



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Evaluación del efecto de nanopartículas metálicas de hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y  
plata (Ag) en el crecimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**

TESIS QUE PRESENTA

**Jessica Denisse Valle García**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis:

**Dr. Luc Dendooven**

Comité tutorial:

**Dr. Fabián Fernández Luqueño-Cinvestav Saltillo**  
**Dr. Edgar Vázquez Núñez-Universidad de Guanajuato**  
**Dr. Frédéric Thalasso Siret-Cinvestav Zacatenco**

Ciudad de México, 26 de Agosto de 2020

## **Agradecimientos**

Gracias al CINVESTAV, al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y particularmente al Laboratorio de Ecología de suelos por abrirme sus puertas para poder llevar a cabo este proyecto de tesis.

A los estudiantes de Doctorado del Laboratorio de Ecología de suelos por asesorarme y guiarme cuando necesitaba ese apoyo.

A mi familia que siempre ha estado en los momentos de superación personal y profesional.

A la vida.

## Índice

	Página
Índice de figuras y tablas	I
Resumen	III
Abstract	IV
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	4
2.1.1. Generalidades	4
2.1.2. Descripción	4
2.1.3. Producción de frijol en México	6
2.2. Nanotecnología	7
2.2.1. Descripción y características de nanopartículas y nanomateriales	8
2.2.2. Nanopartículas de hematita ( $\alpha$ - Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )y plata	9
2.3. Interacción de las nanopartículas con el medio ambiente	11
2.3.1. Efecto de las nanopartículas sobre las plantas	12
2.3.2. Efectos de las nanopartículas sobre microorganismos	13
2.4. Las nanopartículas y su uso en la agricultura	14
3. Justificación	16
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. Materiales y métodos	18
5.1. Muestreo y caracterización fisicoquímica del suelo	21
5.1.1. Selección del sitio de muestreo	21
5.1.2. Determinación del pH y la conductividad electrolítica	22
5.1.3. Determinación de la textura	23
5.1.4. Determinación de la humedad y la capacidad de retención de agua	23
5.1.5. Determinación de capacidad de intercambio catiónico	24
5.1.6. Determinación de carbono y nitrógeno total	25
5.2. Adecuación y preparación de material	25
5.2.1. Adquisición de semillas	25
5.2.2. Caracterización de las nanopartículas	25
5.2.3. Montaje y preincubación de las columnas	26
5.2.4. Montaje y muestreo del experimento	27
5.3. Determinación morfológica y de los rendimientos de la planta	27
5.4. Determinación del contenido de metales en la planta vía ICP-MS	27
5.5. Comunidades microbianas de suelo y planta	28
5.5.1. Extracción de DNA de suelo y suelo rizósferico	28
5.5.1.1. Eliminación de proteínas y purificación de DNA	28
5.5.2. Desinfección de tejido vegetal	29
5.5.2.1. Comprobación de la desinfección de tejido vegetal	29
5.5.3. Extracción de DNA de parte aérea y raíces de la planta	30
5.6. Amplificación del gen 16S rRNA específico de bacterias	31
5.6.1. Amplificación del gen 16S rRNA de suelo y planta	31

<b>6. Resultados</b>	32
<b>6.1. Muestreo y caracterización fisicoquímica del suelo y adecuación del         amterial</b>	32
<b>6.1.1. Parámetros fisicoquímicos del suelo</b>	32
<b>6.1.2. Caracterización de las nanopartículas</b>	32
<b>6.2. Determinaciones morfológicas y rendimiento de (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)</b>	34
<b>6.3. Contenido de metales en la planta</b>	35
<b>6.4. Aislamiento y obtención de DNA metagenómico</b>	37
<b>6.5. Amplificación del gen 16s rRNA y construcción de librerías de DNA         extraído de muestras de suelo</b>	38
<b>7. Discusión de resultados</b>	40
<b>8. Perspectivas y estudios posteriores</b>	49
<b>9. Conclusión</b>	50
<b>10. Referencias</b>	52
<b>11. Anexos</b>	63

## I. Índice de figuras y tablas

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	División de etapas de trabajo para la realización del experimento ..... <b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Mapa del sitio para el muestreo de suelo agrícola. Los puntos indican las parcelas seleccionadas. 20°03'34.4''N 98°22'50.7''W ..... <b>22</b>
<b>Figura 3</b>	Tratamientos y montaje de columnas con suelo y planta ..... <b>26</b>
<b>Figura 4</b>	Nanopartículas de hematita, a) Agregados de NPs b) NPs $\alpha$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en dispersión diluida que presentan forma <i>quasiesférica</i> ..... <b>33</b>
<b>Figura 5</b>	Nanopartículas de plata, a) Agregados de NPs b) NPs de Ag con una variación de tamaño desde 5-10 nm hasta 100 nm ..... <b>33</b>
<b>Figura 6</b>	Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (80V-20 min) para DNA extraído de suelo y suelo rizosférico al día 100 de la siembra del frijol común. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss <sup>-1</sup> ) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss <sup>-1</sup> ) TSFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss <sup>-1</sup> en suelo sin planta) TSAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss <sup>-1</sup> en suelo sin planta) ..... <b>37</b>
<b>Figura 7</b>	Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (80V-20 min) para DNA extraído de raíz y parte aérea del frijol común en etapa adulta. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss <sup>-1</sup> ) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss <sup>-1</sup> ) ..... <b>38</b>
<b>Figura 8</b>	Construcción de librerías para muestras de suelo y suelo rizosférico. Banda ~ 700 pb. D0 (día cero del experimento/día de montaje) D100 (día 100 después de la siembra) ..... <b>39</b>

**Tabla 1** Cierre de producción agrícola para el cultivo del frijol en los últimos cinco años (SIAP, 2020) ..... **6**

**Tabla 2** Características de la semilla de frijol común empleada ..... **25**

**Tabla 3** Comparación de los resultados obtenidos en las características del frijol común evaluado con y sin NPs TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1) ..... **35**

**Tabla 4** Resultados del cambio en la composición de micronutrientes en raíz. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1) ..... **36**

**Tabla 5** Resultados del cambio en la composición de micronutrientes en la parte aérea. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1) ..... **36**

**Tabla A1** Efectos de nanopartículas de plata y hematita sobre plantas ..... **64**

**Tabla A2** Efectos de nanopartículas de Fe y Ag en poblaciones microbianas a diferentes concentraciones ..... **66**

## II. Resumen

Esta investigación evaluó el efecto de nanopartículas (NPs) de hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20-50 nm) y plata (Ag, 1-10 hasta 100 nm) a la concentración de 0.15 g NP kg ss<sup>-1</sup>, sobre las características morfológicas y rendimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado en un suelo agrícola franco arcilloso bajo condiciones de invernadero. Las NPs de Ag favorecieron el rendimiento del frijol, obteniendo un número de vainas ( $8.1 \pm 2.8$ ) y por consiguiente de semillas ( $23.6 \pm 4.5$ ) mayor que el tratamiento control (plantas crecidas sin NPs) el cual fue 8 veces más bajo para las vainas y 4 veces menor para el número de semillas total. Además, caso contrario a lo reportado en otros estudios donde las plantas se ven favorecidas con las NPs de Fe en nuestro caso no hubo diferencias estadísticamente significativas en la morfología de la planta, pero sí una disminución considerable en la concentración del Fe y Mn en raíz. Además, se encontró un valor de  $5.6 \pm 3.1$   $\mu$ g NPs Ag g<sup>-1</sup> de tejido seco en las raíces de las plantas crecidas en presencia de esta NP, lo que equivale aproximadamente a un 4% del valor total agregado en el suelo.

