

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DE UN BIOENSAYO CON
Cucumis sativus PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
FITOTOXICIDAD DE METALES EN SUELOS Y
AGUAS

Alumno: *Hipólito Fernández, Pablo*

Fecha: Junio 2015

Directores

Dr. José María Becerril Soto

Dra. María Teresa Gómez Sagasti

Curso Académico

2014/2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL	4
3.2. DETERMINACIÓN DE METALES EN PLANTA.....	5
3.3. DETERMINACIÓN DE LA ELONGACIÓN RADICULAR	6
3.4. DETERMINACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS ..	6
3.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>ASN1</i>	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1. CONTENIDO DE METALES EN LAS PLÁNTULAS.....	9
4.2. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD EN PLANTAS.....	11
4.3 ALTERACIÓN DE LA ELONGACIÓN RADICULAR	12
4.4. CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS	14
4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>ASN1</i>	17
4.6. ANÁLISIS DEL LOS BIOMARCADORES BIOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS Y GENÉTICO EN SUELOS DE MINERÍA DE Pb y Zn	18
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXO I	1

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio natural viene siendo un problema desde prácticamente la aparición del ser humano. Sin embargo, es a partir de la Revolución Industrial cuando la contaminación del medio ambiente ha aumentado exponencialmente. Como resultado de las diversas actividades antropogénicas, la salud de los recursos suelo y agua se han visto afectados y, en consecuencia, la de los ecosistemas y sociedades que ellos sustentan (Gleyzes y cols., 2002). Los suelos son reservorios de contaminantes peligrosos tales como los metales. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales como el cadmio (Cd), el zinc (Zn) o el plomo (Pb) no se pueden biodegradar, por lo que se caracterizan por una alta persistencia en el medio. Los metales en los suelos pueden causar importantes efectos tóxicos en los organismos residentes. En las plantas, la presencia de metales a altas concentraciones puede provocar la formación de radicales libres generando estrés oxidativo (Mudipalli, 2008) y reemplazar aquellos metales esenciales de pigmentos o de enzimas afectando a su actividad óptima (Malayeri y cols., 2008).

Para determinar el efecto tóxico de los contaminantes es necesario encontrar un método rápido y eficaz que permita evaluar su impacto en el suelo, agua y organismos. En este sentido, se han desarrollado distintos métodos basados en indicadores fisicoquímicos y biológicos. Los indicadores biológicos o bioindicadores (*i.e.*, organismos vivos, poblaciones o comunidades que indican las condiciones del medio en el que viven) aportan una visión integradora y de mayor sensibilidad y rapidez de respuesta frente a las perturbaciones/variables introducidas en el ecosistema suelo (Alkorta y cols., 2003). Los ensayos biológicos o bioensayos son ensayos de laboratorio que sirven para cuantificar la ecotoxicidad de un contaminante a través del uso de determinados organismos modelo como herramientas analíticas (Gómez-Sagasti, 2014). Tradicionalmente, los bioindicadores se encuentran en los principales taxones de los ecosistemas (microorganismos, plantas y animales). Los bioensayos, además de ser

métodos rápidos, han demostrado ser sensibles a los contaminantes tanto en suelos (Rodríguez-Ruiz y cols., 2014) como en aguas (Liu y cols., 2014). Además, a través de los bioensayos se pueden obtener biomarcadores de toxicidad (*i.e.*, cambios medibles ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición de un tóxico) relevantes para la evaluación ecotoxicológica y a través de los cuales determinar el IC₅₀ (*i.e.*, Concentración Inhibitoria máxima media), es decir, la cantidad de una sustancia, el metal, necesaria para inhibir un proceso biológico concreto a la mitad.

En los bioensayos ecotoxicológicos con plantas se suelen utilizar especies modelo, tales como lechuga (*Lactuca sativa*), por su sensibilidad, sencillez y rápido crecimiento. En plantas, los bioensayos están basados en medidas biométricas, normalmente de la raíz de las plántulas, determinando el grado de toxicidad de un medio mediante la relación entre la elongación de la raíz y la presencia y cantidad de contaminante (Alaoui-Sossé y cols., 2004).

Dentro de los biomarcadores sensibles a los contaminantes se encuentran aquellos relacionados con el estrés oxidativo ya que, generalmente, los contaminantes al afectar el funcionamiento de los procesos biológicos y celulares, generan una respuesta antioxidante. La respuesta antioxidante puede ser enzimática (enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa) o mediante metabolitos antioxidantes. Éstos últimos pueden ser lipofílicos (*e.g.*, α -tocoferol) o hidrofílicos (*e.g.*, ácido ascórbico y glutatión).

Gracias a la aparición y el desarrollo de las técnicas moleculares como los microarrays y la qPCR, en la actualidad es posible implementar nuevos biomarcadores génicos en los bioensayos. La parte de la genómica encargada del estudio de estos marcadores se conoce como ecotoxigenómica, la cual se basa en el estudio de la expresión diferencial de los marcadores en distintas condiciones (Hutchins y cols., 2010). Por tanto, consideraremos un biomarcador a aquel gen que, a concentraciones subletales de una sustancia tóxica, se expresa de una manera diferente a la

normal y que permite obtener información sobre el modo de acción de dicha sustancia.

Un aspecto poco estudiado en los bioensayos es la complementariedad y/o correlación de los biomarcadores morfológicos, bioquímicos y genéticos para así poder entender y cuantificar no sólo el efecto toxicológico sino también el modo de acción del contaminante y la respuesta fisiológica de la planta.

En los bioensayos ecotoxicológicos se busca la eficacia, la sencillez y la rapidez. Por consiguiente, es necesario optimizar el proceso con la idea de conseguir un bioensayo útil. A este respecto, la elección de la especie modelo es esencial. El pepino (*Cucumis sativus*) se presenta como una especie muy útil para los bioensayos por la rapidez de crecimiento, facilidad de manipulación y mayor tamaño y biomasa, siendo esta última una característica indispensable para poder realizar análisis bioquímicos y/o moleculares en un solo bioensayo. Por este motivo, en este trabajo se propone un bioensayo ecotoxicológico con plántulas de *C. sativus*.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un nuevo bioensayo basado en biomarcadores morfológicos, metabólicos y genéticos para evaluar la toxicidad de metales en agua y suelo de una forma sencilla y eficaz.

Para alcanzar este objetivo, éste se ha desglosado en cinco objetivos parciales:

- 1) Estandarización de las condiciones de cultivo y manipulación para aumentar la fiabilidad de la respuesta ecotoxicológica.
- 2) Optimización de la determinación de parámetros morfológicos.
- 3) Implementación de parámetros antioxidantes al bioensayo.
- 4) Implementación de nuevos biomarcadores génicos que responden a la toxicidad de metales en el bioensayo de ecotoxicidad.
- 5) Correlación de los parámetros fisiológicos de ecotoxicidad con la fracción biodisponible de los contaminantes del suelo.

