para poder seguir adelante, Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, a mis asesores; Erika Escalante, Laura Pérez, Margarita Gallegos y Enrique García.

## TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	8
2. Planteamiento del problema	11
3. Objetivos	12
3.1 Objetivos específicos	12
4. Materiales y Métodos	13
4.1 Diseño de la unidad experimental	14
4.2 Preparación de la mezcla de suelo	14
4.3 Propagación vegetativa	15
4.4 Procedimiento de muestreo	15
4.5 Inoculación de los contenedores	17
4.6 Determinación de hidrocarburos totales del petróleo	17
4.7 Determinación de pH	17
4.8 Determinación de humedad	17
4.9 Cuantificación de microorganismos	17
4.10 Extracción de fracción microsomal	18
4.11 Cuantificación de proteínas	18
4.12 Pruebas estadísticas	18
4.13 Determinación de actividad enzimática	18
4.14 Ensayo de inducción de la enzima	19
5. Resultados	20
5.1 Aclimatación de la planta	21
5.2 Remoción de hidrocarburos del petróleo	22
5.3 Cuantificación de microorganismos	27
5.4 Determinación de pH	31
5.5 Determinación de humedad	31
5.6 Detección de actividad enzimática	32
6. Conclusiones	39
7. Recomendaciones	41
8 Referencias bibliográficas	43

## 1. Introducción

La industria del petróleo es característica de nuestra época. Cada año se extraen cerca del millón de toneladas de petróleo de yacimientos subterráneos. La mayor parte se utiliza como combustible en forma de gasolina, diesel y turbosina,. Junto con algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) son la principal fuente energética, tanto industrial como doméstica. Alrededor del 15 % del petróleo se utiliza como sustrato para la síntesis de otros compuestos, principalmente plásticos, un grupo heterogéneo que incluye polialquenos (como el polietileno, polibutileno, polipropileno), poliestirenos y cloruro de polivinilo (PVC). El resto, fracciones más pesadas, llamados asfaltenos, se utilizan como pavimento (Bezalel et al., 1996).

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno, nitrógeno y trazas de metales. Es compleja dada la capacidad del átomo de carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, organizándose como cadenas o ciclos.

Este tema de contaminación es especialmente importante para esta generación, ya que el uso masivo de derivados del petróleo ha incrementado la concentración de compuestos xenobióticos en la biósfera (April & Sims. 1990). Xenobióticos son compuestos elaborados por el hombre. En algunos casos, los xenobióticos no son biodegradables, es decir, no son utilizados como sustrato por los seres vivos, sino que se acumulan en la superficie del planeta. Ejemplo de esto son las toneladas de pesticidas e insecticidas que se aplican cada año.

En los últimos 50 años el fenómeno de la contaminación ambiental es una consecuencia del abuso de hidrocarburos como materia prima y fuentes de energía, el mal manejo en extracción y transporte, ha ocasionado el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente, generando una amenaza progresiva a la salud, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales. Esta condición reta a la sociedad de manera global para encontrar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico. Una medida que ha tenido éxito significativo es la aplicación de técnicas de biorremediación y biorrecuperación de suelos, sedimentos y acuíferos (Rea et al., 1998). La biorremediación es una alternativa biológica para el tratamiento de suelos contaminados, un ejemplo fue la remediación con una preparación microbiana (Hozumi et al., 2000; Tsutsumi et al., 2000). La biorremediación utiliza generalmente microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas). Recientemente, se ha comenzado a utilizar plantas superiores para algunas aplicaciones. Aunque han surgido nuevos enfoques en la biorremediación basados en la biología molecular y la ingeniería de bioprocesos, la biorremediación clásica continúa siendo el enfoque favorito para el

procesamiento de desechos biológicos para evitar la propagación de bacterias patógenas (Barbee et al., 1992). Algunos microorganismos pueden degradar de manera natural compuestos orgánicos, esta capacidad se explota para facilitar la degradación de contaminantes (pesticidas, HPA, entre otros) y para operaciones de limpieza de desechos in situ. La aplicación de ensayos de monitoreo sencillos y de alta resolución ha permitido identificar aquellas especies capaces de degradar contaminantes mientras que el uso de sondas génicas específicas permite determinar la abundancia relativa de estos microorganismos (Bouwer & Zehnder; 1993). El uso de novedosas técnicas y herramientas para la biorremediación in situ, en biofiltros y en biorreactores ha contribuido al rápido crecimiento de este campo (Hoff, 1993; Leahy, 1990). La biorremediación ha demostrado ser un complemento costeable y benéfico para ser usado en combinación con métodos químicos y físicos tradicionales como el composteo, la incineración y la extracción con solventes, en el tratamiento de desechos y en la descontaminación del medio ambiente (Anderson, 1993).

De las diferentes fracciones del petróleo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son los de mayor toxicidad y al mismo tiempo los más recalcitrantes a los métodos convencionales de degradación. Los HPA son un grupo de compuestos aromáticos que contienen dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados. Los HPA de bajo peso molecular son susceptibles de biodegradación, sin embargo, los de alto peso molecular son más difíciles de ser degradados biológicamente (Cerniglia, 1993; Park et al., 1990; Wilson & Jones, 1993). Las tasas de degradación de HPA son variables y no dependen solamente de su estructura química, sino también de parámetros fisicoquímicos del sitio, así como del número y variedad de microorganismos presentes (Volkerling et al., 1992). Las variables más importantes que limitan la biodegradación de HPA de alto peso molecular son la transferencia de masa, las heterogeneidades espaciales y las pérdidas abióticas. Dada la baja solubilidad de éstos compuestos en agua, una de las estrategias para la biorremediación en suelo es la adición de surfactantes, naturales o sintéticos, que solubilicen a los HPA y aumenten su biodisponibilidad (Allen et al., 1999; Barkay et al., 1999; Desai & Banat, 1997; Ramana & Karanth, 1989; Rosenberg & Ron, 1999). Es importante considerar que los productos de degradación de los HPA no son necesariamente menos tóxicos que las moléculas parentales, por lo que es imprescindible incorporar procedimientos de monitoreo de toxicidad en las diferentes etapas de la biorremediación. Como se mencionó anteriormente, una de las técnicas que ha recibido atención recientemente es la fitorremediación, tecnología emergente que se emplea en distintas unidades de proceso o plantas de producción para remediar el suelo, los sedimentos, agua superficial y aguas subterráneas que se encuentran contaminados por metales tóxicos o compuestos orgánicos e hidrocarburos. Esta tecnología involucra diferentes mecanismos tales como: fitoextracción, fitoacumulación, rizofiltración,

fitodegradación y fitovolatilización; en todos éstos mecanismos las plantas participan activamente (Finnerty, 1994), una de las plantas que aún no se reporta pero que ha sido probada en la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa es *Cyperus laxus* Lamouroux, planta nativa y abundante del pantano que crece en concentraciones altas de hidrocarburos (Gallegos et al., 2000).

Las ciperáceas son hierbas anuales o perennes. *C. laxus* crece en bosques tropicales, en claros y a lo largo de caminos. Tiene raíces fibrosas de color café ligero u oscuro. Florecen a lo largo de todo el año principalmente de junio a diciembre. Su distribución en México es mayoritariamente al sur del país: Veracruz, Morelos, Nayarit, Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Tabasco (Gordon, 1994; Adams, 1994). *C. laxus* taxonómicamente pertenece a la división de las Traqueofitas de la clase: Angiosperma y de la subclase: Monocotiledónea, se encuentra en la Familia: Cyperaceae, y es del género: *Cyperus*. especie: *Cyperus laxus* Lamouroux.

En un sistema biológico como son las plantas y en este caso *C. laxus*, hay diferentes mecanismos eficientes por los cuales se realiza la detoxificación de los productos que generan el estrés, causado por la presencia de xenobioticos que alteran su metabolismo natural; en ellos participan varias moléculas, diferentes tipos de enzimas y ocurren infinidad de reacciones químicas. Una de las enzimas que participan en la eliminación de moléculas exógenas es la enzima citocromo P450 (CYTP450) (Shinji & Jeffrey, 2000).

El CYTP450 es una hemoproteína que se encuentra normalmente en el retículo endoplásmico liso. Puede reaccionar con oxígeno y con el monóxido de carbono. El CYTP450 es una familia de proteínas muy similares; se conocen varios centenares de miembros de esta familia cada uno con una especificidad por sustrato diferente (Lehninger, 1996). Esto significa que diferentes complejos enzimáticos de CYTP450 se pueden encontrar en individuos de una misma especie (Guengerich, 1993). Las enzimas CYTP450 son los componentes terminales del sistema enzimático oxigenasa de función mixta (MFO) (Livingstone, 1993). Esta enzima cataliza los primeros pasos de deshalogenación oxidativa de compuestos haloaromáticos. La enzima se encuentra en todos los organismos vivos. Ha sido muy estudiada en el hígado de los humanos, también hay estudios en hongos, pero ha sido poco estudiada en plantas, en la literatura se ha encontrado que en general tiene la misma función de detoxificación en los diferentes organismos (Luet-Lot, 1998). Los procariontes contienen formas solubles de esta enzima, los eucariontes presentan esta enzima incorporada a la membrana (microsomal) y las plantas poseen formas solubles y también formas incorporadas a la membrana, permitiendo incrementar la capacidad detoxificadora (Kavesitadze et al., 2001). Prácticamente la enzima CYTP450 es utilizada para el ataque inicial oxidativo en la

ruta de la mineralización de HPA por algunas bacterias y hongos (Cerniglia, 1992; Harayama, 1997).

Entre las funciones más importantes que realizan las enzimas CYTP450 destaca la detoxificadora que elimina sustancias exógenas, mediante la incorporación de grupos funcionales hidrosolubles a compuestos de carácter lipofílico (Shugart, 1996). El CYTP450 también realiza funciones de metabolismo endógeno o degradación para el aprovechamiento de sustancias del propio organismo, tales como: esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles (A y D), alcaloides endógenos. Aquéllas involucradas en la síntesis de óxido nítrico gaseoso simple, que son utilizadas entre otras cosas, como toxina anti-patógena. En algunos organismos sirve como mecanismo de defensa ante el efecto de alcaloides tóxicos de plantas y les aporta, por tanto, un alimento abundante que no es apetecible por otros organismos (Khatishashvili et al., 1997), involucrándose en la biosíntesis de productos secundarios (alcaloides y hormonas), así como en la detoxificación de herbicidas y otros xenobióticos (Irmiler et al., 2000; Guengerich, 1993).