De esta manera, los resultados obtenidos sugieren llevar a cabo estudios a largo plazo, así como la prueba de diferentes concentraciones de NPs que permitan ampliar el conocimiento ya que, la respuesta de las variables es dependiente del tipo de planta y las condiciones ambientales en las que se encuentra.

### III. Abstract

In this research it was carried out a study to evaluate the effect of nanoparticles (NPs) of hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20-50 nm) and silver (Ag, 1-10 to 100 nm) at the concentration of 0.15 g NP kg<sup>ss-1</sup>, on the morphological characteristics and yield of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in a loamy agricultural soil under greenhouse conditions. Ag NPs favored bean yield, obtaining a number of pods ( $8.1 \pm 2.8$ ) and consequently of seeds ( $23.6 \pm 4.5$ ) higher than the control treatment (plants grown without NPs) which was 8 times lower for the pods and 4 times less for the total number of seeds. Furthermore, contrary to what was reported in other studies where plants are favored with Fe NPs, in our case there were no statistically significant differences in plant morphology, but there was a considerable decrease in the concentration of Fe and Mn in the root. In addition, a value of  $5.6 \pm 3.1$   $\mu$ g NPs Ag g<sup>-1</sup> of dry tissue was found in the roots of plants grown in the presence of this NP, which is equivalent to approximately 4% of the total value added in the soil. In this way, the results obtained suggest carrying out long-term studies, as well as the test of different concentrations of NPs that allow expanding knowledge, since the response of the variables is dependent on the type of plant and the environmental conditions. These results suggest that different types and concentrations of NPs affect the plant with unknown consequences for human and organism.



## **1. Introducción**

La nanociencia se enfoca en el diseño, fabricación y caracterización de componentes nanométricos ( $< 100$  nm) con propiedades nuevas, en comparación con materiales similares pero de dimensiones mayores. Esta ciencia tiene múltiples aplicaciones en la medicina, la electrónica, los cosméticos, la agricultura, entre otras. En esta última, la nanotecnología puede ser un factor clave para el desarrollo sustentable al aumentar la productividad de cultivos, reducir el consumo de agua y enriquecer los servicios medioambientales (Liu y Lal, 2015).

El frijol es uno de los cuatro cultivos principales en la base alimentaria de los mesoamericanos y hoy en día se cultiva en América, Asia y África. Además, el frijol tiene importancia económica, social y ambiental en México (Broughton et al., 2003; Fernández-Luqueño et al., 2008).

Las nanopartículas (NPs) siempre se han encontrado en el medioambiente por causas naturales o fuentes antropogénicas (Kurwadkar et al., 2015). Debido a que las NPs tienen diversas aplicaciones, es fácil que se incorporen en sistemas a los cuales no estaban destinadas, tales como el suelo, el agua o el aire, lo cual podría implicar impactos negativos en los ecosistemas.

Los suelos agrícolas y las plantas son sistemas expuestos a las NPs, por lo que sus interacciones y efectos se han estudiado recientemente. Existen estudios que reportan que las NPs tiene efectos nulos, negativos o positivos sobre suelos y cultivos (Kookana et al., 2014). Por ejemplo, se ha reportado que existe correlación entre el tamaño de las NPs de plata y sus efectos tóxicos a causa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Carlson et al., 2008).

Además, las NPs de Ag modificaron la germinación e inhibición del crecimiento del frijol mungo (*Phaseolus radiatus* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.) a 2 g kg<sup>-1</sup> de suelo seco (Lee et al., 2012). En esa misma investigación se demostró que *Arabidopsis thaliana* L.) es sensible a las NPs de Ag y estas inhiben la elongación de raíz. Efectos similares fueron reportados para lechuga y pepino a 100 mgL<sup>-1</sup> (Cox et al., 2016). Por otro lado, las NPs de óxido de hierro incrementan la biomasa de raíz, brotes y ramas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Rui et al., 2016). Efectos similares fueron encontrados por Medina-Pérez et al. (2018) quienes observaron un aumento significativo en nitrógeno total de raíz, número de brotes, peso seco y número de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

De esta manera, existe una relación entre la concentración, el tamaño y el tipo de NP y las posibles interacciones con diferentes plantas, debido a que estas son sumamente sensibles a factores externos y cambios en el medioambiente. Además, la estructura de las comunidades microbianas y la abundancia de estas puede modificarse cuando los microorganismos están en contacto con NPs (He et al., 2011).

Se ha reportado que muchos nanomateriales (NMs) como los nanotubos de carbono, las NPs de hierro, plata, cobre, zinc, óxido de titanio, entre otras, presentan efectos tóxicos en cultivos de bacterias; por ejemplo, los fullerenos tienen un impacto negativo en la estructura y función de éstas al igual que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y ZnO. Además, se han hecho estudios donde se investigaron los efectos de las NPs de Fe en la estructura de la comunidad microbiana y el tamaño de la población de un suelo agrícola (He et al., 2011; Tong et al., 2007). Los microorganismos son susceptibles a la toxicidad de las NPs a nivel celular, comunitario y ecosistémico (Holden et al., 2014); particularmente las NPs de plata han mostrado efectos negativos en biomasa, diversidad y abundancia de comunidades microbianas (Doolette et al., 2016).

Sin embargo, hay muchos estudios con datos inconsistentes respecto a los efectos que las NPs presentan en las comunidades microbianas del suelo. De acuerdo con Simonin et al. (2015) hasta julio del 2014 el número de publicaciones que han estudiado el impacto de NPs de óxidos metálicos, en su mayoría están relacionadas al efecto de Ag, TiO<sub>2</sub> y óxidos de hierro.

El objetivo de esta investigación es determinar los efectos que tienen las NPs de hematita y plata sobre el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pinto Saltillo, cultivado bajo condiciones de invernadero en un suelo agrícola.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. *Phaseolus vulgaris* L.**

#### **2.1.1. Generalidades**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa y su taxonomía jerárquica es

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

El género *Phaseolus* es basto e incluye 80 cultivos y especies silvestres, pero *P. vulgaris* es la especie que más se cultiva. El fruto de las especies de Fabaceae es la vaina; esta tiene varias formas y tamaños. Cada vaina puede contener de una a varias semillas.

#### **2.1.2. Descripción**

*Phaseolus vulgaris* L. es la leguminosa más consumida a nivel mundial y la más importante en la dieta humana con alto valor comercial. El frijol es una planta anual herbácea que se distribuye a nivel mundial debido a que su fruto es comestible. *Phaseolus vulgaris* L. es uno de los cultivos principales en el mundo y el más importante en producción en Brasil, China, India, México y EUA. *Phaseolus vulgaris* L. es originario de América y presenta un contenido de proteína de 24-26%. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el cierre de producción agrícola en México para el 2019 en la modalidad Riego-Temporal se reportaron 1,207,395.37 ha de superficie cosechada de frijol con un valor de producción de 13,040 millones de pesos de los cuales 333,006.73 ha cosechadas corresponden a la variedad pinto saltillo ubicándolo como la variedad que mayor valor de producción le da al país (Tabla 1) (SIAP, 2020).

