

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

EFFECTO DEL Cr (VI) y Pb (II) EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES DE UN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE
Jatropha curcas

TESIS

para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M.C. ANTONIO VALADEZ VILLARREAL

Director de Tesis:



DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

Junio de 2016

Ciudad de México, a 24 de junio del 2016

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**EFFECTO DEL Cr Y Pb EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE
UN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Jatropha curcas***

Que presentó

M.C. ANTONIO VALADEZ VILLARREAL

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa
Asesor: Dra. Angélica Román Guerrero
Asesor: Dr. Antonio Bernabé Antonio

Jurado:

Presidente: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Secretario: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio

Vocal: Dra. Amalia Maldonado Magaña



The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. The signatures are in black ink and appear to be cursive. The first signature is the most legible, followed by the second, third, and fourth which are more stylized.

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del
CONACYT, con la referencia 001466”**

Dedicatorias

A mi esposa Eloísa, por su gran amor, por el apoyo en los momentos trascendentes de mi vida y por sus importantes recomendaciones para la realización del posgrado.

A mi hija, Angélica Valeria, por ser un gran motivador en mi superación además de ser un gran apoyo a lo largo de la vida.

Al Programa de Desarrollo del Profesorado (PRODEP), por el apoyo económico otorgado con la beca para el estudio del Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

A la Universidad Tecnológica de Tabasco por el apoyo para la postulación ante el PRODEP de la beca académica.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en su División Académica de Ciencias Agropecuarias, por el gran apoyo brindado en la realización de parte experimental en sus laboratorios de Tecnología de Alimentos.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por su gran apoyo para la culminación de este posgrado, así como por la amistad que como familia nos brinda.

A los integrantes del Comité Tutoral Dr. Antonio Bernabé Antonio y Dra. Angélica Román Guerrero por su inapreciable apoyo en la revisión y corrección de la tesis.

A la Dra. Amalia Maldonado Magaña por su asistencia y apoyo en el desarrollo del trabajo experimental.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CECYTET) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis.

Al M.C. José Isabel López Naranjo, por su gran amistad y apoyo, personal y de toda su familia.

RESUMEN

Jatropha curcas es una especie tolerante y acumuladora de metales pesados (MP), pero poco se sabe sobre el mecanismo que le confiere esta habilidad. Se sugiere que las enzimas antioxidantes pueden ser partícipes; pero no hay reportes relacionando la actividad enzimática y MP en cultivos de células en suspensión (CCS) de *J. curcas*. Se determinó el efecto del cromo (Cr) o plomo (Pb) (0.0 a 3.0 mM) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POX) en diferentes tiempos de crecimiento de CCS de *J. curcas*. Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad de SOD, POD y CAT por la adición de Cr o Pb. La mayor actividad de SOD ocurrió durante la primera hora, y en POX o CAT se observó a las 24 h. Después de las 192 h, la actividad de las tres enzimas disminuyó por debajo de los valores del control, y coincidió con la etapa exponencial o de mayor crecimiento del cultivo. Hubo una relación cercana entre el Cr o Pb y la actividad de SOD, POD y CAT, que podría relacionarse con la capacidad de *J. curcas* para acumular y tolerar altas concentraciones de Cr o Pb.

ABSTRACT

Jatropha curcas is a tolerant and accumulator plant of heavy metals (HMs), nevertheless poorly is known about the mechanisms by which this ability is conferred. It is suggested that antioxidant enzymes might participate; however, there are no studies reporting the relationship between antioxidant enzymes activities and the presence of HMs over an *in vitro* cell suspension culture of *J. curcas*. The aim of this study was to determine the effect of chromium (Cr) or lead (Pb) at 0.0 to 3.0 mM on the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) through growth of cell suspension culture (CSC) of *J. curcas*. The activity displayed by those enzymes was found significantly increased ($P < 0.05$) when Cr or Pb were added. The greatest enzymatic activity was found at the first hour of culture for SOD and 5 h for POX and CAT, respectively. The results indicated that there is a close relationship between the presence of Cr and Pb and SOD, CAT and POX activities in the cell suspension culture of *J. curcas* which can describe the capability of this plant for tolerating and accumulating high concentrations of Cr and Pb.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
MP	Metales pesados
MS	Medio de cultivo Murashige & Skoog
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
td	Tiempo de duplicación
PS	Peso seco
PF	Peso fresco
μ	Velocidad específica de crecimiento

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efectos tóxicos de los metales pesados sobre la salud	18
Tabla 2	Fuentes antropogénicas de metales pesados en el ambiente	18
Tabla 3	Formas químicas de los metales en el suelo y su disponibilidad relativa para las plantas	20
Tabla 4	Mecanismos de fitorremediación	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas	21
Figura 2	Mecanismos de defensa activados por los MP en las células vegetales	22
Figura 3	Diversas rutas de desplazamiento de la contaminación en el ambiente	24
Figura 4	Proceso de la fitorremediación de los contaminantes	25
Figura 5	Representación de la fitoextracción	27
Figura 6	Modelo de transporte y toxicidad del cromo en las plantas	29
Figura 7	Curva de crecimiento del CCS de <i>J. curcas</i> con 2.27 μ M 2,4-D a los 36 d de cultivo,	39
Figura 8a	Efecto de diferentes concentraciones de Cr (mM) en la actividad del SOD	42
Figura 8b	Efecto de diferentes concentraciones de Pb (mM) en la actividad del SOD	42
Figura 9a	Efecto de diferentes concentraciones de Cr (mM) en la actividad del POX	43
Figura 9b	Efecto de diferentes concentraciones de Pb (mM) en la actividad del POX	44
Figura 10a	Efecto de diferentes concentraciones de Cr (mM) en la actividad del CAT	45
Figura 10b	Efecto de diferentes concentraciones de Pb (mM) en la actividad del CAT durante 360 horas de crecimiento del CCS de <i>J. curcas</i> .	45
Figura 11	Índice de tolerancia de MPs en células de cultivos en suspensión de <i>J. curcas</i> tratados con Cr y Pb	47
Figura 12	Bioacumulación de MPs en células de cultivos en suspensión de <i>J. curcas</i> tratados con Cr y Pb	47

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA TABLAS	8
LISTA FIGURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO DE REFERENCIA	16
2.1 Generalidades y usos de <i>Jatropha curcas</i>	16
2.2 Metales pesados	17
2.3 Absorción de metales pesados en las plantas	19
2.3.1 Mecanismos de defensa y tolerancia.	20
2.4 Fitorremediación de metales pesados	23
2.4.1 Estrategias de fitorremediación	24
2.4.1.1 Fitoestabilización	26
2.4.1.2 Fitoextracción o Fitoacumulación	26
2.4.1.3 Fitovolatilización	27
2.4.1.4 Fitodegradación	27
2.4.2 Cromo	28
2.4.3 Plomo	29
2.5 Plantas usadas en fitorremediación.	31
2.6 Cultivos <i>in vitro</i> de plantas y de células en la fitorremediación.	34
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5 OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos específicos	38
6 MATERIALES Y METODOS	39
6.1 Bioensayos de cromo y plomo	39
6.2 Extracción de enzimas	39
6.2.1. Determinación de la actividad enzimática (SOD)	39
6.2.2. Determinación de la actividad enzimática (POX)	40
6.2.3. Determinación de la actividad enzimática (CAT)	40
6.3 Análisis estadístico	40

7. RESULTADOS	41
7.1 Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de SOD	41
7.2 Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de POX	43
7.3 Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de CAT	44
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	51
10. PERSPECTIVAS	52
11. REFERENCIAS	53

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el desarrollo industrial y la urbanización han incrementado la cantidad y diversidad de contaminantes tóxicos y peligrosos en el suelo (Nriagu, 1979; Wang y col., 2003; Duffus, 2002). Dentro de ellos, los metales pesados (MP) como el plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg) y zinc (Zn) son los contaminantes más comunes, (Kabata-Pendias y Pendias, 1989). El Pb y el Cd son elementos no esenciales, pero el Zn a bajas concentraciones es un micronutriente esencial de las plantas. Dosis más altas de estos metales pueden causar desordenes metabólicos e inhibición del crecimiento para la mayoría de las plantas, llevando con frecuencia a la muerte (Wang y col., 2003; Tripathi y col., 2007).

Los MP no son biodegradables y son capaces de acumularse en plantas y animales a lo largo de la cadena alimenticia. Cuando los humanos ingieren estos organismos, los metales se depositan también en sus tejidos resultando diversas enfermedades dependiendo del metal involucrado (Abdu y Muazu, 2007). Los metales pesados son capaces de generar una serie de trastornos diversos, así el plomo tiene la capacidad de sustituir al calcio en muchos sistemas biológicos y alterar la transmisión de señales por calcio. La interrupción de la transducción de señales puede afectar la transmisión sináptica, los canales de calcio, el sistema enzimático dependiente de calmodulina, diferenciación neuronal, permeabilidad de los capilares cerebrales, función neuroendocrina, fosforilación de proteínas, síntesis de catecolaminas, entre otras (Landrigan y col. 2000)

Otro mecanismo de toxicidad por plomo incluye la capacidad del plomo de interactuar con proteínas y enzimas fijadoras de metales; la interacción, por lo general, incluye la unión del plomo a grupos sulfhídrico y en menor grado a grupos fosfato y carboxilo. La unión a proteínas puede causar que la estructura proteica sufra un cambio conformacional, alterando así la capacidad de la proteína de funcionar con normalidad. El plomo inhibe enzimas en el proceso de síntesis del grupo hemo, lo que puede resultar en anemia, disminución de la disponibilidad de citocromos para la cadena respiratoria, y también acumulación de metabolitos

tóxicos como ácido d-aminolevulínico (ALA)(Goering , 1993; Landrigan y col., 2000)

Diferentes estudios han demostrado el efecto oxidante del plomo sobre diferentes órganos, tejidos y sistemas tanto en humanos como en animales de experimentación. Es así que Pinon-Lataillade y col,(1995). encuentran que el plomo ingerido en alimentos tiene efectos sobre la función reproductiva .También se ha demostrado el efecto de estrés oxidativo tanto en el cerebro como en el hígado y en el riñón (Wadi y col., 1999; Patra y col., 2001).

El Pb^{2+} interfiere en la síntesis de las ferroporfirinas y también en otros importantes procesos bioquímicos debido a la facilidad que tiene este catión para reaccionar con los grupos $-SH$. La toxicidad del plomo se manifiesta mediante un conjunto de síntomas que caracterizan la patología llamada saturnismo, En su forma aguda origina vómitos, anorexia, trastornos nerviosos y alteraciones y malformaciones renales (Jacobs De., 1996; Sanin L.H., 1998)

En el caso del cromo, La población general puede verse expuesta a cromo a través del aire, de los alimentos y/o del agua, siendo diferente en cada caso la biodisponibilidad del cromo. La exposición dérmica también puede ocurrir debido al posible contacto de la piel con productos de consumo que contengan cromo, como cemento, materiales de limpieza, cuero, etc. (McCarron y col, 2000).

Los MP no están sujetos a degradación biológica y por lo tanto, permanecen casi indefinidamente en el medio ambiente (Raskin y Ensley, 2000), siendo transformados estos de un estado de oxidación a otro (Lovley y Coates, 1997; Ross, 2004; Jamal y col., 2006). En el suelo, los MP ocasionan efectos tóxicos sobre los microorganismos del suelo, lo que puede llevar a una disminución en su número y actividades (Padmavathiamma y Li, 2007).

Prácticamente no existen estudios sobre exposición ambiental en el cromo, sino que la mayoría han investigado la exposición ocupacional, tanto aguda como

crónica. Un estudio amplio que se ha encontrado sobre exposición ambiental se realizó en una población china residente junto a una planta de aleación que empleaba cromo desde los años 60, revelando una mayor incidencia de cánceres de pulmón y estómago con respecto a la población nacional. No presenta datos exactos sobre la exposición, pero indica que ésta se producía a través del aire, agua, suelo y alimentos (Zhang y Li. y col., 1987).

La respiratoria es la principal vía de exposición ocupacional a compuestos de cromo. Numerosos estudios realizados sobre trabajadores expuestos ocupacional y crónicamente a cromo (III) y (VI) señalan como principales efectos respiratorios la ulceración y perforación del tabique nasal, así como rinitis y bronquitis. También se ha encontrado que la exposición ocupacional a cromo (VI) provoca alteraciones gastrointestinales (gastritis, indigestión, dolor estomacal, úlcera duodenal) debido a su acción oxidante, así como lesiones en la piel (dermatitis irritativa y úlceras crónicas) y alteraciones renales (niveles elevados de β 2-microglobulina) (Franchini y col., 1993).

Los MP no están sujetos a degradación biológica y por lo tanto, permanecen casi indefinidamente en el medio ambiente (Raskin y Ensley, 2000), siendo transformados estos de un estado de oxidación a otro (Lovley y Coates, 1997; Ross, 2004; Jamal y col., 2006). En el suelo, los MP ocasionan efectos tóxicos sobre los microorganismos del suelo, lo que puede llevar a una disminución en su número y actividades (Padmavathiamma y Li, 2007).

El cromo (Cr) y el plomo (Pb) son elementos no esenciales en la nutrición vegetal, sin embargo, estos pueden ser absorbidos por las plantas, afectando diferentes procesos metabólicos de las células vegetales (Liu y col., 2008; Maksymiec, 1997; Siedlecka y col., 2002). Una de las principales consecuencias de la presencia de los MP, es la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales ocasionan daño en las membranas celulares, proteínas, ácidos nucleicos y pigmentos del cloroplasto (Weckx y col., 1997; Tewari y col., 2002). La acumulación de ERO puede ser debida a la interrupción del equilibrio entre la producción y la actividad del sistema antioxidante que está integrado por enzimas

antioxidantes como la catalasa (CAT), la peroxidasa (POX), la superóxido dismutasa (SOD), y compuestos antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, los carotenoides y el ascorbato (Noctor y col., 1998, Srivastava y col., 2004). La SOD es la enzima que principalmente se encarga de eliminar el anión superóxido $O_2^{\bullet -}$ para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), mientras que la CAT y diversas clases de peroxidasa se encargan de degradar el H_2O_2 producido (Youssef y Azzoz., 2013).

Las células animales tienen SODs que contienen manganeso (Mn) en el sitio activo (MnSOD) en la matriz mitocondrial, además de SODs con Cu y Zn (CuZnSOD) en el espacio intermitocondrial de la membrana y en el resto de la célula (Fridovich, 1995). Las células vegetales tienen más o menos lo mismo, pero algunas tienen SODs con hierro (Fe) (FeSOD) en el cloroplasto además de SODCuZn (Alscher y col., 2002). Las bacterias con frecuencia tienen CuZnSOD además de MnSOD y/o FeSOD; unas cuantas tienen SOD que contiene níquel (Ni) (Halliwell y Gutteridge, 2006).

La CAT se localiza en peroxisomas, citosol y mitocondria, y se encarga de dismutar el H_2O_2 en H_2O y en O_2 (McKersie y col., 1994; Halliwell y Gutteridge, 2006). La mayoría de las catalasas de plantas y animales se localizan en los peroxisomas, que actúa con el H_2O_2 producida por enzimas oxidasas que actúan sobre sustratos como el glicolato, urato y aminoácidos D (Schrader y Fahimi, 2004). La POD elimina el H_2O_2 por oxidación con cosustratos como compuestos fenólicos y/o antioxidantes (Blokhina y col., 2003). Bajo condiciones normales, la concentración de ERO se mantiene baja debido a la actividad de estas enzimas antioxidantes. En condiciones de estrés, las ERO se pueden incrementar, lo cual puede incrementar las actividades de estas enzimas antioxidativas. Las actividades de la SOD, CAT y POD son inducidas en diferentes especies de plantas por la presencia de MP.

Jatropha curcas es una especie ampliamente distribuida en áreas tropicales de México y del mundo y se ha demostrado su gran potencial con fines de

fitorremediación, ya que es capaz de absorber MP de suelos contaminados (Jamil y col., 2009; Liang y col., 2012; Mangkoedihardjo y col., 2008; Yadav y col., 2009; Luhach y Chaudhry, 2012; Ahmadpour y col., 2010)

El cultivo de tejidos o de células vegetales como una herramienta de la biotecnología vegetal, ha contribuido en gran medida a estudios de tolerancia y acumulación de MP en plántulas *in vitro* y en cultivos de células en suspensión de *Prosopis laevigata* (Buendía-González y col., 2010, 2012; Lizhong y Cullen., 1995; Maldonado-Magaña y col., 2013). En un cultivo *in vitro* realizado por Bernabé-Antonio y col. (2015), demostraron que células en suspensión de *J. curcas* mantienen la capacidad de absorber el Pb y Cr adicionados al medio de cultivo, indicando que éste cultivo puede ser empleado para estudiar algunos de los mecanismos de tolerancia y capacidad de acumulación de MP. Hasta donde se sabe, no existen trabajos relacionados a la evaluación del sistema antioxidante de enzimas por efecto de metales pesados en cultivos de células en suspensión de *J. curcas*, por lo que, en el presente estudio se evaluaron diferentes concentraciones de Pb y Cr en diferentes tiempos de crecimiento de los cultivos celulares y su efecto en la actividad de diferentes enzimas.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Generalidades y usos de *Jatropha curcas*

El género *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae y cuenta con más de 70 especies, que se destacan por su rudeza, rápido crecimiento y fácil propagación. Es una planta resistente a la sequía y crece en suelos pobres y arenosos, en climas tropicales y semitropicales, en altitudes que van desde los 0-1500 msnm. Por ejemplo, en Indonesia, la planta es capaz de crecer bajo diversas condiciones de suelo y se utiliza como corredor verde a lo largo de las calles y las casas, y ha sido promovida como una planta para obtener biodiesel de sus semillas. El látex de sus hojas, se ha utilizado en medicina tradicional y también como cerca viva, protegiendo de la erosión (Makkar y col., 1998; Martínez-Herrera y col., 2006). En los últimos años, se han realizado varios estudios para establecer la

adecuabilidad de variedades de semillas oleaginosas no comestibles para producir biodiesel.

Dentro de estas semillas se tiene al algodón (*Gossypium hirsutum*), *Jatropha* (*Jatropha curcas*), hule (*Hevea brasiliensis*), mostaza etíope (*Brassica carinata*), almendro (*Terminalia catappa*), entre otros más (Pinsi y col, 2013; Moser, 2009; Pinzi, y col., 2009; Balat, 2011; Azocar y col., 2010).

Las semillas de *Jatropha* especialmente las especies *J. pohliana*, *J. gossypiifolia* y *J. curcas* tienen un alto contenido de aceite, lo cual ha permitido que estas especies sean consideradas como cultivos potenciales como materia prima de aceite para la producción de biodiesel (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2013). *J. curcas* es única entre todas las fuentes de energía renovable en términos del gran número de posibilidades de utilización que pueden realizarse. Su cultivo requiere de simple tecnología, y comparativamente modesto capital de inversión (Francis y col., 2005). Entre sus otros potenciales, es una especie que podría ser efectiva en la remoción de metales pesados como el plomo y el cadmio, como se demostró con *Euphorbia cheirandenia* (Chehregani y Malayeri., 2007). En adición *J. curcas* es capaz de remover cromo hexavalente (Mangkoedihardjo y col., 2008).

2.2. Metales pesados

El término metal pesado (MP) se refiere a cualquier elemento metálico que tiene una densidad relativamente alta, y de acuerdo al rol de los MP en los sistemas biológicos estos se clasifican como esenciales y no esenciales. Los MP esenciales son aquellos que son necesarios en cantidades mínimas por los organismos vivos para sus funciones fisiológicas y bioquímicas vitales. Algunos de los metales esenciales son Fe, Mn, Cu y Zn. Los metales no esenciales son aquellos que no tienen ninguna función fisiológica ni bioquímica, entre ellos se encuentran el Cd, Pb, Cr, Hg y el arsénico (As). Las concentraciones de MP mas allá de los límites umbrales poseen efectos adversos para la salud humana (Tabla 1) porque interfieren con el normal funcionamiento de los sistemas vivos (Ali y col., 2013).