En el crecimiento de las plantas un factor importante es la humedad, sin embargo no se ha relacionado el contenido de humedad con la capacidad de la planta para absorber y metabolizar diferentes tipos de contaminantes orgánicos, también es conocido que la capacidad de detoxificación es debida a la intervención de las enzimas, una de ellas es el citocromo P4501A1 (CYTP4501A1). Se ha incrementado el interés por estudiar el complejo catalítico activo pero no se ha clarificado la relación entre detoxificación y la expresión de la actividad enzimática de CYTP4501A1.

## 2. Planteamiento del problema

Datos experimentales de nuestro grupo de trabajo sugieren que *Cyperus laxus* en presencia de la microbiota alojada en la raíz de la misma y en el suelo transforma hidrocarburos existentes. Esta planta es nativa del pantano contaminado y se conocen las condiciones ambientales de humedad cambiantes en el ecosistema. Por tal motivo, se pretende relacionar las tasas de degradación de hidrocarburos con respecto al contenido de humedad.

Se desconocen los mecanismos por los que esta especie resiste las altas concentraciones de hidrocarburos en las que se desarrolla, es muy probable que el complejo enzimático CYTP4501A1 esté involucrado en la remoción de hidrocarburos. Se ha comprobado la participación activa de estos complejos enzimáticos en procesos de detoxificación de diferentes organismos, animales, vegetales y hongos (Gramss et al.,

1997). Finalmente se conocen antecedentes de la existencia de monoxigenasas en raíces de plantas (Khatisashvili et al., 1997).

### 3. Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la expresión de la actividad enzimática de CYTP4501A1, en *Cyperus laxus*, planta fitorremediadora de suelos contaminados con hidrocarburos.

#### 3.1 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos son:

1. Establecer la relación entre la remoción de hidrocarburos y diferentes condiciones de humedad e inoculación exógena de microorganismos.
2. Establecer la relación de el contenido de humedad y las características fenológicas de la planta.
3. Establecer la técnica de determinación de actividad enzimática del CYTP4501A1 en raíz.
4. Determinar la actividad enzimática del CYTP4501A1 en raíces de *Cyperus laxus*, creciendo en suelo contaminado con hidrocarburos, en condiciones de inundación (60% de humedad), normal (30% de humedad) y de desecación (10% de humedad).
5. Establecer la relación que existe entre la expresión de la actividad del CYTP4501A1 con los procesos de fitorremediación de la raíz.
6. Determinar si la actividad enzimática del complejo CYTP4501A1 es constitutiva o inducible por hidrocarburos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Diseño de la unidad experimental

Para observar el crecimiento de raíces, se diseñó la unidad experimental, cuenta con tres paredes de vidrio (15 x 15 x 40 cm) y una de acrílico provista de dos orificios (2 cm). Se diseñó una estructura alargada para permitir que las raíces se extendieran libremente hacia abajo (Figura 4.1).

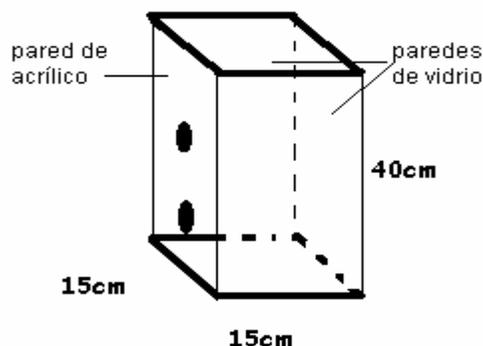


Figura 4.1 Esquema de los contenedores utilizados

#### 4.2 Preparación de la mezcla de suelo

Se prepararon en total 77 kg de suelo. La naturaleza y la distribución del tamaño de partícula se observa en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Tamaño de partícula de suelo modelo

Suelo	Malla
40% suelo mediano	(Entre la malla # 4 y la #16)
40% tezontle	(Entre la malla #4 y la #16)
20% suelo fino	( Entre la malla #16)

La mezcla se homogeneizó y una vez hecho esto se tomó una muestra de 30 g para medir hidrocarburos totales del petróleo (HTP), para cada contenedor se pesó 6.5 kg y se hidrató a 30 % de humedad. Se vació a los contenedores los respectivos 6.5 kg y se dejó reposar durante 24 horas, para una mejor hidratación.

### 4.3 Propagación vegetativa

Se utilizó una planta madre de aproximadamente 30 cm de diámetro modular originaria del sitio contaminado. La planta se transportó desde el pantano (Minatitlán) hasta el invernadero de la UAM-I con el terrón silvestre y se mantuvo en aclimatación bajo condiciones del invernadero (30°C ; 75% humedad relativa) durante seis meses. Posteriormente, se separaron tres módulos para cada contenedor y se dejó uno en el terrón para observar el estrés por herida. Antes las raíces de la planta madre se lavaron con agua corriente. Los racimos de los tres módulos se plantaron en cada contenedor después de medir la longitud de la raíz y de los tallos. Se dejaron aclimatar hasta que los nuevos módulos tuvieron las mismas características (número de módulos, número de inflorescencia, longitud de tallos) de los módulos inicialmente plantados (Figura 4.2).

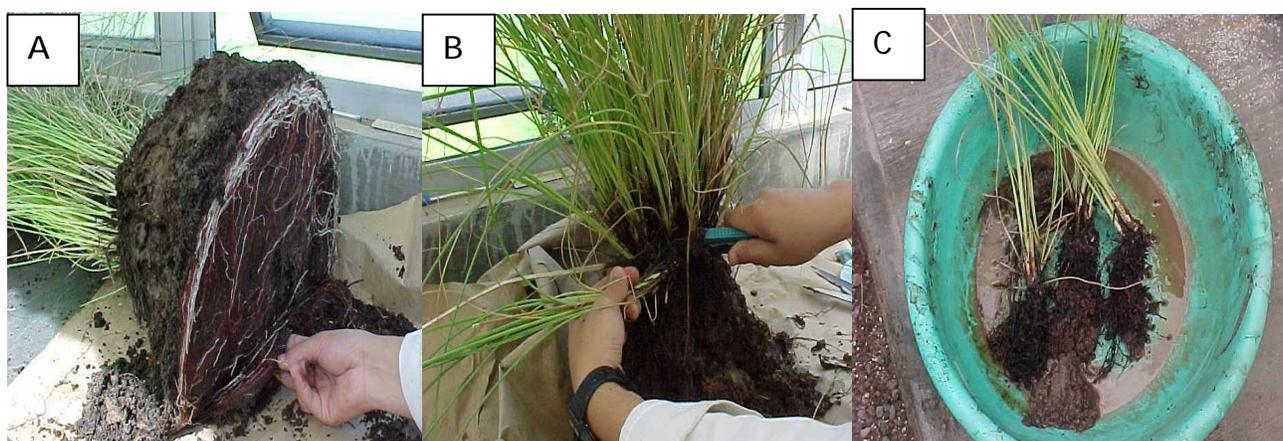


Figura 4.2 Propagación vegetativa. (A) Planta madre traída del sitio contaminado con su terrón silvestre, (B) corte de los módulos, (C) los racimos modulares que se sembraron en los contenedores.

### 4.4 Procedimiento de muestreo

Después de la propagación vegetativa se comenzó con el experimento de los diferentes tratamientos como se muestra en la tabla 4.2 (en total se contó con nueve contenedores).

Tabla 4.2 Tratamiento de los contenedores

Número de contenedor (Pot)	Tratamiento
1	Inundado (60% de humedad)
2	Inoculado (30% de humedad)
3	Inundado (60% de humedad)
4	Inoculado (30% de humedad)
5	Inundado (60% de humedad)
6	Normal (30% de humedad)
7	Normal (30% de humedad)
8	Normal (30% de humedad)
9	Seco (10% de humedad)

El muestreo del suelo se llevó acabo a través de los orificios en el contenedor, a diferentes niveles (figura 4.3), estos muestreos se realizaron por triplicado. En la figura 4.3 se observa la distribución de los orificios para las tomas de muestra.

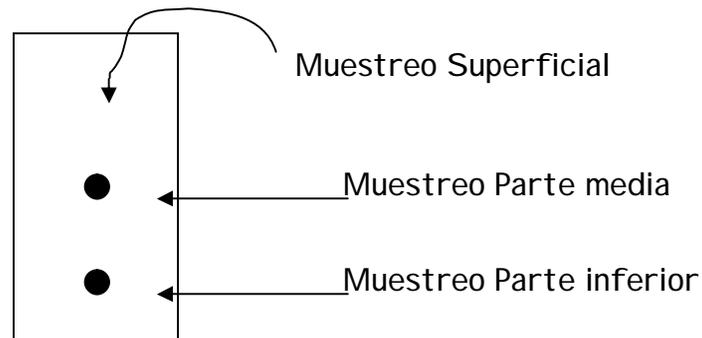


Figura 4.3 Figura que ejemplifica la toma de alícuotas para determinar las diferentes variables de respuesta a los diferentes niveles del contenedor

Los muestreos se realizaron para determinar las variables: pH, humedad, hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y cuenta viable en placa.

#### 4.5 Inoculación de los contenedores

El inóculo, obtenido a partir de la rizosfera de *Cyperus laxus*. (Díaz Ramírez et al., 2003), estaba constituido por 10 cepas de bacterias y 3 cepas de hongos que se cultivaron (30°C) por separado en matraces Erlenmeyer (250 mL). Los 30mL de cultivo se mezclaron en iguales proporciones y se adicionaron a dos contenedores.

#### 4.6 Determinación de hidrocarburos totales del petróleo

Se utilizó el método 3540 de la EPA. Este método se puede aplicar para el aislamiento y concentración de compuestos orgánicos insolubles y poco solubles en agua. Se basa en la extracción de compuestos volátiles y no volátiles de sólidos como suelo sedimentos. El procedimiento fue el siguiente: se pesaron 30 g de suelo (peso seco) y 30 g se sulfato de sodio anhidro (Baker, grado reactivo) en un cartucho de celulosa (Wathman 33 x 80 mm); éste se colocó en el sistema de Soxhlet y se adicionaron 160 mL de mezcla acetona:hexano (1:1) (Baker, grado reactivo) dejando en reflujo de 18 a 24 horas. Posteriormente, el solvente se evaporó en una charola de aluminio (a peso constante) y la concentración de HTP se determinó por diferencia de peso (USEPA, 1995).

#### 4.7 Determinación de pH

A 1 g de suelo se le adicionaron 10 mL de agua destilada,. Se agitó la suspensión por 10 minutos y el pH se leyó en un potenciómetro (Conductronic pH 130) (Aguilar, 1987). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

#### 4.8 Determinación de humedad

Se tomó una alícuota de 5 g de suelo y se colocó en la termobalanza (modelo Ohaus), se registró el peso hasta el peso constante, se le restó este valor al valor inicial del peso húmedo.