En México, el frijol representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas; nutricionalmente es una excelente fuente de éstas, siendo la principal leguminosa de consumo humano en el país (Lara-Flores, 2015). Su contenido proteico es incluso de 2 a 3 veces más que los granos de cereal; además contiene grandes cantidades de almidón, fibra dietética, minerales y vitaminas. Además de su gran aporte nutricional, su consumo está asociado con algunos beneficios en la salud tales como la prevención de enfermedades cardiovasculares, la obesidad, diabetes mellitus y cáncer (Hayat et al., 2014).

Una de las características importantes del frijol común es su capacidad para establecer relaciones simbióticas mutualistas con bacterias. Cuando existen condiciones limitadas de nitrógeno se induce la formación de nódulos, órgano que permite la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio (Nosengo, 2003). A través de los años se ha estudiado la fijación biológica de nitrógeno debido a su importancia agronómica y medioambiental.

La simbiosis fijadora de nitrógeno tiene importancia ecológica y aporta anualmente una cuarta parte del nitrógeno fijado en la biósfera. Estas asociaciones entre leguminosas y *rhizobium* fertilizan el suelo e incorporan de 60 a 120 kg de nitrógeno por hectárea de suelo (Lara-Flores, 2015).

Por otro lado, existen datos sobre el bajo rendimiento en la producción del frijol común que usualmente está asociado con el inadecuado suministro de agua, la presencia de enfermedades y plagas y el cultivo en suelos pobres (Martinez-Romero, 2003). A continuación se aborda el tema de la producción de frijol en México durante el periodo 2015-2019 y se discute la importancia económica de este cultivo.

### 2.1.3. Producción de frijol en México

El frijol es uno de los cultivos que forman la base de la alimentación en México, por lo cual se clasifica como una planta de interés socioeconómico. No solo por el valor nutricional que aporta a la dieta de las personas sino también por las extensas superficies de cosecha y su valor de producción a nivel nacional (Tabla 1).

**Tabla 1. Cierre de producción agrícola para el cultivo del frijol en los últimos cinco años (SIAP, 2020).**

Año	Superficie cosechada (ha)		Producción (toneladas)		Valor de producción (miles de pesos)	
	Todas	Pinto Saltillo	Todas	Pinto Saltillo	Todas	Pinto Saltillo
2015	1,555,131	390,301	969,146	223,526	9,469,052	1,949,187
2016	1,575,988	428,445	1,088,766	284,534	13,271,554	3,247,180
2017	1,625,212	491,267	1,183,868	311,847	16,375,786	4,121,794
2018	1,596,224	422,062	1,196,156	279,611	13,405,089	2,870,468
2019	1,207,395	333,007	879,404	179,509	13,040,180	2,713,970

Producción Agrícola

Ciclo: Ciclicos - Perennes

Modalidad: Riego + Temporal

En México se encuentran 70 variedades de frijol que pueden dividirse en 7 grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. De acuerdo con la información tomada del SIAP la variedad pinto Saltillo es una de las que mayor valor de producción presentan para México. El cultivo del frijol representó un valor de producción equivalente al 25% del valor total de producción a nivel nacional, en 2017, considerando todas las variedades del país (Tabla 1). En el 2019 se observó una producción menor comparada con los años anteriores, esto debido a que su precio está sujeto al libre mercado y las fronteras están abiertas a la importación, por lo tanto, el mercado se satura con el producto que se importó y el cultivo se podría volver poco rentable (Lara-Flores, 2015).

Toda esta relevancia económica que presenta el cultivo del frijol común da pie al estudio y a la participación de diversas áreas de investigación para implementar recursos que permitan

la cosecha mecánica, mejorar la resistencia a plagas y enfermedades, y mejorar la producción para obtener la alta calidad nutricional que se requiere.

## **2.2. Nanotecnología**

El término nanotecnología viene de la combinación de dos palabras: el prefijo número *nano* que se refiere a una billonésima parte y la palabra *tecnología*. La nanociencia estudia los fenómenos, propiedades y respuesta de los materiales atómicos. Entonces, la nanotecnología es el diseño, la manipulación, la construcción y la aplicación, a partir del control de la forma, tamaño y funcionalidad de estructuras y objetos o sistemas del orden de menos de 100 nm (Logothetidis, 2012). Otra manera de definir la nanotecnología es hablar acerca de que esta trata con nanomateriales que tienen al menos una dimensión que varía de 1 a 100 nm (He et al., 2019).

De esta manera, es relevante destacar que, en la nanoescala los materiales poseen diferentes propiedades físicas, químicas, ópticas y electrónicas comparadas con sus contrapartes a escala mayor. Debido a sus extraordinarias y únicas propiedades estos materiales se pueden adaptar para cumplir con tareas específicas. Por ejemplo, a nanoescala el carbono y silicio presentan una resistencia y reactividad química extraordinarias, comparadas con sus formas a gran escala (Kurwadkar et al., 2015).

Con todo esto la nanotecnología tiene importancia en un amplio rango de aplicaciones en distintas áreas, incluyendo la bioremediación de plaguicidas, tratamiento de aguas, biosensores, síntesis de materiales, liberación controlada de fármacos, etc., ya que la versatilidad que ofrecen sus materiales permite crear nanomateriales de un diseño específico para satisfacer una amplia gama de demandas (Yata et al., 2018).

Desde 1980 la nanotecnología se ha propuesto y presentado como la herramienta más prometedora para cooperar con la salud, la energía y problemas ambientales entre otros, que afectan a la población en todo el mundo (Sodano et al., 2016). Por lo tanto, el rápido crecimiento de esta nanociencia y la necesidad de integrar procesos ambientales, sociales y económicos ha hecho que la sustentabilidad se haya convertido en un concepto que permite orientar el desarrollo de esta ciencia y sus aplicaciones hacia la satisfacción de necesidades a nivel mundial.

### **2.2.1. Descripción y características de nanopartículas y nanomateriales**

Dentro de la nanotecnología se encuentran los nanomateriales (NMs). Los NMs han sido los más estudiados en el siglo XXI; estos se pueden preparar a partir de materiales de mayor dimensión, pero el tamaño único y su forma hacen que sus propiedades sean diferentes a las del material original. Un tamaño pequeño ayuda a introducirse en lugares específicos y su área superficial facilita la absorción de sustancias (Khan et al., 2017).

De acuerdo con Khan et al. (2017) los NMs existen en polvos volcánicos, compuestos minerales (NMs naturales) así como en materiales de desperdicio antropogénico como la combustión de carbono, diésel, humos de soldadura, etc. (NMs accidentales). Por otro lado, los NMs manufacturados generalmente se agrupan en los que son a base de carbono, base de metales, óxidos metálicos y dendrímeros.

Por otro lado, las NPs podrían definirse como una categoría de los NMs y se pueden dividir en naturales (accidentales y no accidentales) y manufacturadas (antropogénicas y sintéticas) (Aslani et al., 2014).

Las NPs naturales han existido desde el inicio y formación de la Tierra originadas de una gran variedad de procesos geológicas y biológicos, sin embargo, no hay evidencia de que



puedan dañar los ecosistemas debido a que las NPs naturales y los organismos siempre han coexistido, por lo tanto, han ido evolucionando juntos. Una característica importante es que las NPs naturales no pueden tener un control en su morfología, mientras que las manufacturadas usualmente tienden a ser fabricadas con propiedades específicas (Kurwadkar et al., 2015; Smita et al., 2012).