Tabla 1. Efectos tóxicos de los metales pesados sobre la salud. (Tomada de Maldonado-Magaña y col., 2014)

Metal pesado	Efecto tóxico	Referencia
As	As (arsenato) es un análogo del fosfato por lo que interfiere con procesos celulares esenciales como la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP	Tripathi y col., 2007
Cd	Carcinogénico, mutagénico y teratogénico, disruptor endocrino, interfiere con la regulación del calcio en sistemas biológicos, provoca falla renal y anemia crónica	Degraeve, 1981; Salem y col., 2000 y Awofolu, 2005
Cr	Provoca pérdida del cabello	Salem y col., 2000
Cu	Elevados niveles ocasionan daño cerebral y renal, cirrosis, anemia crónica, irritación estomacal e intestinal	Salem y col., 2000; Wuana y Okieimen, 2011
Hg	Ansiedad, enfermedades autoinmunes, depresión, alteraciones en el equilibrio, somnolencia, fatiga, pérdida de cabello, insomnio, irritabilidad, pérdida de memoria, infecciones recurrentes, alteraciones en la visión, temblores, úlceras, daño cerebral, renal y pulmonar	Neustadt y Pieczenik, 2007; Ainsa y col., 2010 y Gulati y col., 2010
Ni	Dermatitis alérgica, su inhalación puede ocasionar cáncer pulmonar, nasal y de senos paranasales, así como cáncer de garganta y estómago	Salem y col., 2000, Khan y col., 2007, Das y col., 2008
Pb	En niños ocasiona alteraciones en el desarrollo, retraso mental, pérdida de la memoria, problemas de aprendizaje; insuficiencia renal, alteraciones cardiovasculares	Salem y col., 2000; Padmavathiamma y Li, 2007; Wuana y Okieimen, 2011; Igbal, 2012
Zn	Una sobredosis puede ocasionar mareos y fatiga	Hess y Schmid, 2002

Los metales pesados están siendo liberados día con día al medio ambiente debido a varias actividades antropogénicas (Tabla 2), por ejemplo, el uso de agroquímicos, desechos domésticos, efluentes de actividades industriales, así como las emisiones vehiculares urbanas, los cuales están causando trastornos a los ecosistemas terrestres (Wei y col., 2007; Ali y col., 2013; Senesi y col., 2009).

Tabla 2. Fuentes antropogénicas de metales pesados. (Tomado de Maldonado-Magaña y col., 2014)

Metal pesado	Fuente de contaminación	Referencia
As	Pesticidas, conservadores de la madera	Thagavel y Sbbhuramm, 2004
Cd	Pinturas y pigmentos, estabilizantes plásticos, galvanoplastia, fertilizantes	Salem y col., 2000, Pulford y Watson 2003
Cr	Industria del acero, curtido de pieles	Khan y col., 2007
Cu	Pesticidas y fertilizantes	Khan y col., 2007

Hg	Minas de Au-Ag, combustión de carbón, desechos médicos	Memon y col., 2009, Wuana y Okieimen, 2011, Rodrigues y col., 2012
Ni	Efluentes industriales, aparatos de cocina, instrumentos quirúrgicos, aleaciones de acero, baterías de automóviles	Tariq et al., 2006
Pb	Combustión de gasolina con Pb, fabricación de baterías, herbicidas, insecticidas	Thagavel y Sbbhuramm, 2004; Wuana y Okieimen, 2011

2.3 Absorción de metales pesados en las plantas

Las plantas son capaces de absorber metales esenciales y no esenciales del suelo, como respuesta a los gradientes de concentración, mediante la absorción selectiva de iones o por difusión a través de las raíces. La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos en la cadena alimentaria. La absorción y posterior acumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde la solución en el suelo a la raíz de la planta. El transporte de un elemento dado a partir del suelo a las partes aéreas de la planta se puede dividir en tres procesos distintos: absorción a partir de la matriz (por ejemplo, suelo), transporte a la xilema de la raíz y transporte a los retoños. La acción negativa de estos metales sobre la salud es ocasionada al menos por dos vías, transporte medio ambiente en el aire, agua, polvo y comida, la segunda por alterar la forma bioquímica de los elementos. La habilidad de la vida silvestre para acumular y concentrar metales pesados tales como el cadmio, incrementan el riesgo de toxicidad sobre la cadena alimenticia, siendo la dieta una de las principales vías de exposición a metales (Beijer y Jernelov, 1986). En plantas, el concepto de bioacumulación se refiere a la agregación de contaminantes; algunos de ellos son más susceptibles a ser fitodisponibles que otros (Kabata-Pendias, 2000).

Los metales pesados pueden presentarse en el suelo bajo diferentes formas:

1. Solubles en el agua del suelo.
2. Como iones intercambiables de los coloides que integran el complejo de cambio.
3. Formando complejos con la materia orgánica.
4. Absorbidos en los óxidos e hidróxidos de Fe, Mn y Al, sulfuros y fosfatos.

5. Como constituyentes de los minerales secundarios del suelo.

Los metales pesados son retenidos en los suelos de distintas formas, tal y como se indica en la Tabla 3. A su vez, dichas formas de retención representan diferentes grados de disponibilidad relativa para las plantas.

Tabla 3. Formas químicas de los metales en el suelo y su disponibilidad relativa para las plantas.

Formas de retención en el suelo	Disponibilidad relativa
Ion en la disolución del suelo	Fácilmente disponible
Ion en complejo de intercambio orgánico o inorgánico	Disponible
Metales acomplejados o quelatados por compuestos orgánicos	Menos disponible
Metal precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre una alteración química
Incorporado en la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Metal en la estructura mineral	Disponible después de la alteración mineral

2.3.1 Mecanismos de defensa y tolerancia

La capacidad de tolerar y acumular MP en las plantas depende de la especie vegetal (Huang y Cunningham, 1996; McGrath y col., 2002). Cuando un MP entra a las células de una planta, ocurren numerosas reacciones bioquímicas, de las cuales, la mayoría son producidas por bloqueo de grupos funcionales de las proteínas o por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Figura 1)

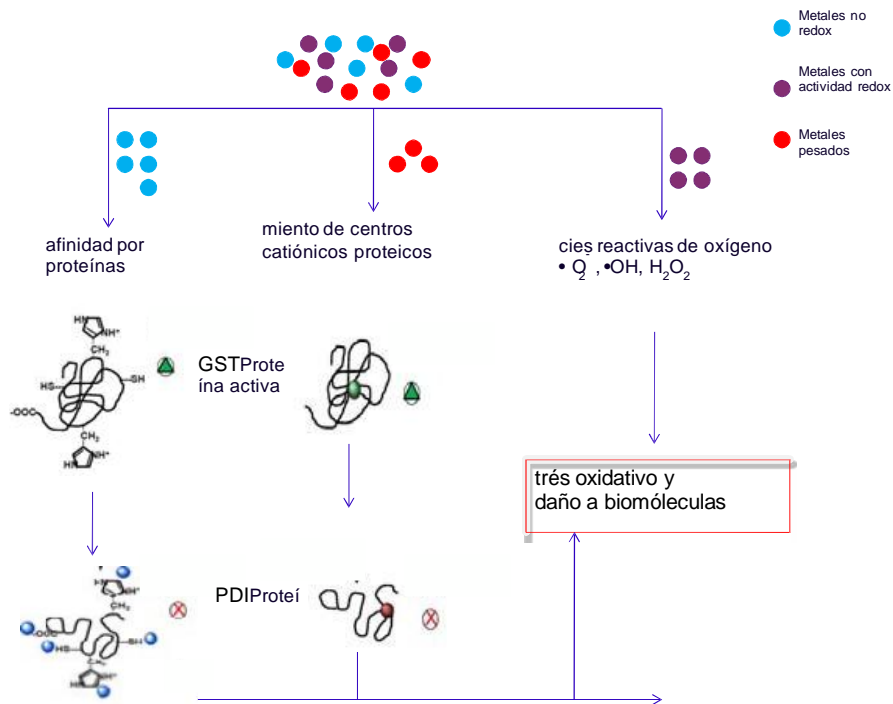


Figura 1. Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas (Tomado de Maldonado-Magaña y col., 2014)

Los mecanismos moleculares de respuesta a MP, incluyen:

a) Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO); por auto-oxidación y reacciones de Fenton y Haber-Weiss, estas reacciones son típicas para los metales con actividad redox (Fe y Cu). La reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) a partir de H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) y superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Esta reacción puede ocurrir en las células vivas y como consecuencia es una posible fuente de estrés oxidativo. La reacción directa es muy lenta, pero es catalizada por el hierro en estado de oxidación (III).

El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso: $\text{Fe}^{3+} + \bullet\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$

El segundo paso es una reacción de Fenton: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$

La reacción neta es: $\bullet\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

b) Bloqueo de grupos funcionales esenciales de biomoléculas, que se presenta principalmente con metales no redox (Cd y Hg) (Pedrosa y col., 2014), y c)

desplazamiento de metales esenciales de biomoléculas (Schützendübel y Polle, 2002).

En respuesta al daño ocasionado por los MP, las células activan sus sistemas antioxidantes, producen moléculas encargadas de la detoxificación (glutati6n, fitoquelatinas y metalotioneínas), así como proteínas capaces de reparar las proteínas dañadas (chaperonas), y activan vías de señalización con el fin de que la célula active todos los mecanismos necesarios para que logre adaptarse, tolerar y defenderse de los MP (Ahsan y col., 2009) (Figura 2).

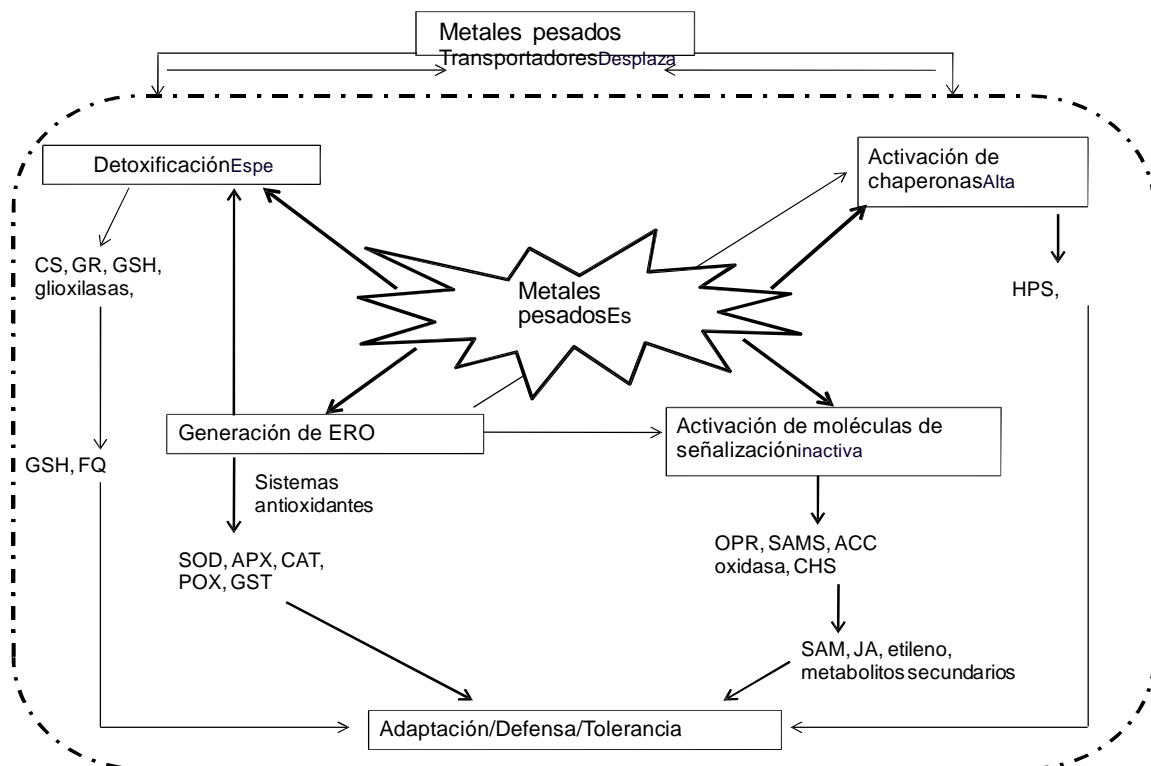


Figura 2. Mecanismos de defensa activados por los MP en las células vegetales. CS, cisteína sintasa; GR, glutati6n reductasa; GSH, glutati6n; GST, glutati6n-S-transferasa; SOD, super6xido dismutasa; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; POX, peroxidasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; HSP, proteína de choque térmico; OPR, ácido 12-oxo-fitodienoico isomerasa; SAMS, S-adenosil-L-metionina sintetasa; ACC oxidasa, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa; CHS, chalcona sintetasa; SAM, S adenosil-Lmetionina; JA, ácido jasmónico. (Ahsan y col., 2009).

2.4 Fitorremediación de metales pesados

El término “fitotecnologías” se refiere a la aplicación de la ciencia y la ingeniería para proveer soluciones que involucran plantas, incluyendo la opción de fitorremediación usando plantas y microbios asociados para remediar los suelos contaminados por elementos trazas y xenobióticos orgánicos (SenGupta, 2002). La fitorremediación es una tecnología relativamente reciente, los estudios de investigación en esta área se han realizado en su mayoría durante las dos últimas décadas. Es una técnica relativamente reciente, estéticamente agradable y adecuada para la aplicación en sitios grandes donde otros métodos de remediación no son rentables o factibles (Garbisu y Alkorta, 2003). Estas fitotecnologías reducen *in situ* o *ex situ* la concentración de diversos compuestos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas (Delgadillo-López y col., 2011). Las plantas pueden remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes y llevar a cabo su detoxificación por diversos mecanismos (Kelley y col., 2000; Miretzky y col., 2004; Cherian y Oliveira, 2005; Eapen y col., 2007; Cho y col., 2008).

Se han identificado una amplia diversidad de especies que tienen capacidad para acumular alta cantidad de MP y reciben el nombre de especies hiperacumuladoras. El grado de asimilación de metales por las plantas varía ampliamente entre especies y entre los órganos de las plantas (Shukla y col., 2007). Por ejemplo, algunos estudios han mostrado que los niveles más altos de arsénico y de cromo se acumulan en las raíces en comparación a los tallos o callos (Gupta y Sinha, 2007; Shukla y col., 2007). Éstas deben acumular al menos $100 \mu\text{g g}^{-1}$ (0.01 % peso seco) de Cd y As; $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ (0.1 % peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb; y $10\,000 \mu\text{g g}^{-1}$ (1.0 % peso seco) de Mn (Watanabe, 1997; Reeves y col., 1999; McGrath y col., 2001; Kamal y col., 2004; Yang y col., 2004; Reeves, 2006; Padmavathiamma y Li, 2007).

2.4.1 Estrategias de fitorremediación

Básicamente, dos tipos de fitorremediación son aplicables a los suelos contaminados por metales pesados: la fitoestabilización y la fitoextracción. La fitoestabilización se utiliza en los suelos donde la gran cantidad de contaminantes imposibilita la fitoextracción, y se basa en el uso de plantas tolerantes a los metales para inmovilizarlos a través de su absorción y acumulación en las raíces o precipitación en la rizosfera, reduciendo así su movilidad y su biodisponibilidad para otras plantas o microorganismos. Por otra parte, la fitoextracción, también conocida como fitoacumulación, es la captación de iones metálicos por las raíces de la planta y su acumulación en las partes cosechables de la misma. (Figura 4). Hay plantas que absorben selectivamente grandes cantidades de metales acumulando en los tejidos concentraciones mucho más altas que las presentes en el suelo o en el agua. Este proceso se ha utilizado para eliminar hidrocarburos de agua y suelo con cultivos de alfalfa, álamo, enebro (Vázquez, 2003). Las posibles rutas de los contaminantes en el ecosistema, se muestra en la Figura 3.

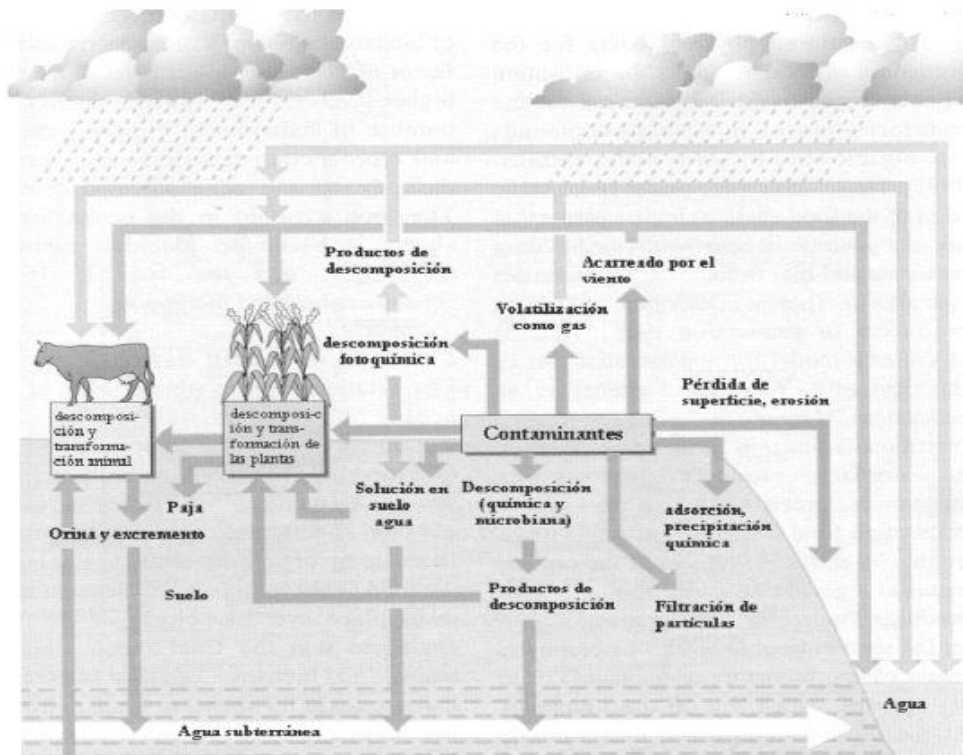


Figura 3. Diversas rutas de desplazamiento de la contaminación en el ambiente.

(Tomado de Schwedt, 2001).

Las plantas exhiben diferentes mecanismos de captación de contaminantes orgánicos e inorgánicos y que se emplean en los procesos de fitorremediación (Figura 4).

Las fitotecnologías se basan en los mecanismos fisiológicos básicos que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición (Tabla 4).

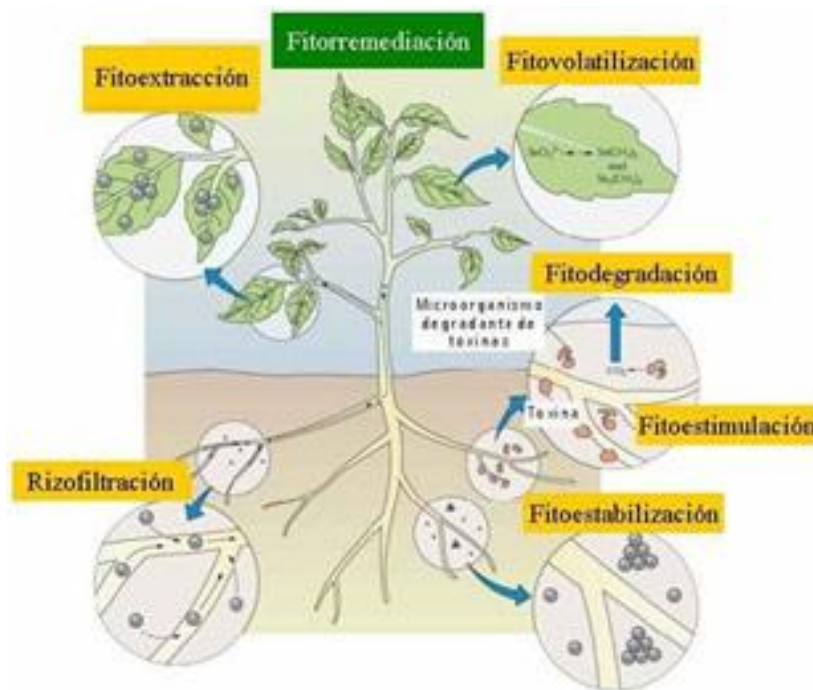


Figura 4. Proceso de la fitorremediación de los contaminantes. (Tomado de <http://institucional.uflo.edu.ar/uflo/novedades.php?ver=novedad&id=525>).

Dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido, las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medio de contención (rizofiltración, fitoestabilización y fitoinmovilización), o eliminación mediante la fitodegradación, fitoextracción y fitovolatilización (Thangavel y Subhram, 2004). En la Tabla 4 se mencionan los mecanismos de fitorremediación en las plantas.

Tabla 4. Mecanismos de fitorremediación

Proceso	Mecanismos	Contaminantes
Fitoestabilización	Complejación	Orgánicos e inorgánicos
Fitoextracción	Hiperacumulación	Inorgánicos
Fitovolatilización	Volatilización a través de las hojas	Orgánicos e inorgánicos
Fitoinmovilización	Acumulación en la rizósfera	Orgánicos e inorgánicos
Fitodegradación	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes	Orgánicos
Rizofiltración	Uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua	Orgánicos e inorgánicos

Fuente: Ghosh y Singh (2005).

2.4.1.1 Fitoestabilización

La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera. Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas o al aire (Barton y col., 2005; Mendez y Maier, 2008).

