



Cambios en la Composición de Ácidos Grasos de *C. laxus* en un Sistema de Fitorremediación con Petróleo Crudo

Noemí Araceli Rivera Casado^a, María del C. Montes Horcasitas^a, Refugio Rodríguez Vázquez^a, Fernando J. Esparza García^a, Octavio Gómez Guzmán^a, Armando Ariza Castolob^b, Josefina Pérez Vargas^c, Graciano Calva Calva^a

Resumen

En este trabajo, se estudió el efecto de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) sobre el perfil de ácidos grasos de *Cyperus laxus* cultivado tanto en condiciones de invernadero como en cultivos *in vitro*. Para el sistema en invernadero, *C. laxus* fue cultivado en suelos intemperizados e impactados con petróleo crudo con concentraciones de hasta 340, 000 mg/Kg de hidrocarburo totales (HTP), mientras que en sistemas *in vitro* se utilizó fenantreno como HPA modelo (0-280 mM) incorporado en un medio semisólido de cultivo vegetal. El perfil de ácido graso fue específico para cada órgano vegetal y estuvo relacionado con el tipo de HPA presente en el sitio. Para ambos sistemas, en las plantas crecidas en ausencia de hidrocarburo se identificaron

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología, CINVESTAV, IPN.

^b Departamento de Química, CINVESTAV, IPN.

^c Posgrado en Ingeniería Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

ácidos grasos comunes de C14-C24 saturados e insaturados. Sin embargo, en presencia de hidrocarburos se identificaron ácidos grasos impares (C15, C17, C21, C23), cadenas hidrocarbonadas con posición y número de insaturaciones poco comunes (C20:3n6, C20:4) así como un aumento en la concentración de C22:2 y C24:0 en tejido de B y hoja. Estos resultados demuestran que la presencia de HPA afecta drásticamente la composición de ácido graso de *C. laxus*, lo que podría estar sugiriendo que el proceso de de remoción de HPA en un sistema de fitorremediación conlleva a un cambio de la composición lipídica de célula vegetal.

Introducción

Las actividades antropogénicas aunadas a los cambios hidrológicos del sitio han ocasionado la contaminación por petróleo crudo de grandes extensiones de suelo en el estado de Tabasco. Estudios previos revelaron que en dichos suelos prevalecía la presencia de hidrocarburos poliaromáticos (HPA), los cuales han sido catalogados como compuestos tóxicos y carcinogénicos, debido a su bajo nivel de biodisponibilidad y biodegradabilidad [1]. Para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos se han reportado diversas tecnologías [2], sin embargo se observó que específicamente en los sitios de interés había una implementación natural de organismos vegetales que podría estar hablando de sistemas de fitorremediación. Aunque el mecanismo de remoción depende de la capacidad metabólica de cada especie vegetal, no se tiene suficiente información acerca de la interacción entre los compuestos estructurales de la planta y los compuestos xenobióticos durante el proceso de fitorremoción. Hasta el momento algunos autores mencionan que HPA del tipo antraceno y fenantreno pueden traslocarse al tejido vegetal por simple difusión, sin embargo esto conlleva cambios en ciertas propiedades fisicoquímicas tanto del compuesto como del tejido vegetal [3-4]. Por lo anterior, se han realizaron evaluaciones sobre el perfil de compuestos fenólicos e HPA en el tejido vegetal de una de las especies pioneras del sitio contaminado: *Cyperus laxus* y fueron detectadas conjugaciones entre HPA-fenoles sugiriendo un interacción química y enzimática entre el xenobiótico y los metabolitos vegetales, de acuerdo con lo señalado por Rivera Casado, *et al.*, (2010). Continuando bajo esta línea, en el presente trabajo, se demostró que la presencia PHEN como hidrocarburo modelo, afecta drásticamente la composición lipídica de los órganos de *C. laxus* sugiriendo que la remoción de HPA en un sistema de fitorremediación depende de los cambios en la composición de lípidos en la célula.