De acuerdo con la Comisión Europea, un nanomaterial es un material natural, incidental o manufacturado con partículas unidas como agregados o aglomerados donde sus dimensiones externas están en el rango de 1-100 nm, por ejemplo, los fullerenos, el grafeno, los nanotubos de carbono, etc. (EU Commission, 2017).

Como se mencionó anteriormente, las NPs son una categoría de los NMs y su clasificación puede depender de su morfología, tamaño y propiedades químicas. De acuerdo con sus características físicas y químicas se pueden catalogar en NPs basadas en carbono (como fullerenos y nanotubos de carbono), NPs cerámicas con aplicaciones en catálisis, NPs poliméricas que usualmente son nanoesferas o nanocápsulas ampliamente usadas en medicina y NPs metálicas que, como su nombre lo dice son hechas de precursores metálicos y debido a sus propiedades se pueden encontrar en aplicaciones como materiales para energía solar, materiales electrónicos, baterías, etc. (Dhineshababu et al., 2016; Khan et al., 2017; Rao et al., 2011; Thomas et al., 2015).

### **2.2.2. Nanopartículas de hematita y plata**

Particularmente las NPs de metales y óxidos metálicos muestran propiedades fisicoquímicas diferentes a los compuestos a gran escala. La mayoría de las aplicaciones de las NPs de óxidos metálicos están enfocadas hacia el ámbito industrial: sensores, absorbentes,

catalizadores. Para este caso de estudio se emplearon dos NPs: un óxido metálico (hematita,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y un metal (plata, Ag).

Existe una preocupación acerca de la incorporación de las NPs a los sistemas ambientales ya que, debido a la gran producción y aplicación de estos pueden incorporarse de manera accidental o existir la liberación no controlada de estos NMs y de alguna manera impactar agua, suelo y plantas.

La disponibilidad de las NPs de hierro (Fe) ha aumentado en los sistemas ambientales siendo principalmente producidos por el sector industrial. Tienen como principal aplicación la remediación ambiental (Zuverza-Mena et al., 2016).

El hierro es un elemento esencial para los organismos vivos y es uno de los cuatro elementos principales en la corteza terrestre así que, la incorporación de NPs de óxido de hierro al medio ambiente puede afectar las funciones de los ecosistemas (Pariona et al., 2017).

Particularmente los óxidos de hierro constituyen una clase de materiales que son ubicuos en la naturaleza.

Debido a la variedad de sus propiedades físicas y a que proporcionan una gran superficie de área, los óxidos de hierro son de gran interés para las disciplinas científicas en varias aplicaciones: electrónica, medicina, remediación ambiental, pigmentos, protección de la corrosión, entre otras. Tres de los polimorfos de óxido de hierro más comunes e importantes son hematita, maghemita y magnetita (Jubb y Allen, 2010; Mansouri et al., 2017).

La hematita es la forma más estable de las NPs de óxido de hierro debido a su alta estabilidad termodinámica y tiene una amplia gama de aplicaciones. Es un semiconductor de costo bajo pero una resistencia muy alta a la corrosión, además sus propiedades absorbentes son de gran importancia para el estudio del transporte de contaminantes. Se puede utilizar como precursores

para la síntesis de magnetita y maghemita lo que lo hace atractivo en la investigación científica y tecnológica (Jubb y Allen, 2010; Kolen'ko et al., 2014).

Por su parte las NPs de Ag se incorporan a diferentes productos de consumo diario debido a su eficiente actividad antimicrobiana y se utilizan ampliamente en la confección, la industria alimentaria, la cosmética y dispositivos médicos. De esta manera, se estima que, para el 2025 la producción mundial de esta nanopartícula alcance más de 800 toneladas. El volumen de producción y los campos de aplicación de las NPs de Ag aumentan continuamente debido a sus propiedades únicas como la alta relación superficie/volumen, alta reactividad química y propiedades ópticas específicas. Entonces, su incorporación al medio ambiente durante todas sus etapas del ciclo de vida: producción, el uso del producto y eliminación, es inevitable, lo cual puede tener como consecuencia riesgos inherentes y posiblemente un impacto en el funcionamiento de los ecosistemas (Guo et al., 2019; Grün et al., 2019; Zhai et al., 2016).

La mayoría de los estudios se centran en la toxicidad de las NPs de Ag en especies bacterianas bajo condiciones de laboratorio, y además varios trabajos hablan de que la nanopartícula es perjudicial para las comunidades microbianas del suelo.

De esta manera, el conocimiento de la toxicidad de las NPs de Ag se basa principalmente en experimentos de laboratorio controlados con cepas de bacterias u hongos, sin embargo, la toxicidad no se limita a estos organismos; estudios recientes han mostrado que este tipo de NPs pueden impactar en algunas plantas como *Lolium multiflorum* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro et al., 2008; Yin et al., 2011).

### **2.3. Interacción de las nanopartículas con el medio ambiente**

El medio ambiente es susceptible al impacto que puedan presentar las NPs debido al gran uso y producción que han tenido a lo largo de décadas. Si las NPs tienen una interacción con el medio ambiente y los organismos que hay en él, pueden presentar disoluciones,

agregaciones, transformaciones químicas, entre otros (Vázquez-Núñez y de la Rosa-Álvarez, 2018), lo cual genera un efecto directamente con los organismos presentes.

### **2.3.1. Efecto de las nanopartículas sobre las plantas**

Las NPs pueden interactuar con las plantas provocando cambios morfológicos y fisiológicos los cuales se relacionan directamente con las características de la nanopartícula: composición química, tamaño, reactividad, forma y dosis (Khodakovskaya et al., 2012). Por otra parte, Shalaby et al. (2016) afirma que, los efectos de las NPs sobre las plantas varían de acuerdo con la especie de la planta y otros factores ambientales presentes.

De acuerdo con Ma et al. (2015) existen dos rutas por las cuales es posible la acumulación y translocación de las NPs en las plantas: (1) de raíz a hoja y fruto o (2) de hoja a raíz. Hernandez-Viezcas et al. (2013) sugieren que las NPs pueden ser absorbidas por la endodermis de la raíz a través de vías apoplásticas y luego transferidas al cilindro vascular por rutas simplásticas; también podría producirse una transferencia al tallo, hoja y fruto (si es el caso) a través de xilema y floema.

Por la gran variabilidad de resultados que se arrojan de experimentos donde se involucran las NPs y las plantas es que hoy en día existen investigadores que continúan evaluando los posibles efectos que pueden presentar las plantas con diferentes fines. Algunos de estos prometen demostrar la transferencia a través de las plantas y su pronto paso a la cadena trófica. Entre algunas plantas modelos se encuentran: maní, soja, trigo, cebolla, frijol común (Prasad et al., 2012; Raskar y Laware, 2014; Ramesh et al., 2014; Sedghi et al., 2013). Muchas de las plantas empleadas en este tipo de estudio son de consumo humano por lo tanto, los resultados son de gran interés debido a que estas plantas pueden representar la entrada de las NPs para el hombre. Además, el frijol común, por ejemplo, representa un cultivo ampliamente consumido por todo el mundo, como anteriormente se mencionó, representa un

36% de la ingesta diaria de proteínas para México, de tal manera que debe existir una atención especial al realizar investigaciones con este tipo de plantas.