2.4.1.2 Fitoextracción o Fitoacumulación

La fitoextracción o fitoacumulación consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas. El primer paso para la aplicación de esta técnica es la selección de las especies de planta más adecuada para los metales presentes y las características del emplazamiento. Una vez completado el desarrollo vegetativo de la planta el siguiente paso es cortarlas y proceder a su incineración y traslado de las cenizas a un vertedero de seguridad, como se observa en la Figura 5. La fitoacumulación se puede repetir ilimitadamente hasta que la concentración remanente de metales en el suelo esté dentro de los límites considerados como aceptables (Kumar y col., 1995).

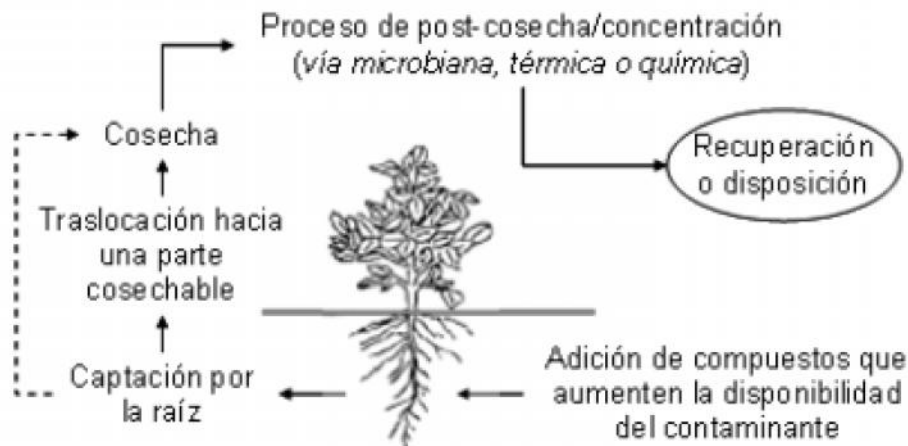


Figura 5. Representación de la fitoextracción
(Tomado de Volke-Sepúlveda y col., 2007).

2.4.1.3 Fitovolatilización

La fitovolatilización se produce a medida que los árboles y otras plantas en crecimiento absorben agua junto con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Algunos de estos pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse en la atmósfera (Prasad y Freitas, 2003). Mediante este proceso se han eliminado contaminantes como: compuestos orgánicos volátiles (benceno, nitrobenceno, tolueno, etilbenceno y *m*-xileno), As, Se y Hg (Burken y Ma, 2006; Padmavathiamma y Li, 2007)

2.4.1.4 Fitodegradación

En la fitodegradación las plantas y los microorganismos asociados a ellos degradan los contaminantes orgánicos en productos inofensivos, o bien, mineralizarlos hasta CO_2 y H_2O . En este proceso los contaminantes son metabolizados dentro de los tejidos vegetales y se producen mecanismos antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (AT), ascorbato peroxidasa (APOX) y otros no enzimáticos como el ascorbato, glutatión reducido, -tocoferol, y -carotenos para prevenir el daño oxidativo (Piotrowska y col., 2010). Algunos trabajos mencionan que existe una acumulación de SOD e isoenzimas de POX en cotiledón, hipocotilo, hipercotilo y radícula expuestas a metales pesados en plantas (Juwarkar y col, 2008; Gao y col., 2009, 2010).

2.4.2 Cromo

El cromo es un metal pesado que no se halla libre en la naturaleza, pero si combinado. Es un elemento natural que está presente en rocas, suelos, aguas, plantas y animales, el cromo trivalente, por ejemplo, es un mineral que se encuentra abundantemente en frutas, verduras, productos lácteos, carnes y, en un menor grado, la cerveza y el vino. El cromo hexavalente en particular es un desnaturizador de proteínas y precipitante de los ácidos nucleicos; además, es considerable la acción cancerígena de los cromatos sobre el pulmón y el aparato digestivo (Otiniano-García y col., 2007).

Existen referencias sobre el cromo, que indican que es un metal pesado que funciona químicamente con distintos estados de oxidación: bivalente, trivalente y hexavalente, siendo este último de gran importancia por su alto poder tóxico. El cromo (II) es inestable y se oxida rápidamente al cromo (III), que en los seres humanos promueve la acción de la insulina; el cromo metálico, o cromo (0), al carecer de actividad biológica y debido a su alta reactividad, no se encuentra libre en la naturaleza, mientras que los derivados del cromo (VI) (cromatos y dicromatos), usualmente son de origen antropogénico (Giardina y col., 2012). La principal fuente de contaminación con este metal es en la industria del cuero, donde sus efluentes contaminan con sólidos en suspensión que contienen cromo; se probó el efecto tóxico de los efluentes con cromo en el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* L. (Aurazo de Zumaeta y Esparza, 1995).

En las plantas está presente en concentraciones detectables, pero no se conoce si es un nutriente esencial para la vida vegetal. El Cr es un elemento que no es esencial para el crecimiento vegetal, por lo que las plantas no poseen un mecanismo específico para su absorción; la absorción de este metal es a través de transportadores empleados para absorber otros elementos esenciales para la planta. La vía de absorción del Cr(VI) involucra el proceso de absorción y la competencia por transportadores activos para el Fe, S y P (Cervantes y col., 2001); mientras que el Cr(III) ingresa a la célula por transporte pasivo (Figura 6); una vez absorbidos, Cr(VI) y el Cr(III) deben cruzar la endodermis vía simplasto,

aunque probablemente el Cr(VI) en las células es reducido a Cr(III) el cual es retenido en las células corticales de la raíz cuando existen bajas concentraciones de Cr(VI), lo cual en parte explica la baja toxicidad del Cr(III) (Cervantes y col., 2001). Skeffington y col. (1976) realizando estudios con Cr radioactivo (^{51}Cr) observo que el Cr es principalmente transportado por la xilema de las plantas. Golovatyj y col. (1999) encontraron que la absorción del Cr depende de las propiedades del suelo y de la concentración de este elemento; la máxima acumulación de Cr siempre fue encontrada en las raíces y una acumulación menor en la parte aérea.

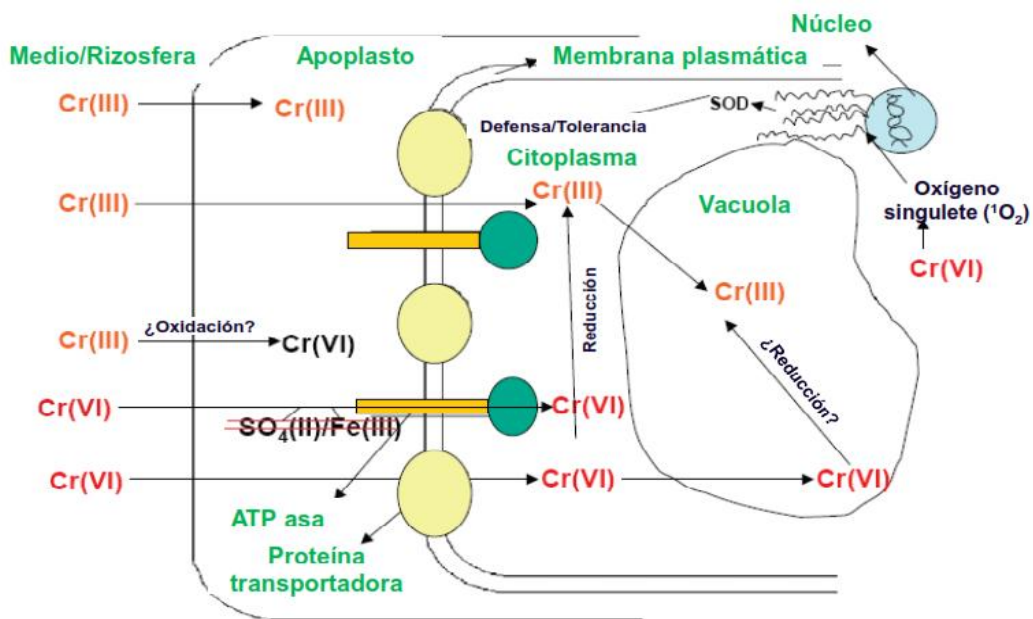


Figura 6. Modelo de transporte y toxicidad del cromo en las plantas (Tomada de Maldonado-Magaña y col., 2014)

2.4.3. Plomo

El plomo (Pb), por ejemplo, es un contaminante ambiental altamente tóxico, su presencia en el ambiente se debe principalmente a las actividades antropogénicas como la industria, la minería y la fundición. En los suelos contaminados con Pb se suele encontrar también Cd y Zn (Hettiarachi y Pierzynski, 2002) por analogía entre sus propiedades y características metálicas algo similar a lo que ocurre para la triada de Fe-Ni-Co. En estos casos la barrera suelo-planta limita la traslocación de Pb a la cadena alimenticia, ya sea por procesos de inmovilización química en el suelo según se ha reportado (Laperche y col., 1997) o limitando el crecimiento

de la planta antes de que el Pb absorbido alcance valores que puedan ser dañinos al ser humano. El Pb presente en suelos contaminados puede llegar a inhibirse mediante la aplicación de fósforo y óxidos de magnesio; sin embargo, estos tratamientos pueden llegar a afectar la biodisponibilidad de otros metales esenciales como el Zn (Hettiararchchi y Pierzynski, 2002; Jain y col., 2010).

En suelos estudiados con diferente pH y contenidos de arcilla y materia orgánica, y donde se han añadido intencionalmente concentraciones de Pb y Zn, ha sido determinada la capacidad de la absorción de los mismos en cada tipo de suelo. Se sembró lechuga y después de cosechar las mismas se evaluaron nuevamente los suelos y se observó que disminuyó la concentración de estos metales en los suelos (Stevens y col., 2003), lo que pone de manifiesto que éstos suelos contaminados son un riesgo para la salud porque las plantas pueden absorber estos metales.

El plomo (Pb) es un metal tóxico ubicuo en el ambiente, ampliamente utilizado en el pasado principalmente como aditivo en pinturas y en combustibles, además de otras aplicaciones industriales en cañerías, baterías, juguetes, artículos escolares, cerámicos vidriados e imprentas (ATSDR, 2007). Es un elemento no esencial para el ser humano y capaz de inducir alteraciones en diversos sistemas del organismo, tales como en los sistemas: nervioso, renal, circulatorio, inmunológico, reproductivo y hematopoyético. La detección de alteraciones en este último sistema contribuye al diagnóstico de exposición (Souza y Tavares 2009). Sólo un porcentaje del total del Pb ingerido por vía gastrointestinal es absorbido (entre el 10 y 15% en adultos, el 50% en niños) (Markowitz, 2000). Una vez que ingresa al torrente sanguíneo, el 95% del Pb se acumula dentro de los eritrocitos durante aproximadamente 30 días (Patrick 2006), donde interfiere en la síntesis del grupo hemo dada su capacidad de alterar la actividad de algunas enzimas que forman parte de esta vía metabólica, como la enzima ácido α -aminolevulínico sintetasa (α -ALAS), ácido α -aminolevulínico dehidratasa (α -ALAD) y ferroquelatasa (Needleman 2004). Como resultado, los niveles de hemo en el organismo disminuyen ocasionando anemia, la cual va acompañada de alteraciones en los

niveles sanguíneos de varios parámetros involucrados en esta vía de síntesis. Estas alteraciones han sido extensamente utilizadas como indicadores de intoxicación por este metal (Sakai y Morita, 1996; Balparda, 2008).

2.5 Plantas usadas en la fitorremediación.

En diversos estudios se han reportado a gran biodiversidad de especies con potencial, probado en campo y en laboratorio, para la fitorremediación. Hasta la fecha, se han identificado 163 taxones de plantas, pertenecientes a 45 familias, tolerantes a los metales y capaces de crecer en concentraciones elevadas. Entre las angiospermas se han identificado cerca de 400 hiperacumuladoras; entre las familias dominantes se encuentran: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Europhobiaceae. De estas familias, Brassicaceae tiene el mayor número de taxones, 11 géneros y 87 especies, con capacidad para hiperacumular metales (Prasad y Freitas, 2003).

En zonas áridas y semiáridas se han reportado especies como el mezquite (*Prosopis laevigata*), huizache (*Acacia spp.*) y pirul (*Schinus molle*), en los cuáles se han evaluado metales pesados de acuerdo a diferentes usos de suelo y la temporada del año, encontrándose Fe, Pb, Mn, Ni, Cu, As y Cd (Alcala-Jauregui y col., 2012; Aragón-Piña y col., 2006)

Mukhopadhyay y Maiti (2010) indican que los géneros de plantas: *Brassica*, *Vetiveria*, *Sesbania*, *Minuartia*, *Juncus*, *Scirpus* y *Thymus* son acumuladoras de Pb, y los géneros de *Vetiveria*, *Sesbania*, *Viola*, *Sedum* y *Rumex*, son plantas acumuladoras de Cd., y Ginocchio y Baker (2004) encontraron que las especies *A. magellanicus bracteatus* y *M. angustata* son plantas hiperacumuladoras para Cd y Pb en estudios realizados en Perú.

Madera-Parra y col. (2014), evaluaron el efecto de las concentraciones de los metales pesados, Hg⁺², Cd⁺², Cr⁺⁶, Pb⁺², en la respuesta fisiológica y acumulación de metales pesados en las especies *Colocasia esculenta*, *Heliconia psittacorum* y

Gynerium sagittatum, siendo *Heliconia* la que obtuvo un factor de traslocación mayor que 1, para Pb (II), Cr (total) y Hg (II) y de 0.4 -0.9 para Cd (II) y Cr (VI).

Maldonado-Magaña y col, (2011), encontraron que la *Acacia farnesiana* (L) Willd, tolera concentraciones de plomo elevadas, acumulando arriba del 80% del Pb^{+2} en las raíces, cuando las semillas se expusieron a concentraciones de 1000 mg L^{-1} de Pb^{+2} con altos factores de bioconcentración y bajos de traslocación.

Existen variados estudios sobre el uso de plantas acuáticas en trabajos de biorremediación algunos ejemplos de ellas son: *Scirpus lacustris* (Cd, Cu, Pb, Mg, Fe, Se, Cr), *Lemna gibba* (Pb, As, Cu, Cd, Ni, Cr, Al, Fe, Zn, Mn), *Azolla caroliniana* (Hg, Cr Sr, Cu, Cd, Zn, Ni, Pb, Au, Pt), *Elatine trianda* (As), *Wolffia papulifera* (Cd) (Zhao y Duncan, 1998; Boniardi y col., 1999; Fogarty y col., 1999; Antunes y col., 2001; Groudeva y col., 2001; Cohen-Shoel y col., 2002; Suseela y col., 2002; Quin y Terry, 2003; Zheng y col., 2003)

Adicionalmente se cuenta con las siguientes plantas que son ornamentales y de fácil acceso, para remover metales pesados: lirio (*Nymphaea ampla* L.), el jacinto de agua o camalote (*Eichornia crassipes* Solms.), el centavito o sombrero acuático (*Hydrocotyle verticillata* Thunb.), el papiro egipcio (*Cyperus papyrus* L.) o el papiro estrellado (*Cyperus alterinifolius* L.), la menta acuática (*Mentha aquatica* L.), la ortiga acuática (*Cabomba aquatica* Aubl.), la cola de zorro o cola de gato (*Ceratophyllum demersum* (Carrillo y col., 2015).

Las plantas que producen múltiples cosechas en un solo periodo de crecimiento como el trébol (*Trifolium* spp.), pueden tener un gran potencial como plantas hiperacumuladoras de metales pesados (Ali y col., 2012). Los pastos son más recomendados para la fitoextracción, que los arbustos y los árboles debido a su alta velocidad de crecimiento, más adaptabilidad al estrés ambiental y gran biomasa (Malik y col., 2010).

Aunque algunos investigadores han sugerido el uso de granos como el maíz y la cebada, esto tiene el inconveniente que contamina la cadena alimentaria tanto de humanos como de animales (Vamerali y col., 2010).

En estudios realizados con, *Vicia sativa* L. (veza o alberja), *Hordeum vulgare* (cebada) y *Helianthus annuus* L. (girasol), en suelos contaminados con lodos de depuradora en condiciones de invernadero, se determinó la presencia de los metales, Pb, Cu, Ni, Zn y Cr. En el análisis de metales en planta se observó en la cebada un incremento lineal en el contenido de todos los metales (excepto el Zn) en la parte aérea, con la aplicación de lodos, sin embargo este efecto no se produjo tan marcadamente en el girasol y la veza aunque si aumentó el contenido de metales en las plantas cultivadas en suelos enmendados con lodos (Cabezas y col, 2004). El contenido de metales totales en el sistema radicular de la cebada incrementó con la dosis de lodo aplicada. Esta misma tendencia se produjo en la veza para el Pb, Cu y Zn, y en el girasol para el Cu. En general las cantidades de metales acumuladas en la planta fueron mayores en la cebada que en la veza y el girasol, siendo significativos los valores en el caso del Cu, Ni y Cr. Este hecho implica la necesidad del control de los contenidos en metales pesados en cereales para evitar su paso a la cadena alimentaria (Cabezas y col, 2004).

Las plantas están expuestas a contaminantes por vías foliar y radicular (Petroff et al. (2008). El transporte de un elemento dado a del suelo a las partes aéreas de la planta se dividen en tres procesos distintos: absorción a partir de la matriz (Por ejemplo, soluciones de suelo), transporte a la xilema de la raíz y transporte al vástago (Schreiber, 2006; Trapp (2004).

El grado de absorción de un metal por las plantas varía ampliamente de especie a especie y de cada parte de la planta (Shukla y col., 2007). Varios estudios han mostrado que los niveles más altos de arsénico y cromo se acumulan en las raíces comparado a las hojas o brotes (Gupta y Sinha, 2007; Shukla y col., 2007). Aún más la absorción de metaloides y metales pesados se dificulta más en suelos

de pH neutro, altos niveles de arcilla y suelos con la presencia de materia orgánica. (O'Dell y col., 2007; Norwood y col., 2007).

Yadav, (2009), estudió el comportamiento de *J. curcas* hacia la bioacumulación de arsénico, cromo y zinc en la raíz, retoño y hojas. Los tratamientos con baja concentración de arsénico y cromo (25 mg kg^{-1}) no mostraron concentración en los tejidos de la planta. Se encontró que la absorción potencial de la planta se incrementó en As y Cr, conforme aumentó la concentración en el suelo. Los tratamientos arriba de 250 mg Kg^{-1} , resultaron en alta concentración en la raíz ($29.00 \pm 1.95 \text{ mg kg}^{-1}$) y en los brotes fue la mitad ($12.50 \pm 0.96 \text{ mg kg}^{-1}$), de arsénico en las plantas comparadas con el testigo.

Agbogidi y col., (2013), estudio la concentración de metales pesados sembrados en *J. curcas* en suelos contaminados con petróleo crudo y observó que las hojas, los tallos y las raíces contienen concentraciones crecientes de metales pesados conforme aumenta la cantidad de petróleo en el suelo. Para Pb se obtienen valores de concentración medios de 3.57, 2.03 y 5.61 mg kg^{-1} para las hojas, tallo y raíces respectivamente y en el caso del cromo de 2.86, 3.2 y 7.68 en hojas, tallos y raíces, para una concentración media de 1.74 y 2.86 de Pb y Cr en el suelo, mostrando que los tejidos de la planta estudiados tuvieron concentraciones mucho mayores de Pb y Cr que los cultivados en suelos no contaminados. Yadav y col., (2009), concluyeron que *J. curcas* puede crecer en suelos contaminados con cromo siendo acumulado este en las raíces y en los retoños.

2.6 Cultivo in vitro de plantas y de células en la fitorremediación

Las fitotecnologías son la aplicación de la ciencia e ingeniería para proveer soluciones que involucran plantas, incluyendo opciones de fitorremediación (usando plantas y microbios asociados) para remediar ambientes contaminados con metales y xenobióticos orgánicos (Mench y col., 2009)

La fitorremediación se define como el uso de plantas para eliminar, destruir o transformar contaminantes del suelo, agua y aire. En este proceso, las plantas

son seleccionadas principalmente por su potencial fisiológico, como en el caso de enzimas presentes para tolerar y asimilar sustancias tóxicas, por sus tasas de crecimiento, por la profundidad de sus raíces y su habilidad para bioacumular y/o degradar contaminantes (Panich-Pat y col., 2010).