#### 4.9 Cuantificación de microorganismos

El procedimiento se realizó por diluciones en serie y subsiguiente plaqueo (Alef & Nannipieri, 1995). Se reportó el número de microorganismos, como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo. Los medios de cultivo utilizados fueron Agar soya y tripticaseína (AST, Bioxon®) para bacterias y Agar papa dextrosa (PDA, Bioxon®) para hongos.

En tubos de ensayo previamente esterilizados se colocaron 3 g de suelo: 27 mL de solución isotónica. Se realizaron 10 diluciones sucesivas. Las cajas con medios (PDA y AST) se inocularon con 100  $\mu$ L de las diluciones seriadas y con la ayuda de una varilla de vidrio se distribuyó en toda la caja. Las cajas fueron incubadas a 30°C. Cada 24 horas se realizó el conteo del número de colonias hasta las 72 h.

#### 4.10 Extracción de la fracción microsomal

Se utilizó entre 25 y 30 g de peso fresco de raíz, la cual fue macerada con nitrógeno líquido en un mortero. Este molido de raíces se homogenizó con una solución (pH 6.5) que contenía: 0.1 M fosfato de sodio, 20% de glicerol (p/v), 14 mM DL dithiothreitol (DTE), 20 mM ácido ascórbico, 1% de polivinil pirrolidona (PVP) insoluble, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Pflugmacher & Sandermann, 1998). Posteriormente, se filtró el extracto. Ya filtrado el extracto se centrifugó a 10,000 gx por 30 minutos, se removió la pastilla y se volvió a centrifugar el sobrenadante a 100,000 gx por 60 minutos. Se recuperó la pastilla (fracción microsomal), y la fracción citosólica es el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con otra solución (pH 7) que contenía; 0.02 M fosfato de potasio y 5 mM DTE.

#### 4.11 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por medio del método de Bradford (1974). Se realizó una curva patrón de albúmina, y se determinó la absorbancia a 595 nm.

#### 4.12 Pruebas estadísticas

Se realizó ANOVA y pruebas de Tuckey realizados en el programa estadístico SPSS, con un intervalo de confianza del 95%.

#### 4.13 Determinación de actividad enzimática

Para la determinación de actividad enzimática se utilizó un espectro de fluorescencia (ISS). Se colocó en la celda de reacción la fracción microsomal que contenía 1-20  $\mu$ g de proteína, también se le adiciono a la celda 10 $\mu$ L sustrato (Etoxiresorufina), 50  $\mu$ L del cofactor NADPH, se llevó hasta 2 mL con el buffer de ensayo (pH 7.6) que contenía; 0.1 M fosfato de sodio, 2.5 mM cloruro de magnesio, 100 mM Cloruro de potasio. Se realizaron cinéticas enzimáticas de 20 minutos.

Para probar el intervalo de concentración del producto que responde de una manera lineal se realizó antes una curva estándar de resorufina (producto fluorescente), para obtener un marco de respuesta que indique el orden de respuesta se utilizó el control positivo, una fracción microsomal semipurificada de hígado de conejo. La unidad de

actividad, se define como la cantidad de enzima que se requiere para formar un pmol de resorufina en un minuto en condiciones de 37°C y a pH 7.6.

#### 4.14 Ensayo de inducción de la enzima

Se trabajó con la especie *Cyperus laxus* Lamouroux. Planta nativa del sitio contaminado con hidrocarburos. Se sembraron semillas que se extrajeron de plantas maduras crecidas con hidrocarburos, que se encuentran en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Las semillas se germinaron en turba sin hidrocarburos, hasta la edad de seis meses, posteriormente, se colocaron en contenedores de vidrio con agrolita previamente contaminada con hidrocarburos extraídos de la mezcla del suelo inicial (5,000 ppm). A diferentes tiempos de exposición (0, 4, 8, 12, 48, 72, 96 y 120 hrs).

Las condiciones en que se realizó la germinación fueron las siguientes; Temperatura 25 - 30 °C, con una humedad relativa de 70 - 95% (mantenida con un sistema de aspersion controlada de agua). Periodos de luz natural de 11 a 12 horas / día.

Transcurrido el tiempo de exposición, se determinó actividad enzimática de citocromo P4501A1 utilizando el espectro de fluorescencia anteriormente mencionado 4.13.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Aclimatación de la planta

Las características anatómicas y fisiológicas de la planta hacen necesaria para su supervivencia, una gradual adaptación o aclimatación a las condiciones medioambientales del invernadero o del campo. La aclimatación de las plantas tuvo una duración de seis meses después de provocar el estrés por herida y el estrés por incremento en la concentración de hidrocarburos. Se determinaron las siguientes variables de respuesta: la altura de tallos, el número de tallos y de inflorescencias.

Después de la aclimatación se contó en total con nueve contenedores de los cuales a tres de ellos se les colocó 60% de humedad, a otros tres el 30%, un contenedor con 10% y finalmente dos con inóculo.

En la figura 5.1 Se presentan los resultados de la variación del número de tallos originales, con respecto al tiempo, para todos los tratamientos después del estrés por corte (herida) y el provocado por el incremento en la concentración de hidrocarburos, se observan los resultados de la pérdida de tallos verdes en cada contenedor desde la propagación vegetativa.

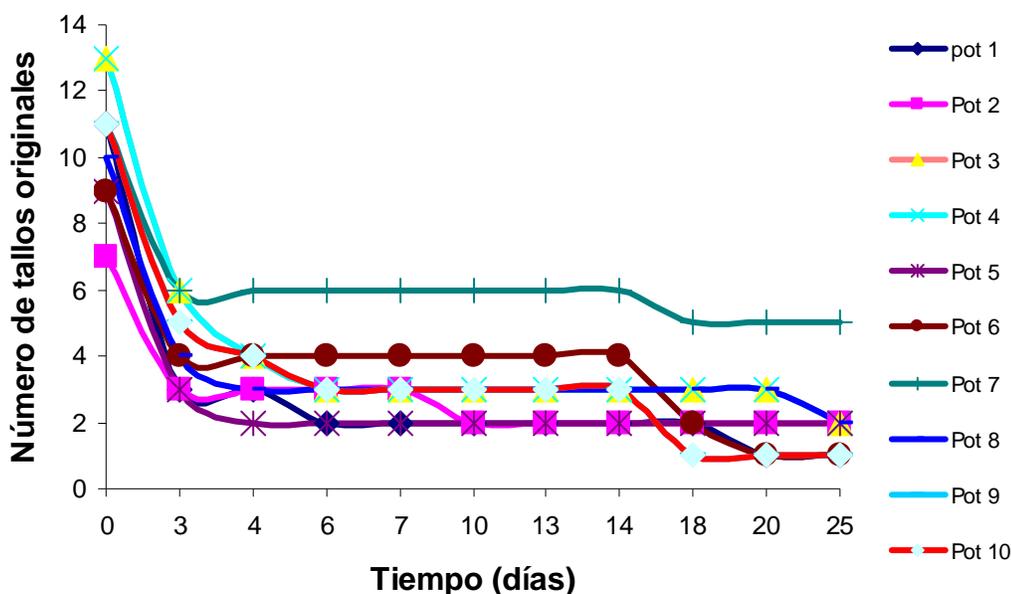


Figura 5.1 Pérdida de tallos verdes en los diferentes contenedores

Después de la propagación vegetativa se observó una pérdida de tallos verdes considerable en los nueve contenedores. Al control (pot 10) sólo se le aplicó el estrés por herida y mostró el mismo comportamiento de pérdida de tallos verdes, por lo que se puede afirmar que la pérdida de tallos verdes se debió predominantemente al estrés por herida y no al incremento de hidrocarburos.

En la figura 5.2 se observan los resultados de la presencia de tallos nuevos en todos los contenedores, 15 días después del corte y trasplante.

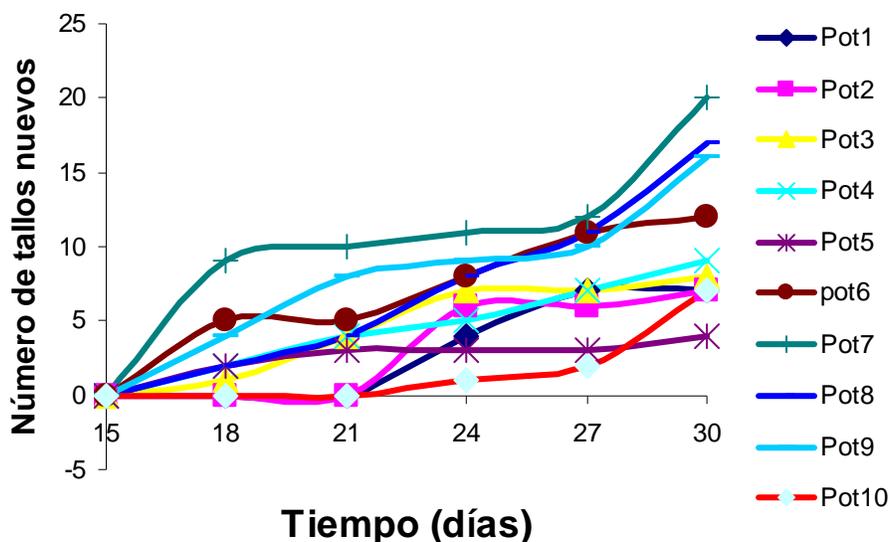


Figura 5.2 Gráfico de tallos nuevos en los diferentes contenedores

Dieciséis días después de la propagación vegetativa comenzaron a salir los nuevos tallos hasta lograr el mismo número inicial. Una vez logrado esto se inició el experimento de diferentes humedades hasta que las plantas presentaran las mismas características iniciales en variables de respuesta como son: longitud de tallo, de raíz, número de tallos verdes y número de inflorescencias. La aclimatación tuvo una duración total de seis meses aproximadamente.

Por lo que se puede afirmar que las plantas después del corte se recuperan igual en presencia o en ausencia de hidrocarburos.

## 5.2 Remoción de hidrocarburos del petróleo

Después de la aclimatación y con las diferentes condiciones de humedad, se les determinó los HTP a cada uno de los contenedores. En la figura 5.3 se observan los HTP en los contenedores que presentan 60% de humedad.