Metodología

Materia vegetal. Para el cultivo *in vitro*, se colectaron y desinfectaron semillas de *C. laxus* desarrolladas en sistemas de invernadero y crecidas en suelo contaminado con 16,000 ppm (S163), 140,000 ppm (SSR) ppm, y 340,000 ppm (S205) de HTP. Las semillas se germinaron en un medio MS adicionado con sacarosa a 30g/L. De igual forma, se colectaron plantas crecidas directamente de los sistemas de invernadero y se obtuvieron los extractos lipídicos de los tres principales órganos de la planta.

Sistemas *in vitro* adicionados con PHEN. Se preparó y esterilizó por filtración una solución stock de PHEN en acetona. Se incorporó en caliente a 25 mL de medio MS previamente esterilizado, obteniendo concentraciones finales de 0, 5, 15, 30 y 50g/L (0, 28, 84, 168, 280 mM). El PHEN residual se obtuvo mediante extracciones con acetato de etilo/agua (1:1), que posteriormente se





llevó a sequedad y se resuspendió en una mezcla de acetato de etilo:hexano (1:1). La concentración de PHEN se cuantificó por HPLC en una columna PRODIGY ODS2.

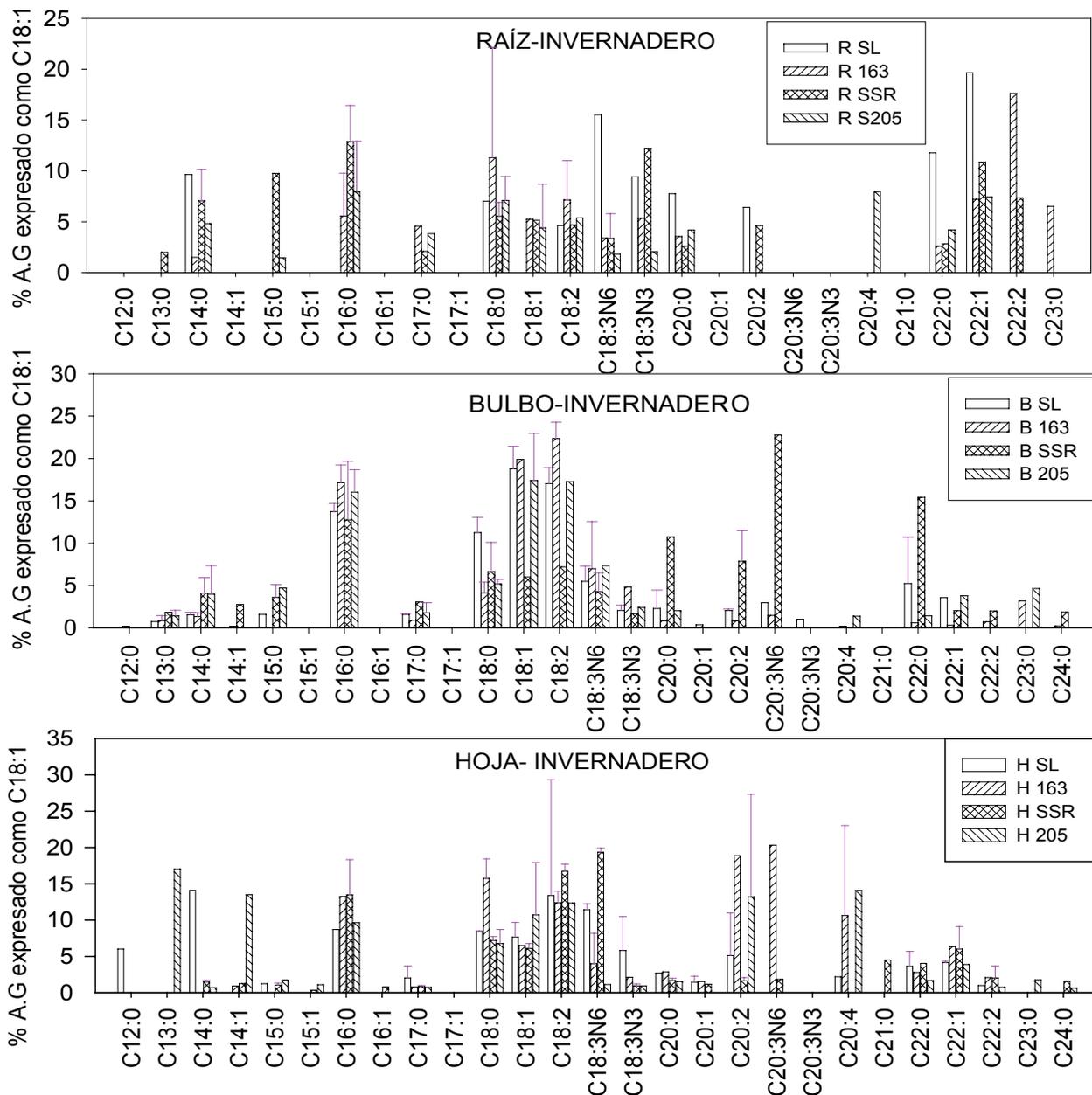
Extracción de compuestos lipídicos. A partir de tejido de raíz (R), bulbo (B) y hoja (H) de *C. laxus* se realizaron extracciones (3x) con cloroformo:metanol (1:1). Se realizó la transesterificación directa propuesta por Burjua, *et al.*, 2007., La identificación y cuantificación de ácidos grasos se llevó a cabo por CG y GC/MS mediante la comparación con los tiempos de retención con el estándar SUPELCO 37 FAME MIX.