Así pues la hipótesis de trabajo es aumentar la fiabilidad y mejorar la medición del impacto de metales con biomarcadores complementarios como son los biométricos, bioquímicos y genéticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Uno de los aspectos más importantes para aumentar la fiabilidad de las respuestas biológicas es la estandarización de las condiciones del bioensayo (Objetivo 1). Para ello, se utilizaron semillas de *Cucumis sativus* Marketmore 70 de la marca Battle conservadas a 4 °C y en oscuridad. Se pre-germinaron 30 semillas de *C. sativus* en placas de Petri sobre papel de filtro húmedo (6 mL agua desionizada) en condiciones controladas (25/18 °C día/noche, un fotoperiodo de 14/10 horas día/noche con densidad de flujo de fotones de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Tabla I.1. del Anexo I). Al cabo de 72 h de pre-germinación, se seleccionaron 10 semillas con una radícula emergida de aproximadamente 10 mm y se colocaron en línea en el tercio superior de la placa de Petri sobre papel de filtro negro con 6 mL de agua desionizada y/o la respectiva solución de metal (ppm) (Cd: 25, 50, 75, 100, 150, 200; Zn: 50, 100, 150, y 200; y Pb: 250, 500, y 1000). Consecuentemente, se utilizó un control (sin metal) para cada metal. El control al igual que los tratamientos de menor concentración, se suplementó con KNO_3 para compensar el contenido adicional en nitratos del tratamiento con mayor concentración. La solución de los controles y de los tratamientos se ajustó a pH 5,8-6,0 con KOH (2 M). Las placas se colocaron con una inclinación de 45° para favorecer el crecimiento vertical de la radícula e incubadas durante 48 h en una cámara de germinación bajo las condiciones ambientales indicadas anteriormente. Se realizaron 5 réplicas biológicas por cada tratamiento (n=5).

Una vez transcurridas 48 h de exposición, las plántulas fueron recogidas y separadas en cotiledones, hipocótilos y radícula para las determinaciones de

biomasa, metales (n=3), contenido en antioxidantes y pigmentos (n=3) y expresión génica (n=3).

Para los bioensayos con suelo, se utilizó suelo procedente de una mina abandonada en la provincia de Vizcaya (País Vasco, España) (43°13' N; 3°26' O). Se pesaron 10 g de suelo seco en cada placa Petri, se colocó papel de filtro negro como se ha descrito anteriormente, y se añadieron 14 mL de agua desionizada. Las placas con el suelo humedecido se dejaron 72 h en la cámara de germinación para su envejecimiento antes de colocar las semillas pre-germinadas. Al cabo de 72 h, las semillas pre-germinadas se colocaron en las placas en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente para las disoluciones con metales.

3.2. DETERMINACIÓN DE METALES EN PLANTA

Para determinar el contenido de metales en las plántulas, éstas primero se des-adsorbieron incubando 10 plántulas con 50 mL de CaCl_2 0.01 M durante 30 minutos a una velocidad moderada (~180-200 rpm) en un agitador orbital. A continuación, el material vegetal fue lavado con agua desionizada (x3), secado con papel absorbente y separado en parte aérea, hipocótilo y radícula. Tras obtener el peso fresco (PF), las muestras se secaron durante 48 h a 80 °C, obteniendo así el peso seco (PS) de cada una de ellas (n=3, cada réplica con 10 plantas).

Las muestras vegetales (~10 mg PS) se molieron y se sometieron a digestión ácida. Se empleó el método descrito por Zhao y cols. (1994) para la determinación de Cd, Pb y Zn en plantas. Las muestras de suelos se tamizaron a 2 mm, se secaron en estufa y conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis. La concentración de Cd, Pb y Zn biodisponibles en el suelo se determinó siguiendo el método descrito por Houba y cols. (2000) que emplea CaCl_2 como extractante, el cual posee una fuerza iónica similar a la concentración salina media de muchos suelos y es capaz de extraer los cationes absorbidos por éste. La determinación y cuantificación de metales (Cd, Zn, y Pb) en cada muestra digerida se realizó mediante espectrometría de plasma con acoplamiento inductivo a través de un

detector de masas (ICP-MS) (Agilent 7700) en el Servicio de Análisis Químico de la UPV/EHU.

La bioacumulación y la movilización de los metales se determinaron a través de los índices de bioacumulación (IB) y translocación (IT).

$$IB = C_p / C_{so} \quad (1)$$

$$IT = C_p / C_r \quad (2)$$

Donde: C_p : concentración de metal en la parte aérea; C_{so} : concentración de metal en el medio; C_r : concentración de metal en la radícula.

Por una parte, el IB (1) proporciona la relación entre la concentración de metal en la parte aérea de la planta y la concentración de metal en el medio (Gupta y Sinha, 2008). Así pues, cuando el IB es mayor que 1 se considera que el tejido vegetal acumula metal. Por otra parte, el IT (2) aporta la relación entre la concentración del metal en la parte aérea (cotiledones) y la raíz, indicando una movilización del metal hacia la parte aérea cuanto esta es superior a 1 (Yu y cols., 2012).

3.3. DETERMINACIÓN DE LA ELONGACIÓN RADICULAR

Al término del período de exposición (48 h), se fotografiaron las placas y determinó la elongación radicular (ER) de las plantas de *C. sativus* de cada tratamiento con la ayuda del software ImageJ (Abramoff y cols., 2004). Para ello, fue necesario disponer de una escala común a todos los tratamientos. La medida de ER se realizó desde el nudo (*i.e.*, región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. El porcentaje de inhibición (I) fue obtenido de la siguiente operación: $I = (ER_{control} - ER_{muestra}) / ER_{control} * 100$.

3.4. DETERMINACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS

Al final del bioensayo, las diferentes partes de las plántulas de pepino (cotiledones, hipocótilo y radículas) se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Los antioxidantes lipofílicos fueron determinados mediante UPLC siguiendo el método que describen García-Plazaola y Becerril 1999 con las modificaciones de García-Plazaola y

Becerril (2001). La extracción de los metabolitos se realizó mediante homogeneizador eléctrico (Tissue Tearor 985370) a 5.000 rpm en 1 mL de acetona 100%. Los extractos se centrifugaron a 13.200 rpm a 4 °C durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se pasó por un filtro de PTFE de 0.22 µm. El análisis cromatográfico se realizó usando un UPLC Waters Acquity H-Class (Milford, MA, USA) equipado con un detector de fotodiodos PDA-detector y un detector de fluorescencia FLR-detector.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ASNI*

Al final del bioensayo, 5 plántulas de *C. sativus* de cada tratamiento y réplica biológica fueron lavadas con agua desionizada, secadas mediante papel absorbente y rápidamente separadas en cotiledones, hipocótilos y radículas. Una vez pesadas (PF), las partes vegetales fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido (n=3, cada réplica con 5 plántulas). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su procesado.

Para la extracción del RNA se utilizó el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Antes de empezar, la zona de extracción se limpió con agua desionizada, etanol al 96% y ZAP RNase Free® y todo el material fue autoclavado (121 °C, 20 min) previo uso. Para la evaluación de la calidad del RNA extraído, se tuvieron en cuenta la relación de la absorción a longitud de onda de 260 nm y 280 nm. Las muestras se trataron con DNase I de Invitrogen para eliminar el DNA genómico. Se añadió 1 µL DNase I (2 U) a cada muestra de RNA a ~0,2 µg/µL e incubó a 37 °C/30 minutos. Las muestras de RNA se guardaron a -20 °C.