Se consideran normalmente tres formas de realizar cultivos *in vitro*, como son el cultivo de células en suspensión, células inmovilizadas o como tejidos u órganos (Arias y col., 2009). Con el fin de contar con medios de experimentación controlados, se ha optado por utilizar extractos celulares, cultivos celulares de plantas no diferenciadas, tales como callos y células en suspensión, cultivos de órganos diferenciados tales como raíces y retoños, explantes como discos de hojas, raíces extirpadas, plantas completas en cultivos hidropónicos, plantas completas en macetas con suelo en condiciones de invernadero y plantas completas en el campo (Doran, 2009)

Ya que los cultivos de plantas *in vitro* se cultivan y mantienen libres de contaminación microbiana, estos pueden usarse para distinguir respuestas y capacidades metabólicas de células de plantas a partir de aquellas presentes normalmente en la rizósfera o tejidos de plantas (Chaudhry y col., 2005; Lebeau y col., 2008) El cultivo *in vitro* es una herramienta muy útil ya que, una vez establecidos los cultivos, están disponibles en cualquier momento para el investigador y, el tiempo necesario para llevar a cabo experiencias determinadas puede reducirse considerablemente al compararlo con el uso de plantas enteras. La relativa homogeneidad de los cultivos y la facilidad con que las condiciones pueden estandarizarse (composición del medio de cultivo, parámetros nutricionales, niveles de reguladores de crecimiento, adición de efectores y/o inhibidores, etc.) ayuda a conseguir la reproducibilidad de los resultados (Couselo y col., 2010).

El crecimiento de las células de plantas es más rápido en suspensión que en cultivos de callos y es también controlado más fácilmente debido a que el medio de cultivo puede ser fácilmente corregido o cambiado. Los órganos pueden ser

inducidos a desarrollarse en células en suspensión y la iniciación de raíces y brotes generalmente comienzan en agregados celulares. Los embriones somáticos pueden surgir a partir de células simples. Las células a partir de suspensiones pueden también ser colocadas en 'placas en medio sólido donde las células simples y/o células agregadas crecen en colonias de callos a partir de las cuales las plantas pueden ser con frecuencia regeneradas (George y col., 2008)

Sin embargo, el cultivo de tejidos no será nunca una tecnología práctica y comercial que pueda aplicarse en fitorremediación a gran escala. Por el contrario, debe considerarse como una herramienta capaz de predecir lo que pueda ocurrir a nivel de planta, desarrollando modelos que faciliten el conocimiento de los mecanismos metabólicos y de tolerancia de los contaminantes que funcionan en las plantas (Doran, 2009)

Adicionalmente para este tipo de cultivos se utilizan plantas con alta producción de biomasa, sistemas de raíz extensivos y tolerancia al estrés. Por esto se tiene amplia utilidad para la aplicación a problemas de contaminación y de biorremediación completamente verde y limpia (Hall, 2002).

Con base en sistemas de células aisladas se han realizado diversos estudios relacionados con los procesos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que operan durante el estrés salino, osmótico y frío (Bressan y col., 1982; Bhaskaran y Smith, 1990; Tholakalabavi y col., 1994; Leonardi y col., 1995; Robertson y col., 1995; Hawkins y Lips, 1997; Tholakalabavi y col., 1997; Cazalé y col., 1998) y han permitido el aislamiento de genes relacionados con estrés osmótico y salino (Umeda y col., 1994). Los cultivos en suspensión también son considerados importantes reactores para la obtención de productos valiosos como endulzantes, farmacéuticos, saborizantes, fragancias, compuestos aromáticos y enzimas (Mühlbach, 1998).

Soomro y Asma (2007), establecieron cultivos en suspensión de células y callos de rápido crecimiento de *J. curcas*, con un periodo de mantenimiento por un

periodo de dos años, sin cambio aparente en la velocidad de crecimiento y para su uso posterior en otros experimentos. Bernabé-Antonio y col. (2015) demostraron que, en cultivos de células en suspensión, *J. curcas* puede acumular altas concentraciones de plomo y cromo. Para cromo 6000 mg/L y para plomo 8000 mg/L, por lo que puede considerarse a *J. curcas* como una especie con un alto potencial para ser considerada como hiperacumuladora de estos dos elementos.

3. JUSTIFICACIÓN

El incremento en la contaminación de suelos, aguas y aire con metales pesados, de diferente origen sobre todo industrial y de combustión de vehículos automotores, ha generado la necesidad de buscar métodos que permitan destoxificar estos recursos. Una manera de poder hacerlo es a través de plantas que acumulan en su interior metales pesados como el cromo y el plomo. *Jatropha curcas* tiene esta capacidad por lo que se han realizado diferentes estudios en este sentido, sin embargo, se hace uso de plantas cultivadas en suelo.

Con el fin de aprovechar la biotecnología vegetal, se buscó realizar el cultivo de tejidos de *J. curcas*, ya que estos han contribuido en gran medida a estudios de acumulación y tolerancia de metales pesados.

Dentro de este tipo de estudios, se tomó como base estudios anteriores donde se cultivaron células en suspensión de *J. curcas*, que tiene la capacidad de absorber metales pesados adicionados al medio de cultivo. Adicionalmente, *J. curcas* se distribuye ampliamente en zonas áridas y semiáridas del país, donde se encuentra la mayoría de los sitios contaminados por metales pesados

4. HIPÓTESIS

La presencia de Cr y de Pb provoca un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en cultivos de células en suspensión de *J. curcas*

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Conocer el efecto del cromo (Cr) o plomo (Pb) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) en diferentes tiempos de crecimiento de un cultivo de células en suspensión (CCS) de *J. curcas*.

5.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de Cr(VI) y Pb(II) en el crecimiento de cultivos de células en suspensión

Determinar la capacidad de remoción de Cr(VI) y Pb(II) por células en suspensión

Estudiar el efecto de Cr(VI) y Pb(II) sobre las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) en diferentes tiempos de crecimiento de un cultivo de células en suspensión (CCS) de *J. curcas*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bioensayos de cromo y plomo

Para realizar este bioensayo, se estableció un CCS siguiendo la técnica reportada por Bernabé-Antonio y col. (2015). Biomasa fresca (2 g) se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de medio de cultivo MS (Murashigue y Skoog, 1962). Se adicionó al medio de cultivo, sacarosa (3% p/v) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 2.27 μM). Como fuente de Cr y Pb, se adicionaron al medio de cultivo sales de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, (Baker Analyzed, 108 Phillisburg, N.J.), respectivamente usando concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mM. Los cultivos se incubaron por 15 d en un agitador orbital a 110 rpm y 25 ± 2 °C, y se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 h con luz fluorescente blanca $60 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$.

6.2 Extracción de enzimas

Se colectaron en condiciones asépticas, muestras de cultivo celular (1 mL), a las 1, 5, 10, 24, 192 y 360 h después del inicio de la incubación. El máximo punto de muestreo (360 h) correspondió con el punto final de la fase de crecimiento exponencial, establecida de acuerdo a la cinética de crecimiento (Figura 7), de un cultivo de células en suspensión (CSC) de *J. curcas*, tal y como lo reportó Bernabé-Antonio y col. (2015). Las muestras de células se transfirieron a viales de 2 mL y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Para obtener los extractos crudos de enzimas (CCE), las células se filtraron y se enjuagaron con EDTA (10mM) para remover el Cr o Pb extracelular. Posteriormente, 100 mg de células frescas se resuspendieron en un buffer de fosfatos (100 mM, pH 6.8), se sonicaron por 15 min y se centrifugaron a 13,000 rpm, por 15 min a 4°C. El sobrenadante que contenía el CCE, se usó para determinar la actividad de SOD, POX y CAT.

6.2.1. Determinación de la actividad enzimática (SOD)

Cada ensayo de SOD fue realizado por el método de nitroazul tetrazolio (NBT) descrito por Fryer y col., (1998) y Beyer y Fridovich, (1987)). El color púrpura desarrollado se midió a 560 nm en un espectrofotómetro (Cecil serie 3000). Se

usó como blanco el buffer de ensayo sin SOD (100 mM, K_2HPO_4). Se elaboró una curva de inhibición a 560 nm contra un volumen creciente de muestra de *J. curcas*. Una unidad de SOD se definió como la contenida en un volumen de extracto que causa un 50% de inhibición de la fracción SOB inhibible de la reducción del NBT. Cada unidad de actividad enzimática se expresó como unidades SOD por gramo de biomasa fresca (PF) (USOD g^{-1}).

6.2.2 Determinación de la actividad enzimática (POX)

La actividad de POX se determinó de acuerdo a Kar y Mishra (1976), Se determinó la cantidad de purpurogallina 420 nm en un espectrofotómetro (Cecil serie 3000). Se definió una unidad de peroxidasa como la cantidad de enzima que causa un incremento 0.1 unidades de absorbancia a 420 nm. Cada unidad de actividad enzimática se expresó como unidades POX por gramo de biomasa fresca (PF) (UPOX g^{-1}).

6.2.3 Determinación de la actividad enzimática (CAT)

La actividad de catalasa se determinó de acuerdo a Aebi (1984). La actividad de la catalasa se estimó por el decremento en la absorbancia de H_2O_2 a 240 nm en un espectrofotómetro (Cecil series 3000). Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima que rompe 1 μ mol de H_2O_2 en un minuto a temperatura ambiente y pH 7. Cada unidad de actividad enzimática se expresó como unidades CAT por gramo de biomasa fresca (PF) (UCAT g^{-1}).

6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las unidades enzimáticas a partir de los tratamientos de MPs (Cr y Pb) se sujetaron a un análisis de varianza (ANOVA) seguida por una prueba de rangos múltiples de Tukey (P 0.05). Se usó el software SAS 9.0 (SAS Institute Inc. 2002) para el análisis estadístico. Cada tratamiento consistió de tres matraces y se obtuvieron tres muestras por matraz. Los tratamientos se repitieron dos veces.

7. RESULTADOS

La figura 7 muestra la cinética de crecimiento del cultivo celular, que se utilizó para realizar las pruebas enzimáticas.

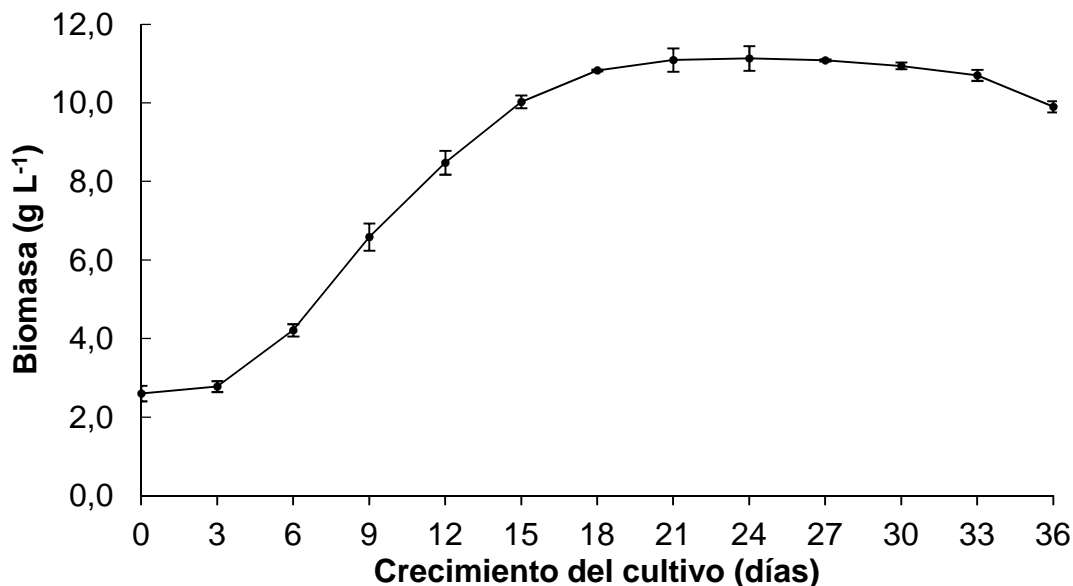


Figura 7. Curva de crecimiento del CCS de *J. curcas* con 2.27 μM 2,4-D a los 36 d de cultivo. (Tomado de Bernabé-Antonio y col., 2015).

7.1. Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de SOD

En este trabajo la concentración y tipo de metales pesados (Cr y Pb) afectaron significativamente ($P < 0.05$) la actividad catalítica de SOD, POX y CAT, en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*. En el tratamiento control (libre de MP), la actividad de SOD no presentó cambios significativos de 1 a 192 h (297.4-333.5 USOD g^{-1}), pero al final de la etapa del crecimiento exponencial (360 h), (Fig. 8a y 8b), se observó un decremento (178.7 USOD g^{-1}). Los tratamientos de Cr o Pb (0.5-3.0 mM) incrementaron significativamente la actividad de SOD desde 1 a 24 h en comparación con la muestra control. En contraste, se observó un comportamiento opuesto 192 y 360 h, respectivamente a las concentraciones de Cr, 0.5 a 2.0 mM.

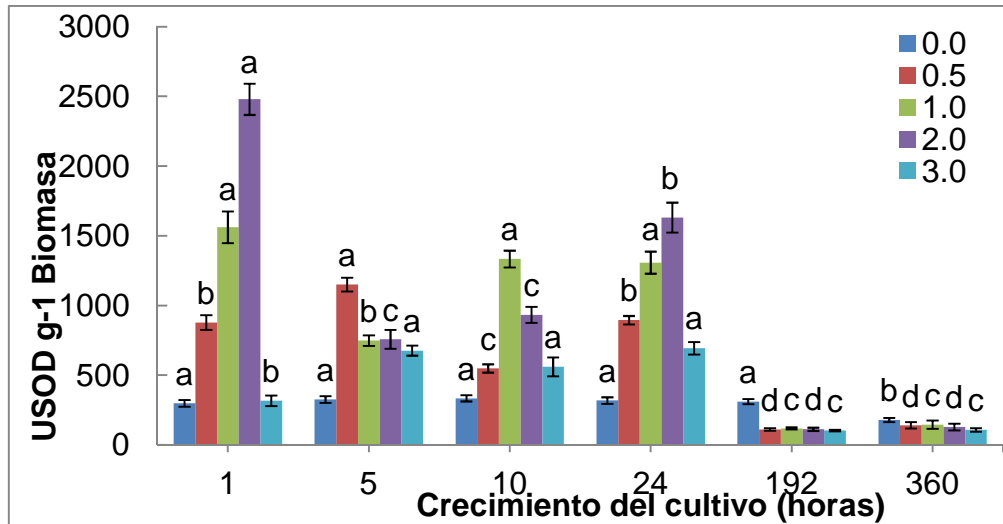


Figura 8a. Efecto de diferentes concentraciones (mM) de Cr en la actividad de SOD durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes (P 0.05).

El efecto opuesto se observó cuando Pb fue usado a concentraciones de 0.5 a 3 mM. La actividad más alta de SOD para ambos MP, se obtuvo en 1 h, correspondiendo a 2.0 mM de Cr (2479.39 USOD g⁻¹) (Figura 8a) y 0.05 mM de Pb (1681.0 USOD g⁻¹); una concentración de 2.0 mM de Pb a 24 h también mostró alta actividad SOD (1663.8 USOD g⁻¹) (Figura 8b).

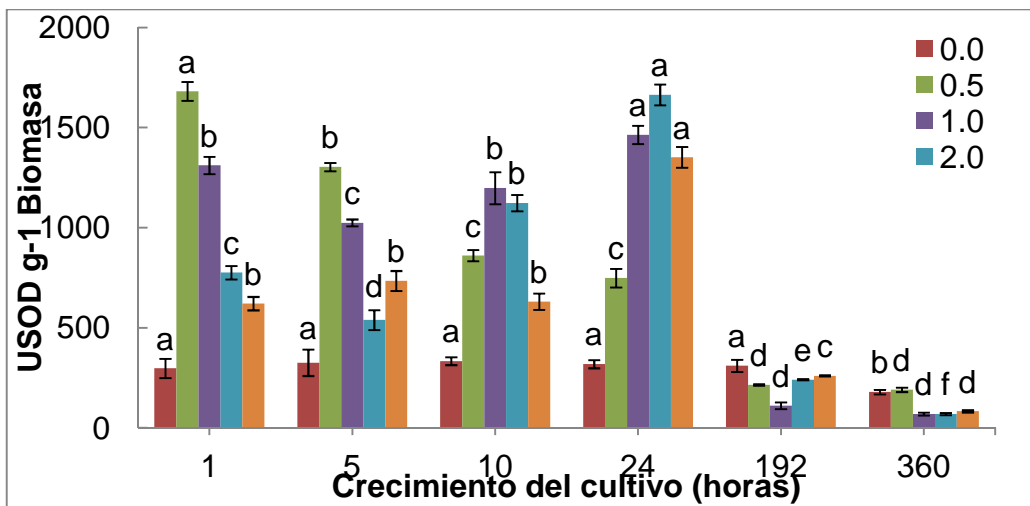


Figura 8b. Efecto de diferentes concentraciones (mM) de Pb en la actividad de SOD durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes (P 0.05).

Estos resultados indican que el cultivo de células en suspensión de *J. curcas*, muestra la capacidad de responder eficientemente en un tiempo relativamente corto (de 1 a 24 h) para inhibir el radical anión superóxido producido después de la adición de Cr o Pb, incrementando la actividad de SOD.

7.2. Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de POX

La inducción de POX es una respuesta general de plantas superiores a factores abióticos y esta actividad esta correlacionada a concentraciones elevadas de MPs, tales como Zn, Cd, Cu, Ni y Pb. (Assche y Clijsters, 1990). En este trabajo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad de POX, en el cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

En cultivos tratados sin MPs, (figuras 9a y 9b), la actividad fue prácticamente constante durante las primeras 192 h del cultivo (1617.0-1852.5 UPOX g^{-1}), y decreció significativamente a las 360 h. El Cr y Pb causaron un patrón significativamente diferente en la actividad POX en comparación con la muestra control.

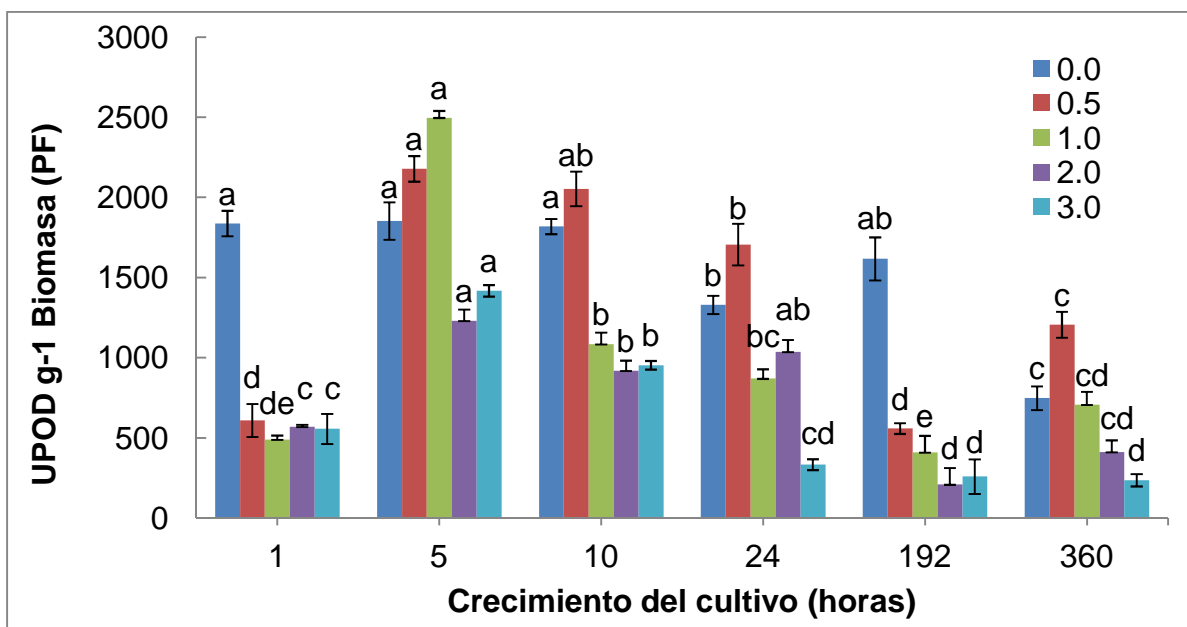


Figura 9a. Efecto de diferentes concentraciones (mM) of Cr en la actividad de POX durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

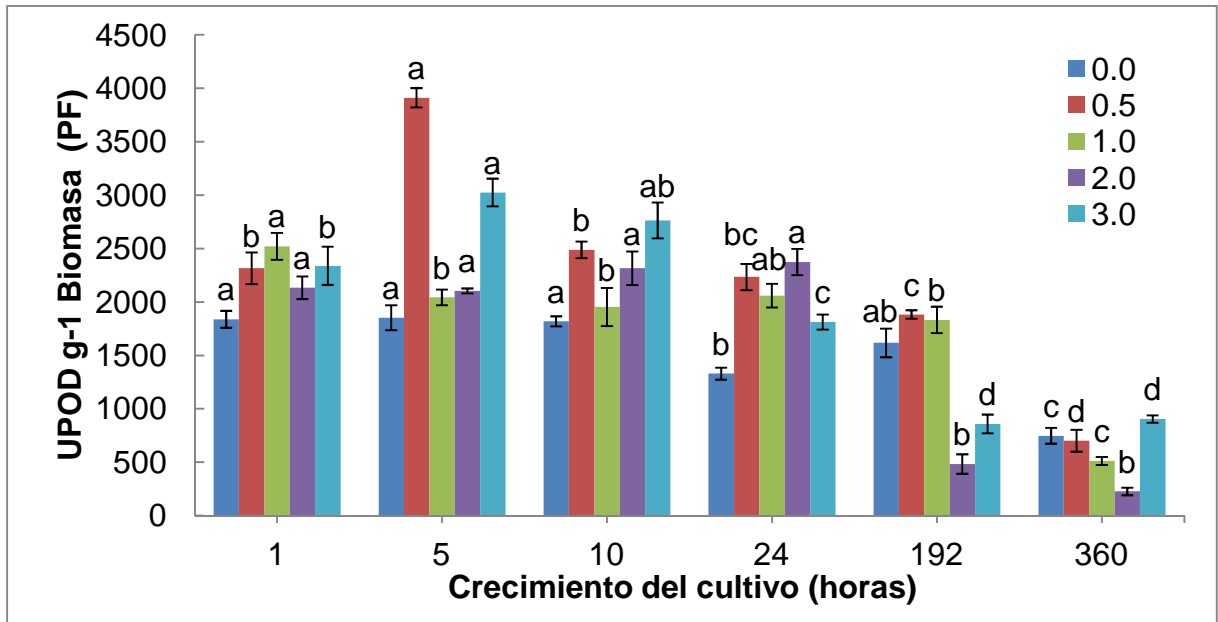


Figura 9b. Efecto de diferentes concentraciones (mM) Pb en la actividad de POX durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

En general, se encontró una actividad mayor en una concentración 0.5 mM de 5 a 24 h y 360 h, al compararse con la muestra control, mientras que las otras concentraciones de Cr mostraron disminuciones en la actividad POX. (Figura 9a). La actividad POX mas alta se observó con Cr 1.0 mM a 5 h ($2497.0 \text{ UPOX g}^{-1}$). Adicionalmente, todas las concentraciones de Pb ensayadas indujeron un incremento de la actividad POX. De 1 a 24 h, y la actividad POX mas alta ($3911.7 \text{ UPOX g}^{-1}$), se obtuvieron a 0.05 mM y 5 h (Figura 9 b)

7.3 Efecto del Cr y Pb sobre la actividad de CAT

Al igual que para las otras enzimas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), para la actividad de la CAT como consecuencia de la presencia de los metales pesados Cr y Pb. En ambos casos la actividad CAT en el cultivo de células en suspensión de *J. curcas*, fue más bajo que el mostrado por el tratamiento control. Figura 10a y 10b.

