

Patrones de expresión de sistemas antioxidantes en plantas pioneras presentes en balsas de estériles contaminadas con altas concentraciones de metales pesados

A. López-Orenes, M.A. Ferrer, A.A. Calderón

Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. antonio.orenes@upct.es

RESUMEN

Las zonas contaminadas por la acción minera causan graves problemas medioambientales, en especial las balsas de estériles mineros por sus altas concentraciones de metales pesados y su susceptibilidad a ser erosionadas por agentes ambientales. El estudio de la fisiología de las plantas que crecen de forma espontánea en estas zonas degradadas, puede constituir una herramienta de gran importancia a la hora de plantear técnicas de restauración de las balsas de estériles mineros más eficaces. *Zygophyllum fabago* es una de las especies que se encuentran, habitualmente, en las balsas de estériles mineros de la Sierra de Cartagena. Presenta una alta tolerancia a niveles elevados de metales pesados y una buena adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la zona, lo que le permite ser de las primeras especies en colonizar dichos espacios, mejorando las condiciones del suelo para que otras especies puedan establecerse con posterioridad. En este trabajo se analizan los niveles de algunos componentes del sistema antioxidante y la capacidad antioxidante de plantas de *Z. fabago* pertenecientes a tres poblaciones de la Sierra de Cartagena, dos de las cuales procedentes de sendas balsas de estériles. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas crecidas en las balsas presentaron niveles superiores de los parámetros citados, sugiriendo que el carácter de planta pionera de *Zygophyllum* puede estar relacionado con la activación de un robusto sistema antioxidante que minimice el daño oxidativo provocado por las condiciones desfavorables de crecimiento.

Palabras clave: *Zygophyllum fabago*; capacidad antioxidante; tolerancia al estrés

1. Introducción

La contaminación ambiental por metales pesados (MP) está aumentando de forma alarmante como consecuencia del incremento del desarrollo industrial y de la agricultura intensiva. El aumento de los MP en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, pudiendo alcanzar concentraciones nocivas para la salud y el equilibrio biológico. Las zonas mineras y en concreto las balsas de estériles mineros presentan niveles muy elevados de MP y son zonas donde conviene reducir la presencia de estos contaminantes, recuperando o restaurando los ecosistemas degradados. Estas balsas de estériles mineros son áreas de difícil restauración mediante el uso de plantas, ya que el establecimiento y supervivencia de las mismas están condicionados por los altos niveles de MP, pH extremos, bajos niveles de nutrientes y baja capacidad de retención de

agua de los suelos [1,2]. No obstante, incluso en estas balsas se observan islas de vegetación [3], lo que sugiere que la revegetación de la zona podría llevarse a cabo, y con ello se podría impedir la erosión del suelo y la consiguiente propagación de MP. A las extremas condiciones edáficas que se presentan en las balsas de estériles mineros hay que sumar que la zona de estudio se localiza en la Sierra de Cartagena, en el SE de España, caracterizada por tener un clima mediterráneo semiárido, con alta temperatura, alta irradiancia y escasez de precipitaciones. Por tanto, las plantas se encuentran sometidas a un alto grado de estrés, especialmente durante los meses de verano. La selección de especies adecuadas, que se puedan establecer, crecer, y colonizar los suelos contaminados con MP, es importante para la remediación exitosa de estas zonas. Durante los últimos 30 años, se han identificado más de 450 especies de plantas hiperacumuladoras entre diferentes taxones [4]. Sin embargo, en la práctica, existe un interés

continuo en la búsqueda de plantas tolerantes nativas o naturalizadas, perfectamente adaptadas al entorno ecológico local, como una estrategia útil para alcanzar niveles aceptables de cobertura vegetal en los procesos de recuperación de suelos [5-7]. Con el fin de lograr la revegetación autosostenible de las zonas degradadas, resulta necesario conocer los mecanismos que determinan la tolerancia de las plantas a las duras condiciones ambientales, lo que permitiría poner en marcha programas de restauración con mayores probabilidades de éxito.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal

En el estudio se utilizaron hojas completamente expandidas de plantas de *Zygophyllum fabago* crecidas de forma espontánea en tres localizaciones de la Sierra de Cartagena. Dos de las poblaciones analizadas procedieron de sendas balsas de estériles mineros (denominadas “Agustin” y “Mercader”) y la tercera de una zona localizada a 1 km de distancia de las anteriores y con niveles de metales pesados significativamente inferiores a los de las balsas (ZNA, Tabla 1). Las muestras se recolectaron en primavera y se transportaron al laboratorio, refrigeradas, en el menor tiempo posible. Una vez allí se lavaron bien con agua destilada, se secaron suavemente sobre papel de filtro, se congelaron y pulverizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta su análisis.

2.2 Determinación de marcadores de estrés

Los niveles de clorofilas a y b y de carotenoides totales se determinaron de acuerdo con lo descrito en [8]. Como marcadores de estrés oxidativo se midieron los niveles de H₂O₂, radical superóxido, oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y de prolina [8].