Se diseñaron los cebadores específicos para el gen *ASNI* (asparragina sintetasa 1) de *C. sativus* escogido por su potencial como biomarcador temprano de exposición a metales en *Arabidopsis thaliana* presentado en la Tesis Doctoral de Gómez-Sagasti (2014). En primer lugar, la secuencia del gen *ASNI* de *A. thaliana* se obtuvo de la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). A continuación, la secuencia se comparó con el genoma completo de *C. sativus* disponible en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se utilizó la

herramienta bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con el fin de obtener los posibles alineamientos entre especies. Una vez elegidas las secuencias de *C. sativus* con mayor homología (>85%) se realizó un segundo alineamiento mediante el software ClustalW (Thompson y cols., 2002) para determinar las partes de las secuencias homólogas más adecuadas para el diseño de cebadores. Los cebadores para el gen *ASN1* se diseñaron mediante el software Primer3 Plus (Rozen y Skaletsky, 2000). Los criterios establecidos en el diseño de cebadores del *ASN1* (F: 5'-CCCACAGAACTCAGCTCGTC -3'/R: 5'- CAGCGTCCCATTTCGACAGC -3') fueron los siguientes: (i) tener una longitud entre 18-22 pb; (ii) producir un producto de amplificación entre 80 y 150 pb; y, (iii) tener una temperatura de hibridación similar entre los dos cebadores (F: forward, y R: reverse) de aproximadamente 60 °C (iv) situarse en la región 3'-UTR. Los cebadores para el gen de referencia *Ef1* que codifica el factor de elongación-1 α (F: 5'-ACTTTATCAAGAACATGATTAC-3'/R:3'-TTCCTTCACAATTCATCG-5') se obtuvieron del estudio de Migocka y Papierniak (2011).

Una vez extraído el RNA y diseñado los cebadores, se procedió a realizar la Retro-Transcripción (RT) para obtener el DNA complementario o cDNA con el kit PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los productos de la RT se guardaron a -20 °C. Para la PCR en tiempo real (qPCR) se siguieron las instrucciones del kit SYBR Premix ExTaq Perfect Real Time (Takara) y se utilizó el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems). Los parámetros fijados para cada experimento de qPCR fueron el volumen de reacción (25 μ L), la temperatura de anillamiento de los cebadores (60 °C) y el número de ciclos (45 ciclos). Los reactivos para la amplificación y las condiciones de los ciclos de la qPCR se muestran en la Tabla I.1. del Anexo I.

La visualización y corrección de errores técnicos así como la idoneidad de las curvas de disociación de los cebadores, se realizó a través del programa StepOne Plus v2.3 (Applied Biosystems). Posteriormente, para la cuantificación relativa de la expresión se establecieron las muestras Control

(0 ppm de metal) a las 48 h de exposición como “muestras calibradoras” y el gen *EF1* como “gen de referencia” (previa evaluación de su aptitud como tal). Los valores obtenidos en forma de “órdenes de cambio (OC)” se obtuvieron a través de la siguiente ecuación (3) (Livak y Schmittgen, 2001).

$$\text{Órdenes de cambio (OC): } 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Donde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$; $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{ASN1 \text{ en muestra}} - Ct_{EF1 \text{ en muestra}}$; $\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{ASN1 \text{ muestra control}} - Ct_{EF1 \text{ en muestra control}}$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONTENIDO DE METALES EN LAS PLÁNTULAS

Tras la exposición de las plántulas de *C. sativus* a diferentes concentraciones de Pb, Cd y Zn durante 48 h, se determinó el contenido total de estos metales en planta (Tabla 1). La cantidad de metal acumulado en las plántulas aumentó proporcionalmente con el incremento de la concentración de cada metal, siendo la radícula el órgano con mayor acumulación seguido del hipocótilo. La mayor acumulación de metales en la radícula es una respuesta habitual (Barrutia y cols., 2011) ya que este órgano es una barrera para la translocación de metales a los tejidos aéreos especialmente para los metales con baja biodisponibilidad como el Pb y con gran capacidad para ser retenidos extracelularmente mediante reacciones de intercambio catiónico en el apoplasto y componentes del tejido vascular (Hernández-Allica y cols., 20078). De hecho, en nuestro estudio observamos que el Pb (Tabla 1-A) tuvo los valores más bajos de IT de los tres metales ensayados, acumulándose en la radícula la mayor parte del metal tomado por la plántula.

Por otra parte, los metales con mayor movilidad, como el Cd (Tabla 1-B) y el Zn (Tabla 1-C), presentaron mayores valores de translocación (IT), bioacumulación (IB) y concentración en los tejidos aéreos de las plántulas. La mayor movilidad correspondió al Zn siendo el metal más acumulado, alcanzando niveles de entre 4 y 26 veces superiores a los del Cd para la misma concentración de metal en el medio. De hecho, los valores obtenidos por esta especie son elevados para el bajo tiempo de exposición. La alta

disponibilidad del Zn en el medio y el hecho de que sea un micronutriente esencial para las plantas, hace que éstas dispongan de transportadores vía simplástica y mecanismos para facilitar su absorción y translocación específica, lo cual explicaría la respuesta observada (Tandy y cols., 2006).

Tabla 1. Valores de los índices de bioacumulación (IB) y de translocación (IT) en los distintos órganos de las plántulas de *Cucumis sativus* bajo los tratamientos de (A) Pb, (B) Cd y (C) Zn. COT: cotiledones; HIPO: hipocótilo; R: radícula.

A	[Pb]medio	Órgano	[Pb]órgano	IB	IT
250		COT	11,6 (± 3,0)	0,1 (± 0,01)	0,01 (± 0,001)
		HIPO	39,8 (± 4,7)	0,2 (± 0,02)	
		R	1407,2 (± 146,2)	5,6 (± 0,6)	
500		COT	77,6 (± 28,9)	0,16 (± 0,1)	0,02 (± 0,006)
		HIPO	177,2 (± 88,5)	0,35 (± 0,2)	
		R	4488,6 (± 408,4)	8,98 (± 0,8)	
1000		COT	127,8 (± 19,8)	0,13 (± 0,02)	0,01 (± 0,002)
		HIPO	327,1 (± 64,6)	0,33 (± 0,1)	
		R	12103,3 (± 306,0)	12,10 (± 0,3)	

*El contenido de Pb en los cotiledones, hipocótilo y radícula de las plántulas control (0 ppm) fue de 0,28 (± 0,06), 0,08 (± 0,15) y 3,42 (± 0,34) ppm, respectivamente.

B	[Cd]medio	Órgano	[Cd]órgano	IB	IT
25		COT	1,9 (± 0,3)	0,1 (± 0,01)	0,02 (± 0,003)
		HIPO	23,4 (± 1,9)	0,9 (± 0,1)	
		R	121,8 (± 6,2)	4,9 (± 0,25)	
50		COT	5,6 (± 0,9)	0,1 (± 0,02)	0,02 (± 0,003)
		HIPO	66,6 (± 3,8)	1,3 (± 0,08)	
		R	301,6 (± 27,7)	6,0 (± 0,6)	
75		COT	13,0 (± 1,8)	0,2 (± 0,02)	0,03 (± 0,002)
		HIPO	134,1 (± 33,4)	1,8 (± 0,5)	
		R	493,4 (± 42,2)	6,6 (± 0,6)	
100		COT	14,0 (± 5,8)	0,1 (± 0,1)	0,03 (± 0,012)
		HIPO	149,1 (± 10,2)	1,5 (± 0,1)	
		R	535,2 (± 55,4)	5,4 (± 0,6)	
150		COT	55,1 (± 5,6)	0,4 (± 0,04)	0,06 (± 0,007)
		HIPO	319,9 (± 41,8)	2,1 (± 0,3)	
		R	892,7 (± 179,0)	6,0 (± 1,2)	
200		COT	73,6 (± 12,1)	0,4 (± 0,1)	0,04 (± 0,008)
		HIPO	353,6 (± 26,2)	1,8 (± 0,1)	
		R	1679,2 (± 28,7)	8,4 (± 0,1)	

*El contenido de Cd en los cotiledones, hipocótilo y radícula de las plántulas control (0 ppm) fue de 0,05 (± 0,01), 0,09 (± 0,04) y 0,36 (± 0,15) ppm, respectivamente.