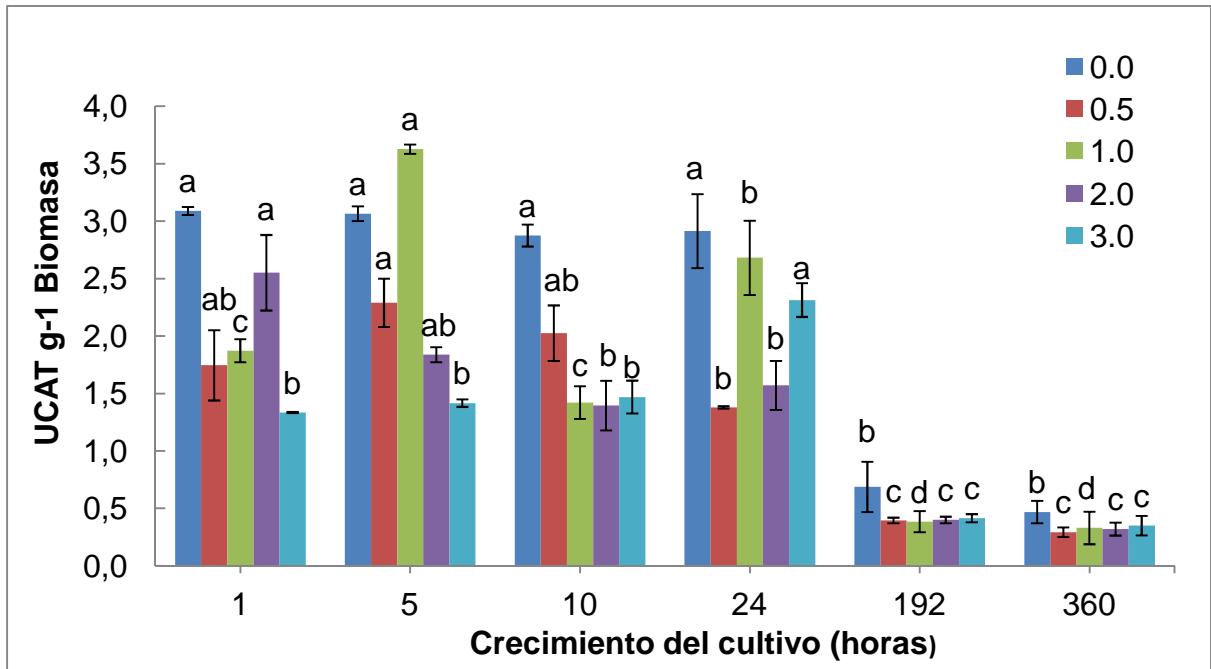


Figura 10a. Efecto de diferentes concentraciones (mM) of Cr en la actividad de CAT durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes (P 0.05).

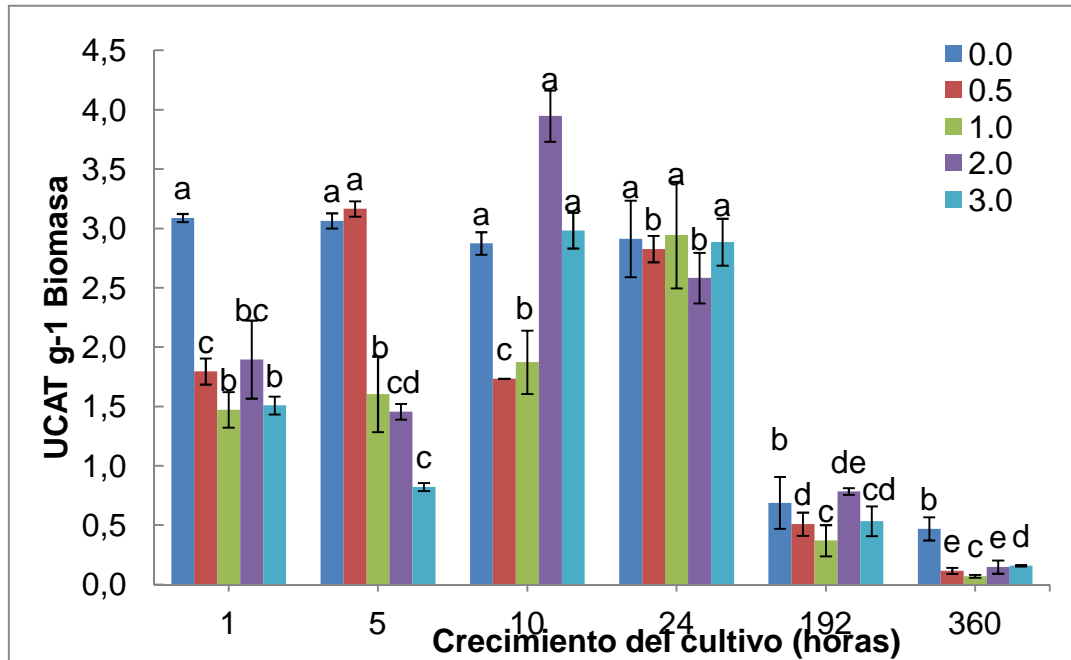


Figura 10b. Efecto de diferentes concentraciones (mM) of Pb en la actividad de CAT durante 360 h en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Las barras de error representan la desviación estándar, columnas con el mismo tratamiento a diferentes tiempos, seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes (P 0.05).

La actividad de CAT fue de 0.8 a 3.63 UCAT g⁻¹, durante las primeras 24 h y decreció significativamente a las 192 y 360 h. La actividad de CAT más alta inducida por Cr fue con 1.0 mM a 5 h (3.63 UCAT g⁻¹) (Figura 10a); La actividad CAT más alta inducida por Pb fue de 2.0 mM hasta 10 h (3.95 UCAT g⁻¹) (Figura 10b). Estos resultados sugieren que la enzima CAT en un cultivo de células en suspensión de *J. curcas*, tuvo baja efectividad en destoxificar el H₂O₂, debido a las grandes cantidades de Cr o Pb. Este comportamiento podría deberse a la estructura de la enzima que contiene un grupo HEME donde el Fe es un elemento fundamental en el transporte de electrones.

La absorción en la nutrición de las plantas de elementos no esenciales, ocurre debido a la competencia de proteínas que transportan nutrientes con metales análogos que son esenciales.

8. DISCUSIÓN

La tolerancia a los metales en las plantas está relacionada a una actividad catalítica incrementada de las enzimas antioxidantes (Srivastava y col., 2004; Sz Il si, 2014). La actividad incrementada de las enzimas SOD, POX y CAT, en células de *J. curcas* bajo estrés a partir de Cr y Pb está relacionada a niveles elevados de ERO. Esta actividad contribuye a la tolerancia de las plantas a la acumulación de altas concentraciones de MPs.

Por ejemplo, Bernabé-Antonio y col., (2015) reportaron un índice de tolerancia más alto en células de *J. curcas* tratadas con Cr (0.5 y 1.0mM); pero con concentraciones más altas de Cr (2.0 y 3.0 mM), decreció significativamente (Figura 11). Sin embargo, usando 0.5 y 1.0 mM de Pb el índice de tolerancia no fue estadísticamente diferente comparada al control y fue más alto con 2.0 y 3.0 mM de Pb (Figura 11). Adicionalmente la acumulación tanto de Pb y Cr en células de *J. curcas*, se incrementó conforme las concentraciones de MPs se incrementaron (Figura 12).

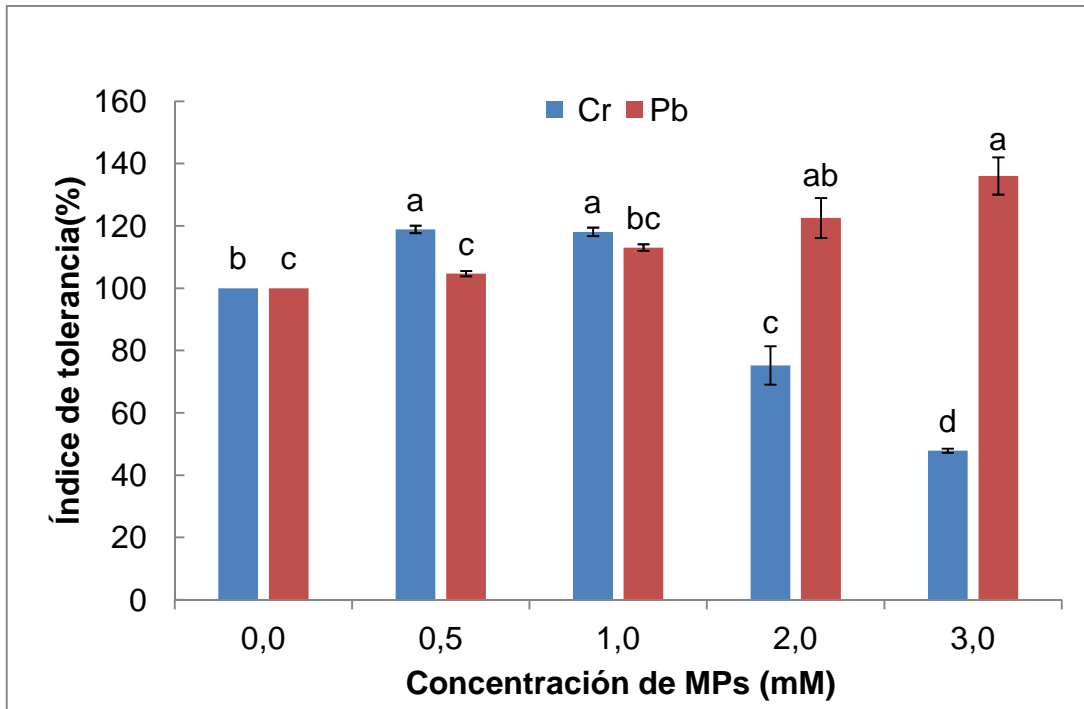


Figura 11. Índice de tolerancia a MPs de cultivos de células en suspensión de *J. curcas* tratadas con Cr y Pb [Tomado de: Bernabé-Antonio y col., 2015]

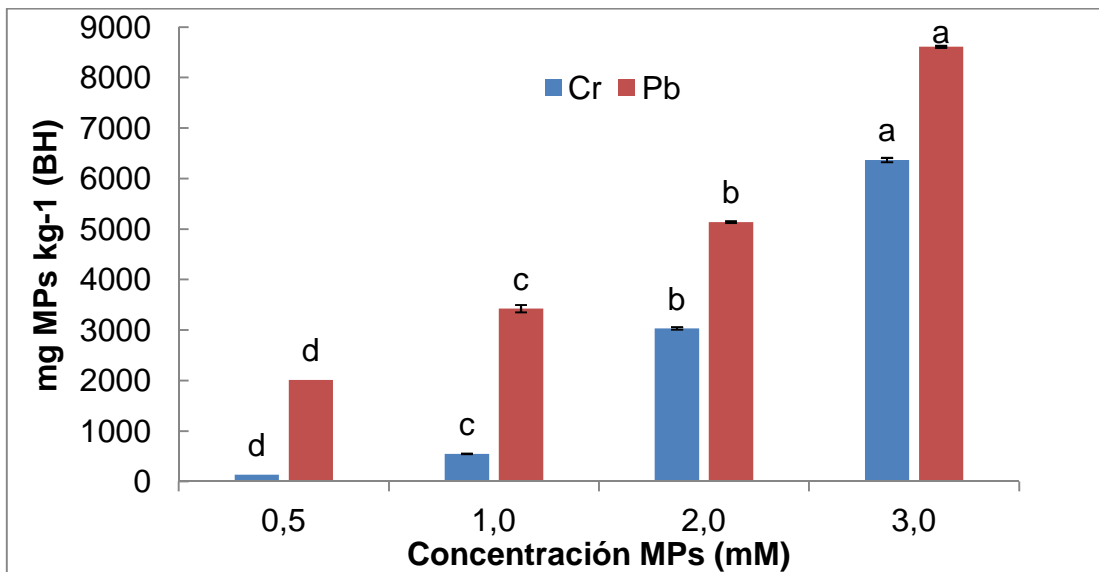


Figura 12. Índice de bioacumulación a MPs de cultivos de células en suspensión *J. curcas* tratadas con Cr y Pb [Tomado de: Bernabé-Antonio y col., 2015].

Estos resultados indican que el Cr fue más tóxico que el Pb, que podría estar asociado con las diferencias observadas entre las actividades de las enzimas antioxidantes en la que SOD y POX fueron crucialmente importantes (Figuras 8a,

8b, 9a, 9b, 10a, 10b). Si la concentración de MPs está asociada con la generación de ROS, el hecho de que la actividad de SOD se observa en la presencia de Cr más que el Pb, indica que niveles más altos de radicales anión superóxido se producen en la presencia de Cr.

Así SOD podría ser usada como un biomarcador de estrés ambiental (Dazy y col, 2009; Lozano y col, 1996). Aún más, la actividad de otras enzimas antioxidantes tales como glutatión S-transferasa podría también estar asociada con la tolerancia y acumulación de niveles altos de Cr y Pb en *J. curcas* (Mani y Kumar, 2014; Yadav y col., 2009).

En otros MPs, especies tolerantes como *Atriplex hortensis* y *A. rosea*, las hojas provenientes de plantas cosechadas en suelos contaminados en la presencia de Pb, Ni, Cu y Zn (1333.5, 1673.7, 501, y 3587.9 ppm, respectivamente), mostraron menor actividad SOD (0.06 USOD g^{-1}), comparado con células de *J. curcas* (Kachout y col., 2009). También raíces de *Pisum sativum* tratadas con 1 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, tuvieron un incremento de la actividad de SOD y CAT que contribuye a la acumulación de cantidades excesivas de Pb (Malecka y col., 2001). A partir de estos tipos de estudios, la actividad catalítica de enzimas antioxidantes parece ser potenciadas por los MPs en las plantas tolerantes como una respuesta al estrés oxidativo de las células (Srivastava y col., 2004; Sz Il si, 2014).

Por otro lado, hay reportes que indican que el Pb, un elemento no esencial, es un análogo de los nutrientes Fe y Zn. (Maldonado-Magaña y col., 2013; Peer y col., 2005). Por lo tanto, las altas concentraciones de Pb podrían ser transportadas dentro de las células de *J. curcas*, limitando el transporte de Fe y reduciendo consecuentemente la actividad de CAT. Se observó una reducción de la actividad de CAT en cultivos *in vitro* de *Prunus cerasifera* and *Borage officinalis* en la presencia de Fe (Lombardi y col., 2003; Mohamed y Aly, 2004).

La menor acumulación de Cu en las hojas de *Zea mays*, y mayor actividad en enzimas antioxidantes (SOD, POX, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa),

en este cultivo sugirieron una capacidad de tolerancia incrementada para proteger la planta del daño oxidativo (Tanyolac y col., 2007). Por otro lado, CAT juega un papel clave en la prevención del daño oxidativo celular por la degradación de H_2O_2 a H_2O y O_2 (McKersie y Leshem, 1994). El incremento en la actividad CAT puede ser crucial para la sobrevivencia de la planta bajo condiciones moderadas de estrés causado por MPs. No obstante, otras moléculas no enzimáticas como los polifenoles pueden jugar un papel muy importante en la actividad antioxidante (Sánchez-Rangel y col., 2014). Varios estudios evalúan los efectos de algunos MPs en plántulas *in vitro* y en cultivos de células en suspensión que han sido investigados desde el punto de vista de biología y toxicología ambiental, pero no se han hecho intentos por dilucidar la actividad enzimas antioxidantes. Por ejemplo, plántulas de *Prosopis laevigata* tuvieron la capacidad de absorber Cd, Cr, Pb y Ni, pero su capacidad para acumular estos metales pesados fue diferente; Cr y Cd fueron más tóxicos (Buendia-Gonzalez y col., 2012) Adicionalmente, los cultivos de células en suspensión de *P. laevigata* mostró tolerancia y acumulación significativa de Pb bajo diferentes condiciones de este MP (Maldonado-Magaña y col., 2013), no obstante, las células acumularon menos que las semillas. Un estudio realizado por Lizhong y Cullen (1995) en un cultivo de células en suspensión de *Catharanthus roseus*, reportó que la toxicidad de MPs (Hg, Cu, Cd, Pb, Zn y Cr) era directamente proporcional a la concentración de MPs en el medio de cultivo.

El presente trabajo establece una aproximación del papel de las enzimas antioxidantes SOD, POX y CAT, durante el crecimiento de células de *J. curcas* en el que el tiempo de 192 h y 360 h correspondió a la mitad y el final de la etapa de crecimiento exponencial, respectivamente (Bernabé-Antonio y col., 2015). La actividad más grande para SOD y POX se observaron de 1 a 192 h, mientras que para CAT se observó de 1 a 24 h. Este modelo indica que una función importante de SOD y POX durante el crecimiento exponencial, donde posiblemente grandes cantidades de EROs se generaron debido a la gran actividad metabólica requerida para lograr el crecimiento celular (Klavina y Levinsh, 2008). En CAT podría jugar un papel esencial en la fase lag del cultivo. La actividad de SOD fue

diferente a través del tiempo en comparación con el crecimiento de *Cardiospermum halicacabum L* (Jahan y col., 2014).

Un estudio realizado por Klavina y Levinsh (2008) usando cultivos de tejidos de plantas de cultivares de *Sorbus*, reportó un incremento en la actividad de POX durante las primeras horas de crecimiento. La reducción en la actividad ocurrió durante las primeras horas de la fase crecimiento exponencial del cultivo. Se encontró también una actividad elevada de CAT en retoños *in vitro* de cultivos y plantas aclimatadas de *C. halicacabum L* (Jahan y col., 2014).

La presencia de enzimas que catalizan la degradación de H_2O_2 en las células de *J. curcas* y seguido de diferentes mecanismos de acción o tienen diferente localización celular provee a *J. curcas* una ventaja para administrar EROs, con el fin de evitar su acumulación. La actividad de CAT se reporta que se incrementa en algunas especies tratadas con MPs (Hassan y Mansoor, 2014), mientras que la actividad de POX ha sido reportada que tiene una función esencial para reducir el estrés causado por MPs (Tanyolac y col., 2007). Las EROS pueden suprimir la actividad de enzimas que pertenecen al sistema antioxidante, generalmente a través de la reducción de glutatión y enlazando con grupos sulfhidrilo de enzimas (Juknys y col., 2012)

Maldonado-Magaña y col, 2011, sugiere, un mecanismo de resistencia contra el estrés de MPs, al estudiar los efectos de la peroxidación de lípidos en brotes de *A. farnesiana*, En este caso se observó que el nivel de GSH y la alta proporción de GSH/GSSG, en brotes de semillas bajo cierta concentración de Pb^{+2} (250 mg L^{-1}), sugiere que puede estar involucrado el metabolismo del glutatión sobre todo GSH, y que tiene un papel activo en la detoxificación de ROS, tanto de manera directa (no enzimática) como indirecta por la acción de GR (Glutatión reductasa).

