



DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MERCURIO (Hg) EN TRES VARIETADES DE *PHASEOLUS VULGARIS* L. ENDEMICAS DE ZACATECAS

Josefina Huerta García ¹, Jorge Bluhm Gutiérrez ², Felipe de Jesús Escalona Alcázar ², Edgar León Esparza Ibarra ¹ y Francisco Javier Cabral Arellano ¹

¹ Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, jhuga@msn.com

² Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, jorgebg5@yahoo.com.mx

RESUMEN

Los Metales Pesados (MP) tales como el mercurio (Hg) pertenecen a un grupo de agentes que inducen una respuesta de estrés a nivel celular y bioquímico. Una característica importante de esta respuesta en las plantas reside principalmente en alteraciones en germinación, desarrollo radicular y concentración de proteínas. En esta investigación se evaluó *in vitro* el efecto del Hg en tres variedades de *Phaseolus vulgaris* L., cultivadas en Zacatecas, con la finalidad de analizar si estas leguminosas crecidas en hábitats metalíferos han desarrollado tolerancia y/o sensibilidad a los MP. Las semillas de frijol flor de mayo, flor de junio y negro zacatecas fueron sometidas a cuatro tratamientos de HgCl₂ (0.01g/L, 0.1g/L, 1g/L y 10 g/L). Los resultados obtenidos mostraron una notable inhibición de la germinación conforme aumentó la dosis de Hg. También la raíz reveló claramente inhibición en su desarrollo a partir de 0.1g/L/HgCl₂. Finalmente la evaluación sobre la concentración de proteínas a través de perfiles de expresión electroforética y cuantificación por espectrometría mostraron una disminución muy marcada a medida que se incrementaron las concentraciones del metal, comparadas con el grupo testigo. Dos de las variedades de estudio, flor de mayo y flor de junio resultaron más sensibles a los efectos mercuriales en comparación con el negro zacatecas que expresó mayor tolerancia al Hg en los parámetros evaluados.

1. INTRODUCCIÓN

La industria minera, tiene un alto impacto en el ambiente desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua. Durante los procesos mineros se genera gran cantidad de desechos sólidos (jales), líquidos (aguas residuales) y gaseosos (gases, humos y partículas). De esta manera, la generación de residuos peligrosos en la minería constituyen problemas de contaminación difíciles de resolver (Gutiérrez y Moreno, 1995).

Los principales peligros ambientales en la transferencia de metales pesados desde el suelo a las plantas son la entrada de ellos a la cadena trófica, pérdida de cobertura vegetal o cosecha por su fitotoxicidad y la absorción desde el suelo por plantas tolerantes, lo que conlleva a graves efectos tóxicos en la salud humana (Azebedo y Rodríguez, 2012). Por lo tanto, además del suelo, las plantas son un elemento importante en los procesos de contaminación. Esto es especialmente relevante en zonas agrícolas, ya que la transferencia de MP a los seres humanos puede producirse de manera directa. Los metales con mayor peligrosidad para los seres humanos son el cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) (Chojnacka *et al.*, 2005). El Hg, es un metal que adopta varios estados de oxidación, esta característica le permite fácilmente dispersarse en todos los ecosistemas.

La selección del modelo *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) en ésta investigación, se realizó en base a estudios efectuados por Hernández (2001) quien sugirió el uso de esta especie como planta



fitoremediadora, lo cual fue corroborado por López (2002), adicionalmente estudios realizados por Cabral (2003) demuestran que este modelo representa un sistema de referencia estable para monitorear proteínas y RNAs mensajeros, donde la abundancia de estas moléculas permitirá, disponer de ellas de forma estable y económica para futuros estudios. Por otro lado Huerta (2011), manifiesta que dosis micromolares de Hg ($10 \mu\text{M/L}$) en frijol, alteran la expresión de la proteína nucleolar Fibrilarina (Fb) de manera específica. Además se pretende evaluar la respuesta de la planta a nivel radicular en presencia del contaminante y los cambios morfológicos que pueda generar.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo evaluó el efecto de Hg en *Phaseolus vulgaris L.*, a través de tres parámetros, como indicadores de toxicidad: índice de germinación, desarrollo radicular y concentración de proteínas. El diseño experimental consistió en someter las semillas a distintos tratamientos de HgCl_2 , los resultados mostraron clara evidencia de toxicidad con una disminución en la germinación, elongación radicular y síntesis de proteínas conforme se incrementaron las dosis de mercurio, lo que conllevó finalmente a la muerte del 100% de las semillas.