Resultados

Perfil de ácidos grasos en órganos de *C. laxus* crecidos en suelos contaminados con petróleo crudo bajo condiciones de invernadero.

Se identificaron ácidos grasos de cadena par de C12:0 a C24:0 en los extractos de los órganos de *C. laxus* crecidos bajo las diferentes concentraciones de TPH (163, SSR, 205) y en el suelo control no contaminado (SL, Figura 1). Interesantemente, también se identificaron ácidos grasos de cadena impar, tales como C13:0, C15:0, C17:0 y C21:0 específicamente en los extractos de órganos de plantas crecidas en suelos contaminados. La presencia de los hidrocarburos en el suelo genera una disminución en la concentración de algunos ácidos grasos presentes en el tejido, tales como C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C22:0 y C22:1 en R; C18:0 en B y C14:0, C17:0, C18:3n3 en hoja. Mientras que la concentración de otros ácidos grasos no se ve afectada, tal es el caso de C18:0, C18:1, C18:2 en R; C16:0, C18:1, C18:2, C18:3n6, C18:3n3, C22:1 en B y C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0, C20:1, C20:2, C22:0, C22:1, C22:2 en H. Sin embargo, se favorece la síntesis de ciertos ácidos grasos cuando la planta se encuentra creciendo en suelo contaminado, por ejemplo C15:0, C17:0, C20:4, C22:2, C23:0 en R; C14:0, C15:0, C20:2, C20:3n6; C22:2, C23:0, C24:0 en B y C20:3n6, C20:4, C21:0, C23:0, C24:0 en H. Para esta última observación, es importante





considerar que no todos los cambios se observan para todas las plantas que crecieron en los diferentes suelos, más bien ciertos comportamientos se observaron para aquellos suelos donde se tenía la concentración de THP más alta. Por ejemplo, la presencia de C15:0 se observó únicamente en los extractos de las raíces crecidas en el suelo SSR y S205, mientras que C17:0 para el mismo extracto de órgano únicamente se observó en las plantas crecidas en suelo S163 y SSR.

Estos resultados sugieren que los cambios en el perfil de ácido graso en el tejido de *C. laxus* pudieran estar relacionados tanto con el tipo de hidrocarburo presente en el suelo como del metabolismo intrínseco de cada órgano vegetal como respuesta a cambios en el ambiente. De ello, la presencia de ácidos grasos de cadena impar en extractos de R y H pudiera estar implicando la participación de rutas bioquímicas alternas en los plástidos, tal como la biosíntesis a partir de aminoácidos en lugar de la ruta reportada a través de

Figura 1

Perfil de ácido graso en tejido de raíz (R), bulbo (B) y hoja (H) de *Cyperus laxus* crecido en suelos intemperizados e impactados con petróleo crudo con 16,000 ppm (S163), 140,000 ppm (SSR) ppm, 340,000 ppm (S205) de hidrocarburos totales del petróleo en relación con plantas cultivadas en suelos no contaminados (SL).

acetil-CoA durante condiciones de estrés en plantas [5-6]. Por otro lado, la presencia de ácidos grasos de cadenas largas pares o impares en los extractos de tejido de plantas expuestas a hidrocarburo tales como C20-C24, los cuales son componentes o precursores de estructuras celulares como membrana, cutícula, suberina o ceras en la célula vegetal. Algunos autores sugieren cambios importantes, tanto bioquímicos como fisiológicos ya sea a nivel celular, de órgano y de organismo completo como respuesta a la presencia de HPA en un sistema de fitorremediación [5, 7-8].