Madera-Parra y col.,(2014) y Conklin, (2001) al estudiar tres especies tropicales, *Gynerium sagittatum* (Gs), *Colocasia esculenta* (Ce), y *Heliconia psittacorum* (He), detectaron que la presencia de MPs en el medio, como son Hg^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+6} y

Pb⁺², activaron el mecanismo de defensa de la planta ocasionando una mayor producción de enzimas con actividad peroxidasa, como por ejemplo, la ascorbato peroxidasa, una enzima importante en los mecanismos antioxidantes de la planta (Conklin, 2001).

9. CONCLUSIONES

La actividad de las enzimas SOD, POX y CAT de un sistema antioxidante en un cultivo de células en suspensión, se vio afectado grandemente por tratamientos con Cr y Pb.

La gran actividad de SOD (538.4 - 2479.4 USOD g) y POX (2042.7 - 3911.7 UPOX g), se evidenció dentro de 1 a 24 h bajo tratamientos de Cr o Pb (0.5 – 3.0 mM).

La actividad más alta de SOD se encontró en 1 h de cultivo mientras que en POX este comportamiento ocurrió a las 5 h para ambos MPs (2 mM o 1mM de Cr para SOD y POX, respectivamente y 0.5 mM Pb para ambas enzimas).

Es probable que las enzimas SOD y POX son claves para la eliminación de ERO inducidos por aquellos MPs en cultivos de *J. curcas*, permitiendo a las células tolerar y acumular Cr o Pb.

Este es el primer estudio que reporta el efecto de MPs sobre la actividad de SOD, POX y CAT en cultivo de células en suspensión de *J. curcas*.

Estudios adicionales del metabolismo secundario se requieren para evaluar otras actividades de enzimas oxidativas durante todos los periodos de crecimiento del cultivo

10. PERSPECTIVAS

Se considera de primordial interés que se evalúen otros sistemas enzimáticos relacionados con la formación de EROs y que podrían contribuir también a la tolerancia de *J. curcas* a los metales pesados, Pb y Cr, como son glutatión peroxidasa, glutatión reductasa entre otras.

La determinación de la variación en el material proteico como consecuencia de la formación de enzimas provocadas por la acción de la presencia de metales pesados.

11. REFERENCIAS

- ATSDR (2007). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, Georgia.
- Abdu N., Muazu M. (2007). Trace metals accumulation in urban soil: Effects of municipal waste fertilization. *In: Olufajo, O.O. Omokore, D.F., Akpa, G.N. (eds.), Proceedings of the 41st Annual Conference of the Agricultural Society of Nigeria (ASN) held at ABU, Zaria between 22nd and 26th of October pp. 289-293.*
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.
- Agbogidi, O.M., Mariere, A.E., Ohwo, O.A. (2013). Metal concentration in plant tissues of *Jatropha curcas* L grown in crude oil contaminated soil. *Journal of Sustainable Forestry* **32**: 404-411.
- Ahmadpour, P., Azmi, M.N., Arfin, A., Hassandy, A.H., Karam, D.S., Aendy, H., Majid, N.M., Schamshuddin, J. (2010). Uptake of heavy metals by *Jatropha curcas* L. planted in soils containing sewage sludge. *American Journal of Applied Sciences* **7**: 1291-1299.
- Ahsan, N., Renaut, J., Komatsu, S. (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* **9**: 2602-2621.
- Ainza, C., Trevors, J., Saier, M. (2010). Environmental mercury rising. *Water, Air & Soil Pollution* **205**: 47–48.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications. *Chemosphere* **91**: 869 – 881.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331–1341
- Antunes, A.P.M., Watkins, G.M., Duncan, J.R. (2001). Batch studies on the removal of gold (III) from aqueous solution by *Azolla filiculoides*. *Biotechnology Letters* **23**: 249-251
- Aragón-Piña, A., Campos-Ramos, A.A., Leyva-Ramos, R.; Hernández-Orta, M., Miranda-Ortiz, N., Luszczewski-Kudra, A. (2006). Influencia de emisiones

- industriales en el polvo atmosférico de la ciudad de San Luis Potosí, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **22**: 5-19.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna* **76**: 109-121.
- Assche, F.V., Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* **13**: 195-206.
- Aurazo de Zumaela, M., Esparza, M.L. (1995). Toxicidad aguda del cromo usando *Allium cepa* L. OPS/CEPIS/95-25(LAB) pp. 23
- Awofolu, O.R. (2005). A Survey of trace metals in vegetable, soil and lower animal along some selected major roads in metropolitan city of Lagos. *Environmental Monitoring and Assessment* **105**: 431–447
- Azocar, L., Ciudad, G., Heipieper, H.J., Navia, R. (2010). Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 621–636
- Balat, M. (2011). Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. *Energy Conversion and Management* **52**: 1479–1492
- Balparada, J.K. (2008). Intoxicación por plomo: una revisión con énfasis en la población pediátrica. *CES Medicina* **22**: 43-58.
- Barton, C., Marx, D., Adriano, D., Jun-Koo, B., Newman, L., Czapka, S., Blake, J. (2005). Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences* **12**: 251-265.
- Beijer, K., Jernelöv, A. (1986). Sources, transport and transformation of metals in the environment. Friberg L, Nordberg GF, Vouk VB (eds.), *In: Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, Amsterdam, pp. 68-84
- Bernabé-Antonio, A., Álvarez, L., Buendía-González, L., Maldonado-Magaña, A., Cruz-Sosa, F. (2015). Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissues & Organ Culture* **120**: 221-228.

- Beyer, W.F. Jr., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* **161**: 559-66.
- Bhaskaran, S., Smith, R.H. (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science* **30**:1328-1337.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- Boniardi, N., Rota, R., Nano, G. (1999). Effect of dissolved metals on the organic load removal efficiency of *Lemna gibba*. *Water Research* **33**: 530-538.
- Bressan, R.A. Handa, A.K. Handa, S. Hasegawa, P.M. (1982). Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiology* **70**: 1303-1309
- Buendía-González, L., Estrada-Zuñiga, M.E., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E.J. (2012). Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell Tissues & Organ Culture* **108**: 287-296
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C.E., Vernon-Carter, E.J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant L. *Bioresource Technology* **101**: 5862-5867.
- Burken, J.G., Ma, X. (2006). Phytoremediation of volatile organic compounds. In: *Phytoremediation Rhizoremediation*. Springer Netherlands pp. 199-216
- Cabezas, J.G., Pastor, J., Sastre-Conde, I., Lobo, M.C. (2004) Absorción y acumulación de metales pesados en tres especies vegetales en suelos enmendados con lodos de depuradoras. *Environmental Biotechnology and Engineering* 1-13.
- Carrillo Niquete, G.A., Andrade, J.L., Hernández Terrones, L., Cobos Gasca, V. (2015) La fitorremediación: una opción limpia para un problema sucio. *Bioagrocencias* **8**: 22-27.

- Cazalé, A., Rouet-Mayer, M., Barbier-Brygoo, H., Mathieu, Y., Laurière, C. (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology* **116**: 659-669.
- Cervantes, C., Campos-García, J. Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Talavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 335-347.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., Joner, E.J. (2005). Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science & Pollution Research* **12**: 34–48.
- Chehregani, A., Malayeri, B. (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. *International Journal of Agriculture and Biology* **9**: 462-465
- Cherian, S., Oliveira, M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology* **39**: 9377-9390.
- Cho, C., Yavuz-Corapcioglu, M., Park, S., Sung, K. (2008). Effects of grasses on the fate of VOCs in contaminated soil and air. *Water, Air, & Soil Pollution* **187**: 243-250.
- Cohen-Shoel, Z., Barkay, N., Ilzyer, D., Gilath, L., Tel-Or, E. (2002). Biofiltration of toxic elements by *Azolla* biomass. *Water, Air, & Soil Pollution* **135**: 93-104.
- Conklin, PL., (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Journal Plant Cell Environment*. 24, 383 – 394.
- Couselo, J.L., Corredoira, L., Vieitez, M.; Ballester, A. (2010). Aplicación del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en estudios de fitorremediación. *Revista Real Academia Galega de Ciencias* Vol. XXIX. pp. 77-87
- Das, K.K., Das, S.N., Dhundasi, S.A. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research* **128**: 412-425

- Dazy, M., Masfaraud, J.F., Ferard, J.F. (2009). Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* **75**: 297-302.
- Degraeve, N. (1981). Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research* **86**: 115-135
- Delgadillo-López, A.E., González-Ramírez C.A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J.R., Acevedo-Sandoval, O. (2011) Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **14**: 597- 612
- Doran, M.P. (2009) Plant tissue cultures in phytoremediation research. *Biotechnology and Bioengineering* **103**: 60-76
- Duffus, J.H. (2002). Heavy metals: A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **74**: 793–807.
- Eapen, S., Singh, S., D'Souza, S.F. (2007). Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances* **25**: 442- 451.
- Fogarty, R.V., Dostalek, P., Patzak, M., Votruba, J., Tel-Or, E., Tobin, J.M. (1999). Metal removal by immobilised and non-immobilised *Azolla filiculoides*. *Biotechnology Techniques* **13**: 530-538
- Franchini, R. Mutti, A. Cavatorta, E. Predoni, C. Borghetti, A. (1993) Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals
EUR
8903 EN (Chromium). Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, 1984 (edición en castellano de la Conselleria de Sanitat i Consum de la Generalitat Valenciana,).
- Francis, G., Edinger, R., Becker, K. (2005). A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum* **29**: 12-24.

- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97–112
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A., Baker, N.R. (1998). Relationships between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* **116**: 571-580.
- Gao, S., Yan, R., Wu, J., Zhang, F.L., Wang, S.H., Chen, F. (2009). Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* cotyledons under lead stress. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C. Journal of Biosciences* **64**: 859 863
- Gao, S., Ou-yang, C. Tang, L. Zhu, J.Q. Xu, Y. Wang, S.H. Chen, F. (2010). Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. *Journal of Hazardous Materials* **182**: 591 597.
- Garbisu, C., Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *The European Journal of Mineral Processing Environmental Protection* **3**: 58–66.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (2008) Plant Tissue Culture Procedure Background. Chapter 1. In: Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. Springer, Netherlands, 3rd Edition. pp 504
- Ghosh, M., Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products. *Applied Ecology and Environmental Research* **3**: 1-18.
- Giardina, E.B., Heredia, O.S., Castro, M.A., Efron. D.N. (2012). Fitotoxicidad del cromo sobre *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomía & Ambiente* **32**: 75-80.
- Ginocchio, R., Baker, A. 2004. Metallophytes in Latin America: a remarkable biological and genetic resource scarcely know and studied in the region. *Revista chilena de Historia Natural* **77**: 185-194.
- Goering PL. (1993) Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*; 14(2-3): 45-60.
- Golovatyj, S.E., Bogatyreva, E.N. (1999). Effects of levels of chromium content in a soil on its distribution in organs of corn plants. *Soil Research and Use of Fertilizers* 197-204

- Groudeva, VI., Groudev, S. N., Doycheva, A. S. 2001. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *International Journal of Mineral Processing* **62**: 293-299
- Gulati, K., Banerjee, B., Bala Lall, S., Ray, A. (2010). Effects of diesel exhaust, heavy metals and pesticides on various organ systems: possible mechanisms and strategies for prevention and treatment. *Indian Journal of Experimental Biology* **7**: 10–721.
- Gupta, A.K., Sinha, S. (2007). Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping site. *Bioresource Technology* **98**: 1788–1794.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
- Hassan, M., Mansoor, S. (2014). Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **38**: 55-61.
- Hawkins H. J., Lips S.H. (1997). Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO uptake and PM-ATPase activity. *Journal of Plant Physiology* **150**: 103-109
- Hess, R., Schmid, B. (2002). Zinc supplement overdose can have toxic effects. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **24**: 582-584
- Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M. (2002). In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: Influence of plant growth. *Journal Environmental Quality* **31**: 564- 573.
- Huang, J.W., Cunningham, S.D. (1996). Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* **134**: 75-84.
- Iqbal, M.P. (2012). Lead pollution - a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **25**: 289-94.
- Jacobs De. (1996) The health effects of lead on the human body. *Lead Persp.*; 104:10-12.

- Jahan, A.A., Anis, M., Aref, I.M. (2014). Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls in *in vivo* and *ex vitro* environment. *Biotechnology Reports* **4**: 66-72.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A.K., Chandra, A. (2010). Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiologiae Plantarum* **32**: 979-986.
- Jamal, S.N., Igbal, M.Z., Athar, M. (2006). Evaluation of two wheat varieties for phototoxic effect of mercury on seed germination and seedling growth. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **71**: 41–44.
- Jamil, S., Abhilash, P.C., Singh, N., Sharma, P.N. (2009). *Jatropha curcas*: a potential crop for phytoremediation of coal fly ash. *Journal of Hazardous Materials* **172**: 269-275.
- Juknys, R., Vitkauskaitė, G., Raait, M., Vencloviene, J. (2012). The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology* **7**: 299-306.
- Juwarkar, A.A., Yadav, S.K. Kumar, P. Singh, S.K. (2008). Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment* **145**: 7-15.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1989). Trace Elements in the Soils and Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Kabata-Pendias, A. (2000). Trace Elements in Soils & Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Kachout, S.S., Mansoura, A.B., Leclerc, J.C., Jaffel, K., Rejeb, M.N., Ouerghi, Z. (2009). Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *Atriplex rosea*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **83**: 37-43.
- Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Cote, R. (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment International* **29**: 1029-1039.
- Kar, M., Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**: 315-319.

- Kelley, C., Gaither, K.K., Baca-Spry, A., Cruickshank, B.J. (2000). Incorporation of phytoremediation strategies into the introductory chemistry laboratory. *The Chemical Educator* **5**: 140-143.
- Khan, M.A., Ahmad, I., ur Rahman, I. (2007). Effect of environmental pollution on heavy metals content of *Withania somnifera*. *Journal of Chinese Chemical Society* **54**, 339–343.
- Kavi a, D., Levinsh, G. (2008). Growth of tissue culture and changes in oxidative enzyme activity of *Sorbus* and tayberry cultivars during cold storage. *Acta Universitatis Latviensis* **745**: 179-186.
- Kumar, P.B., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology*. **29**: 1232-1238.
- Landrigan PJ, Boffetta P, Apostoli P. 2000 The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: A critical review. Am J In
- Laperche, V., Logan, T.J., Gaddam, P., Traina, S.J. (1997). Effect of apatite amendment on plant uptake of Pb from contaminated soil. *Environmental Science Technology* **31**: 2745-2753.
- Lebeau, T., Braud, A., Jezequel, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils. *Environmental Pollution* **153**: 497–522.
- Leonardi, A., Heimovaara-Dijkstra, S., Wang, M. (1995) Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Physiologia Plantarum* **93**: 31-37.
- Liang, J., Yang, Z., Tang, L., Xu, Y., Wang, S., Chen, F. (2012). Growth performance and tolerance responses of *Jatropha (Jatropha curcas)* seedling subjected to isolated or combined cadmium and lead stresses. *International Journal of Agriculture and Biology* **14**: 861-869.
- Lizhong, Z., Cullen, W.R. (1995). Effect of some heavy metals on cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Environmental Sciences* **7**: 60-65.

- Liu, D., Islam, E., Li, T., Yang, X., Mahmood, Q. (2008). Comparison of synthetic chelators and low molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of heavy metals by two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Hazardous Materials* **153**: 114-122
- Lombardi, L., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (2003). Physiological, biochemical, and molecular effects of *in vitro* induced iron deficiency in peach rootstock Mr. S 2/5. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 2149-2163.
- Lovley, D.R., Coates, J.D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 285–289.
- Lozano, R., Azcon, R., Palma, J.M. (1996). SOD and drought stress in *Lactuca sativa*. *New Phytologist* **136**: 329-331.
- Luhach, J., Chaudhry, S. (2012). Phytoremediation potential of *Jatropha curcas* for removal of heavy metals from refinery sludge. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **3**: 1076-1080.
- Ma, J.F., Namoto, K. (1996). Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiology Plantarum* **97**: 609–617
- Makkar H.P., Becker, K., Schmook, B. (1998). Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of México and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* **52**: 31-36.
- Maksymiec, W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* **34**: 321-342.
- Markowitz, M. (2000). Lead poisoning. *Pediatrics in Review* **21**: 327-335.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil* **232**: 207-214.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy* **75**: 1-56.
- McKersie, B.D., Leshem, Y.Y. (1994). *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 256 pp.

- Madera-Parra C.A., Peña-Salamanca E.J. Solarte-Soto J.A. (2014) Efecto de la concentración de metales pesados en la respuesta fisiológica y capacidad de acumulación de metales de tres especies vegetales tropicales empleadas en la fitorremediación de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios. *Ingeniería y Competitividad*, Volumen 16, No. 2, p. 179 – 188
- Maldonado-Magaña A, Favela-Torres E., Rivera-Cabrera F. Volke-Sepulveda T.L (2011) Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production *Plant Soil* **339**: 377–389
- Maldonado-Magaña, A., Orozco-Villafuerte, J., Buendía-González, L., Estrada-Zuñiga, M.E., Bernabé-Antonio, A., Cruz-Sosa, F. (2013). Establishment of cell suspension cultures of *Prosopis leavigata* (Humb. and Bonpl. Ex willd) M.C. Johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **12**: 489-498.
- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W., Tomaszewska, B. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* **48**: 687-698.
- Malik, R.N., Husain, S.Z., Nazir, I. (2010). Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* **42**: 291–301.
- Mangkoedihardjo, S. (2008). *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil. *World Applied Sciences Journal* **4**: 519-522.
- Mangkoedihardjo, S., Ratnawati R., Alfianti, N. (2008). Phytoremediation of hexavalent chromium polluted soil using *Pterocarpus indicus* and *Jatropha curcas* L. *World Applied Sciences Journal* **4**: 338-342.
- Mani, D., Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology* **11**: 843-872.
- Martínez-Herrera, Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortiz. G., Becker, K. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* **96**: 80-89.

- Memon, A.R., Schroder, P. (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science & Pollution Research* **16**: 162–175.
- Mendez, M.O., Maier, R.M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments-An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* **116**: 278-283.
- Mench M., Schwitzguébel, J.P., Schroeder, P., Bert, V. Gawronski, S., Gupta, S. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science Pollution Research International* **16**: 876–900.
- Miretzky, P., Saralegui, A., Fernández-Cirelli, A. (2004). Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* **57**: 997-1005.
- Mohamed, A.A., Aly, A.A. (2004). Iron deficiency stimulated some enzymes activity, lipid peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced *in vitro*. *International Journal of Agriculture and Biology* **6**: 179-184.
- Moser, B.R. (2009). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell Development Biology-Plant* **45**: 229–266
- Mukhopadhyay, S., Maiti, S.K. (2010). Phytoremediation of metal mine waste. *Applied Ecology and Environmental Research* **8**: 207-222.
- Mühlbach H. P. (1998). Use of plant cell cultures in biotechnology. *Annual Review of Biotechnology* **4**: 113-176.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Needleman, H. (2004). Lead poisoning. *Annual Review of Medicine* **55**: 209-222.
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G. (2007). Chronic toxicity of arsenic, cobalt chromium and manganese to *Hyalella azteca* in relation to exposure and bioaccumulation. *Environmental Pollution* **147**: 262–272.
- Nriagu, J.O. (1979). Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* **279**: 409-411.

- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.
- O'Dell, R., Silk, W., Green, P., Claasen, V. (2007). Compost amendment of Cu–Zn minespoil reduces toxic bioavailable heavy metal concentrations and promotes establishment and biomass production of *Bromus carinatus* (Hook and Arn.). *Environmental Pollution* **148**: 115–124.
- Otiniano-García, M., Tuesta-Collantes, V., Robles-Castillo, H., Luján-Velázquez, M., Chávez-Castillo, M. (2007). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Médica Vallejiana* **4**: Lima: 32-42.
- Pabón, L.C., Hernández-Rodríguez, P. (2013). Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **17**: 194-209
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, & Soil Pollution*. **184**: 105-126.
- Panich-Pat, T., Upatham, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Lanza, GR. (2010). Phytoextraction of metal contaminants by *Typha angustifolia*: interaction of lead and cadmium in soil-water microcosms. *Journal of Environmental Protection and Ecology* **1**: 431-437
- Patrick, L. (2006) Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic* **11**: 2-22.
- Pedrosa, G.M., Smedbol, E., Carneiro, M.L.C., Garcia, Q.S., Juneau, P. (2014). Reactive oxygen species and plant hormones. *In: Oxidative Damage to Plants*, Ahmad, P. (ed.), pp. 65-88. Academic Press, Elsevier, USA.
- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, L., Freeman, J.L., Muiyphy, A.S. (2005). Phytoremediation and hyperaccumulator species. *In: Topics in Current Genetics*, Tama's, T.M., Martinoia, E. (eds.), pp. 299-340. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Petroff, A., Mailliat, A., Amielh, M., Anselmet, F. (2008). Aerosol dry deposition on vegetative canopies. Part 1: review of present knowledge. *Atmospheric Environment* **42**: 3625–3653
- Pinon-Lataillade G, Thoreux-Manlay A, Coffigny H, Masse R, Soufir JC. (1995) Reproductive toxicity of chronic lead exposure in male and female mice. *Hum Exp Toxicol.* 14(11): 872-78.
- Pinzi, S., García I.L., López-Gimenez, F.J., Luque de Castro, M.D., Dorado, G., Dorado, M.P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. *Energy and Fuels* **23**: 2325–2341
- Pinzi, S., Leiva-Candia, D., López-García, I., Redel-Macías, M.D., Dorado, M.P. (2013). Latest trends in feedstocks for biodiesel production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **8**: 126-143.
- Piotrowska, A., Bajguz, A. Godlewska-Zylkiewicz, B., Zambrzycka, E. (2010). Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 594–604.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O. (2003). Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**: 276-312.
- Pulford, I.D., Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - A review. *Environmental International* **29**: 529-540
- Quin, G., Terry, N. (2003). Selenium removal by constructed wetlands: quantitative importance of biological volatilization in the treatment of selenium-laden agricultural drainage water. *Environmental Science & Technology* **37**: 606-615.
- Raskin I., Ensley B.D. (eds.), (2000). Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons, N.Y. 304 pp.
- Reeves, R.D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils. NATO Science Series IV Earth Environmental Science. Morel J.L., Echevarría, G., Goncharova, N. (eds.). Springer Netherlands **68**: 25–52

- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Borhidi, A., Berazaín, R. (1999). Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* **83**: 29-38
- Rodrigues, S.M., Henriques, B., Reis, A.T., Duarte, A.C., Pereira, E., Romkens, P.F.A.M. (2012). Hg transfer from contaminated soils to plants and animals. *Environmental Chemical Letters* **10**: 61–67.
- Robertson A.J., Ishikawa, M., Gusta, V. (1995). The effect of prolonged abscisic acid treatment on the growth, in freezing tolerance a protein patterns of *Bromus inermis* (Leyss) cell suspensions culture at either 3° or 25 °C. *Journal of Plant Physiology* **145**: 137-142.
- Ross, S. (2004). Toxic Metals in Soil-Plant Systems. Chichester, UK. John Wiley and Sons.
- Sakai, T., Morita, Y. (1996). Delta-aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **68**: 126-132.
- Salem, H.M., Eweida, E.A., Farag, A. (2000), Heavy metals in drinking water and their environmental impact on human health. ICEHM2000, Cairo University, Egypt, pp. 542- 556
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Jacobo-Velázquez, D.A. (2014). Abiotic stress based bioprocesses for the production of high value antioxidant phenolic compound in plants: An overview. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **13**: 49-61.
- Schrader, M., Fahimi, H.D. (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology* **122**: 383–393
- Schreiber, L. (2006). Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2515–2523.

- Schützendübel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365.
- Schwedt, G. (2001). *The Essential Guide to Environmental Chemistry*. John Wiley and Sons Ltd U.K.
- SenGupta, A.K. (ed.) (2002). *Environmental Separation of Heavy Metals: Engineering Processes*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Senesi, G.S., Dell'Aglio, M., Gaudioso, R., DeGiacomo, A., Zaccone, C., De Pascale, O., Miano, T.M., Capitelli, M. (2009). Heavy metal concentrations in soils as determined by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), with special emphasis on chromium. *Environmental Research* **109**: 413–420.
- Shukla, O.P., Dubey, S., Rai, U.N. (2007). Preferential accumulation of cadmium and chromium: Toxicity in *Bacopa monneri* L. under mixed metal treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **78**: 252–257
- Siedlecka, A., Krupa, Z. (2002). Functions of enzymes in heavy metal treated plants. Prasad M.M.V. y Kazimierz, S. (eds.). In: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, pp. 303-324. Kluwer, Netherlands.
- Skeffington, R.A., Shewry, P.R., Peterson, P.J. (1976). Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **132**: 209–214.
- Soomro F., Asma M.R (2007) Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pakistan Journal of Botany* 39(7): 2431-2441
- Srivastava, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, U.N. (2004). Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite. *Journal of Plant Physiology* **161**: 665-674.
- Sz Il si, R. (2014). Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An Overview. P. Ahmad, (ed.), In: *Oxidative Damage to Plants*, pp. 89-129. Academic Press, Elsevier, USA.

- Tanyolac, D., Ekmekci, Y., Unalan, A.E. (2007). Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere* **67**: 89-98.
- Tariq, M., Ali, M., Shah, Z. (2006). Characteristics of industrial effluents and their possible impacts on quality of underground water. *Soil & Environmental* **25**: 64–69.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S. (2002). Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* **162**: 381-388.
- Thangavel, P., Subhram, C.V. (2004). Phytoextraction: Role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy Part B*. **70**: 109-130.
- Tholakalabavi, A., Zwiazek, J.J., Thorpe, T.A. (1994). Effect of mannitol and glucose induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoids* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **30**: 164-170.
- Tholakalabavi, A., Zwiazek, J.J., Thorpe, T.A. (1997). Osmotically stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *Journal of Plant Physiology* **151**: 489-496.
- Trapp, S. (2004). Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research International* **11**: 33–39.
- Tripathi, L., Tripathi, J.N., Tushemereirwe, W.K. Bandyopadhyay, R. (2007). Development of a semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from banana plants. *European Journal of Plant Pathology* **117**: 177-186.
- Umeda, M., Hara, C., Matsubayashi, Y., Li, H.H., Liu, Q., Tadokoro, F., Aotsuka, S., Uchimiya, H. (1994). Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology* **25**: 469–478.

- Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G., 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* **8**: 1–17.
- Vázquez, M.D. (2003). Uso de especies vegetales para controlar ambientes contaminados. Profesora del Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Unidad de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A., de la Rosa D.A. (2007). Capítulo 4, *Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados por EPT*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. pp. 57-89.
- Wadi S.A. Ahmad G. (1999) Effects of lead on the male reproductive system in mice. *J Toxicol Environ Health A* ; 56(7): 513-21
- Wang, H., Kimberley, M.O., Schlegelmilch, M. (2001). Biosolids derived nitrogen mineralization and transformation in forest soils. *Journal of Environmental Quality* **32**: 1851- 1856
- Wang, Q.R., Cui, Y.S., Liu, X.M., Dong Y.T. Christie, P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China, *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **38**: 823-838.
- Watanabe, M.E. (1997). Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science & Technology* **31**: 182–186.
- Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M. (1997). Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**: 405-410.
- Wei, Z., Xi, B., Zhao, Y., Wang, S., Liu, H., Jiang, Y. (2007). Effect of inoculating microbes in municipal solid waste composting on characteristics of humic acid. *Chemosphere* **68**: 368–374.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* **2011**: 1–20.



EFFECT OF Cr AND Pb ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN A CELL SUSPENSION CULTURE OF *Jatropha curcas*

EFEECTO DEL Cr Y Pb EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE UN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Jatropha curcas*

A. Valadez-Villarreal^{1,2}, A. Maldonado Magaña³, A. Bernabé-Antonio⁴, M.E. Estrada-Zúñiga⁵, A. Román-Guerrero¹, F. Cruz Sosa^{1*}

¹Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, C.P. 09340, México D.F.

²Universidad Tecnológica de Tabasco, Carretera Villahermosa-Teapa, Km. 14+600, Col. Centro, C.P. 86280, Villahermosa, Tabasco, México.

³Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

⁴Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Col. Las Agujas, C.P. 45010, Zapopan, Jalisco, México.

⁵Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, km. 15.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

Received April 24, 2015; Accepted October 27, 2015

Abstract

Jatropha curcas is a tolerant and accumulator plant of heavy metals (HMs). Little is known about the mechanisms behind this ability. It is suggested that antioxidant enzymes might participate; however, there are no studies reporting the relationship between the activities of antioxidant enzymes and the presence of HMs in an *in vitro* cell suspension culture of *J. curcas*. The aim of this study was to determine the effect of chromium (Cr) or lead (Pb) at 0.0 to 3.0 mM on the activity of three antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) through the growth of cell suspension cultures (CSC) of *J. curcas*. The activity displayed by those enzymes was statistically significant ($P \leq 0.05$) when Cr or Pb was used. The greatest enzymatic activity was noted at the first hour of culture for SOD and at five h for POX and CAT. After 192 h, the activity of these three enzymes decreased, which coincided with the exponential growth phase of the cell culture. The results indicated that there is a close relationship between the presence of Cr and Pb and SOD, CAT, and POX activities in a cell suspension culture of *J. curcas*, which can explain the plant's capability for tolerating and accumulating high concentrations of Cr and Pb.

Keywords: *Jatropha curcas*; cell cultures; heavy metal; chromium; lead; enzymatic activity.

Resumen

Jatropha curcas es una especie tolerante y acumuladora de metales pesados (HMs), pero poco se sabe sobre el mecanismo que le confiere esta habilidad. Se sugiere que las enzimas antioxidantes pueden ser partícipes; pero no hay reportes relacionando la actividad enzimática y HMs en cultivos de células en suspensión (CSC) de *J. curcas*. Se determinó el efecto del cromo (Cr) o plomo (Pb) (0.0 a 3.0 mM) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POX) en diferentes tiempos de crecimiento de CSC de *J. curcas*. Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la actividad de SOD, POD y CAT por la adición de Cr o Pb. La mayor actividad de SOD ocurrió durante la primera hora, y en POX o CAT se observó a las 5 h. Después de las 192 h, la actividad de todas las enzimas disminuyó, lo cual coincidió en el mayor crecimiento del cultivo celular. Hubo una relación cercana entre el Cr o Pb y la actividad de SOD, POD y CAT, que podría relacionarse con la capacidad de *J. curcas* para acumular y tolerar altas concentraciones de Cr o Pb.

Palabras clave: *Jatropha curcas*; cultivo de células; metales pesados; cromo; plomo; actividad enzimática.

* Corresponding author. E-mail: cuhp@xanum.uam.mx
Tel. +52 (55) 5804 4714

1 Introduction

Plants can take up non-essential elements for nutrition such as heavy metals (HMs) like chromium (Cr) and lead (Pb), which are toxic to metabolic processes (Maksymiec, 1997; Siedlecka *et al.*, 2002). One of the main consequences associated with the incorporation of HMs is their toxicity; they promote an increase in the production and accumulation of superoxide anion radicals (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl (OH) and singlet oxygen (1O_2) radicals, collectively known as reactive oxygen species (ROS). These ROS may lead to an unspecific oxidation of cell membranes, proteins, nucleic acids, and chloroplast pigments (Jain *et al.*, 2010; Weckx *et al.*, 1997; Tewari *et al.*, 2002).

The accumulation of ROS is caused by a disequilibrium in the balance between ROS production and the capacity of the antioxidant system to inactivate them, causing cellular oxidative stress and inducing cell death. A plant's antioxidant system comprises non-enzymatic and enzymatic processes. The former is associated with glutathione, carotenoids, and ascorbate synthesis, while the latter is associated with superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) activities (Noctor and Foyer., 1998; Srivastava *et al.*, 2004), which are induced by the exposure of high HMs concentrations (Lukatin *et al.*, 2104). SOD catalyzes the dismutation of O_2^- to H_2O_2 and O_2 and is crucial in plants to regulate ROS concentrations through its higher activity, which is related to *de novo* synthesis (Dazy *et al.*, 2009). Peroxidases, such as CAT and POX, catalyze the decomposition of H_2O_2 , although their products and locations are different. CAT produces H_2O and O_2 and is found in the mitochondria and peroxisomes, while POX generates the oxidation of phenolic compounds and/or antioxidant compounds in the cytoplasm, vacuoles, membrane, and cell wall (Blokhina *et al.*, 2003). An important tool for understanding physiological and biochemical mechanisms in response to cellular oxidative stress is the plant cell and tissue culture (Errabii *et al.*, 2007).

Jatropha curcas is a species widely distributed in tropical areas of Mexico and other places worldwide. This plant was found to be able to decrease Zn, Pb, Cr, Cd, and Cu concentrations in sewage sludge containing those HMs. Zn content of the sewage sludge was 366.23 mg kg⁻¹ before planting and 117.97 mg kg⁻¹ after harvesting; Pb after harvesting measured at 1.12 mg kg⁻¹ while the initial level was 5.18 mg kg⁻¹; Cr after harvesting measured at 7.69

mg kg⁻¹ while the initial level was 33.86 mg kg⁻¹; Cu after harvesting measured at 4.13 mg kg⁻¹ while the initial level was 19.18 mg kg⁻¹; Cd content was initially 0.16 mg kg⁻¹ and after harvesting measured at 0.04 mg kg⁻¹.

The quantification of HMs in the whole plant showed the highest accumulation of Zn (29.5 mg kg⁻¹), Cu (0.44 mg kg⁻¹), and Cd (8.35 mg kg⁻¹) in the roots, while Pb (4.63 mg kg⁻¹) and Cr (0.33 mg kg⁻¹) contents were higher in the aerial parts, suggesting that *J. curcas* might be a suitable plant for phytoremediation (Ahmadpour *et al.*, 2010). In fact, the highest biomass and growth performance of *J. curcas*, in terms of height, basal diameter, and number of leaves was found in 40% contaminated sawdust in combination with 60% soil. On the other hand, an increase in biomass production (from 10.4 to 15.1 g L⁻¹) of cell suspension cultures from *J. curcas* was displayed by adding Pb to the culture medium. Moreover, when adding Cr and Pb (3 mM), this species displayed the capability for tolerance and accumulation of significant amounts of these HMs, accounting for 6.37 mg kg⁻¹ for Cr and 8.61 mg kg⁻¹ for Pb respectively (Bernabé-Antonio *et al.*, 2015). Despite the convenience for using *J. curcas* as a Cr and Pb accumulator when the whole plant or a cell suspension culture is used, the mechanisms involved are still not well understood or described.

Thus, the aim of this work was to investigate the effect of different concentrations of Cr and Pb on the enzyme antioxidant system in a cell suspension culture of *J. curcas* as an approach to understanding the antioxidant defense mechanisms behind the plant's detoxification strategy in response to heavy metals.

2 Materials and methods

2.1 Cr and Pb bioassays

For conducting this work, a cell suspension culture of *Jatropha curcas* established by Bernabé-Antonio *et al.* (2015) was provided by the Universidad Autonoma Metropolitana Campus Iztapalapa (UAM-I). Fresh weight biomasses (2 g each) were inoculated in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of the culture medium described by Murashigue and Skoogs (1962). Sucrose (3% w/v) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 2.27 μM) were added to the culture medium. K₂Cr₂O₇ or Pb(NO₃)₂ salts (source: Baker Analyzed, 108 Phillipsburg, NJ) were added to the culture medium as a source of Cr and Pb, respectively, using

concentrations of 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 mM, according to Bernabé-Antonio *et al.* (2015). Cultures were incubated for 15 days on an orbital shaker at 110 rpm and 25 ± 2 °C, and maintained at a 16 h photoperiod with white fluorescent light $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Extraction of enzymes

Cell culture samples (1 mL) were collected in aseptic conditions at 1, 5, 10, 24, 192, and 360 h after the beginning of incubation. The maximum sampling time (360 h) corresponded with the end of the exponential growth phase, established according to growth kinetics (Fig. 1) of a *J. curcas* cell suspension culture (CSC) as reported by Bernabé-Antonio *et al.* (2015). The cell samples were transferred into 2 mL vials and immediately frozen in liquid nitrogen. To obtain the crude enzyme extracts (CEE), the cells were filtered and then rinsed with EDTA (10 mM) to remove extracellular Cr or Pb. Subsequently 100 mg of cells (fresh weight) were re-suspended in a phosphate buffer (100 mM, pH 6.8), sonicated for 15 min, and then centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant containing the CEE was used to determine the SOD, POX, and CAT activity.

2.3 Determination of enzymatic activities

2.3.1 Superoxide dismutase (SOD)

Each SOD assay was conducted by the method of nitroblue tetrazolium (NBT) described by Fryer *et al.* (1998). The purple color developed was measured at 560 nm in a spectrophotometer (CECIL 3000 series). The assay buffer (100 mM K_2HPO_4) without SOD was used as a blank. An inhibition curve at 560 nm contrary to an increasing volume of the sample was performed.

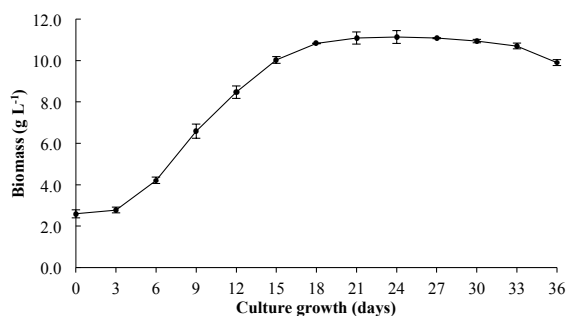


Fig. 1. Growth kinetics of a cell suspension cultures

of *J. curcas* during 36 days on MS medium with 2.27 mM 2,4-D. (Taken of Bernabé-Antonio *et al.*, 2015).

One unit of SOD was defined as that contained in the extract volume that caused 50% inhibition of the SOD inhibitable fraction of the NBT reduction (Beyer and Fridovich 1987). Each unit of enzymatic activity was expressed as SOD units per gram of fresh biomass (USOD g^{-1}).

2.3.2 Peroxidase (POX)

POX activity was determined according to Kar and Mishra (1976). The amount of purpurogallin was determined at 420 nm in a spectrophotometer (CECIL 3000 series). One unit of peroxidase was defined as the amount of enzyme causing an increase of 0.1 absorbance units at 420 nm. Each unit of enzymatic activity was expressed as POX units per gram of fresh biomass (UPOX g^{-1}).

2.3.3 Catalase (CAT)

Catalase activity was determined according to Aebi (1984). Catalase activity was estimated by the decrease in absorbance of H_2O_2 at 240 nm in a spectrophotometer (CECIL 3000 series). One unit of catalase was defined as the amount of enzyme that breaks 1 μmol of H_2O_2 per minute at room temperature and pH 7. Each unit of enzymatic activity was expressed as CAT units per gram of fresh biomass (UCAT g^{-1}).

2.4 Statistical analysis

The obtained data of the enzymatic units from HMs (Cr and Pb) treatments were subjected to variance analysis (ANOVA) followed by a Tukey's multiple range test ($P \leq 0.05$). SAS 9.0 software (SAS Institute Inc., 2002) was used for statistical analysis. Each treatment consisted of three flasks and three samples per flask were obtained. The experiments were repeated twice.

3 Results

3.1 Effect of Cr and Pb on SOD activity

In this work, the concentration and type of HMs (Cr or Pb) affected significantly ($P \leq 0.05$) the catalytic activity of SOD, CAT, and POX enzymes in a cell suspension culture of *J. curcas*. In the control treatment (HMs-free), SOD activity did not present

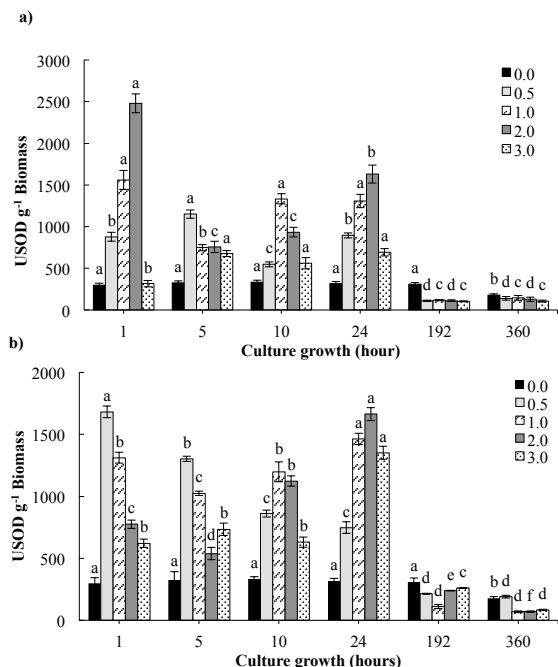


Fig. 2. Effect of different concentration (mM) of Cr (a) and Pb (b) in SOD activity during 360 hour in a cell suspension culture of *J. curcas*. Error bars represent standard deviation, columns with the same treatment at different times followed by the same letter are not statistically different ($P \leq 0.05$).

significant changes from 1 to 192 h (297.4 - 333.5 USOD g^{-1}), but at the end of the exponential growth stage (360 h) (Fig. 2a, 2b) a decrease was observed (178.7 USOD g^{-1}). Cr or Pb treatments (0.5 - 3.0 mM) significantly increased the activity of SOD from 1 to 24 h in comparison to the control sample. In contrast, an opposite effect occurred at 192 and 360 h, respectively (Fig. 2a, 2b). In fact, the activity of SOD 1 h after the addition of the HM was increased when Cr concentrations from 0.5 to 2.0 mM were used. An opposite effect was observed when Pb was used from 0.5 to 3.0 mM. Moreover, the highest SOD activity observed for both HMs was assessed at 1 h, corresponding to 2.0 mM of Cr (2479.39 USOD g^{-1}) (Fig. 2a) and 0.5 mM of Pb (1681.0 USOD g^{-1}); a concentration of 2.0 mM of Pb at 24 h also showed high SOD activity (1663.8 USOD g^{-1}) (Fig. 2b). These results indicate that a cell suspension of *J. curcas* displays the ability to respond efficiently in a relatively short time (from 1 to 24 h) to scavenge the superoxide anion radicals produced after the addition of Cr or Pb by increasing SOD activity.