### **2.3.2. Efecto de las nanopartículas sobre microorganismos**

Los microorganismos, particularmente los que se encuentran en el suelo tienen un papel relevante en los ciclos geoquímicos. La actividad de microorganismos del suelo es un buen indicador para la calidad de éste ya que controlan las transformaciones y mineralizaciones de los compuestos naturales y xenobióticos. Perturbar la actividad de los microorganismos del suelo puede traer consecuencias y debido a la sensibilidad que presentan con el ambiente son susceptibles a los efectos de los NMs. Por ejemplo, un estudio demostró que los NMs de fullereno presentan un efecto en bacterias del suelo. Los autores mostraron que la respiración y la biomasa microbiana no se vieron afectadas pero la cantidad de bacterias de crecimiento rápido disminuyó sustancialmente (Johansen et al., 2008).

Las NPs podrían afectar la riqueza y abundancia de las poblaciones microbianas susceptibles a daño celular por oxidación de los metales observándose un posible daño en la membrana, por otro lado, puede ocurrir una pérdida de componentes intracelulares ya que la entrada de las NPs daña organelos, tales como el núcleo (Kumari et al., 2014).

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica empleando *Science Direct* y *Google Scholar* con el fin de identificar los diferentes efectos que se presentan las dos NPs descritas anteriormente sobre plantas y en microorganismos. En el **ANEXO 1** se presentan la Tabla A1 donde se recopiló información sobre el efecto de las NPs de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Ag con base en su tamaño, concentración y modo de aplicación, directamente relacionado en las plantas. Por otro lado, en la Tabla A2 se pueden observar los efectos sobre poblaciones microbianas que presentan las NPs de Ag y Fe a distintas concentraciones.

## **2.4. Las nanopartículas y su uso en la agricultura**

La agricultura es una actividad básica por la cual los humanos viven y sobreviven en la Tierra. Por su parte, la nanotecnología es ampliamente aplicada cada día en nuestra vida y está revolucionando la sociedad. Esta ciencia ha empezado a tener marcha dentro de la agricultura y la industria alimenticia desde el 2003. De todas las NPs metálicas, las de plata son unas de las más comerciales y con una gran variedad de aplicaciones debido a su actividad antimicrobiana; las NPs de oro son ampliamente estudiadas como sensores y las NPs de dióxido de titanio también son muy estudiadas como agentes desinfectantes así como aditivos de comida y mejoradoras de sabor. Por otro lado, las NPs de productos naturales son normalmente diseñados como sistemas liberadores y utilizadas en la industria de alimentos (He et al., 2019).

Considerando el continuo crecimiento de la población a nivel mundial así como el cambio climático, la demanda por una mejora en la distribución y producción de alimentos ha creado un reto a nivel global. De esta manera, la nanotecnología se ha convertido en una estrategia y herramienta de interés sostenible en los sistemas agrícolas. La nanotecnología tiene el potencial de revolucionar la agricultura con su uso en los siguientes campos: biosensores, monitoreo y producción de alimentos, fertilizantes, plaguicidas, calidad del agua y liberación controlada de agroquímicos (Hong et al., 2013; Rodrigues et al. 2016).

De acuerdo con Yata et al. (2018), la agricultura utiliza compuestos químicos en grandes cantidades que contribuyen en acelerar la degradación del suelo. Desde ese punto de vista, la nanotecnología busca la forma de compensar esos productos y mejorar el uso de nuevos productos para lograr la eficiencia en plantas y cultivos. Por ejemplo, la absorción de nutrientes puede ser mejorada por la reducción del tamaño de partícula que aumentará el área

de superficie específica de un fertilizante, entonces aumentará el contacto con la superficie de la planta (Bastani et al., 2018).

### **3. Justificación**

La presente investigación se enfocó en evaluar el efecto de NPs de Ag y Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre el frijol común en la etapa adulta, ya que presenta una importancia económica, alimenticia y social para todo el país, en especial para el centro de México. Entonces este trabajo permite tener una mirada integral sobre los posibles daños ambientales producidos por un impacto particular y en este momento desconocido. Actualmente hay estudios específicos para un tipo de planta, un tipo de NP y una concentración en particular, por lo tanto, este trabajo permite profundizar en los conocimientos teóricos sobre *Phaseolus vulgaris* L. y desarrollar evidencia sobre su comportamiento bajo la presencia de dos NPs ampliamente utilizadas por su alto interés económico e industrial lo cual las convierte en un posible riesgo para el medio ambiente.

Además, el estudio de la interacción planta-microorganismos-nanopartícula particularmente para estas dos NPs no ha sido documentado. Este trabajo es parte de toda una investigación donde se ha trabajado con *P. vulgaris* empleando otro tipo de NPs, de tal manera que se busca establecer las bases para las etapas posteriores que comprende la investigación completa en el caso del análisis molecular y los efectos en poblaciones microbianas de un suelo agrícola y *Phaseolus vulgaris* L. tratados con NPs.



## **4. Objetivo**

### **4.1.General**

Determinar los efectos asociados a la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) que fue cultivada en un suelo agrícola tratado con nanopartículas de  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Ag.

### **4.2.Específicos**

- Evaluar los cambios en el crecimiento y morfología del frijol en la etapa adulta crecido en un suelo tratado con nanopartículas de  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Ag.
- Evaluar los componentes de rendimiento del frijol: número de vainas y número de semillas.
- Cuantificar la acumulación de las NPs en diferentes tejidos de la planta y el cambio en la composición de micronutrientes de esta.