(Continuación)

C	[Zn]medio	Órgano	[Zn]órgano	IB	IT
50		COT	161,5 (\pm 0,2)	3,2 (\pm 0,004)	0,3 (\pm 0,02)
		HIPO	374,3 (\pm 85,4)	7,5 (\pm 1,7)	
		R	601,1 (\pm 47,9)	12,02 (\pm 1,0)	
100		COT	193,0 (\pm 8,3)	1,9 (\pm 0,1)	0,2 (\pm 0,01)
		HIPO	1866,8 (\pm 560,0)	18,7 (\pm 5,6)	
		R	1269,2 (\pm 177,7)	12,7 (\pm 1,5)	
150		COT	201,1 (\pm 9,9)	1,3 (\pm 0,1)	0,1 (\pm 0,02)
		HIPO	781,6 (\pm 656,9)	5,2 (\pm 0,4)	
		R	1676,2 (\pm 120,2)	11,2 (\pm 0,8)	
200		COT	295,2 (\pm 40,3)	1,48 (\pm 0,2)	0,1 (\pm 0,01)
		HIPO	1052,6 (\pm 84,6)	5,26 (\pm 0,4)	
		R	2383,2 (\pm 72,7)	11,92 (\pm 0,4)	

*El contenido de Zn en los cotiledones, hipocótilo y radícula de las plántulas control (0 ppm) fue de 131,50 (\pm 4,66), 107,78 (\pm 15,01) y 83,54 (\pm 7,63) ppm, respectivamente.

4.2. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD EN PLANTAS

La monitorización del impacto de los contaminantes sobre los ecosistemas se ha realizado durante mucho tiempo exclusivamente en base a la concentración de los compuestos químicos y la legislación para la declaración de suelos contaminados se ha basado en los Valores Indicativos de Evaluación (VIE B/C) (IHOBE, 1998). Sin embargo, los datos químicos no son suficientes para evaluar el impacto y toxicidad de los contaminantes ya que factores como la biodisponibilidad del contaminante, interacción con los componentes del suelo y efectos sinérgicos o antagonistas modifican la toxicidad (Juvonen, 2000). Así pues, para una correcta monitorización es necesario contar, además de con la información química, con la información de toxicidad de los organismos más relevantes de los ecosistemas (Meier, 1997). Los bioensayos con plantas han sido normalizados (Normas ISO) y son de uso frecuente por su coste-efectividad, relevancia en los ecosistemas, contacto directo con el suelo, facilidad de realización, etc. (Wang, 1991). Sin embargo, existen grandes discrepancias en los resultados entre estudios debido a la disparidad de metodologías aparentemente similares, especies o variedades de plantas modelo, y a la falta de un protocolo estandarizado que agrupe las metodologías. Por ello, en este estudio primeramente se ha estandarizado un protocolo de manipulación del material vegetal que

aumente la fiabilidad de la respuesta en la exposición de las plantas a los contaminantes (metales) (Objetivo 1).

Gran parte de los bioensayos determinan simultáneamente el efecto sobre la germinación y el crecimiento y no tienen en cuenta la variabilidad de las semillas durante la emergencia radicular dificultando la interpretación del efecto fitotóxico. Además, muchas de las especies modelos (*e.g.*, *Lactuca sativa*) tienen una biomasa baja que impide analizar otros biomarcadores bioquímicos o génicos en los bioensayos tradicionales. Por esta razón, en este estudio seleccionamos la especie *C. sativus* que se caracteriza por un rápido crecimiento de la radícula y tejidos fotosintéticos y produce biomasa suficiente en 5 días para determinar el contenido en antioxidantes y los biomarcadores génicos. Así, seleccionamos semillas emergidas con idéntico desarrollo para su exposición a los metales y determinar la respuesta fisiológica en tan solo 48 h. Para determinar esta respuesta se analizó la elongación radical (biomarcador biométrico), el contenido en tocoferoles (metabolitos antioxidantes) y la expresión del gen *ASN1* que codifica el enzima asparragina sintetasa (biomarcador génico).

4.3 ALTERACIÓN DE LA ELONGACIÓN RADICULAR

Tradicionalmente los bioensayos de fitotoxicidad se han realizado determinando la inhibición del crecimiento por su sencillez, alta sensibilidad y bajo coste (Visioli y cols., 2014). En este ensayo se ha optimizado la determinación de la elongación radicular (ER) mediante el tratamiento informático de las fotografías de las plántulas en crecimiento, lo que permite un seguimiento del crecimiento sin manipulación de las plántulas. Además, la incubación de las plántulas sobre papel de filtro negro inocuo (testado en experimentos previos; datos no mostrados) facilita este análisis al aumentar el contraste (Objetivo 2).

La inhibición de ER de las plántulas de *C. sativus* expuestas 48 h a Cd, Zn y Pb aumentó proporcionalmente al incremento de la concentración del metal en el medio y a su bioacumulación en la radícula (Figura 1 y Figura I.1 del Anexo I). De tal manera que, tras 48 h de exposición se produjo una

inhibición del 50% (I_{50}) con 100 ppm de Cd, 130 ppm de Zn y 420 ppm de Pb. Además, el I_{50} de cada metal supone un punto de inflexión (cambio de pendiente) en la respuesta de la planta frente a cada metal.

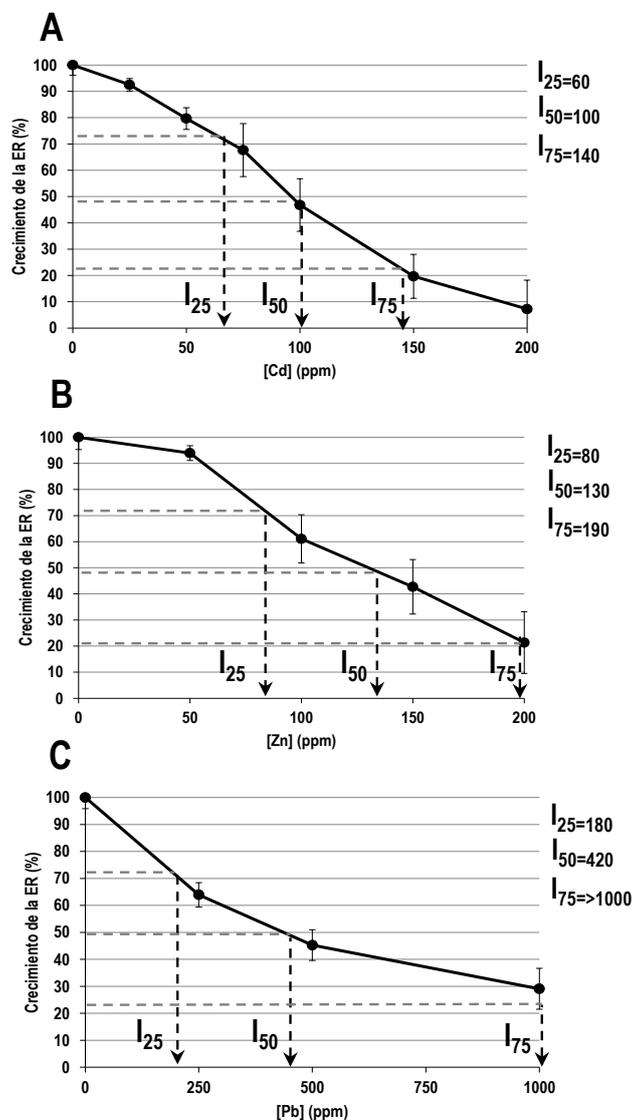


Figura 1. Crecimiento de la radícula a distintas concentraciones de (A) Cd, (B) Zn y (C) Pb tras 48 h de exposición. En la margen derecha se muestran los valores teóricos de I_{25} , I_{50} e I_{75} (ppm).