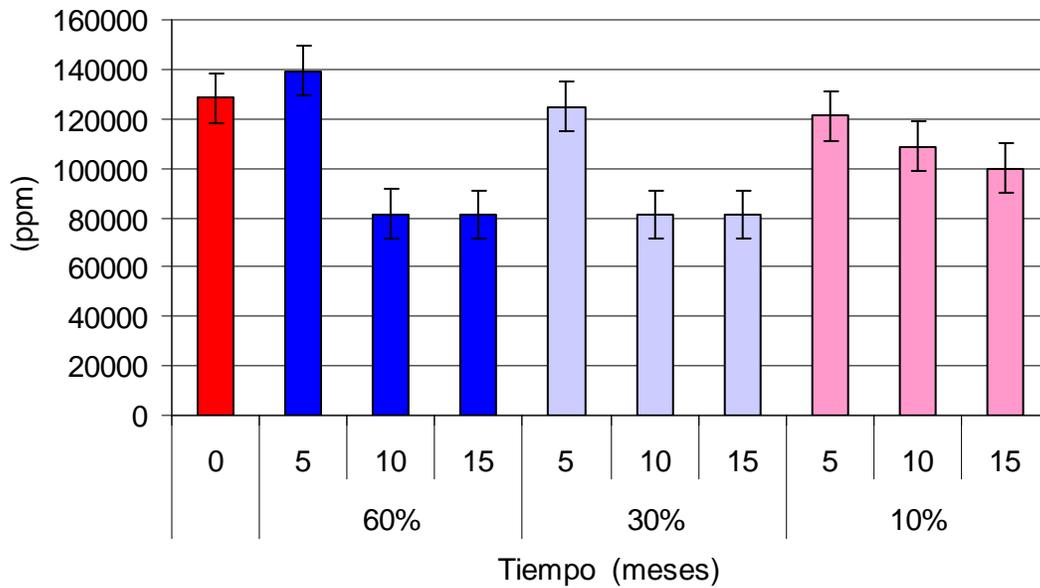


Figura 5.3 Remoción de hidrocarburos totales del petróleo en los contenedores inundados, 60 % de humedad

Lo que se puede observar es, que del tiempo cero a los cinco meses (periodo de aclimatación), no hubo diferencias significativas en la concentración de hidrocarburos. Después, de cinco a diez meses hay una importante remoción de hidrocarburos, aun que de diez a quince meses no se observa diferencia

En la figura 5.4 Se presentan los resultados de HTP en el contenedor con 10% de humedad. Donde se grafican las concentraciones de hidrocarburos en partes por millón, a los cinco, diez y quince meses.

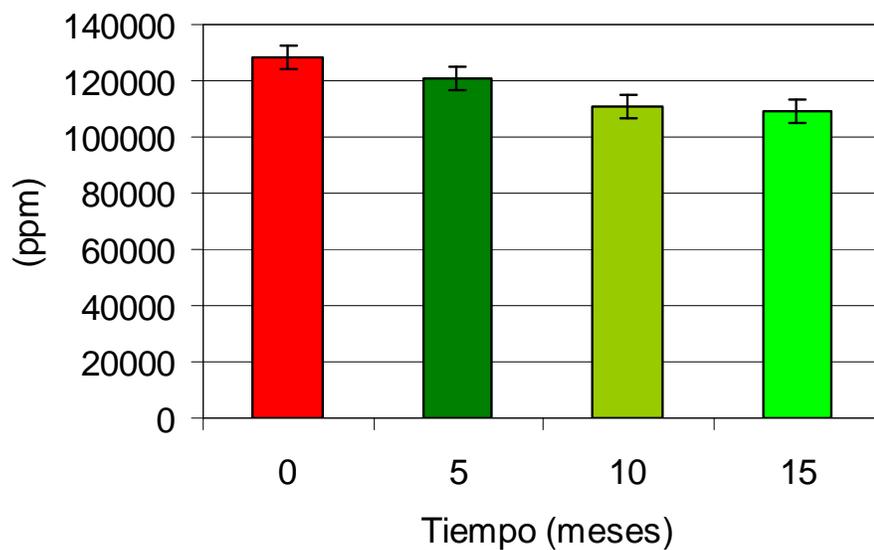


Figura 5.4. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo en el contenedor seco, 10% de humedad

Donde se observa que no hay diferencias significativas en el tiempo en que transcurre el experimento.

Con respecto al hecho de que no hubiera cambios significativos en los últimos cinco meses en la cantidad de hidrocarburos en el suelo se mantuvo constante, pudiera atribuirse principalmente a que los hidrocarburos que se encuentran en el suelo (asfáltenos) son los más difíciles de ser degradados por el sistema planta-microorganismo.

Para poder observar la rapidez con la que desaparecen los HTP se calcularon las tasas de remoción para cada uno de los tratamientos. En la figura 5.6 se muestra las tasas de remoción de HTP en los contenedores con diferentes condiciones de humedad, los datos se reportan como miligramos de HTP que desaparecen por kilogramo de suelo al mes.

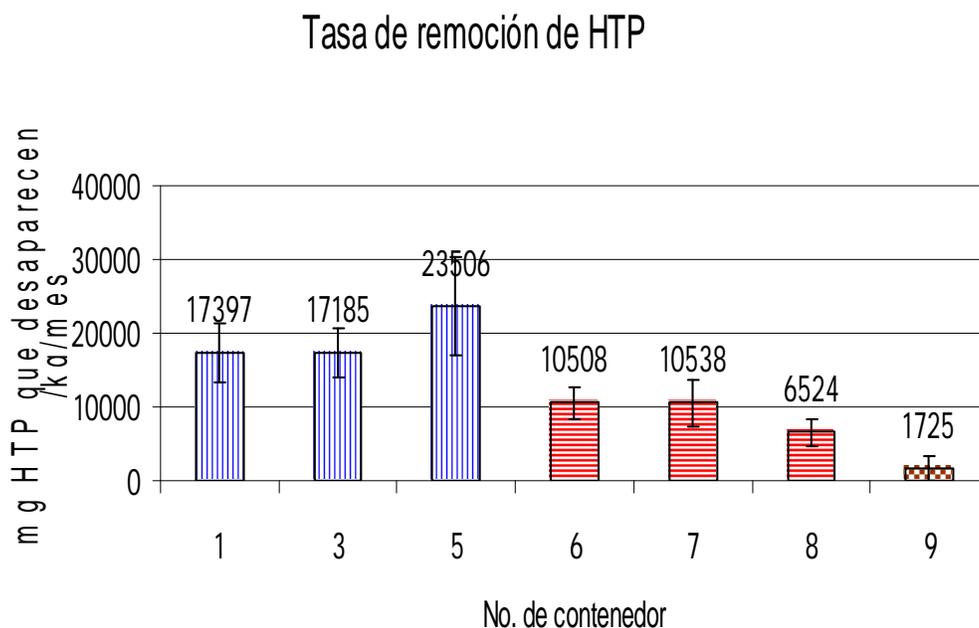


Figura 5.5 Máxima tasa de remoción de los contenedores expuestos a diferentes contenidos de humedad; en las barras con líneas verticales se muestran los contenedores con 60 % de humedad, en las barras con líneas horizontales los que contienen 30 % de humedad y la última barra con un 10% de humedad

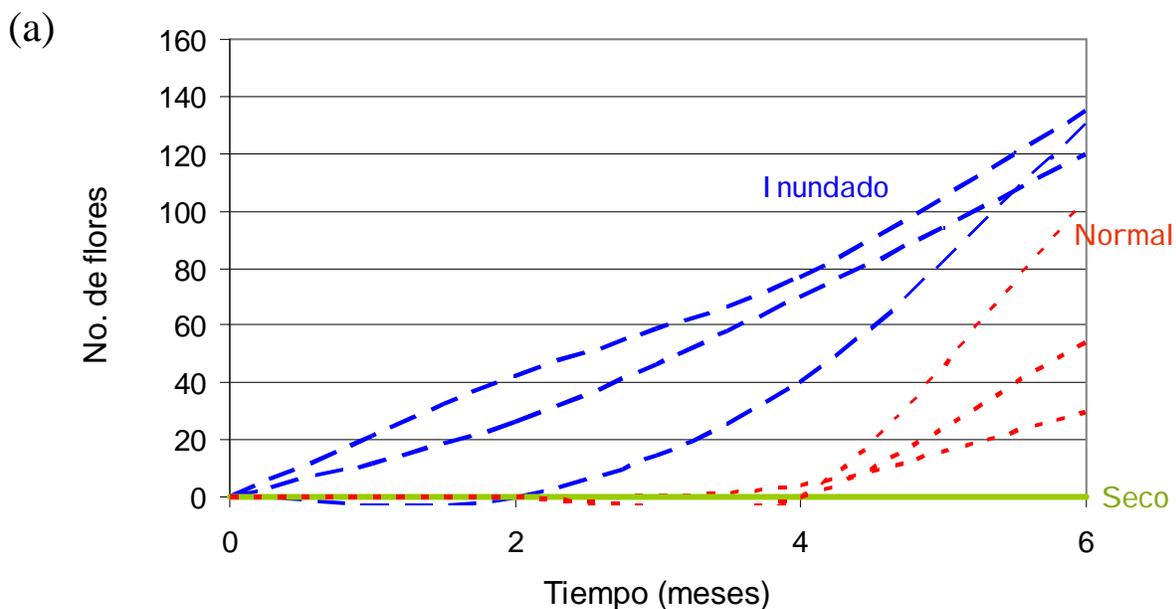
Lo que podemos observar es la máxima tasa de remoción, se encuentra entre los cinco y diez meses en que transcurre el experimento. Por otra parte no hay diferencias

significativas entre los contenedores que tienen las mismas condiciones de humedad, pero si hay diferencias entre los distintos tratamientos.

Los contenedores con 60% de humedad presentaron un promedio de 50% de remoción, mientras que los contenedores con 30% de humedad presentaron 20% de remoción, el contenedor con 10% de humedad tuvo 10% de remoción de HTP presentes en el suelo. Con estos resultados se observó que existe una relación directa entre la tasa de remoción y las diferentes condiciones de humedad.

Esto sugiere que la remoción de hidrocarburos presentes en el suelo con la cantidad de agua en los contenedores pudiera estar relacionado directamente. También que todos los procesos de remediación biológica aprovechan la capacidad degradativa de los microorganismos del suelo y la capacidad depuradora de las plantas. (Davies & Coleman, 2000).