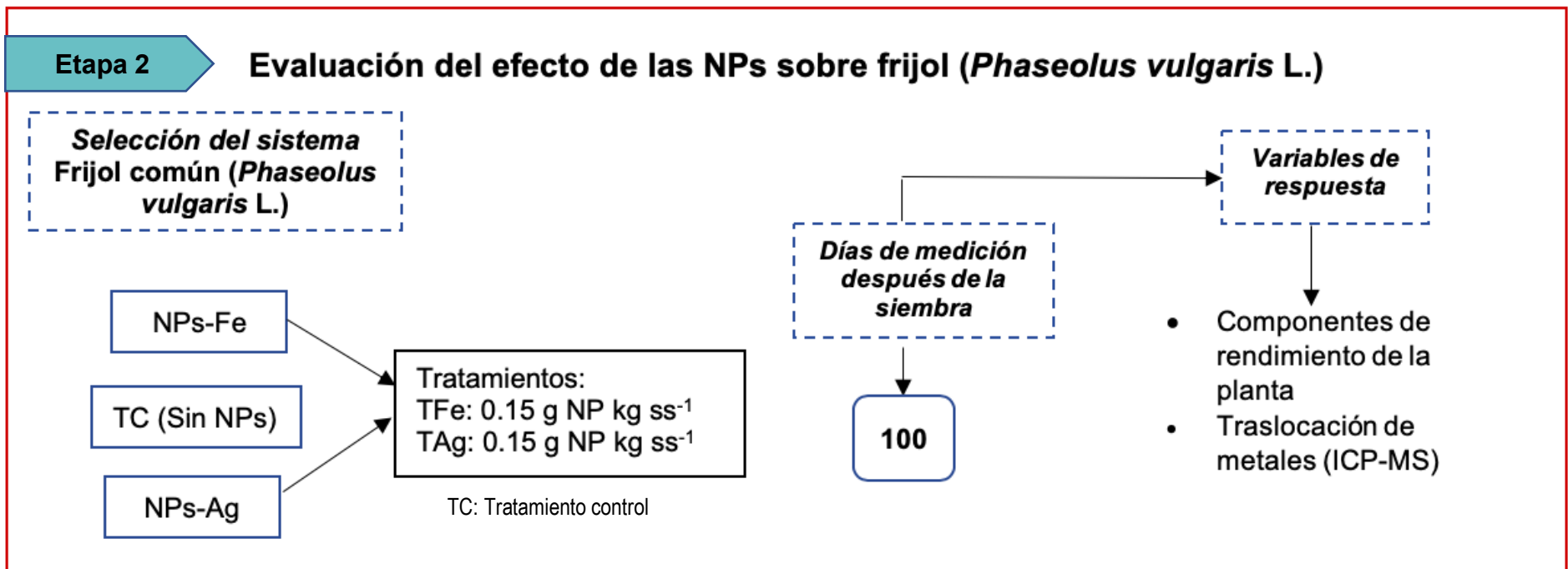
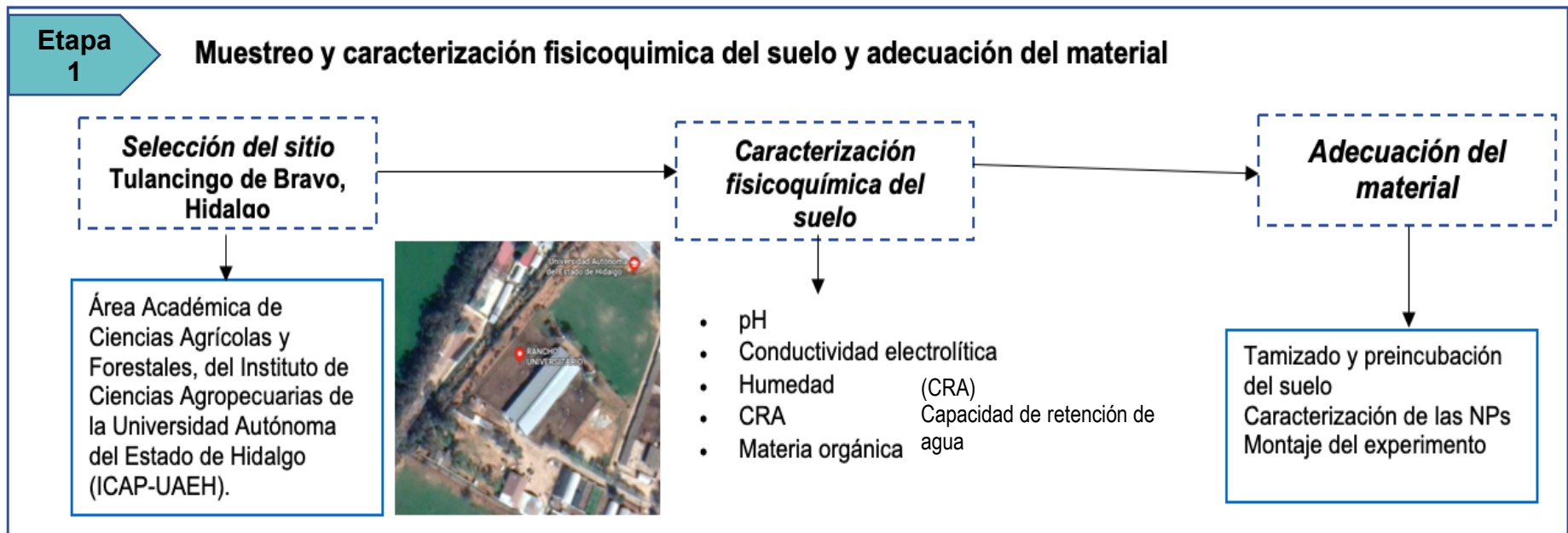
## **5. Materiales y métodos**

La estrategia experimental que se tomó para llevar a cabo el proyecto se divide en tres etapas que se pueden observar en la Figura 1.

Etapa 1 Muestro y caracterización fisicoquímica del suelo y adecuación del material

Etapa 2 Evaluación del efecto de las NPs sobre frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Etapa 3 Análisis del efecto de las NPs en poblaciones microbianas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y suelo agrícola



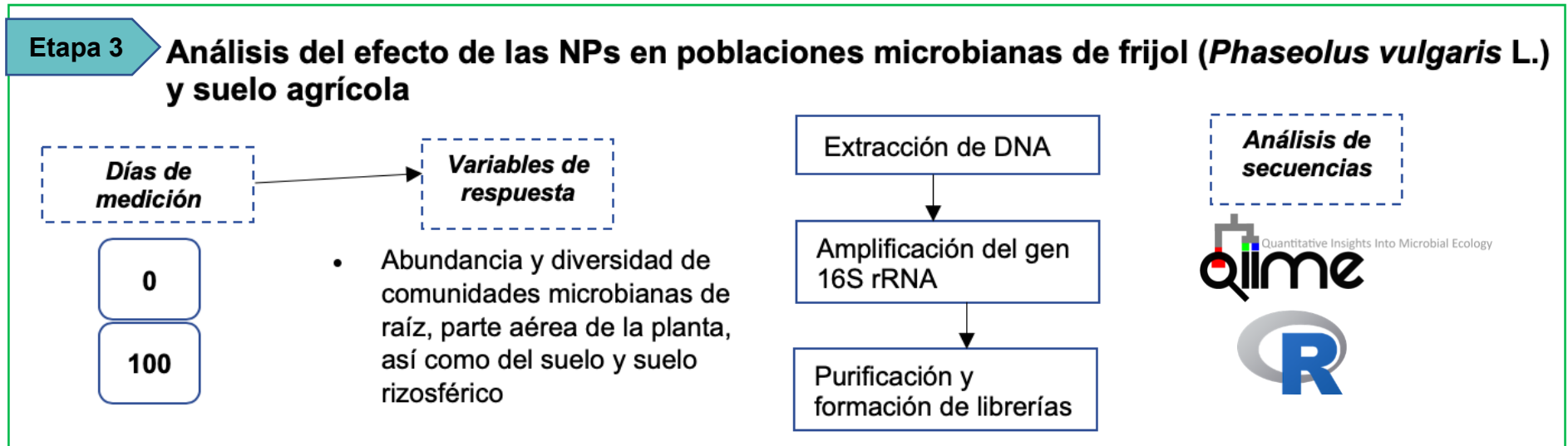


Figura 1. División de etapas de trabajo para la realización del experimento.

## **5.1.Muestro y caracterización fisicoquímica del suelo**

Se llevó a cabo el muestreo de suelo agrícola en una parcela ubicada en el Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales, del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ICAP-UAEH) el día 4 de junio de 2019 en temporada de primavera.

El suelo agrícola muestreado se sometió a un análisis de factores que influyen en el efecto de las NPs tanto de la planta como de las comunidades microbianas en el suelo, dichos factores son: pH, conductividad electrolítica, humedad, capacidad de retención de agua (CRA), carbono total, textura, nitrógeno total y capacidad de intercambio catiónico.

### **5.1.1. Selección del sitio de muestreo**

Como anteriormente se mencionó el muestreo del suelo se llevó a cabo en el Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales, ICAP-UAEH localizada en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hidalgo.