El Cd fue el metal más tóxico ya que, aunque su nivel de acumulación en la radícula fue 2,5 veces inferior al de Zn y 9 veces inferior al de Pb, la inhibición de la ER fue mayor que la mostrada por estos dos metales. El Pb presentó una menor fitotoxicidad debido a la menor disponibilidad y alta reactividad con los componentes de las paredes celulares y su acumulación en las vacuolas de las células radicales (Lamb y cols., 2010). A diferencia de las pruebas tradicionales de germinación de semillas, la evaluación del

efecto en la ER de las plántulas de *C. sativus* permite ponderar el efecto tóxico de los metales presentes a niveles de concentración bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que, sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de ER. Por lo tanto, la inhibición de la ER constituye uno de los biomarcadores subletales más sensibles para la evaluación de los efectos biológicos de los metales en planta (Rodríguez y Mendoza, 2008).

Cabe mencionar la singularidad en la respuesta de las plántulas de *C. sativus* al Zn ya que a bajas concentraciones (0-50 ppm), no se observó inhibición de la ER (Figura 1). Como ya se ha mencionado anteriormente, el Zn, al ser un elemento esencial para el funcionamiento y desarrollo vegetal, es posible que a bajas concentraciones no propicie ningún daño en las plantas.

4.4. CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS

La presencia de metales en el medio altera los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, incluyendo la inducción de estrés oxidativo mediante el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que oxidan componentes celulares como lípidos, clorofilas o proteínas (Hasanuzzaman y cols., 2014). Las plantas poseen mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo como la utilización de especies antioxidantes. Estudios previos han demostrado la acumulación de tocoferoles (T) en plantas expuestas a metales (Sharma y cols., 2012; Hasanuzzaman y cols., 2014). Esta acumulación se ha relacionado con la tolerancia de las plantas a los metales, entre ellos el Cd y el Zn, debido a su capacidad para eliminar las ERO (Artetxe y cols., 2002). Por tanto, el contenido en tocoferoles podría ser un buen biomarcador bioquímico frente al estrés por metales (Objetivo 3).

Sin embargo, dada la desigual acumulación de los distintos tocoferoles (isómeros α - β - δ - γ -T) entre especies y en los distintos órganos de la planta (Hasanuzzaman y cols., 2014), fue prioritario determinar la distribución de isómeros en plántulas de pepino. El órgano donde hubo mayor cantidad de tocoferoles fue el cotiledón, seguido del hipocótilo y de la radícula (Tabla

2). En los tejidos fotosintéticos se generan ERO de manera habitual durante el funcionamiento normal del aparato fotosintético por lo que tienen mayor nivel de protección antioxidante basal que el resto de órganos (Abbasi y cols., 2007). De hecho, el nivel de T en cotiledones fue 6 veces más elevado que el del hipocótilo y 21 veces más elevado que en la radícula (Tabla 2). Cabe mencionar que la mayor parte del valor “ $\beta+\gamma$ -T” corresponde previsiblemente a γ -T. La distribución de isómeros de T en plantas es desigual. Las plantas acumulan α -T mayoritariamente en hojas y raíz, γ -T en las semillas y β - y δ -T a muy bajos niveles (Abbasi y cols., 2007). Nuestros resultados (Tabla 2), coinciden con los obtenidos por estos autores.

Tabla 2. Contenido en tocoferoles en presencia (I_{50}) o en ausencia (0) de metales de los distintos órganos. (A) Cd; (B) Zn y (C) Pb. R (radícula), HIPO (hipocótilo), COT(cotiledón).

A	Órgano	Tratamiento Cd	$\beta+\gamma$ -T	α -T	T-Total
	COT	0	22101,9	14799,3	33029,2
		I_{50}	20980,3	16090,4	31697,2
	HIPO	0	319,0	5397,1	5988,3
		I_{50}	407,2	5083,0	5554,5
	R	0	88,0	1661,6	1750,7
		I_{50}	100,8	3021,4	3108,4

* I_{50} Cd:100 ppm.

B	Órgano	Tratamiento Zn	$\beta+\gamma$ -T	α -T	T-Total
	COT	0	21304,4	13997,8	36315,7
		I_{50}	21458,1	11649,8	35701,8
	HIPO	0	449,5	4070,6	5439,8
		I_{50}	417,8	3841,4	4327,7
	R	0	52,9	1200,2	1254,3
		I_{50}	94,1	1616,8	1782,9

* I_{50} Zn:100 ppm.

C	Órgano	Tratamiento Pb	$\beta+\gamma$ -T	α -T	T-Total
	COT	0	15623,8	12605,0	28726,8
		I_{50}	13717,4	15439,4	30024,1
	HIPO	0	289,4	4574,5	4924,4
		I_{50}	556,7	4263,2	4903,9
	R	0	55,0	1569,5	1629,4
		I_{50}	72,6	1635,5	1715,3

* I_{50} Pb: 500 ppm.

Tras la exposición a metales observamos una respuesta desigual en función del metal y en función de órgano afectado. Aun así y al igual que en otros estudios (Artetxe y cols., 2002) se desencadena una respuesta antioxidante

frente a la exposición a metales que incrementa los niveles de tocoferoles. El órgano más afectado fue la radícula. Este es un aspecto interesante ya que la radícula fue el órgano con menor contenido en tocoferoles (Tabla 2) y el más interesante para el seguimiento de los parámetros del bioensayo desarrollado.

El Cd provocó un aumento del 81% en el α -T y en menor medida de $\beta+\gamma$ -T (15%) en radícula (Tabla 2-A), sin apenas variación en el contenido de T en el hipocótilo y cotiledón. Este hecho es interesante puesto que el aumento de T se produce en el órgano que mayor contenido de metal acumuló, la radícula (Tabla 1), lo cual nos permite indicar que la acumulación de metales provoca estrés oxidativo en este órgano y como consecuencia se activa el sistema antioxidante, incrementando los niveles de T. La respuesta en presencia de Zn es muy similar a la del Cd, sin embargo, es el $\beta+\gamma$ -T el que más aumentó en la radícula (77%) y en menor medida el α -T (34%) (Tabla 2-B). Este hecho sugiere la existencia de una respuesta de antioxidantes distinta según el metal presente en el medio, lo cual puede ser interesante para futuros estudios. Además, de nuevo coincide el aumento en el contenido de tocoferoles con la mayor presencia de metal en el órgano y con menor nivel de protección antioxidante. Estos resultados indican que la radícula es un órgano adecuado para el seguimiento de biomarcadores de exposición a metales por su mayor sensibilidad al estrés oxidativo generado por la presencia de éstos.

La respuesta al Pb de las plántulas de *C. sativus* fue completamente distinta a las observadas previamente. Observamos que la variación del $\beta+\gamma$ -T en radícula fue mucho menor (32%) mientras que se observó una gran variación de este isómero en el hipocótilo (92%) (Tabla 2-C). A pesar de que el Pb acumulado en la plántula fue elevado, no hubo un efecto notorio a nivel de tocoferoles en la radícula. Así pues, el contenido en T no sería un buen biomarcador en el caso del Pb.

4.5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN *ASNI*

La utilización de marcadores génicos en los bioensayos supone una gran ventaja ya que no sólo permite discernir la exposición de la planta a un determinado contaminante, sino también cuál es el mecanismo de acción regulado en la exposición a dicho contaminante (Liu y cols., 2009). Por ello, la búsqueda de biomarcadores génicos de respuesta a los contaminantes es un área emergente que facilita la detección, cuantificación y diagnóstico precoz de los efectos de la exposición a los mismos (Liu y cols., 2009).