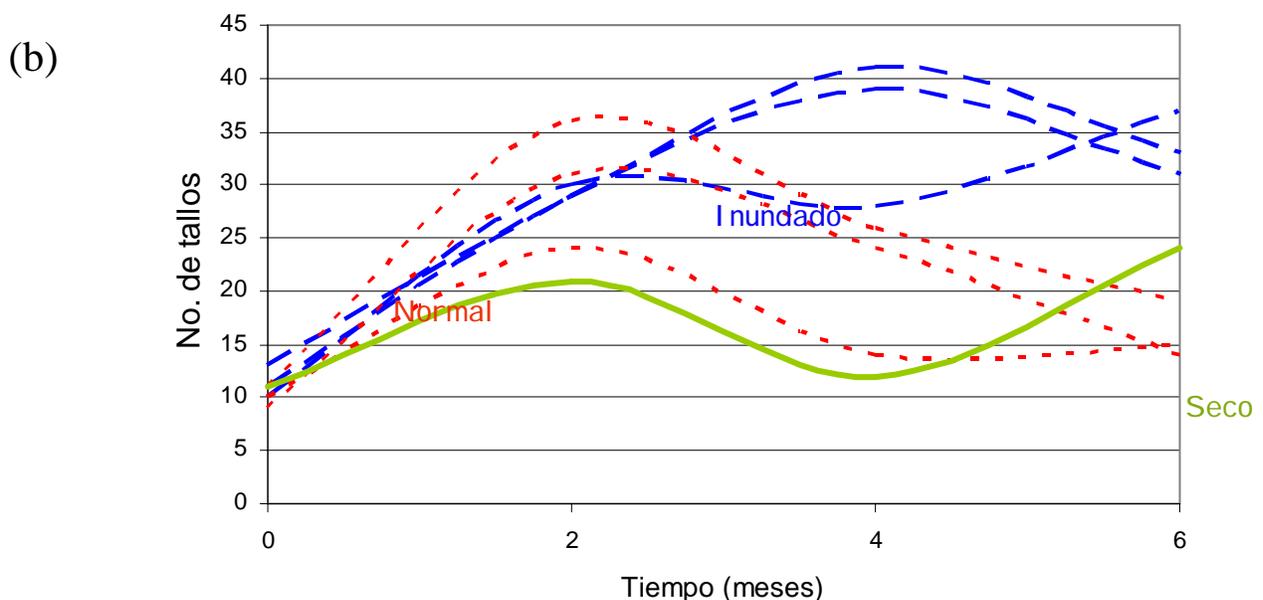
Después de la aclimatación las diferencias fisiológicas de las plantas eran evidentes. Por lo que cabría la posibilidad de que las condiciones de humedad modificaron características fisiológicas y no tan sólo eso, también modifiquen o retrasen el ciclo de vida de la planta. Con el objetivo de observar como varia la fonología de las plantas con respecto a las condiciones de inundación, se observa en la figura 5.7 (a) se observa el número de flores con respecto al tiempo en meses.



Figuras 5.6 (a) Aparición de inflorescencias en las diferentes condiciones de humedad: en líneas cortadas en azules se representan a los contenedores con 60% de humedad, en líneas punteadas en rojo los contenedores que se mantuvieron a 30% de humedad y línea continua en verde el contenedor con 10% de humedad

En este gráfico de aparición de inflorescencia, se observa que existe un retraso en la aparición de flores en los contenedores con 30% y 10 % de humedad, que aun con el retraso el contenedor con 10% de humedad se adapta a las condiciones de sequía y después de los cuatro meses en esta condición el número de tallos se incrementa hasta su estado inicial. Con esto se puede decir que existe una relación entre las condiciones de humedad y la aparición de flores.

En la figura 5.6 (b) Se muestra la variación de tallos con respecto al tiempo en los tres tratamientos.



Figuras 5.6 (b) Aparición de módulos en las diferentes condiciones de humedad: en líneas cortadas en azul se representan a los contenedores con 60% de humedad, en líneas punteadas en rojo los contenedores que se mantuvieron a 30% de humedad y línea continua en verde el contenedor con 10% de humedad

En la figura 5.6 (b) se observó que en los contenedores con un 30% y 60% se observa un incremento en la aparición de tallos verdes pero después de los cuatro meses hay un decremento. Esto podría coincidir con algún otro proceso por el cual atraviesa la planta y al parecer después se estabiliza el número de tallos verdes.

Por lo que se puede afirmar que la fonología está relacionada directamente con el contenido de humedad. Independientemente, del incremento de los hidrocarburos esta planta se recupera favorablemente con un incremento de humedad.

Otro aspecto fenológico en la raíz de *C. laxus* y en las figuras 5.7 (a) Se presentan para visualizar esquemáticamente las dimensiones de la raíz original (27 cm) y quince meses después se observa el crecimiento en la figura 5.7 (b) (63 cm).



Figura 5.7 (a) Raíz de *C. laxus* después de la aclimatación



Figura 5.7 (b) Quince meses después

### 5.3 Cuantificación de microorganismos

La cuenta en placa de los microorganismos se refiere al número de células viables o fragmentos miceliales en una muestra, capaces de crecer sobre una fuente nutritiva (agar).

Con el objetivo de monitorear la cantidad de microorganismos presentes en el suelo modelo antes la propagación vegetativa y de iniciar al experimento de las diferentes condiciones de inundación. Se realizó el análisis de cuenta viable en placa de microorganismos los valores promedio son:  $1.7 \times 10^7$  para bacterias y  $5.8 \times 10^5$  para hongos estos niveles semejantes a lo que se reporta en los suelos contaminados con hidrocarburos: bacterias  $9.24 \times 10^7$  de UFC/g y en hongos  $3.01 \times 10^6$  UFC/g (Alef & Nannipieri, 1995)

Ocho meses después de la aclimatación de las plantas se realizó la cuenta viable en placa donde se observan los siguientes valores: para contenedores sin inocular  $5.2 \times 10^9$  UFC/g bacterias y el promedio en contenedores inoculados es de  $2.9 \times 10^9$  UFC/g en bacterias. Para hongos los contenedores sin inóculo presentaron valores promedio de  $1.8 \times 10^5$  UFC/g y los contenedores inoculados  $3.9 \times 10^5$  UFC/g.

Los valores de bacterias fueron incrementados con respecto al valor inicial, esto puede deberse a la adaptación en las nuevas condiciones que son propicias para darse un

proceso de selección. En el conteo de hongos los valores decrecen, esto puede atribuirse a otros factores involucrados en el crecimiento de microorganismos como el pH y la composición de los nutrientes en el suelo.

Esta diferencia se muestra en las figuras 5.11 (a) y (b), donde se observan los hongos en los contenedores con la misma cantidad de humedad, dos se encuentran inoculados y dos presentan la microbiota nativa del suelo modelo.

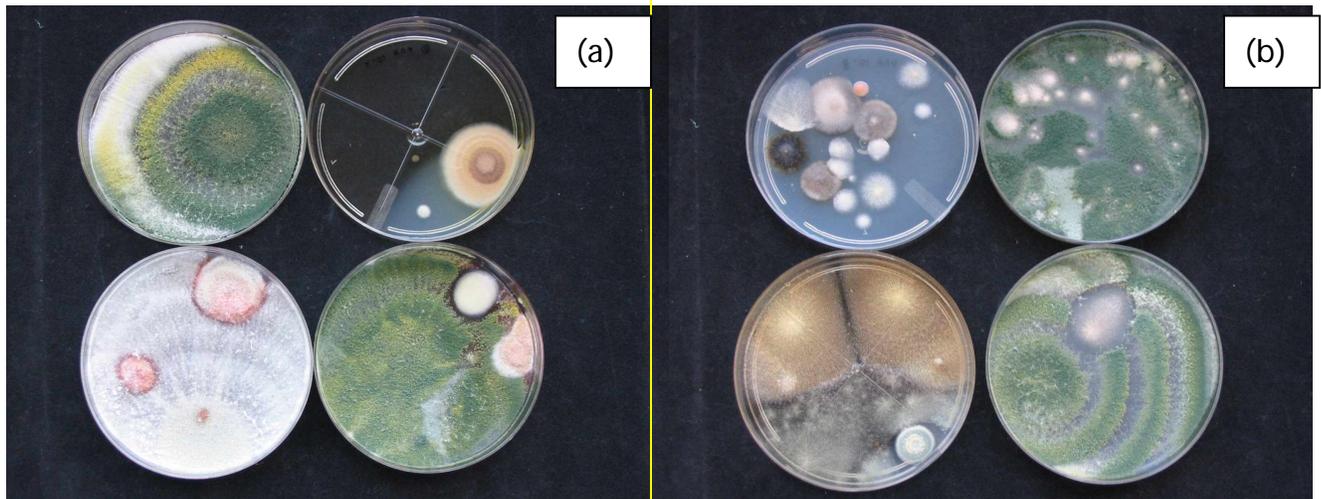


Figura 5.8 (a) Diversidad de hongos en contenedores 6 y 7 sin inóculo y (b) contenedores 2 y 4 con inóculo

En las figuras 5.9 (a) y (b) Se presentan los resultados de la diversidad en bacterias de las colonias existentes en el suelo de los contenedores inoculados y no inoculados.