Tulancingo se localiza entre los 2200 y 2660 m sobre el nivel del mar, su clima presenta una temperatura promedio anual de 14°C con una precipitación anual entre 500 y 550 mm (Ayala-Garay, 2013).

Se consideraron cuatro parcelas del sitio (réplicas de campo) que comprenden el área seleccionada de la Figura 2. El muestreo se realizó de manera aleatoria en cada parcela para obtener una mezcla compuesta de cada una de ellas.

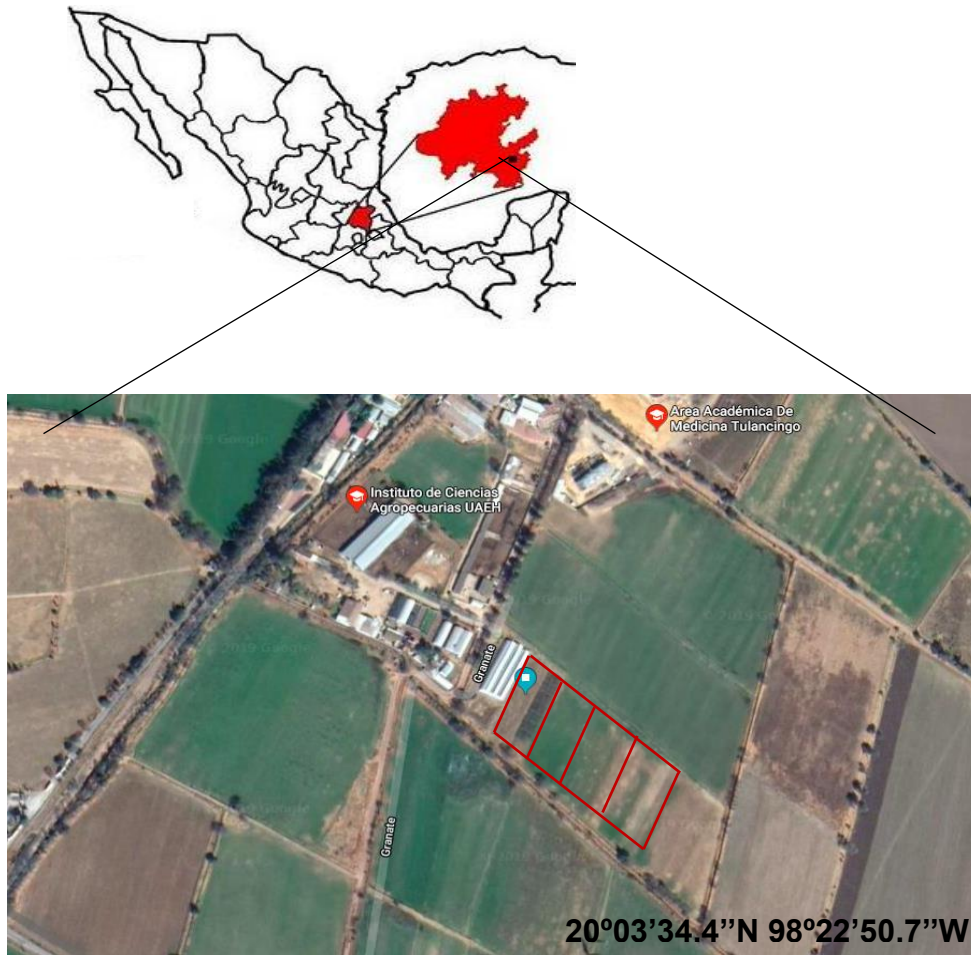


Figura 2. Mapa del sitio para el muestreo de suelo agrícola. Los puntos indican las parcelas seleccionadas. 20°03'34.4''N 98°22'50.7''W.

### 5.1.2. Determinación del pH y la conductividad electrolítica

Se colocaron 10 g de suelo previamente tamizado en un vaso de precipitados y se adicionaron 25 ml de agua destilada, se agitó la mezcla y se dejó reposar por 10 minutos. El procedimiento se repitió dos veces más. Después de esto se leyó el pH empleando el potenciómetro *Hanna HI 110®*.

Para la determinación de la conductividad se pesaron 200 g de suelo y se agregó agua destilada suficiente para alcanzar el 100% de la CRA. Esta mezcla se dejó reposar por 24 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min se extrajo el sobrenadante y se tomó la lectura empleando el conductímetro *Hanna HI2300®*.

### 5.1.3. Determinación de la textura

La textura se determinó empleando el procedimiento de Bouyoucos (NOM-021-RECNAT-2000).

Se pesaron 80 g de suelo y se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para eliminar la materia orgánica. La operación se repitió hasta no observar efervescencia en la muestra. Una vez eliminada la materia orgánica, se pesaron 50 g del suelo en un vaso de precipitado y se añadieron 600 ml de agua destilada, 10 ml de una solución de hexametáfosfato de sodio (50 g/L) y se agitó por 2 minutos empleando una batidora. Esa mezcla se pasó a una probeta de 1 l y se aforó con agua destilada. Se agitó por inversión para homogeneizar, se dejó reposar por 40 segundos y se tomó la primera lectura de temperatura y del hidrómetro.

Se dejó reposar por 2 horas para realizar la segunda lectura.

### 5.1.4. Determinación de la humedad y la capacidad de retención de agua

Para determinar la humedad se pesaron 5 g de suelo en un recipiente limpio, éste se colocó en un horno a 105°C durante 24 horas. Se dejó enfriar y se pesó. Se empleó la ecuación (1) para determinar el porcentaje de humedad

$$\% \text{Humedad} = \frac{(W_a - W_b) * 100}{(W_a - W)} \quad (1)$$

Donde:

W= peso del recipiente vacío

W<sub>a</sub>= peso del recipiente más el suelo húmedo (inicial)

W<sub>b</sub>= peso del recipiente más el suelo después del secado

Se determinó la capacidad de retención de agua (CRA) del suelo tamizado. Se pesó una pieza de papel filtro y se colocó en un embudo de plástico, sobre el papel filtro se agregaron 50 g de suelo. Se colocó un frasco debajo del embudo y fue adicionada agua destilada hasta inundar el suelo. Este suelo con agua se cubrió utilizando papel aluminio para evitar evaporación. Se dejó reposar 24 horas y posteriormente se pesaron el papel filtro junto con el suelo húmedo. Los cálculos se efectuaron empleando la ecuación (2)

$$\text{CRA (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{(W_t - (p_f * F_{p_f}) - W_{ss}) * 1000}{W_{ss}} \quad (2)$$

Donde:

$W_t$ =peso total drenado 24 horas (g)

$P_f$ = peso del papel filtro inicial/seco (g)

$F_{p_f}$ = factor de retención de agua del papel filtro, que se obtiene con el blanco de papel filtro que se satura con agua, cubierto con aluminio y drenado por 24 horas.

$W_{ss}$ = peso del suelo seco. Se calcula utilizando el contenido de humedad inicial del suelo (Ecuación 3).

$$W_{ss} = \frac{W_{sh} * (100 - \%Hum)}{100} \quad (3)$$

### 5.1.5. Determinación de capacidad de intercambio catiónico

Se empleó y modificó la metodología descrita por la NOM-021 RECNAT-2000.



### 5.1.6. Determinación de carbono y nitrógeno total

La determinación de carbono total se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Amato (1983) mientras que, el nitrógeno total del suelo se determinó empleando el método de Kjeldahl modificado y descrito en la NOM-021 RECNAT-2000.