En un estudio anterior de expresión génica realizado con la planta modelo *A. thaliana* expuesta a un tratamiento polimetálico (PM: Zn, Cd, Pb, Co, Ni, Cu, Hg y Mn) y a cada uno de los 8 metales del tratamiento (Gómez-Sagasti, 2014), el gen *ASNI* mostró una gran sobreexpresión tanto en el tratamiento PM como con cada metal individual. Por eso en este estudio el gen *ASNI* fue seleccionado como un biomarcador temprano de exposición a metales y con potencial para poder ser implementado en bioensayos de fitotoxicidad con otras especies modelo como *C. sativus*. El gen *ASNI* codifica un enzima del metabolismo del nitrógeno con gran relevancia biológica en las plantas. La asparragina sintetasa cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina o amonio al aspartato formando asparragina y glutamato. El aminoácido asparragina, además de como aminoácido sirve como almacén y transporte de nitrógeno. En situaciones de estrés abiótico (alta temperatura, salinidad, metales o deficiencia nutricional) la disponibilidad de carbono disminuye, como consecuencia de la menor capacidad fotosintética, y aumenta la proteólisis y la acumulación de amonio en los tejidos (Herrera-Rodríguez y cols., 2007). Se cree que la sobreexpresión del gen *ASNI* y la consecutiva síntesis de asparragina servirían como mecanismo de detoxificación de amonio. No obstante, la significación biológica de esta sobreexpresión en respuesta a la exposición de metales necesita ser investigada. En cualquier caso, este gen se convierte en un potencial biomarcador de estrés por contaminación metálica en plantas.

Al igual que en *A. thaliana*, las plántulas de *C. sativus* expuestas 48 h a las concentraciones de Cd, Zn y Pb que causan un I_{50} de la ER (Figura 1) sobreexpresaron el gen *ASN1*, especialmente las radículas de las plántulas expuestas a Cd (x6,2 órdenes de cambio respecto al control) seguidas de las de Pb (x2,4 órdenes de cambio respecto al control) (Figura 2). Este biomarcador es muy sensible al Cd ya que, de todos los metales, este fue el metal menos acumulado en los tejidos pero el que manifestó un cambio mayor en la expresión de gen *ASN1*.

<i>ASN1</i>	Cd	Zn	Pb
	+1,7	+1,7	+4,8
	+2,8	+1,0	+0,8
	+6,2	+1,4	+2,4

Figura 2. Órdenes de cambio en la expresión del gen *ASN1* de las plántulas de *Cucumis sativus* expuestas a los I_{50} de Cd, Zn y Pb respecto a sus correspondientes controles (0 ppm de metal).

En el tratamiento con Pb el efecto más notorio no se dio en la radícula sino en los cotiledones (x4,8). El Zn fue el metal que menor sobreexpresión produjo en cotiledones y en radícula de las plántulas de *C. sativus* (un incremento de 70% y 40%, respectivamente), hecho que es atribuible a su papel biológico como se ha puesto de manifiesto en apartados anteriores de este trabajo (4.1. y 4.3). Por lo tanto, la expresión del gen *ASN1* es un buen biomarcador de la exposición a metales y puede ser incorporado a bioensayos con plantas para evaluar la toxicidad de los suelos.

4.6. ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES BIOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS Y GENÉTICO EN SUELOS DE MINERÍA DE Pb y Zn

Para verificar la sensibilidad de los biomarcadores implementados en el bioensayo con los metales en disolución, se realizó un bioensayo con cinco suelos reales procedentes de una zona minera con altos contenidos en Zn y Pb (Objetivo 5). Por una parte, la disminución de la ER se relacionó con el aumento de la concentración de Zn y Pb biodisponibles del suelo (Tabla 3).

Por otro lado, se observó un aumento discreto en el contenido de α -T en la radícula con el aumento de la concentración disponible de metal en el suelo. Por último, la expresión del gen *ASN1* se sobreexpresó en radícula a medida que aumentaba el nivel la toxicidad del suelo.

En vista a estos resultados, la ER, el contenido en α -T y el perfil de expresión del gen *ASN1* son buenos biomarcadores de toxicidad de suelos contaminados por metales. Nuestros resultados abren nuevas líneas de investigación para la evaluación de suelos y aguas contaminadas con metales.

Tabla 3. Valores de los biomarcadores biométricos, bioquímicos y génicos medidos en la radícula de las plántulas de *Cucumis sativus* expuestas a los diferentes suelos de minería de Zn/Pb (S1, S2, S3, S4 y S5).

Suelo	Metales biodisponibles (ppm)		Nivel Toxicidad*	Crecimiento de ER (%)	α -T (pmol·gr PF ⁻¹)	γ -T (pmol·gr PF ⁻¹)	ASN1 _R (Órdenes de cambio)
	Zn	Pb					
S1	270,8	166,7	1	83	2.580,1	104,8	+2,4
S2	657,9	86,3	3	57	2.884,3	79,5	+2,6
S3	390,2	79,6	2	40	3.043,9	39,9	+4,1
S4	453,4	207,5	4	30	3.313,5	76,3	+6,1
S5	1009,9	218,6	5	13	2.924,7	46,2	+3,7

*El nivel de toxicidad se ha obtenido ponderando los valores de [Zn] y [Pb] biodisponibles, siendo el "nivel 1" el menos tóxico y el "10" el de mayor toxicidad. R: radícula.

5. CONCLUSIONES

De este trabajo se concluye lo siguiente:

- El bioensayo estandarizado con plántulas de *Cucumis sativus* propuesto en este estudio es una herramienta muy útil para determinar los efectos tóxicos causados por estos a nivel fisiológico, bioquímico y génico.
- La inhibición del crecimiento de la radícula se presenta como un biomarcador sensible y coste-efectivo a la presencia de metales debido a la correlación entre la inhibición y la concentración de metales. En este sentido, la radícula es el órgano en el que más se deberían centrar los estudios ecotoxicológicos.
- En presencia de metales se produce un aumento de las especies antioxidantes (α -, γ -tocoferol) en respuesta al estrés oxidativo generado por la presencia de estos iones. El tipo de respuesta antioxidante es

específica a cada metal, lo cual puede ser interesante para futuros estudios de especificidad metal/biomarcador.

- El gen *ASNI* ha demostrado ser el biomarcador más sensible a la exposición de metales.
- El Cd es el metal más tóxico seguido del Zn y del Pb en base a la inhibición radicular, alto contenido en α -tocoferol y elevada sobreexpresión del gen *ASNI* en la radícula.
- La inhibición de la elongación radicular, el contenido en tocoferoles y la sobreexpresión del gen *ASNI* se correlacionan con el incremento de la acumulación de metales (especialmente en la radícula), lo cual los convierte en parámetros idóneos para la evaluación de la toxicidad de suelos y aguas.
- La implementación de biomarcadores biométricos, metabólicos y génicos permite ampliar el conocimiento sobre el efecto y modo de acción de los metales en planta y ofrece la posibilidad de abordar la problemática de la contaminación de una forma más completa.

*Los resultados de este trabajo se presentaron en formato poster en el VII. Simposio Nacional sobre Control de la Degradación y Restauración de Suelos (CONDEGRES2015) celebrado el 23-26 de junio de 2015 en Bilbao (Figura I.2., Anexo I).

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, A.R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., Voll, L.M. 2007. Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant. Physiol.* 143:1720-38.

Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 11:36-42.

Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M-L., Epron, D., Badot, P.M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science.* 166:1213-1218.

Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amezaga, I., Garbisu, C. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Rev. Environ. Health.* 18:65-73.

Artetxe, U., García-Plazaola, J.I., Hernández, A., Becerril, J.M. 2002. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol. Biochem.* 40:859-863.