La metodología empleada consistió en analizar tres variedades de frijol (flor de mayo, flor de junio y negro zacatecas) cultivadas en el estado de Zacatecas a distintas concentraciones de HgCl_2 . Las semillas fueron esterilizadas previamente en una disolución de hipoclorito sódico al 3%. En seguida se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. La imbibición de las semillas fue llevada a cabo por inmersión en 20 mL de las diferentes soluciones de Hg (0.01g/L , 0.1g/L , 1g/L y 10g/L) por 4 horas.

Germinación y desarrollo. Posteriormente las semillas se colocaron en cajas petri con doble capa de papel filtro, con 15 mL de la misma solución, se colocaron en incubadora simple a 25°C con diferentes tiempos: 0, 72, 144, 216 y 288 horas, quedando codificados de la siguiente manera: la letra A-0 horas, B-72, C-144, D-216 y E-288 horas, generándose tres grupos de estudio GI (flor de mayo), GII (flor de junio) y GIII (negro zacatecas), con 5 periodos de tiempo: 0, 72, 144, 216 y 288 horas y 4 tratamientos de HgCl_2 : T1- 0.01g/L , T2- 0.1g/L , T3- 1g/L , T4- 10g/L , el grupo testigo fue codificado como T0 sin HgCl_2 . El porcentaje de germinación fue monitoreado cada 72 horas.

Obtención de tejido radicular y extracción de proteínas solubles. Una vez que cada uno de los grupos cumplieron los tiempos establecidos, se procedió a cortar la raíz de las plántulas, se midió la longitud y peso de biomasa obtenida (dato no mostrado) y se fotografiaron, tras lo cual se sumergieron en nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, al cual se le adicionó buffer de extracción NET-2 (Tris- HCl 500mM pH 7.4, NaCl 150mM, Nonidet NP- 40 o Igepal 0.05%), se colocaron $20 \mu\text{L/mg}$ de tejido radicular (Nambara, 1992). Se disolvió en agitador (vortex), se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf, se almacenó en congelación (-4°C) para la cuantificación de proteínas solubles de acuerdo a la técnica de micro Bradford (1976).

Medición de concentración de proteínas. La medición de proteínas se realizó en el espectrofotómetro (Bradford, 1976), donde se adicionaron en varios eppendorf cantidades de 1 hasta $10 \mu\text{L}$ de muestra ajustando a un volumen de $800 \mu\text{L}$ con solución NaCl 150 mM, después se agregó $200 \mu\text{L}$ de solución de trabajo Bradford (Bradford Dye Sigma MO). Se mezclaron los tubos en el vortex y se dejaron reposar por tres minutos a temperatura ambiente. Después se transfirió a una cubeta y se leyó la absorbancia a una densidad óptica de 595 nm de luz visible. El blanco para ajustar el espectrofotómetro a cero contiene $800 \mu\text{L}$ de NaCl 150 mM + $200 \mu\text{L}$ de solución de trabajo de Bradford. La cantidad de proteína se calculó con una curva patrón. Cada determinación se hizo por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 resume los resultados obtenidos por el efecto de HgCl_2 en la germinación de los tres grupos de estudio. Como se observa en el T-1 la germinación fue un tanto homogénea en cada



uno de los grupos. Sin embargo en el T-2 los grupos mostraron una respuesta diferencial, el grupo II fue el más sensible con un 95% de semillas germinadas y con el T-3 también mostró ser el más afectado solo el 10% germinó, seguido por el grupo I donde el 20% germinó y finalmente el grupo III mostró gran capacidad de tolerancia con un 65% de semillas germinadas en un periodo de 288 horas. El T-4 fue letal para los tres grupos, ninguna semilla germinó.

Tabla 1 Germinación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. expuestos a HgCl ₂						
Grupo I Semillas Frijol flor de mayo						
Tiempo/Hrs	No semillas	T0/Testigo	T1-0.01 g/L/HgCl ₂	T2-0.1 g/L/HgCl ₂	T3-1 g/L/HgCl ₂	T4-10 g/L/HgCl ₂
72	20	20/100%	19/95%	19/95%	2/10%	0/0%
144	20	20/100%	20/100%	19/95%	3/15%	0/0%
216	20	20/100%	20/100%	20/100%	4/20%	0/0%
288	20	20/100%	20/100%	20/100%	4/20%	0/0%
Grupo II Semillas flor de junio						
Tiempo/Hrs	No semillas	T0/Testigo	T1-0.01 g/L/HgCl ₂	T2-0.1 g/L/HgCl ₂	T3-1 g/L/HgCl ₂	T4-10 g/L/HgCl ₂
72	20	19/95%	18/90%	17/85%	2/10%	0/0%
144	20	20/100%	19/95%	18/90%	2/10%	0/0%
216	20	20/100%	20/100%	19/95%	2/10%	0/0%
288	20	20/100%	20/100%	19/95%	2/10%	0/0%
Grupo III Semillas negro zacatecas						
Tiempo/Hrs	No semillas	T0/Testigo	T1-0.01 g/L/HgCl ₂	T2-0.1 g/L/HgCl ₂	T3-1 g/L/HgCl ₂	T4-10 g/L/HgCl ₂
72	20	20/100%	20	20/100%	3/15%	0/0%
144	20	20/100%	20	20/100%	3/15%	0/0%
216	20	20/100%	20	20/100%	6/30%	0/0%
288	20	20/100%	20	20/100%	13/65%	0/0%