Perfil de ácidos grasos en órganos de *C. laxus* cultivados in vitro y sometidos a PHEN. Dadas las observaciones en los sistemas de fitorremediación en invernadero, se establecieron sistemas de cultivo *in vitro* de *C. laxus* utilizando PHEN como hidrocarburo modelo. La sobrevivencia de las plantas y el contenido de clorofila se vieron afectados entre los 7 y 14 días de cultivo en presencia de PHEN (Figura 2). La clorosis fue evidente después de siete días a concentraciones de 168 mM y 281 mM del PAH; a los 14 días para 84 mM de PHEN, y a los 21 días con 28 mM PHEN. Se reportó un comportamiento similar para *Arabidopsis* [9] expuesta a 0.05 mM de PHEN, donde la clorosis fue evidente a partir de las 6 horas de haber sometido la planta al PAH, lo cual pudiera estar relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno en el tejido como consecuencia de la presencia del xenobiótico en el medio, ya que se ha reportado que la toxicidad del PAH disminuye la actividad del metabolismo vegetal dañado a nivel de membrana celular, lo que reduce el transporte de nutrientes y metabolitos a la célula.

Interesantemente, *C. laxus* no presentó cambios fenológicos antes de 21 días de tratamiento a concentraciones de PHEN mil veces superiores a las reportadas con *Arabidopsis*, lo que sugiere que esta *Cyperaceae* posee características metabólicas específicas que le permiten sobrevivir a la presencia de este tipo de hidrocarburos recalcitrantes. Estas diferencias metabólicas pudieran estar relacionadas con la cantidad de HPA y el tipo de órgano donde fue adsorbido el xenobiótico en el tejido vegetal (Tabla 1). Aunque de manera general, se

Órgano	PHEN (mM)				
	0	28	84	168	280
Raíz	n.d.	5.619 ± 4.54	17.620 ± 10.39	29.165 ± 16.44	24.1 ± 5.7
Bulbo	n.d.	3.015 ± 2.95	2.275 ± 2.04	3.93 ± 0.127	4.9 ± 4.3
Hoja	n.d.	3.385 ± 0.93	2.172 ± 1.63	4.200 ± 0.3960	7.5 ± 0.3
Total/g planta	n.d.	4.001 ± 2.52	7.355 ± 4.686	12.431 ± 5.654	12.166 ± 3.433
Remanente	-----	67 ± 14.1	60 ± 16.9	30.5 ± 2.1	89.6 ± 2.2
Remoción (%)	-----	33	40	69.5	10.4

Tabla 1

Concentración de PHEN (mM/g) en órganos de *Cyperus* después de 21 días de cultivo.

observó una mayor acumulación de PHEN en tejido de R y H conforme se incrementó la concentración de HPA en el medio, fue notable que la máxima acumulación en R se alcanzó cuando se tuvo una concentración de 169 mM de PHEN en el medio, mientras que la acumulación en H se incrementa a 280

mM de PHEN. No obstante, aunque los valores de hidrocarburo residual no mostraron ninguna relación respecto a la cantidad de PHEN adicionado al medio, se observó que los datos más elevados de acumulación y de remoción se obtuvieron a una concentración de 168 mM.