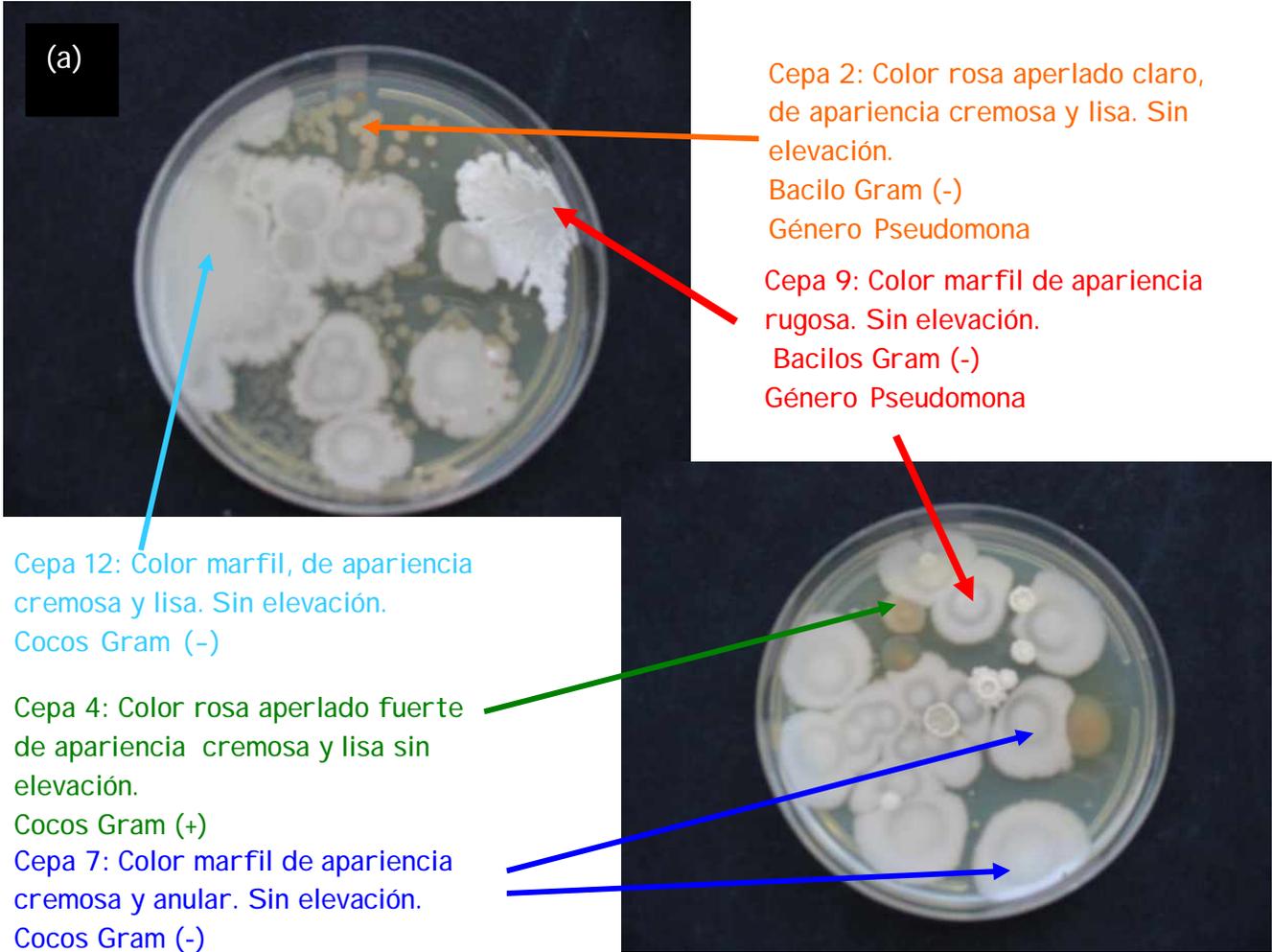


Figura 5.9 (a) Diversidad de bacterias en contenedores 2 y 4 inoculados

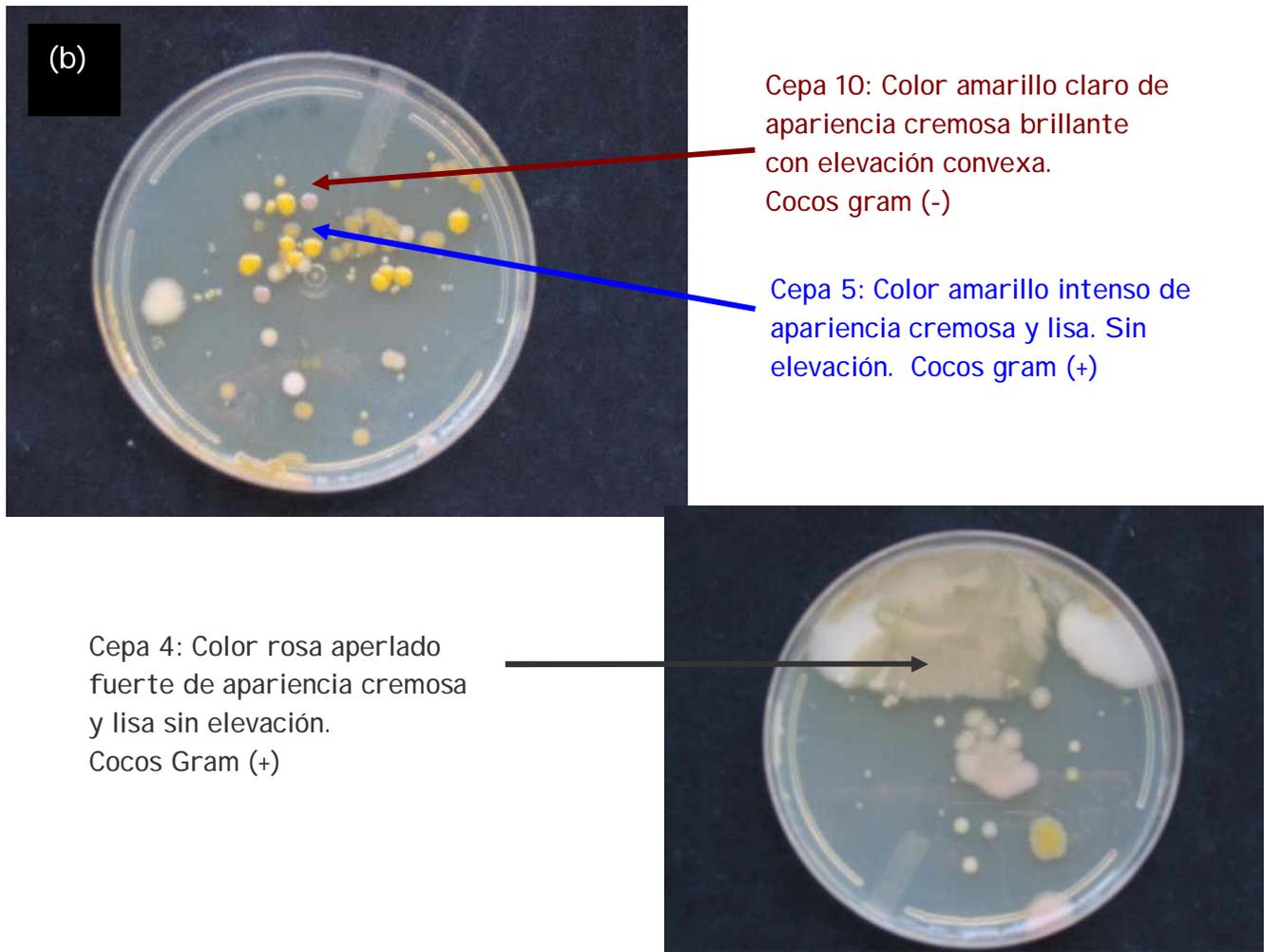


Figura 5.10 (b) Diversidad de bacterias en contenedores 6 y 7 sin inocular

Aun que los contenedores dos y cuatro fueron inoculados, no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos, la abundancia es similar en los dos, las diferencias radican en la diversidad. Aun con la cepas inoculadas no existió mayor remoción de hidrocarburos. Esto podría deberse a que en este momento los hidrocarburos presentes en el suelo sean más difíciles de degradar, tales como los asfaltenos o que la remoción se pueda ver con mayor claridad en algún tiempo posterior debido al tiempo que puedan tardarse las asociaciones entre microbiota exógena y endógena o incluso las asociaciones con la planta.

## 5.4 Determinación de pH

Con el objetivo de monitorear y determinar las condiciones de operación de las unidades experimentales se presenta la tabla 5.1 donde se observan los promedios de resultados de pH en los contenedores a diferentes tiempos (estas determinaciones se realizaron por triplicado).

Tabla 5.1 Variación de pH en las diferentes condiciones de humedad

Condiciones	Antes de la propagación	8 meses después	10 meses después
60% de humedad	5.7	4.0	4.1
30% de humedad	5.6	4.6	4.6
10% de humedad	5.6	5.4	5.3

Las determinaciones de pH y humedad demostraron que no había diferencias significativas entre los contenedores y entre los diferentes niveles de la unidad experimental, a lo largo de del experimento.

En general se observa que los niveles de pH son ácidos, lo cual coincide con los reportes de la zona pantanosa donde se tomó la planta. En todos los contenedores después de colocar a las plantas en sus respectivas macetas, el pH se acidificó, excepto en el contenedor número nueve (seco), en el que el pH es ligeramente más alcalino.

Cinco meses después de la última determinación, ya aclimatados los contenedores inoculados y con la adición de nutrientes se determinó el pH. Se observó que no hubo diferencias significativas entre los dos contenedores, pero sí se observó un incremento en los dos contenedores de 4.6 a 6.5. Valores alcalinos propician el crecimiento y el mantenimiento de bacterias y originar a su vez valores bajos en las cuentas de hongos.

## 5.5 Determinación de humedad

Todo el tiempo en que transcurrió la aclimatación de las plantas después de la propagación vegetativa, los contenedores presentaron 20% de humedad, se observó también que no hubo diferencias significativas entre los niveles de los contenedores.

Con esto se puede decir que el agua se distribuye de una manera homogénea en toda la columna.

Los resultados de humedad para los contenedores fueron los siguientes: los contenedores inundados  $57 \pm 0.41\%$ , los contenedores normales  $33 \pm 0.33\%$  y para el contenedor seco  $10 \pm 0.44\%$ . Estas determinaciones se realizaron por triplicado, con la metodología antes mencionada, cada mes a lo largo de un año (tiempo transcurrido de la parte experimental de este trabajo).

## 5.6 Detección de la actividad enzimática

Para probar el intervalo de concentración del producto que responde de una manera lineal con respecto a la intensidad de fluorescencia se realizó una curva estándar de resorufina que se muestra en la figura 5.15.

Para poder visualizar el marco de referencia que indica el orden de respuesta de la enzima se realizó una cinética enzimática de 20 minutos del CYTP4501A1 purificado, de hígado de conejo (Sigma Aldrich); esto se observa en la figura 5.16.