En lo referente al desarrollo de plántulas y elongación de la raíz, los grupos testigo y experimentales se evaluaron de manera comparativa, los resultados se muestran en las siguientes imágenes representativas del estudio. En la figura 1 se observan las etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. de los grupos testigo, donde se puede observar una germinación y desarrollo radicular óptimas en cada una de las variedades en un periodo de 288 horas, tiempo durante el cual se llevó a cabo el estudio.



Fig. 1 Desarrollo de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. / Testigo: flor de junio (grupo I), flor de mayo (grupo II) y negro zacatecas (grupo III): A-0 horas, B-72 horas, C-144 horas, D-216 horas y E-288 horas.



Los efectos del T-2 (0.1gr/L/HgCl_2) revelaron una notable reducción en la elongación radicular desde las 72 a las 216 horas, reactivándose a las 288 horas en los tres grupos (datos no mostrados). Estas observaciones también fueron reportadas por Patra y colaboradores (2004) quienes mencionan que el HgCl_2 reduce la elongación de raíces primarias en plántulas de *Zea mays* y genera un lento crecimiento de las plántulas coincidiendo esto con los resultados obtenidos.

La figura 2 ilustra el desarrollo de plántulas sometidas a T-3 (1g/L/HgCl_2) en las cuales hubo cambios significativos en los tres grupos inhibiéndose desde un 90% la germinación en el grupo II, 80% en el grupo I y un 45% en el grupo III, este último continuó mostrando mayor tolerancia al Hg en comparación con los grupos I y II. Sin embargo el 55% de las semillas del grupo III que lograron germinar, no alcanzaron su desarrollo y murieron poco después. La inhibición y retraso de la germinación también fue observada por Varshney (1990) quien plantea que altas concentraciones de Hg reducen en gran medida la germinación y desarrollo radicular de *Phaseolus vulgaris* L por activación proteolítica.



Fig.2. Desarrollo de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. Tratamiento $3/1\text{g/L/HgCl}_2$: flor de junio (grupo I), flor de mayo (grupo II) y negro zacatecas (grupo III): A-0 horas, B-72 horas, C-144 horas, D-216 y E-288 horas

Por último con el T-4 (10g/L/HgCl_2) se observó una completa inhibición de la germinación e incluso provocó la muerte del 100% de las semillas en las tres variedades. El Hg ha sido catalogado por Munzuroglu y Geckil (2002) como uno de los metales más tóxicos y con una mayor capacidad de inhibir la germinación en comparación con otros metales como el Cd, Co, Cu y Pb.

En relación a los valores obtenidos en la concentración de proteínas de muestras testigo y experimentales, los resultados nos permiten observar cambios sustanciales. La concentración proteica disminuyó conforme aumentó la dosis de HgCl_2 , datos reportados en la tabla 2 que coinciden con resultados publicados por otros investigadores (Prasad y Strzalka, 2002; Hamid, *et al.*, 2010). Al iniciar la germinación, en las semillas se presenta el fenómeno de hidratación que conlleva a la movilización de una gran cantidad de proteínas almacenadas, en las primeras horas y síntesis de novo en las horas subsiguientes. La técnica por espectrometría nos permite visualizar los niveles de proteínas que están siendo codificadas en los muestras testigo (sin HgCl_2) y como están siendo moduladas en respuesta al metal en los grupos experimentales, con los diferentes tratamientos. Como se observa las semillas inician el proceso germinativo con una alta concentración proteica y conforme aumentan los niveles de Hg la síntesis de proteínas va en detrimento. Estas observaciones concuerdan con Costa y Spitz (1997), quienes detectaron una



disminución de proteínas solubles por exposición a MP y Palma (2002), declara que la disminución de proteínas es resultado de incremento de actividades proteolíticas celulares en respuesta al Hg. Una observación interesante es que el grupo III presentó una mayor concentración proteica en los diferentes tratamientos comparado con los grupos I y II.