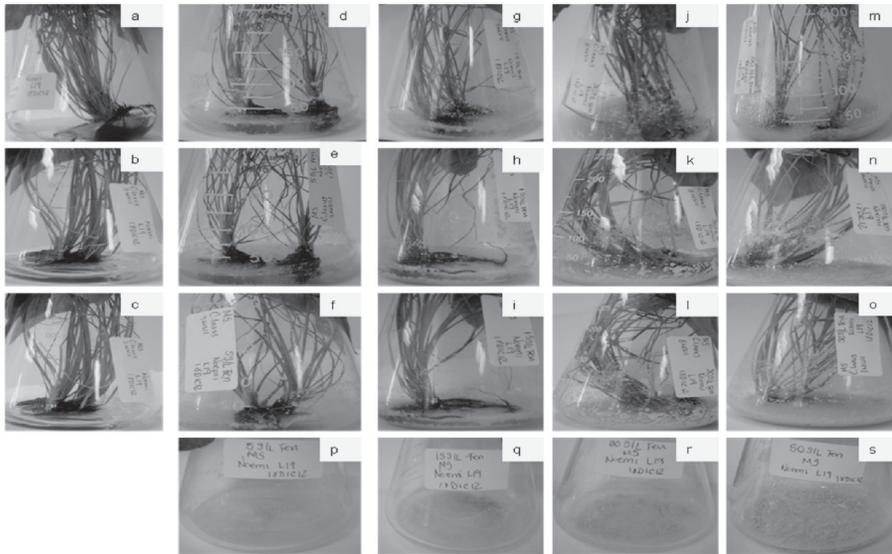


Figura 2

Cultivo in vitro de *Cyperus* a los 7, 14 y 21 días en medio MS bajo 0 (a, b, c), 28 (d, e, f), 84 (g, h, i), 168 (j, k, l) y 280 (m, n, o) mM de PHEN. Los controles abióticos en medio MS + PHEN (p, q, r y s). Para el experimento, se trasplantaron organismos de un año de cultivo en medio MS y fueron colocados en un medio con PHEN. Después de 21 días, se realizaron extractos de la fracción lipídica de cada órgano vegetal y se evaluó el PHEN residual.

Efecto del PHEN sobre el perfil de ácidos grasos en cultivos in vitro de *C. laxus*. Con base en los resultados anteriores, los cambios fisiológicos de *C. laxus* dada la presencia de PHEN están íntimamente relacionados con cambios en el metabolismo vegetal, por lo que en esta sección se evaluaron los cambios en el perfil de ácido graso de los diversos órganos de *C. laxus* por la presencia de PHEN como HPA, modelo en un sistema aséptico (Figura 3). Se identificaron ácidos grasos de cadena par, C14:0 a C24:0 saturados y hasta con tres insaturaciones, así como de cadenas impares de C13:0 a C23:0 saturados y con una insaturación.

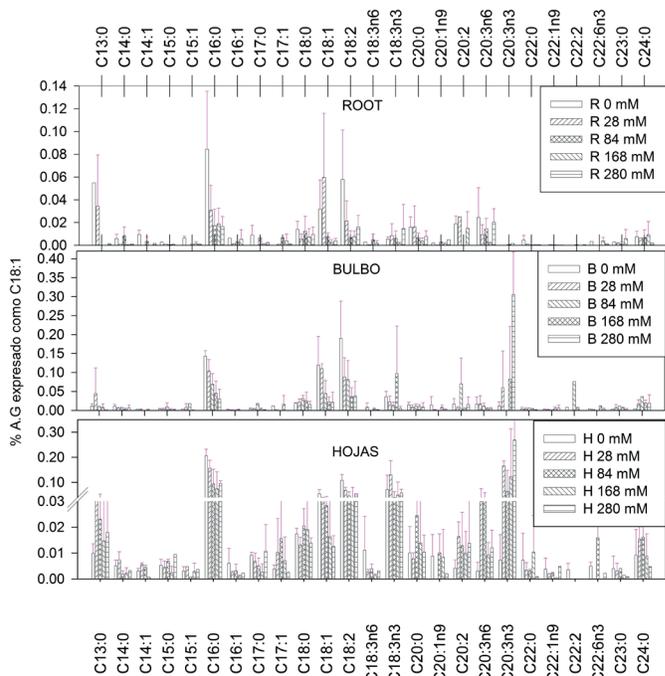


Figura 3

Perfil de ácidos grasos en raíz (R), bulbo (B) y hoja de (H) de *Cyperus laxus* cultivado in vitro en medio MS adicionado con 0-280 mM de PHEN

Fue notable la gran variabilidad de los resultados, dado que se consideraron los valores promedio de la respuesta de los extractos de tejido de individuos diferentes sometidos al mismo tratamiento. Este comportamiento se fundamenta en la variabilidad genética en plantas, aunado a la variabilidad reportada específicamente para la familia *Cyperaceae* [10]. Por otro lado, dada la versatilidad metabólica de las plantas, se conoce que la respuesta de cada individuo dependerá de la concentración del hidrocarburo, de la disponibilidad del mismo al tejido y del metabolismo de cada especie vegetal [3-4].