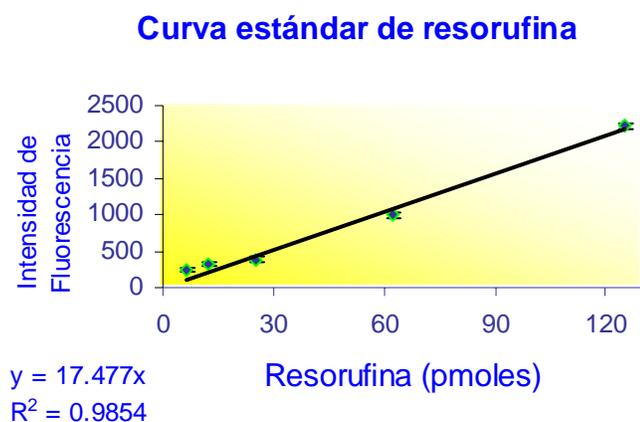


Figura 5.11 Curva estándar de resorufina

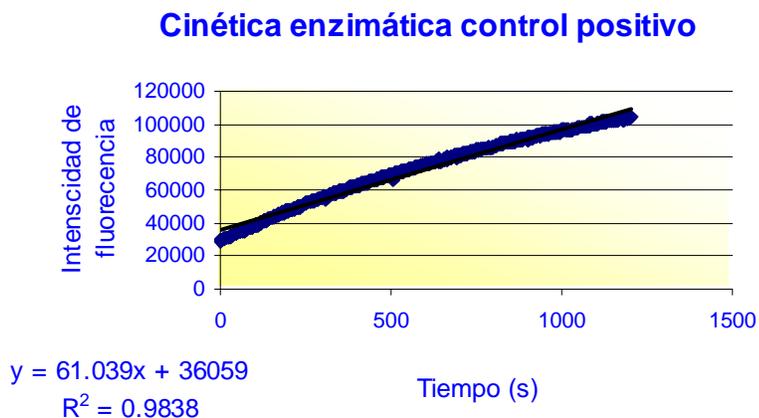


Figura 5.12 Cinética enzimática del CYTP450 extraído de hígado de conejo

Con este resultado se encontraron las concentraciones de resorufina (Sigma Aldrich) donde existe una linealidad entre las concentraciones de resorufina y la intensidad de fluorescencia, que corresponde al orden de respuesta del CYTP4501A1.

Con el objetivo de conocer, si esta planta produce CYTP4501A1 y para observar el efecto de la actividad enzimática con respecto al almacenamiento de la muestra. Se realizaron consecutivamente cinéticas de la fracción microsomal extraída de la raíz. Se

utilizaron plantas de las mismas edades, crecidas en suelo con hidrocarburos. Los resultados se reportan en la tabla 5.2

Tabla 5. 2 Cinética enzimática de CYTP4501A1

Prueba	Fracción Microsomal	Tratamiento	Ua (pmoles de resorufina /min)	Ua /mg de proteína
1	Almacenada*	c/ HC 30% de humedad	8.372	86.2
2	Sin almacenar	c/HC 30% de humedad	35.59	83.9

\*Almacenada por 1 mes a -70°C

Unidad de actividad (UA): se define como la cantidad de enzima que se requiere para formar un pmol de resorufina en un minuto en condiciones de 37°C y a pH 7.6

Con estos resultados se afirma, que sí existe actividad enzimática medible de CYTP4501A1 en la raíz de *Cyperus laxus*, también es evidente la pérdida de actividad enzimática de la muestra almacenada aun a -70 °C. Datos experimentales no mostrados sugieren que las muestras solo pueden ser almacenadas por un periodo máximo de 48 horas. Esto coincide con Pflugmancher & Sandermann, 1998, los cuales trabajan con tejidos vegetales almacenados hasta 48 horas.

Con el objetivo de encontrar el intervalo de concentración de proteína en el tejido vegetal de la raíz, se realizaron cinéticas enzimáticas de 20 minutos (CYTP4501A1), que se observan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3 Cinéticas enzimáticas con diferentes concentraciones de proteína total

Muestra	Concentración de proteína ( $\mu\text{g}$ de proteína)	UA ( $\mu\text{moles}$ de resorufina /min)	Actividad específica Ua/mg prot/min
Control positivo	100	1381	13814
Control positivo	30	385	12854
Control Positivo	10	128	12884
Muestra de raíz	102	13	130
Muestra de raíz	30	118	3959
Muestra de raíz	10	-1	19

Muestra de raíz: Fracción microsomal de la raíz de *Cyperus laxus* crecida en suelo sin hidrocarburos.

Con los resultados obtenidos se puede decir que la cantidad de proteínas necesarias para la detección de la actividad enzimática se encuentra en intervalo de  $\approx 10$  - 20 g de tejido húmedo. Las pruebas para estandarizar el método señalan que la cantidad de proteína microsomal necesaria para la detección de citocromo en animales y en plantas no es la misma, en plantas los intervalos de detección radican en concentraciones de 15 a 50  $\mu\text{g}$  y en animales el intervalo es de 30-100  $\mu\text{g}$  cuando se tiene cantidad de proteínas por de bajo o por arriba del intervalo se hace una sobreestimación de la actividad enzimática.

Ya puesta la técnica a punto se seleccionó la concentración de 30  $\mu\text{g}$  de proteína para la medición. Con el objetivo de observar si existía correlación entre los diferentes tratamientos, con la actividad enzimática. Se determinó la actividad enzimática de los contenedores con diferentes condiciones de humedad e inoculados. Estos resultados se presentan en la tabla 5.4.

Tabla 5. 4 Actividad enzimática de citocromo P450 en raíz de *Cyperus laxus* en diferentes condiciones de inundación

Condiciones	UA pmoles de Resorufina /min	Ac. Especifica (ua/mg prot/min)
Sin hidrocarburos 30% de humedad	1.7 ± 0.08	152
Con hidrocarburos 10% de humedad	0.9 ± 0.02	83
Con hidrocarburos 30% de humedad	2.2 ± 0.21	202
Con hidrocarburos 60% de humedad	4.4 ± 0.29	402
Inoculado C/HC 30% de humedad	43.4 ± 0.30	3583

Estos resultados indican, que sí existe relación directa entre la actividad enzimática de la raíz de esta planta en los diferentes contenidos de humedad del suelo, pero aún es mayor la diferencia entre el contenedor inoculado y los otros contenedores.

La fracción microsomal con la técnica que medimos y bajo las mismas condiciones del ensayo de los experimentos, el inóculo promueve la expresión en la actividad enzimática de CYTP4501A1 de manera importante diez veces más.

El efecto sobre la actividad enzimática y los microorganismos coinciden con los observados en respuesta ante la infección con hongos en el sistema monooxigenasa en el frijol. La infección induce a la expresión del CYTP450, esto es un incremento en la cantidad de CYTP450 y CYTP420 (Durst et al., 1997).

Entonces el incremento de la actividad enzimática en los contenedores inoculados pudiera deberse propiamente a la relación que existe entre la planta y los consorcios nativo e inoculado. Molecularmente hablando, pudiera haber algún segundo mensajero el cual se induce por la exposición a los hidrocarburos, sintetizado por los microorganismos, que a su vez induzca la actividad de la enzima vegetal propiamente.

Después de percatarnos en datos recientes de la literatura que existen formas solubles de esta enzima (Kvesitadze et al., 2001; Varazashvili et al., 2001), se decidió no

despreciar esta actividad detectarla, por lo que la metodología de la extracción de esta enzima se amplió y se obtuvo la fracción citosólica y microsomal.

Con el objetivo de demostrar que existe otra actividad a parte de la microsomal como es la citosólica, se realizaron determinaciones de la enzima en las dos fracciones microsomal y citosólica. Y para observar si existe inducción de esta enzima en la mezcla de hidrocarburos.

En la tabla 5.5 se reportan los resultados para las dos condiciones, con hidrocarburos (5,000 ppm) y sin hidrocarburos. Los tiempos de exposición van desde cero horas hasta 120 horas y se presenta la actividad de la fracción citosólica, microsomal y se obtuvo porcentaje de la actividad.

Tabla 5.5 Porcentaje de actividad enzimática/ g de raíz húmeda

Tiempo de exposición (h)	Fracción microsomal		Fracción citosólica	
	Sin hidrocarburos (%)	Con hidrocarburos (%)	Sin hidrocarburos (%)	Con hidrocarburos (%)
0	36	37	64	63
4	42	19	58	81
8	64	23	36	77
12	13	23	87	77
48	29	30	71	70
72	20	26	80	74
96	50	48	50	52
120	71	55	29	45

Los valores de la actividad enzimática más grandes en la mayoría de los casos provienen de la fracción citosólica.

En raíces de frijol y en maíz la hidroxilación de nitrobenzeno es un proceso vía monooxigenasas que se realiza intensivamente en la fracción microsomal. (Varazashvili et al., 2001). En los resultados observamos que la mayor actividad enzimática se encuentra en la fracción soluble. Esto puede deberse al tipo de contaminante en el que se colocaron las plantas.

En la tabla mostrada la actividad puede ser considerada como constitutiva y que la mezcla de los hidrocarburos extraídos del suelo provocan una inducción transitoria como se observa en la figura 5.17.

Debido a los resultados obtenidos podemos decir que las plantas poseen formas solubles y también enzimas incorporadas a la membrana, permitiendo incrementar la capacidad detoxificadora lo cual menciona Kavesitadze et al., 2001.

### Cinética enzimática de CYTP450A1 en raíz de *Cyperus laxus*

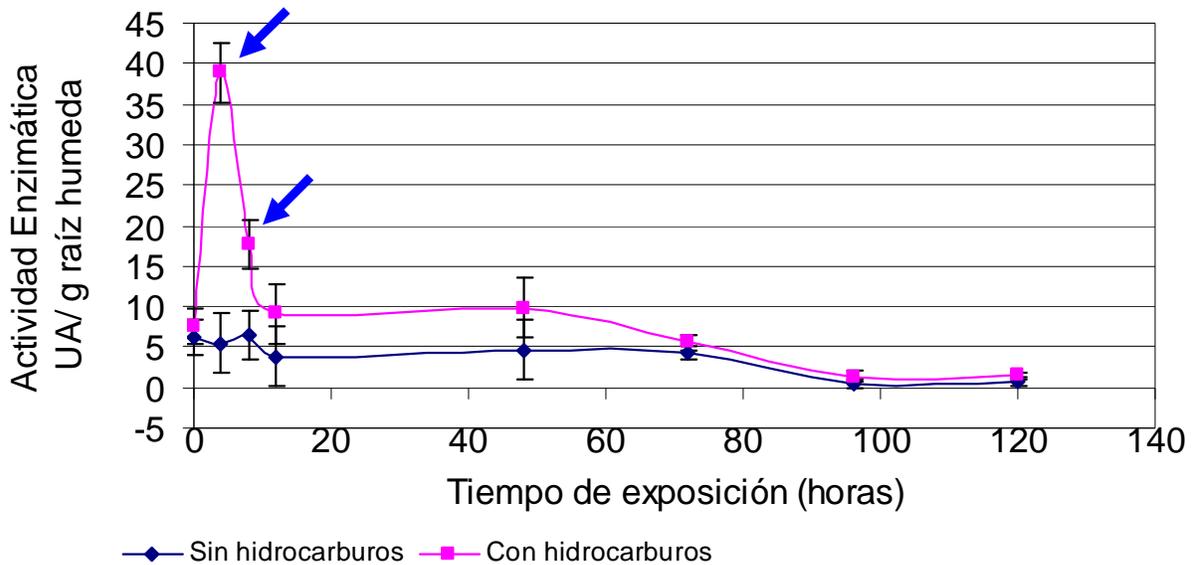


Figura 5. 13 Cinética enzimática de citocromo P450 en raíz de *C. laxus*; la línea azul es el control positivo sin hidrocarburos y la línea rosa con hidrocarburos (5,000 ppm)

Esta inducción transitoria es más evidente a las cuatro y a las ocho horas con la exposición del contaminante, antes de las 24 horas de exposición al contaminante la actividad decrece esta coincide con lo reportado en la literatura que después de 24 horas de la acción del nitrobenzeno en las raíces la actividad monooxigenasa del CYTP450 disminuye y existe un incremento en la actividad peroxidasa de CYTP450 (Varazashvili et al., 2001).