Tabla 2 Concentración de proteínas $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tejido radicular en *Phaseolus vulgaris* L. Grupos testigo y expuestos a cuatro tratamientos de HgCl_2

Grupo I Semillas Frijol flor de mayo					
Tiempo/Hrs	Testigo	T-1	T-2	T-3	T-4
0	1.104	1.099	1.076	1.212	1.112
72	1.089	0.969	0.596	0.294	0.129
144	0.939	0.756	0.382	0.157	0.072
216	0.587	0.587	0.218	0.121	0.047
288	0.792	0.821	0.585	0.091	0.06
Grupo II Semillas Frijol flor de junio					
Tiempo/Hrs	Testigo	T-1	T-2	T-3	T-4
0	1.113	1.014	1.107	1.099	1.101
72	1.023	0.777	0.489	0.141	0.12
144	0.899	0.614	0.323	0.102	0.012
216	0.456	0.473	0.241	0.082	0.01
288	0.699	0.704	0.561	0.031	0.002
Grupo II Semillas Frijol negro zacatecas					
Tiempo/Hrs	Testigo	T-1	T-2	T-3	T-4
0	1.231	1.114	1.127	1.199	1.201
72	1.103	0.907	0.689	0.399	0.152
144	0.999	0.744	0.623	0.238	0.099
216	0.606	0.563	0.471	0.432	0.058
288	0.999	0.904	0.854	0.521	0.046

4. CONCLUSIONES

En base a estos resultados podemos concluir que el Hg es uno de los contaminantes más tóxicos y que puede difundirse con mucha facilidad a través de los diferentes ecosistemas, produciendo así efectos perjudiciales en procesos biológicos fundamentales.

Las plantas presentan ciertos mecanismos de acumulación y tolerancia a los metales pesados, esta capacidad puede ser útil en fitorremediación, sin embargo esto conlleva a un grave problema de salud pública, porque son la puerta de entrada a la cadena alimenticia.

Este modelo permitió valorar el efecto del HgCl_2 a través de tres parámetros: germinación, desarrollo radicular y concentración de proteínas, los cuales demostraron una marcada inhibición, aunque de manera diferencial, los grupos I y II resultaron más sensibles a la exposición del metal que el grupo III.

Se manifiesta que la variedad negro zacatecas de *Phaseolus vulgaris* L., expresó desde un principio ser más tolerante a los efectos de HgCl_2 , en cada uno de los parámetros evaluados, estos resultados constituyen el primer paso para estudiar la posible capacidad de fitorremediación y/o acumulación de metales en esta variedad de frijol endémica del estado de Zacatecas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Azevedo R., y Rodríguez E. "Phytotoxicity of Mercury in Plants": A Review. Journal of Botany. 2012: pp. 1-6.
2. Cabral A.F.J. "U1 snRNP en embriones de Frijol en dormancia". Disertación Doctoral, 2003, Universidad Autónoma de Zacatecas



3. Costa, G., and Spitz E. "Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, proteins content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*". Plant Sci. 1997, pp. 131-140
4. Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H., Górecki, H. "Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants". The Science of the Total Environment. 2005, pp. 175-182.
5. Gutiérrez R. M.E. y Moreno T. M. 1995. Los residuos en la minería mexicana. En: Garfias y Ayala, F.J. y Barojas W. L. (Eds.). Residuos Peligrosos en México. SEMARNAP - INE. 1ª Edición México. p. 126
6. Hamid, N., Bukhari, N., and Jawaid F. "Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations". Pak. J. Bot. 42 (1) 2010, pp. :239-246.
7. Hernández P.J.L. "Respuestas biológicas de plantas superiores a la exposición de altas concentraciones de metales pesados. Disertación Doctoral".2001, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
8. Huerta G. J. "Influencia de $HgCl_2$ en la Proteína Fibrilarina y su Expresión Genética en etapas tempranas de Germinación de *Phaseolus vulgaris* L." Disertación Doctoral, 2011, Universidad Autónoma de Zacatecas
9. López S.D.L. "Evaluación de minerales y metales pesados en cultivos agrícolas y selección de especies con potencial de fitorremediación". Disertación Licenciatura, 2002, Universidad de Las Américas, Puebla, México.
10. Palma, J.M., Sandalio, C.F., Romero-Puertas M.C. "Plant Proteases protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes". Plant Physiol Bioche. 2002, pp. 521-530.
11. Prasad, M.N.V. and Strzalka K. "Physiology and Biochemistry of heavy metal toxicity and tolerance in plants". 2002. Dordrech Kluwer Academic Publishers. Chapter 4, pp. 147-149