Barrutia, O., Artetxe, U., Hernández, A., Olano, J.M., García-Plazaola, J.I., Garbisu, C., Becerril, J.M. 2011. Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of northern Spain: implications for phytoremediation and germplasm preservation. *Int. J. Phytoremediation.* 13:256-70.

García-Plazaola, J.I. y Becerril, J.M. 1999. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.* 10:307-313.

García-Plazaola, J.I. y Becerril, J.M. 2001. Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees.* 14:339-343.

Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M. 2002. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures. *Trac. Trend. Anal. Chem.* 21:451-467.

Gómez-Sagasti M. 2014. Identificación y selección de biomarcadores de exposición temprana a metales en *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* mediante técnicas de expresión génica. Tesis Doctoral. Dirigida por José María Becerril y Carlos Garbisu. Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea, Facultad de Ciencia y Tecnología.

Gupta, A.K. y Sinha, S. 2008. Decontamination and/or revegetation of fly ash dykes through naturally growing plants. *J. Hazard Mater.* 153:1078-1087.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. 2014. Role of tocopherol (Vitamin E) in plants: abiotic stress tolerance. P. Ahmad (Ed): *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance and Beyond*, Volume 2, Chapter 12.

Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Garbisu, C. 2008. Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environ. Pollut.* 152:32-40.

Herrera-Rodríguez, M.B., Perez-Vicente, R., Maldonado, J.M. 2007. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower *Helianthus annuus* under various environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 45:33-38.

Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., van Vark, W. 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31:1299-1396.

Hutchins, C.M., Simon, D.F., Zerges, W., Wilkinson, K.J. 2010. Transcriptomic signatures in *Chlamydomonas reinhardtii* as Cd biomarkers in metal mixtures. *Aquat. Toxicol.* 100:120-127.

- IHOBE. 1998. Investigación de la contaminación del suelo. Calidad del Suelo. Valores indicativos de evaluación (VIE-A, VIE-B, VIE-C). IHOBE, S.A., Bilbao, España.
- Juvonen, R., Martikainen, E., Schultz, E., Joutti, A., Ahtiainen, J., Lehtokari, M. 2000. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47:156-166.
- Lamb, D.T., Ming, H., Megharaj, M., Naidu, R. 2010. Relative tolerance of a range of Australian native plant species and lettuce to copper, zinc, cadmium, and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59:424-32.
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H., Qu, L.J. 2009. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ. Exp. Bot.* 67:377-386.
- Liu, Y., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M. 2014. Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu-Ni, Cu-Zn and Cu-Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere.* 112:282-288.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 25:402-408.
- Malayeri, B.E., Chehregani, A., Yousefi, N., Lorestani, B. 2008. Identification of the hyper accumulator plants in copper and iron mine in Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:490-492.
- Meier, J.R., Chang, L.W., Jacobs, J., Torsella, J., Meckes, M.C., Smith, M.K. 1997. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated bi-phenyls. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:928-938.
- Migocka, M. y Papierniak, A. 2011. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol. Breed.* 28:343-357.

Mudipalli, A. 2008. Metals (micronutrients or toxicants) and global health. *Indian J. Med, Res.* 128:331-334.

Rodríguez, P. y Mendoza, A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en suelo y agua. La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Fisiología. pp. 428.

Rodríguez-Ruiz, A., Asensio, V., Zaldibar, B., Soto, M., Marigómez, I. 2014. Toxicity assessment through multiple endpoint bioassays in soils posing environmental risk according to regulatory screening values. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:9689-9708.

Rozen, S. y Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (pp. 365-438). En: Krawetz S, Misener S (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology Humana Press*, Totowa, NJ.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 1-26.

Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B. 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere.* 62:1454-63.

Thompson, J.D., Gibson, T., Higgins, D.G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2-3.

Visioli, G., Conti, F.D., Gardi, C., Menta, C. 2014. Germination and root elongation bioassays in six different plant species for testing Ni contamination in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92:490-496.

Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A.A. 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.* 399:257-261.

Wang, W. 1991. Higher plants (common duckweed, lettuce and rice) for effluent toxicity assessment. En: *Plants for Toxicity Assessment: Second*

Volume. J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang, and M. A. Lewis (Eds.). Philadelphia.

Yu, R., Ji, J., Yuan, X., Song, Y., Wang, C. 2012. Accumulation and translocation of heavy metals in the canola (*Brassica napus* L.)-soil system in Yangtze River Delta, China. *Plant Soil*. 353:33-45.

Zhao, F., McGrath, S.P., Crosland, A.R. 1994. Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25:407-418.

ANEXO I

Tabla I.1. Reactivos de amplificación y condiciones de los ciclos de qPCR.

Reactivo	Reacción Volumen (μL)	Programa de amplificación		
		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Nº Ciclos
H2O MilliQ*	7,5	50	20 seg	45
SYBR	12,5	95	10 min	
ROX	0,5	95	15 seg	
Cebador F 10 μm	1,5	60	1 min	
Cebador R 10 μm	1,5	95	30 seg	
cDNA	1	60	15 seg	

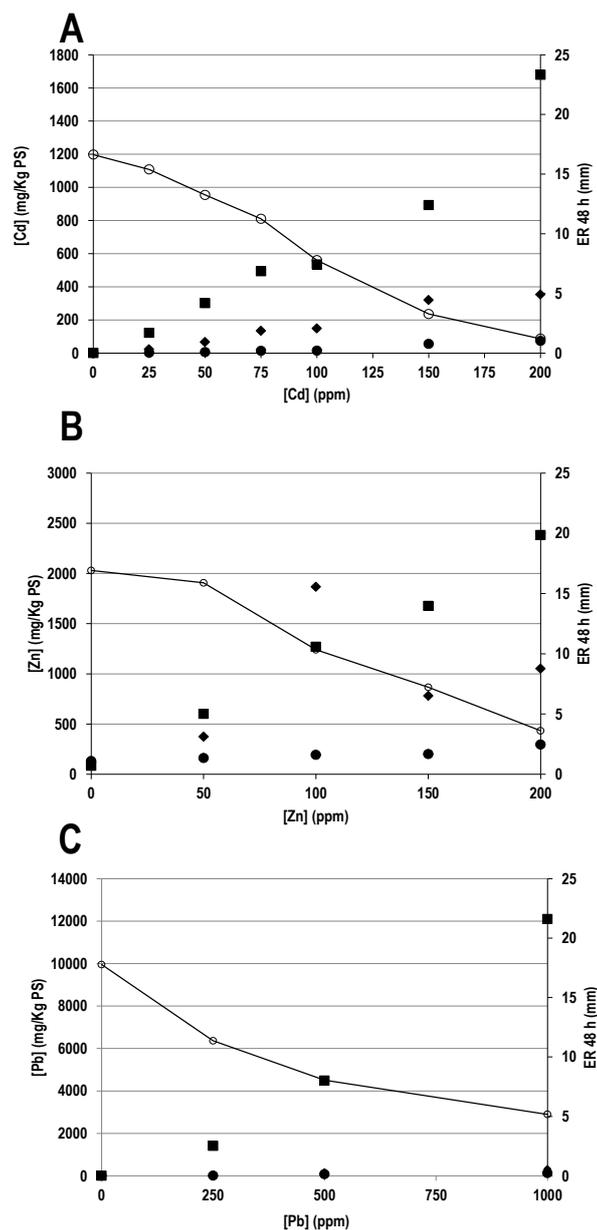
*Volumen final: 25 μL 

Figura I.1. Relación entre el contenido en metales de los órganos de las plántulas y la elongación radicular (ER) a las 48 h de exposición a (A) Cd, (B) Zn y (C) Pb. COT: cotiledón; HIPO: hipocótilo; R: radícula

Estandarización de un bioensayo con *Cucumis sativus* para la determinación de la fitotoxicidad de metales en suelos y aguas

M.T. Gómez-Sagasti, A. Yoldi, P. Hipólito, U. Artetxe y J.M. Becerril
Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco, UPV/EHU, P. O. Box 644, E-48080 Bilbao

Introducción

Los bioensayos con plantas son una herramienta eficaz para la evaluación de la toxicidad de los suelos contaminados. Gran parte de la variabilidad que dificulta su uso generalizado y la interpretación de los resultados radica en la falta de un protocolo estandarizado y que elimine las variables asociadas a las condiciones experimentales, al germoplasma vegetal, a las condiciones de exposición y a los biomarcadores relevantes de toxicidad que existen entre los bioensayos tradicionales con plantas. En este sentido, las nuevas tecnologías permiten determinar nuevos biomarcadores de toxicidad que podrían ser implementados en bioensayos para evaluar la ecotoxicidad de los suelos.