Se ha observado que los contaminantes exógenos como son los pesticidas no pueden ser utilizados por las plantas, por lo que para degradarse se deben someter a modificaciones en su estructura como son: oxidación, reducción, hidrólisis, conjugación, etc. (Kreuz et al., 1996). Esto no quiere decir que el CYT P450 sea el único mecanismo a través del cual se oxide una molécula, por lo que cabría la posibilidad de que existieran otros mecanismos y estos intervinieran en este proceso.

Aunque aún no se ha reportado el CYP450 metabolice anillos aromáticos en plantas (Harvey et al., 2002), esta involucrado en metabolizar contaminantes aromáticos y policlorados en animales (Livingstone & David, 1993). Se ha reporta la inducción de CYP450 en plantas por herbicidas (Werck et al., 2000). Prácticamente la enzima CYTP450 es utilizada para el ataque inicial oxidativo en el camino de la mineralización de hidrocarburos policíclicos aromáticos por algunas bacterias y hongos (Cerniglia, 1992; Harayama, 1997).

Así mismo no se han encontrado pruebas directas de la participación de CYP450 de plantas en metabolizar contaminantes aromáticos industriales (Harvey et al., 2002)

## 6. CONCLUSIONES

Las plantas inoculadas no presentaron mayor remoción de hidrocarburos a los quince meses, la abundancia microbiana fue similar a la de los contenedores no inoculados aunque la diversidad fue diferente a los inoculados. Por el contrario a los 15 meses todos los contenedores llegan a valores similares de remoción de hidrocarburos en el suelo, aunque con diferentes velocidades de remoción.

Se observó una relación directa entre la remoción de los HTP y las condiciones de humedad. Al mismo tiempo se observa que el efecto de las distintas condiciones de humedad modifican las características fenológicas e incluso el ciclo de vida de *Cyperus laxus*.

La actividad enzimática de CYTP4501A1 es constitutiva y parcialmente inducible a las 4 y a las 8 horas de exposición a los contaminantes. *Cyperus laxus* contiene también formas solubles de la misma enzima. La actividad de CYTP4501A1 es mayor en las formas solubles.

Finalmente, la actividad enzimática y la remoción de hidrocarburos no guardan una relación clara,

## 7. Recomendaciones

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo experimental se recomienda para estudios posteriores:

Para poder distinguir el tipo de hidrocarburo que preferencialmente la planta y en consorcio consume, la mezcla de hidrocarburos debe ser fraccionada.

Para visualizar los fenómenos existentes en los contenedores con el suelo modelo y la distribución de los hidrocarburos se debe obtener HTP y fraccionar a diferentes niveles de contenedor con los distintos tratamientos.

Para poder discernir que tipo de hidrocarburo induce a la enzima se tratará exponer a la enzima con cada una de las fracciones de la mezcla.

Para saber si la cantidad de enzima que se sintetiza es mayor en presencia de hidrocarburos se recomienda realizar Western Blot.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, C. D., Davidse, G., M. Sousa., 1994. Flora mesoamericana Cyperaceac. s. y A.O. Charter. (Eds.). Instituto de Biología. UNAM. 6: 402.

Aguilar, A., 1987. Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo Ed. Sociedad Mexicana de la ciencia del suelo, México, pp.25-30

Alef, K. Y Nannipieri, P., 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Ed. Academic Press, USA.

Allen, C. C., Boyd, D. R., Hempenstall, F., Larkin, M. J. and Sharma N. D., 1999. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1335-1339

Anderson, T. A., Guthrie, E. A. and Walton. B. T., 1993. Bioremediation in the Rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27:2630-2636

April, W. and Sims. R. C., 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20:253-265.

Barkay, T. S. Nayon-Venezia, Ron, E. Z. and Rosenberg, E., 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2697-702

Barbee, G.C., Brown, K. W. and Donnelly. K. C., 1992. Fate of mutagenic chemicals in soils amended with petroleum and wood preserving sludges. *Waste Man. & Res.* 10:73-85

Bezalel, Hadar L. Y., and C.E. Cerniglia. 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:292-295

Bradford, M.M, 1974. 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

Bower, E. J. and A. J. B. Zehnder., 1993. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *Trends. Biotech.* 11:287-318

- Cerniglia, C. E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3:351-368
- Davies, T. G. E. and Coleman, J .O. D., 2000. The Arabidopsis thaliana ATP-binding cassette proteins and emerging superfamily. *Plant, Cell and Environment*. (Inpress)
- Desai, J.D. and I.M. Banat., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64
- Díaz, R. I., Saad, H., Gutiérrez, R., Favela, T. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fraction by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian J. Microbiol.* (Inpress)
- Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A.A., Salaün, J.-P., Werck-Reichhart, D., 1997. Induction of plant cytochrome 450. In: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*. Kluwer, Dordrecht pp. 19-34.
- Finnerty, W.R. 1994. Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:291-295
- Gallegos, M. M., Gómez, S. A., González, C. L., Montes, O. G., Yañez, T. L. Zermeño, E. J., Gutiérrez, R. M., 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum- contaminated soil in Mexican tropical swamp. *Water Science and Technology*, Vol. 42: (5-6) 377-384.
- Gordon, C. T., 1994. *Systematic Botany monographs. Revision of the Mexican Species of Cyperus (Cyperaceae)*. 43:10-43.
- Gramss, G., Gunther, Th., Voigt, K. D. and Kirsche, B., 1997. Comparative activities of oxidoreductase enzymes in tissue extracts of crop plants and in culture fluids of fungal mycelia. *Chemosphere* 36(9):1923-1934.
- Guengerich, P. F., 1993. Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*. 81(5): 440-447

Harayama S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol* 8:268-273.

Harvey, P., Campanela, B., Castro, P., Harms, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A., Smrcek, S., and Werck, D., 2002. Phytoremediation of Polyaromatic Hydrocarbons, Anilines and Phenols. *Environ Sci & Pollut Res.* 9 (1): 29-47.

Hoff, R., 1993. Bioremediation: An overview of its development and use for oil spill cleanup. *Mar. Pollut. Bull.* 26:476-481

Hozumi, T., H. Tsutsumi, and M. Kono., 2000. Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhodka in the sea of Japan. I. Chemistry and characteristics of heavy oil loaded on the Nakhodka and biodegradation tests by a bioremediation agent with microbiological cultures in the laboratory. *Mar. Pollut. Bull.* 40:308-314

Irmler, S., Schröder, G., St-Pierre, B., Crouch, N.P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U. and Schröder, J., 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant. J.* 24, 797-804.

Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. and Korte., 1997. Plant monooxygenases: Participation in xenobiotic oxidation. *Ecotox. and Enviromen. Safety* 36: 118-122.

Kreuz, K., R. Tommasini, R. and Martinoia, E. 1996. Old enzymes for a new job: How cells dispose of herbicides. *Plant Physiol.* 111, 349-353.

Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Sadunishvili and Ramsden, J. 2001. Some aspects of the enzymatic basic of phytoremediation. *J. of boil. Phy. and chem.* 1, 49-57.

Leahy, J.G., and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Reviews.* 54:305-315

Lehninger, A.L. Nelson, D.L. y Cox, M. M. 1996, *Principios de bioquímica*, Ed. Omega España. pp. 1245.

Livingstone, D. R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integ Physiol* 120, 43-49

Livingstone, D. R., 1993. Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 195-211

Luet-Lot, W., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases. *Current Opinion in Chem. Biol.* 2:263-268.

Park, K.S., R.C. Sims, and Dupont, R.R., 1990. Transformation of PAHs in soil systems. *J. Environ. Eng.* 116:632-641

Pflugmacher, S., and Sandermann, H., 1998. Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotic in Marine Macroalgae. *Plant. Physiol.* 117:123-128.

Ramana, K.V., and N.G. Karanth., 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J. Chem. Tech. and Biotech.* 45:249-257

Rea, P.A., Martinoia, E., Li, Z-S., Lu, Y-P. and Drozdowicz, Y. M., 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiol and Plant Mol. Biol.* 49: 727-760

Rosenberg, E. and E. Z. Ron. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *App Microbiol Biotechnol*, 52:154-162

Shinji K. and Jeffrey G. S. 2000. *Pesticide Biochem. and Physiol.* 68, 34-41

Shugart, Lee R. 1996. *Molecular Markers to Toxic Agents.* CRC Press Inc. pp. 133-161

Tsutsumi, H., Y Hirota, and Hirashima, A., 2000. Bioremediation on the shore after an oil spill from the Nakhodka in the sea of Japan. II. Toxicity of a bioremediation agent with microbiological cultures in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 40:315-319

Tsushima, H., M. Kono, K. Takai, T. Manabe, M. Haraguchi, I. Yamamoto, and C. Oppenheimer., 2000. Bioremediation on the shore after an oil spill from the

Nakhodka in the sea of Japan. III. Field test of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 40:320-324

USEPA., 1998. Risk Handbook, pp. 1-30.

Varazashvili, G. Khatishashvili, M. Kurashvili, M. Pruidze, T. Ananiashvili, G. Zaalishvili and M. Gordeziani., 2001. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells *J. of Biol. Phy. and Chem.* (1): 85-88

Volkerling, F., A.M. Breure, A. Sterkenbufg, and J.G. van Andel., 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:548-552

Werck-Reichhart D, Feyereisen R., 2000. Cytochrome P450- A success story. *Genome Biol.* 1 (6) reviews: 3003.1-3003.0

Werck, D., Hehn, A., and Didierjean, L., 2000. Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in plant science* 5(3): 116-123.

Wilson, S. C. and Jones., K. C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 80:229-249

Los integrantes de este jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 3 de Diciembre del 2003.

---

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
Presidente

---

Dra. Margarita E. Gallegos Martínez  
Secretaria

---

Dra. Laura J. Pérez Flores  
Vocal

---

M en B. Erika Escalante Espinosa  
Vocal

---

Dr. Enrique García Hernández  
Vocal