2.3 Análisis de compuestos antioxidantes y determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se midió mediante tres ensayos espectrofotométricos (métodos del DPPH, ABTS y FRAP), de acuerdo con lo descrito en [8]. Como compuestos antioxidantes se determinó el contenido de fenoles solubles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, así como los niveles de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides totales y flavanoles. También se analizaron los niveles de ácido ascórbico y de tioles totales. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante técnicas espectrofotométricas, de acuerdo con lo descrito en [8].

2.4. Análisis de sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de compuestos fenólicos

Las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa (PAL) y guayacol-peroxidasa (PRX) se determinaron espectrofotométricamente [8].

2.5. Análisis estadísticos

Los datos se presentan como la media de tres muestras de cada zona, con un mínimo de cuatro repeticiones por muestra. Todo los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (versión 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

3. Resultados y Discusión

Los niveles de clorofilas disminuyeron drásticamente en las plantas que crecieron en las balsas de estériles mineros en comparación con las plantas de la zona no afectada (Tabla 2), aunque la relación Chl a/b fue bastante parecida. Esta relación presenta valores relativamente bajos, lo que indicaría que incluso las plantas de la zona no afectada estarían soportando cierto grado de estrés en el momento del muestreo.

La peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas se utilizaron como marcadores de daño oxidativo a macromoléculas. Curiosamente, se observó una marcada disminución en el contenido de estos parámetros en las plantas crecidas en las balsas de estériles en comparación con las de la zona no afectada (Figura 1). Además, los niveles de H₂O₂ y de radical superóxido fueron significativamente menores en las plantas crecidas en balsas de estériles (Figura 1). En cuanto a la prolina se observó también como en las plantas crecidas en las balsas los niveles descendían considerablemente respecto a las procedentes de la zona no afectada (datos no mostrados).

Con el fin de tener una primera evaluación de la capacidad antioxidante de extractos procedentes de las hojas de *Z. fabago* se llevaron a cabo tres ensayos (DPPH, ABTS y FRAP). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, en la que se observa que la capacidad antioxidante de los extractos procedentes de las plantas que crecen en las balsas fue mayor, indicando que los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo se encuentran sobreactivados en estas plantas.

En cuanto al contenido fenólico de los extractos se observó que los niveles de fenoles solubles totales fueron superiores en las plantas crecidas

en las balsas de estériles mineros (Tabla 4), al igual que ocurría con los niveles de ácidos hidroxicinámicos, sin embargo los niveles observados de flavonoides y flavanoles fueron similares en todas las muestras (datos no mostrados).

Los niveles de ácido ascórbico fueron también mayores en plantas crecidas en las balsas, al igual que ocurrió con los niveles de tioles totales (Tabla 4). El ascórbico actúa como reductor de muchos radicales libres, minimizando los daños causados por el estrés oxidativo y protegiendo, de esta forma, a las macromoléculas del daño oxidativo. La capacidad para donar electrones en un rango amplio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas hace del ácido ascórbico el principal destructor de especies activas del oxígeno (EAO) en fase acuosa. El aumento de los niveles de ascórbico en las plantas crecidas en las balsas de estériles mineros podría indicar que hay una generación continua de dichas EAO. Algo similar ocurriría con el glutatión, que reacciona químicamente con oxígeno singlete, superóxido y radicales hidroxilo, y, por tanto, funciona directamente como un captador de radicales libres. El glutatión tiene un papel central en la defensa antioxidante y, además, tiene la capacidad para regenerar al ácido ascórbico, vía ciclo ascorbato-glutatión.

En cuanto a las enzimas implicadas en el metabolismo fenólico, se observó que la PAL, enzima que cataliza la reacción que convierte L-fenilalanina en ácido trans-cinámico, disminuía en las plantas crecidas en las balsas de estériles (datos no mostrados), esto podría deberse a que al haber un mayor contenido en compuestos fenólicos en dichas plantas, se ralentiza la biosíntesis de estos. En el caso de la PRX soluble, enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando H₂O₂ como cosustrato, se observó que los niveles obtenidos en el pantano Agustín fueron similares a los obtenidos en las plantas crecidas fuera de las balsas de estériles, y que los niveles de las plantas crecidas en el pantano Mercader fueron muy superiores a las anteriores (datos no mostrados). Estos resultados indicarían la activación de un mecanismo antioxidante por el cual la PRX oxidaría los compuestos fenólicos utilizando el H₂O₂ como aceptor de electrones, esto a su vez explicaría también el hecho de que los niveles de H₂O₂ en plantas crecidas en las balsas de estériles mineros fueran inferiores, debido a la eficaz respuesta de las plantas de *Z. fabago* para reducir dichas EAO.