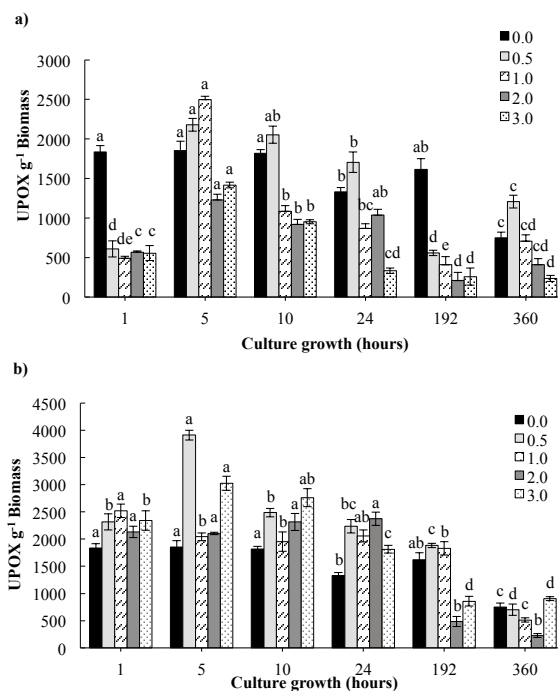


Fig. 3. Effect of different concentration (mM) of Cr (a) and Pb (b) in POX activity during 360 hour in a cell suspension culture of *J. curcas*. Error bars represent standard deviation, columns with the same treatment at different times followed by the same letter are not statistically different ($P \leq 0.05$).

3.2 Effect of Cr and Pb on POX activity

POX induction is a general response of higher plants to abiotic factors and this activity is correlated to elevated concentrations of HMs such as Zn, Cd, Cu, Ni, and Pb (Assche and Clijsters, 1990). In this work, significant differences ($P \leq 0.05$) were found in POX activity in the cell suspension culture of *J. curcas*. In cultures treated without HMs (Fig. 3a, 3b) the POX activity was almost constant during the first 192 h of culture (1617.0 - 1852.5 UPOX g^{-1}), and decreased significantly at 360 h. Cr and Pb caused significantly different patterns in the POX activity in comparison with the control sample. In general, 0.5 mM of Cr from 5 to 24 h and at 360 h showed higher POX activity compared to the control sample, while the other Cr concentrations showed lowering POX activity (Fig. 3a). The highest POX activity was observed with Cr 1.0 mM at 5 h (2497.0 UPOX g^{-1}); meanwhile all tested concentrations of Pb induced an increase of POX activity from 1 to 24 h (Fig. 3b), and the highest POX activity (3911.7 UPOX g^{-1}) was obtained

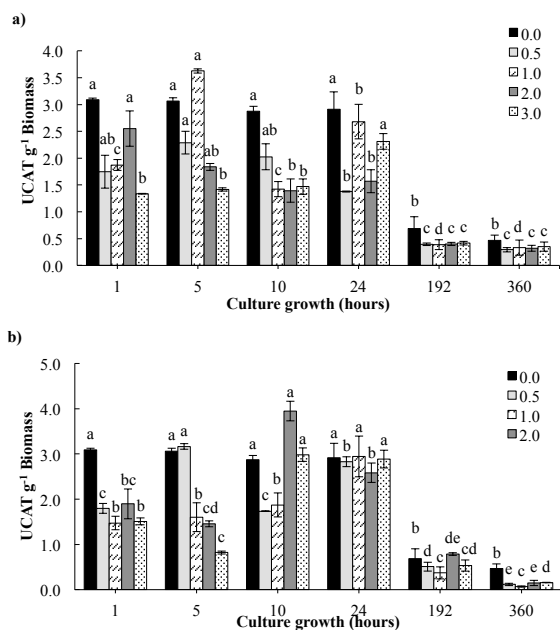


Fig. 4. Effect of different concentration (mM) of Cr (a) and Pb (b) in CAT activity during 360 hour in a cell suspension culture of *J. curcas*. Error bars represent standard deviation, columns with the same treatment at different times followed by the same letter are not statistically different ($P \leq 0.05$).

at 0.5 mM and 5 h (Fig. 3b). The highest activity of POX from a cell suspension culture of *J. curcas* was determined at 5 h for both HMs. This indicates that there is a relationship with SOD activity which generates H_2O_2 , the substrate of POX at 1 h of culture, and consequently leads to greater activity of POX at 5 h.

3.3 Effect of Cr and Pb on CAT activity

In the same way to the other enzymes, statistically significant differences ($P \leq 0.05$) were found in CAT activity as a result of the Cr or Pb heavy metals. In both cases, CAT activity in cell suspension cultures of *J. curcas* was lower than that displayed by the control treatment (Fig. 4a, 4b). CAT activity was from 0.8 - 3.63 $UCAT\ g^{-1}$ during the first 24 h, and decreased significantly at 192 and 360 h. The highest CAT activity induced by Cr was with 1.0 mM at 5 h (3.63 $UCAT\ g^{-1}$) (Fig. 4a); the highest CAT activity induced by Pb was with 2.0 mM until 10 h (3.95 $UCAT\ g^{-1}$) (Fig. 4b). These results suggest that the CAT enzyme in a cell suspension culture of *J. curcas* had low effectiveness in detoxifying H_2O_2 due to high amounts of Cr or Pb. This behavior could be due to the structure of the enzyme that contains a heme

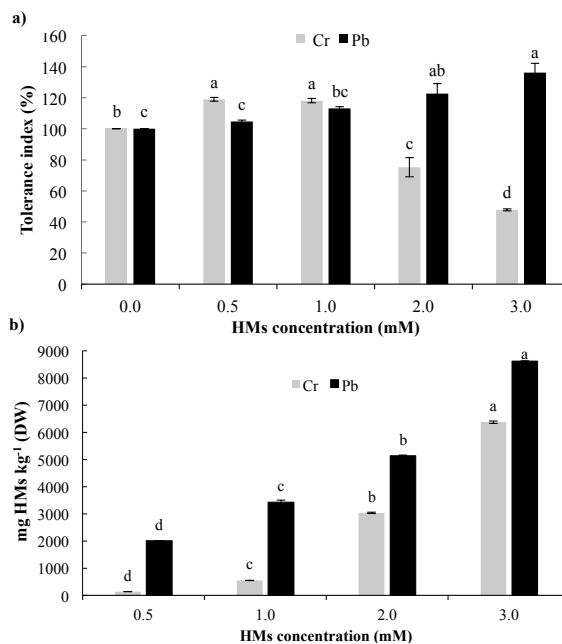


Fig. 5. Tolerance index (a) and bioaccumulation of HMs (b) of *J. curcas* cell suspension culture treated with Cr and Pb. Taken of Bernabé-Antonio *et al.* (2015).

group where Fe is a key element in the transference of electrons. The absorption of non-essential metals in plant nutrition occurs due to competition of nutrient transport proteins with analogous metals that are essential.

4 Discussion

Metal tolerance in plant cells is related to an increased catalytic activity of antioxidant enzymes (Srivastava *et al.*, 2004; Szollosi, 2014). The enhanced activity of SOD, POX, and CAT enzymes in cells of *J. curcas* under stress from Cr and Pb was related to higher levels of ROS. This activity contributes to the plant's toleration and accumulation of high concentrations of HMs. For instance, Bernabé-Antonio *et al.* (2015) reported a higher tolerance index in the cells of *J. curcas* treated with Cr (0.5 and 1.0 mM), but with higher concentrations of Cr (2.0 and 3.0 mM) it was significantly decreased (Fig. 5a). However, using 0.5 and 1.0 mM of Pb the tolerance index was not statistically different compared to the control, and it was higher with 2.0 and 3.0 mM of Pb (Fig 5a). In addition, the accumulation of both Pb and Cr in *J. curcas* cells was increased as the concentrations of HMs were increased (Fig. 5b).

These results indicated that Cr was more toxic than Pb, which could be associated with the differences observed between the activities of the antioxidant enzymes, in which SOD and POX were crucially important (Fig. 2-4). If the concentration of HMs is associated with the generation of ROS, the fact that higher SOD activity is observed in the presence of Cr rather than Pb indicates that higher levels of superoxide anion radicals are produced in the presence of Cr. Thus, SOD could be used as a biomarker of environmental stress (Dazy *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 1996). Moreover, the activity of other antioxidant enzymes such as glutathione S-transferase could also be associated with the toleration and accumulation of high levels of Cr and Pb in *J. curcas* (Mani and Kumar, 2014; Yadav *et al.*, 2009).

In other HMs tolerant species such as *Atriplex hortensis* and *A. rosea*, the leaves from plants grown in polluted soil in the presence of Pb, Ni, Cu, and Zn (1333.5, 1673.7, 501, and 3587.9 ppm, respectively) showed a lower SOD activity (0.06 USOD g⁻¹) compared with *J. curcas* cells (Kachout *et al.*, 2009). Also, root cells of *Pisum sativum* treated with 1 mM Pb(NO₃)₂ had an increased activity of SOD and CAT which was reported to contribute to the accumulation of excessive amounts of Pb (Malecka *et al.*, 2001). From these types of studies, the catalytic activity of antioxidant enzymes seems to be potentiated for HMs tolerant plants as a response to oxidative cell stress (Srivastava *et al.*, 2004; Szollosi, 2014).

On the other hand, there are reports indicating that Pb, a non-essential element, is an analogue for Fe and Zn nutrients (Maldonado-Magaña *et al.*, 2013; Peer *et al.*, 2005). Therefore, high concentrations of Pb could be transported within the *J. curcas* cells, limiting the transport of Fe and consequently decreasing the activity of CAT. A reduction of the activity of CAT in *in vitro* cultures of *Prunus cerasifera* and *Borage officinalis* was observed in the presence of Fe (Lombardi *et al.*, 2003; Mohamed and Aly, 2004). The lower Cu accumulation in the leaves of *Zea mays*, and higher antioxidant enzyme (SOD, POX, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase) activities in this cultivar suggested an enhanced tolerance capacity of this cultivar to protect the plant from oxidative damage (Tanyolac *et al.*, 2007). In addition, CAT plays a key role in preventing cellular oxidative damage by degradation of H₂O₂ to H₂O and O₂ (McKersie and Leshem, 1994). The increase in CAT activity can be crucial for plant survival under moderate stress caused by HMs (Youssef and Azooz, 2013). Nonetheless, other non-enzymatic molecules

as phenolic compounds may play an important role in antioxidant activity (Sánchez-Rangel *et al.*, 2014).

Various studies evaluating the effects of some HMs on *in vitro* plantlets and cell suspension cultures have been investigated from the point of view of environmental biology and toxicology, but no attempts have been made to elucidate the activity of antioxidant enzymes. For instance, plantlets of *Prosopis laevigata* had the capacity to uptake Cd, Cr, Pb, and Ni, but their ability to accumulate these heavy metals was different; Cd and Cr were more toxic (Buendía-González *et al.*, 2012). Additionally, cell suspension cultures of *P. laevigata* showed significant tolerance and accumulation of Pb under different concentrations of this HM (Maldonado-Magaña *et al.*, 2013), although cells accumulate lower amounts than seedlings. A study carried out by Lizhong and Cullen (1995) in a cell suspension culture of *Catharanthus roseus* reported that the toxicity of HMs (Hg, Cu, Cd, Pb, Zn, and Cr) was directly proportional to the concentration of HMs in the culture media.

The present work establishes an approach of the role of SOD, POX, and CAT antioxidant enzymes during the growth of *J. curcas* cells in which the time of 192 h and 360 h corresponded to the middle and the end of the exponential stage, respectively (Bernabé-Antonio *et al.*, 2015). The greatest activities for SOD and POX were seen from 1 to 192 h, while for CAT were seen from 1 to 24 h. This pattern indicates a higher function of SOD and POX during the exponential stage, where possibly high quantities of ROS were generated due to the high metabolic activity required to achieve cell growth (Klavina and Ievinsh, 2008); CAT could play an essential role in the lag phase of the culture. SOD activity was different through time in comparison to the growth of *Cardiospermum halicacabum* L. (Jahan *et al.*, 2014). A study carried out by Klavina *et al.* (2008) using plant tissue cultures of *Sorbus* cultivars reported an increase in the activity of POX during the early hours of growth. The decrease in activity occurred during the exponential growth phase of the culture. Greater activity of CAT was also found in *in vitro* shoot cultures and acclimatized plants of *C. halicacabum* L. (Jahan *et al.*, 2014).

The presence of enzymes that catalyze the degradation of H₂O₂ in *J. curcas* cells and follow different mechanisms of action or have different cell locations provides *J. curcas* cells an advantage for managing ROS in order to avoid their accumulation. The activity of CAT is reported to be increased in some species treated with HMs (Hassan and Mansoor,

2014), while the activity of POX has been reported to have an essential function to reduce stress caused by HMs (Tanyolac *et al.*, 2007). ROS can suppress the activity of enzymes belonging to the antioxidant enzymatic system, usually through the depletion of glutathione and binding with sulfhydryl groups of enzymes (Juknys *et al.*, 2012).

Conclusion

The activity of SOD, POX, and CAT enzymes from the antioxidant system of a cell suspension culture of *J. curcas* was significantly affected by Cr and Pb treatments. High SOD (538.4 - 2479.4 USOD g⁻¹) and POX (2042.7 - 3911.7 UPOX g⁻¹) activity was displayed from 1 to 24 hours under Cr or Pb (0.5 to 3.0 mM) treatments. The highest activity of SOD was found at 1 h of culture while in POX this behavior occurred at 5 h for both HMs (2 mM or 1 mM Cr for SOD and POX, respectively, and 0.5 mM Pb for both enzymes). It is likely that the SOD and POX enzymes are a key to the elimination of ROS induced by those HMs in cultures of *J. curcas*, allowing the cells to tolerate and accumulate Cr or Pb. This is the first study reporting the effect of HMs on the activity of SOD, POX, and CAT in a cell suspension culture of *J. curcas*. Further studies of secondary metabolism are required to evaluate other antioxidative enzymatic activities during all culture growth periods.

Acknowledgements

This research was funded by the Programa para el Desarrollo Profesional Docente de la Secretaría de Educación Pública (PRODEP-SEP) through a doctoral scholarship in the UAM-Iztapalapa Biotechnology Program (PNPC-CONACYT).

Notation

CAT	catalase
CEE	crude enzyme extracts
CSC	cell suspension culture
HMs	heavy metals
POX	peroxidase
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase

References

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Ahmadpour, P., Azmi, M.N., Arfin, A., Hassandy, A.H., Karam D.S., Affendy, H., Majid N.M. and Schamshuddin, J. (2010). Uptake of heavy metals by *Jatropha curcas* L. planted in soils containing sewage sludge. *American Journal of Applied Sciences* 7, 1291-1299.
- Assche, F.V. and Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment* 13, 195-206.
- Bernabé-Antonio, A., Álvarez, L., Buendía-González, L., Maldonado-Magaña, A. and Cruz-Sosa, F. (2015). Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissues and Organ Culture* 120, 221-228.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194.
- Buendía-González, L., Estrada-Zuñiga, M.E., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F. and Vernon-Carter, E.J. (2012). Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell Tissues Organ Culture* 108, 287-296.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C.E. and Vernon-Carter, E.J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant L. *Bioresource Technology* 101, 5862-5867.
- Dazy, M., Masfarau, J.F. and Ferard, J.F. (2009). Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75, 297-302.
- Errabii, T., Gandonou, C.B., Essalmani, H. Abrini, J. Idaomar, M. and Senhaji N.S. (2007). Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 95-102.
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A. and Baker, N.R. (1998). Relationships

- between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116, 571-580.
- Hassan, M. and Mansoor, S. (2014). Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in mung bean seedlings after lead and cadmium treatments. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 38, 55-61.
- Jahan, A.A., Anis, M. and Aref, I.M. (2014). Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls in in vivo and ex vitro environment. *Biotechnology Reports* 4, 66-72.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A.K. and Chandra, A. (2010). Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 979-986.
- Juknys, R., Vitkauskaitė, G., Račaitė, M. and Venclovienė, J. (2012). The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. *Central European Journal of Biology* 7, 299-306.
- Kachout, S.S., Mansoura, A.B., Leclerc, J.C., Jaffel, K., Rejeb, M.N. and Ouerghi, Z. (2009). Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *Atriplex rosea*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83, 37-43.
- Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57, 315-319.
- Klavina, D. and Ievinsh, G. (2008). Growth of tissue culture and changes in oxidative enzyme activity of *Sorbus* and tayberry cultivars during cold storage. *Acta Universitatis Latviensis* 745, 179-186.
- Lizhong, Z. and Cullen, W.R. (1995). Effect of some heavy metals on cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Environmental Sciences* 7, 60-65.
- Lombardi, L., Sebastiani, L. and Vitagliano, C. (2003). Physiological, biochemical, and molecular effects of *in vitro* induced iron deficiency in peach rootstock Mr.S 2/5. *Journal of Plant Nutrition* 26, 2149-2163.
- Lukatin, A., Egorova, I., Michailova I., Malec, P. and Strzalka, K. (2014). Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28, 80-86.
- Maksymiec, W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321-342.
- Maldonado-Magaña, A., Orozco-Villafuerte, J., Buendía-González, L., Estrada-Zuñiga, M.E., Bernabé-Antonio, A. and Cruz-Sosa, F. (2013). Establishment of cell suspension cultures of *Prosopis leavigata* (Humb. and Bonpl. Ex willd) M.C. Johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 489-498.
- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W. and Tomaszewska, B. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* 48, 687-698.
- Mani, D. and Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11, 843-872.
- McKersie, B.D. and Leshem, Y.Y. (1994). *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Springer. 256 p.
- Mohamed, A.A. and Aly, A.A. (2004). Iron deficiency stimulated some enzymes activity, lipid peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced *in vitro*. *International Journal of Agriculture and Biology* 6, 179-184.
- Murashige, T. and Skoogs F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15, 473-497.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279.

- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, L., Freeman J.L. and Muihy, A.S. (2005). Phytoremediation and hyperaccumulator species. In: *Topics in Current Genetics*, (M.J. Tamás and E. Martinoia, eds.), Pp. 299-340. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Jacobo-Velázquez, D.A. (2014). Abiotic stress based bioprocesses for the production of high value antioxidant phenolic compound in plants: An overview. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 49-61.
- Siedlecka, A. and Krupa, Z. (2002). Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In: *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, (M.M.V. Prasad and S. Kazimierz, eds.), Pp. 303-324. Springer, Netherlands.
- Srivastava, S., Tripathi, R.D. and Dwivedi, U.N. (2004). Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*-an angiospermic parasite. *Journal of Plant Physiology* 161, 665-674.
- Szollosi, R. (2014). Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview. In: *Oxidative Damage to Plants*, (P. Ahmad, ed.), Pp. 89-129. Academic Press, Elsevier, USA.
- Tanyolac, D., Ekmekci, Y. and Unalan A.E. (2007). Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere* 67, 89-98.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N. and Bisht, S.S. (2002). Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162, 381-388.
- Weckx, J.E.J. and Clijsters, H.M.M. (1997). Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology Biochemistry* 35, 405-410.
- Yadav, S.K., Juwarkar, A.A., Kumar, G.P., Thawale, P.R., Singh, S.K. and Chakrabarti, T. (2009). Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology* 100, 4616-4622.
- Youssef, M.M. and Azooz, M.M. (2013). Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Okra (*Hibiscus esculentus* cv.Hassawi). *Science International* 1, 12-16.