Efecto del PHEN en el perfil de ácido graso de cultivos *in vitro* de *C. laxus*.

Los resultados evidenciaron una disminución en la cantidad de ácidos grasos comunes en los diferentes órganos cuando se expuso la planta a las diferentes concentraciones de PHEN en el medio. Tal es el caso de tejido R, donde la concentración de C16:0, C18:1, C18:2 y C20:0 disminuía mientras se incrementó la concentración de PHEN. De igual forma en el B, se observó una disminución de C16:0, C18:1, C18:2, C18:3n3 (a excepción de B 168mM) y un aumento en C24:0 conforme se incrementó la concentración de PHEN. Y en el caso de H, se observó una tendencia a la disminución de C16:0, C18:1 y C18:2 con un aumento de C20:2. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de PHEN repercute en la biosíntesis de ácidos grasos no-plastídicos, lo que involucra la elongación de cadenas mayores a C18 y un mayor número de insaturaciones (>3). Adicionalmente, de manera análoga a lo observado en plantas crecidas en invernadero, los tratamientos *in vitro* con PHEN, mostraron un incremento en la concentración de ácidos grasos de cadenas largas C20-C24, específicamente C20:3 en extractos de B y hoja. Estos resultados podrían sugerir que bajo la presencia de HPA en el medio, *C. laxus* es capaz de dirigir flujos metabólicos a la producción de estructuras celulares como membrana, cutina, suberina y ceras con el objeto de salvaguardar la integridad vegetal, repercutiendo a nivel bioquímico y fisiológico. Estos cambios metabólicos comúnmente son autorregulados a través de nódulos flexibles o puntos de bifurcación involucrados en la compleja arquitectura bioquímica de la planta [11].

Conclusiones

El perfil de ácidos grasos en plantas tanto de sistemas de fitorremediación en invernadero como *in vitro* se vio afectado drásticamente, mostrando un incremento en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, sugiriendo que la remoción del hidrocarburo por el sistema vegetal está directamente relacionado con cambios en la composición lipídica de la planta. La acumulación de PHEN en *C. laxus* depende del tipo de órgano que en este caso se observó mayormente en raíz y hoja.

Referencias

Semple, K.T., K.J. Doick, K.C. Jones, P. Burauel, A. Craven, and H. Harms, "Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediments is complicated". *Environ Sci & Tech.* 38: p. 228A-231A. 2004

Tang, J., X. Lu, Q. Sun, and W. Zhu, "Aging Effect of Petroleum Hydrocarbons in Soil under different Attenuation Conditions." *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 149: p. 109-117. 2012

Coleman, J.O.D., M.M.A. Blake-Kalff, and T.G.E. Davies, "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation". *Trends in Plant Science.* 2: p. 144-151.1997

Pilon-Smits, E., "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: p. 15-39. 2005

Kolattudkudy, P.E., "Biosynthesis of cuticular lipids". *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 21: p. 163-192.1970

Kroumova, A.B., Z. Xie, and G.J. Wagner, "A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry.* 91: p. 11437-11441. 1994

Kunst, L. and A.L. Samuels, "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax". *Progress in Lipid Research.* 42: p. 51-80. 2003

Lessire, R., M.-A. Hartmann-Bouillon, and C. Cassagne, "Very long chain fatty acids: occurrence and biosynthesis in membrane fractions from etiolated maize coleptiles". *Phytochem.* 21(1): p. 55-59. 1982

Alkio, M., T.M. Tabuchi, X. Wang, and A. Colón-Carmona, "Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms". *Journal of Experimental Botany.* 56(421): p. 2983-2994. 2005

Roalson, E.H., "A Synopsis of Chromosome Number Variation in the *Cyperaceae*". *Bot Rev.* 74: p. 209-393. 2008

Stephanopoulos, G.N., A.A. Aristidou, and J. Nielsen, *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*, San Diego, California: *Academic Press.* 725. 1998