Objetivo

Optimización y desarrollo de un bioensayo con *Cucumis sativus* que permita evaluar de forma sencilla, precoz y fiable la fitotoxicidad de los metales en suelos y aguas en base a su efecto sobre biomarcadores biométricos (elongación radical-ER-), bioquímicos (contenido de tocoferoles-T-) y génicos (expresión del gen *ASN1* de la asparagina sintetasa).

Materiales y Métodos

Pre-germinación
Temperatura: 25/18 °C día/noche
Fotoperiodo: 14/10 horas día/noche (100 μmol m⁻² s⁻¹)
72 h

Disoluciones: Cd (ppm): 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200
Zn (ppm): 0, 250, 1000, 1500, 2000
Pb (ppm): 0, 250, 500, 1000

Suelo: suelos de minería de Zn/Pb (St-Sio)

Recogida del material
48 h

Indicadores de toxicidad:
Químicos (Q) Contenido en metales (Cd, Zn, Pb) → ICP-MS (Galende y cols., 2014)
Biométricos (B) Inhibición de la ER → Análisis de imagen
Bioquímicos (BQ) Contenido en tocoferoles: α-T, γ-T → UPLC (Artetxe y cols., 2001)
Moleculares (M) Expresión del gen *ASN1* → RT-qPCR (Gómez-Sagasti, 2014)

Resultados y Discusión

Q En disolución

Cd [Cd]medio (ppm)	Órgano	[Cd] Órgano (ppm)	IB	IT
25	COT	1.91 (± 0.3)	0.4 (± 0.01)	0.02 (± 0.003)
	HIPO	23.4 (± 1.9)	0.9 (± 0.1)	
	R	121.8 (± 6.2)	4.9 (± 0.3)	
50	COT	5.6 (± 0.9)	0.11 (± 0.02)	0.02 (± 0.003)
	HIPO	66.6 (± 3.8)	1.33 (± 0.1)	
	R	309.6 (± 27.7)	6.03 (± 0.6)	
75	COT	13.8 (± 1.28)	0.17 (± 0.02)	0.03 (± 0.002)
	HIPO	134.1 (± 13.4)	1.79 (± 0.15)	
	R	493.4 (± 42.2)	6.58 (± 0.56)	
100	COT	14.0 (± 0.8)	0.44 (± 0.1)	0.03 (± 0.012)
	HIPO	449.3 (± 10.2)	1.49 (± 0.1)	
	R	535.2 (± 55.4)	5.35 (± 0.6)	
150	COT	55.1 (± 5.6)	0.4 (± 0.04)	0.06 (± 0.007)
	HIPO	319.9 (± 41.8)	2.1 (± 0.3)	
	R	1024.7 (± 79.0)	6.69 (± 0.8)	
200	COT	73.6 (± 12.1)	0.4 (± 0.1)	0.04 (± 0.008)
	HIPO	353.6 (± 26.2)	1.8 (± 0.1)	
	R	1679.2 (± 28.7)	8.4 (± 0.1)	

*La [Cd] en los cotiledones, hipocótilo y radícula de las plantas control (0 ppm) fue de 0.07 (± 0.001), 0.1 (± 0.04) y 0.4 (± 0.2) ppm, respectivamente.

B

BQ

Metal	α-T	β-T	T-total
Cd	C 15,000 I ₅₀ 16,000	C 22,400 I ₅₀ 21,000	C 33,000 I ₅₀ 32,000
Zn	C 5,400 I ₅₀ 3,000	C 300 I ₅₀ 400	C 6,000 I ₅₀ 5,500
Pb	C 1,600 I ₅₀ 3,000	C 80 I ₅₀ 100	C 1,700 I ₅₀ 3,100

M

Metal	α-T _R	β-T _R	T-total
Cd	C 15,000 I ₅₀ 16,000	C 22,400 I ₅₀ 21,000	C 33,000 I ₅₀ 32,000
Zn	C 5,400 I ₅₀ 3,000	C 300 I ₅₀ 400	C 6,000 I ₅₀ 5,500
Pb	C 1,600 I ₅₀ 3,000	C 80 I ₅₀ 100	C 1,700 I ₅₀ 3,100

Conclusiones

El bioensayo con *Cucumis sativus* desarrollado en este estudio es una herramienta útil para determinar la ecotoxicidad de los suelos y aguas contaminados con metales. Los tres biomarcadores ensayados (elongación radical; bioquímicos (contenido en tocoferoles) y génicos (expresión del gen *ASN1*)) responden a la exposición de metal en suelos y aguas contaminados con metales. En disolución, el Cd es el metal más tóxico para las plantas de *C. sativus* tras 48 h de exposición, seguido del Zn y del Pb. Esto es debido probablemente a la gran movilidad del Cd y a que este no sea un elemento esencial. En presencia de Cd se observaron los mayores cambios en los tres biomarcadores. Así, a la concentración I₅₀ de elongación radical, se duplica el contenido en α-T y aumenta 6 veces la expresión del *ASN1*. De los tres biomarcadores ensayados la expresión del gen *ASN1* fue el más sensible a la toxicidad inducida por Cd. Será interesante determinar las implicaciones biológicas de esta sobreexpresión. Además, es necesario complementar estas respuestas con biomarcadores de otros taxones (microorganismos y animales) para aumentar la fiabilidad en la evaluación de la ecotoxicidad de los suelos contaminados.

... y en suelo

Suelo	[Zn] _B (ppm)	[Pb] _B (ppm)	% Crecimiento ER	α-T _R (pmol·gr ⁻¹ ·PF ⁻¹)	γ-T _R (pmol·gr ⁻¹ ·PF ⁻¹)	ASN1 _R (Ordenes cambio)
S1	32.5	11.8	100	1,900	42	+1.1
S2	54.5	3.2	100	2,600	105	+1.7
S3	270.8	166.7	83	2,600	105	+2.4
S4	261.6	31.3	82	2,900	77	+2.0
S5	657.9	86.3	57	2,900	80	+2.6
S6	390.2	79.6	40	3,000	40	+4.1
S7	453.4	207.5	30	3,300	76	+6.1
S8	865.9	92.2	30	2,500	83	+2.3
S9	1095.0	133.0	27	3,200	67	+2.9
S10	1009.9	218.6	13	2,900	46	+3.7

R: [metal] biodisponible en suelo; R: radícula

Agradecimientos

Este trabajo ha sido co-financiado mediante los proyectos MINECO-AGL 2012-2915-CO3-1 y UPV/EHU-GV IT-299-07

Figura I.2. Póster presentado en el VII. Simposio Nacional sobre Control de la Degradación y Restauración de Suelos (CONDEGRES2015).