4. Conclusiones

Z. fabago es una de las especies pioneras en la colonización de las balsas de estériles mineros de la Sierra de Cartagena, gracias, posiblemente, a la activación de un robusto sistema antioxidante. Los análisis realizados muestran claras diferencias entre las plantas crecidas dentro de las balsas de estériles y fuera de este ambiente. Así, en líneas generales, las plantas crecidas en las balsas presentan niveles superiores de compuestos antioxidantes, lo que podría indicar el estrés al que están expuestas en esas condiciones, de ahí que los extractos de dichas plantas tengan mayor capacidad antioxidante para limitar la acumulación de las EAO. Aun así, la inversión de los escasos recursos disponibles en las balsas en la activación del sistema antioxidante, conduciría a la disminución en el contenido en pigmentos fotosintéticos, déficit nutricional y, en suma, a un peor estado fisiológico de la planta. Por el contrario, la sobre-activación de la defensa antioxidante llevaría a una disminución de los niveles de los marcadores de estrés con respecto a las plantas de la zona no afectada (que, posiblemente, también se encontraban sometidas a condiciones sub-óptimas de crecimiento).

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proyecto CTM2011-23958) y por el MECD (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo se ha realizado en el Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Tordoff GM, AJM Baker, AJ Willis, (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- [2] Conesa HM, Faz A, Arnaldos R, (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 1–11.
- [3] Párraga-Aguado I, Álvarez-Rogel J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013a). Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. *Ecol. Eng.* 58:84–90.
- [4] Maestri E, Marmioli M, Visioli G, Marmioli N, (2010). Metal tolerance and

hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environ. Exp. Bot.* 68: 1–13.

[5] Kirmer A, Tischew S, Ozinga WA, von Lampe M, Baasch A, van Groenendael JM, (2008). Importance of regional species pools and functional traits in colonization processes: predicting re-colonization after large-scale destruction of ecosystems. *J. Appl. Ecol.* 45, 1523e1530.

[6] Chen L, S. Gao, P. Zhu, Y. Liu, T. Hu, J. Zhang. (2013). Comparative study of metal resistance and accumulation of lead and zinc in two poplars. *Physiol Plantarum* doi:10.1111/ppl.12120.

[7] Párraga-Aguado I, González-Alcaraz MN, Álvarez-Rogel J, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013b). The importance of edaphic niches and pioneer plant species succession for the phytomanagement of mine tailings. *Environ. Pollut.* 176: 134–143.

[8] López-Orenes A, Martínez-Moreno JM, Calderón AA, Ferrer MA, (2013). Changes in phenolic metabolism in salicylic acid-treated shoots of *Cistus heterophyllus*. *Plant Cell Tiss. Org.* 113: 417-427.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Características de los suelos de las poblaciones estudiadas (Conesa, comunicación personal).

Muestra	ZNA	Agustin	Mercader
pH	7.83	7.17	7.21
%CaCO ₃	24.56	10.75	8.62
EC (ds/m)	1.75	2.65	3.46
CO (%)	3.18	0.71	0.57
DOC (mg/kg)	400.33	31.95	18.13
N total (g/kg)	4.29	0.30	0.24
As (mg/kg)	14.75	190.00	414.33
Cd (mg/kg)	8.00	45.33	22.67
Cu (mg/kg)	46.70	69.83	89.67
Mn (mg/kg)	702.75	7923.67	12084.67
Pb (mg/kg)	646.75	3438.67	2620.00
Zn (mg/kg)	546.75	5368.33	3517.33

Tabla 2. Contenido en Clorofilas (µg compuesto/g PF) (P < 0,05)

Muestra	Chl a	Chl b
ZNA	892.24 ^a	701.39 ^a
Agustin	665.05 ^b	657.22 ^b
Mercader	461.84 ^c	357.94 ^c

Tabla 3. Capacidad antioxidante (P < 0,05)

Muestra	DPPH µmol eq. ácido gálico /g PF	ABTS µmol /g PF	FRAP µmol Fe (II) /g PF
ZNA	2.00 ^c	0.63 ^c	9.66 ^c
Agustin	3.44 ^a	1.30 ^a	16.65 ^a
Mercader	2.78 ^b	1.06 ^b	14.23 ^b

Tabla 4. Compuestos antioxidantes (P < 0,05)

Muestra	Fenoles µmol eq. ácido gálico /g PF	Ascórbico µmol /g PF	Tioles µmol /g PF
ZNA	1.34 ^c	1.84 ^c	299.48 ^c
Agustin	2.72 ^a	3.14 ^a	410.41 ^a
Mercader	2.11 ^b	2.68 ^b	378.86 ^b

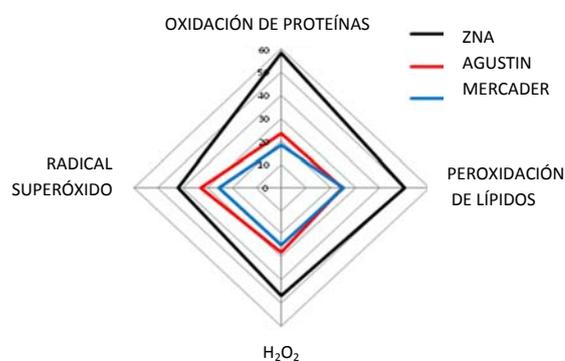


Figura 1. Niveles de diferentes marcadores de estrés: oxidación de proteínas (nmol de hidrazona/g PF), radical superóxido (nmol NO₂⁻/g PF), peroxidación de lípidos (nmol MDA/g PF) y H₂O₂ (nmol/g PF) expresados como porcentaje de la suma total.