## 5.2. Adecuación y preparación de material

### 5.2.1. Adquisición de semillas

Se emplearon semillas de frijol común variedad Pinto Saltillo provenientes de Emiliano Zapata, Arteaga, Coahuila las cuales presentan las siguientes características.

**Tabla 2. Características de la semilla de frijol común empleada**

Información	Características
Periodo vegetativo	Riego: 115-123 días Temporal: 87-100 días
Ciclo vegetativo	Intermedio
Fecha de siembra	Riego: 1-25 mayo, Arteaga; 1 junio- 25 Julio Saltillo, Ramos Arizpe, Parras
Temporal	Cuando se regularicen las lluvias
Fecha de cosecha	A partir de septiembre
Color de semilla	Crema claro con pintas café claro
Semilla pura (min)	98%
Germinación (max)	85%
Humedad (max)	No mayor del 12%
Tratamiento químico	Sin tratamiento

### 5.2.2. Caracterización de las nanopartículas

Se adquirieron NPs de Ag y  $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$  de ID-nano. Investigación y Desarrollo de Nanomateriales S.A. de C.V las cuales se sometieron a un análisis de microscopía electrónica de transmisión para determinar el tamaño de partícula.

Se llevó a cabo la caracterización de las NPs empleando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca *JEOL JEM-1400*.

Se realizó la prueba empleando de 2500 a 120,000 aumentos.

### 5.2.3. Montaje y preincubación de las columnas

El suelo de cada parcela se tamizó con una malla de 5 mm. Se agregaron submuestras de 7 kg de suelo de cada parcela (n=4) a columnas de PVC (60 cm de alto x 17 cm de diámetro) llenas en el fondo con una capa de tezontle de 7 cm. El suelo en cada columna se ajustó al 40% de la CRA y se dejó reposar durante una semana.

Se aplicaron dos tratamientos testigo sin planta (suelo con NPs, TSAg y TSFe) y tres tratamientos con planta (TC-control, TAg y TFe). Los tratamientos fueron aplicados tres días previos a la siembra de la semilla. Los tratamientos seleccionados fueron a una concentración de 0.15 g  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs kg ss<sup>-1</sup> para el tratamiento de hematita (TFe) y 0.15 g Ag-NPs kg ss<sup>-1</sup> para el tratamiento de plata (TAg).

P1, P2, P3 y P4 corresponden a las parcelas que se muestrearon en el campo agrícola las cuales representan las réplicas de campo (Figura 3).

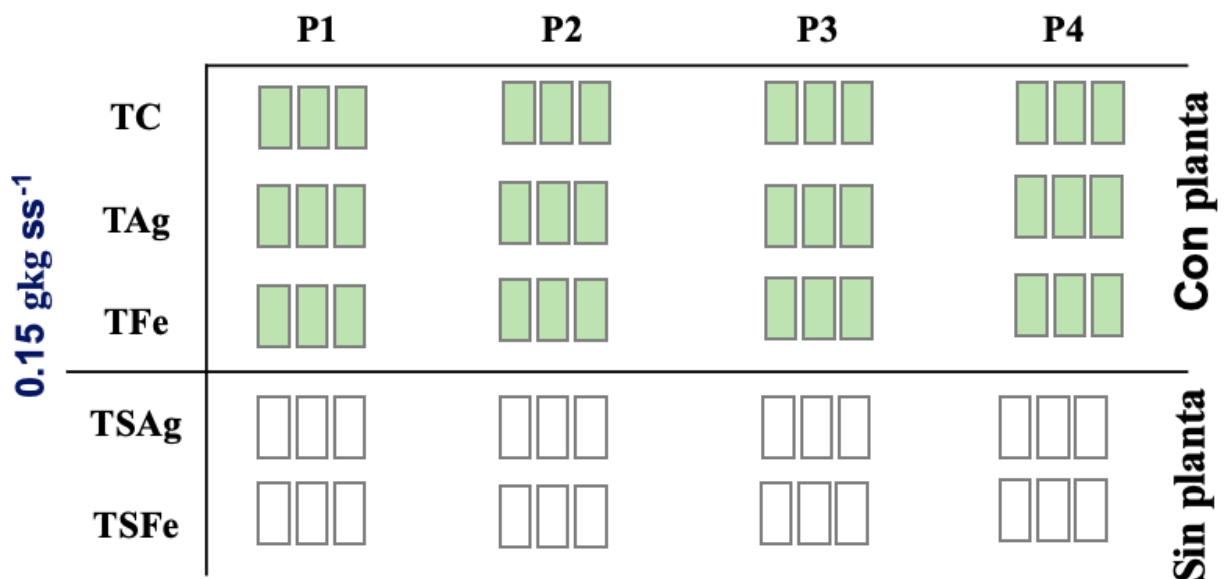


Figura 3. Tratamientos y montaje de columnas con suelo y planta.

#### **5.2.4. Montaje y muestreo del experimento**

El experimento se llevó a cabo bajo condiciones controladas en invernadero. Después de tres días de incubación se plantaron tres semillas por columna a 2 cm de profundidad. Se llevó a cabo un muestreo del suelo al día 0 (día de siembra) para posteriores análisis de biología molecular y fue almacenado a -20°C. Las columnas se colocaron aleatoriamente y fueron monitoreadas durante 115 días. Las condiciones del invernadero durante el experimento fueron de 25°C y 40-50% de humedad. Las columnas se regaron dos veces por semana para evitar la lixiviación.

Quince días después de la siembra se realizó de manera aleatoria un raleo de las plantas dejando solo una por columna con el fin de evitar competencia de nutrientes y agua entre ellas. Además, se colocaron tutores en cada planta para evitar enredos.

100 días después de la siembra (DDS) se llevó a cabo un muestreo destructivo de la planta de frijol, así como del suelo para los respectivos análisis. Tales muestras fueron almacenadas a -20°C.

#### **5.3.Determinación morfológica y de los rendimientos de la planta**

A los 100DDS se llevó a cabo el muestreo destructivo. Se tomaron 4 columnas al azar por tratamiento por parcela y se determinaron las variables: longitud de la raíz, longitud de la parte aérea (tallo y hoja en conjunto), número de vainas, número de semillas, peso húmedo y peso seco (este último se realizó una semana después del muestreo con el fin de dejar secar las plantas y poder calcular el contenido de agua presente).

#### **5.4.Determinación del contenido de metales en la planta vía ICP-MS**

Las raíces y partes aéreas de las plantas fueron pulverizadas de manera separada y tamizadas a 150 µm. Se tomaron submuestras de 2 gramos que fueron analizadas para determinar el contenido de plata (Ag), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn).

El contenido de metales se determinó por espectrometría de emisión de plasma (ICP) con un espectrómetro de emisión de plasma PERKIN ELMER Modelo OPTIMA 8300 en el Laboratorio de análisis químico CINVESTAV Saltillo ubicado en Ramos Arizpe, Coahuila, México.

## **5.5. Comunidades microbianas de suelo y planta**

### **5.5.1. Extracción de DNA de suelo y suelo rizosférico**

En primer lugar, se llevó a cabo la eliminación de materia orgánica de 60 submuestras de 0.5 g de cada muestra de suelo (día 0 y día 100) y 36 submuestras de 0.5 g de suelo rizosférico (Ceja-Navarro et al., 2010).

La extracción de DNA se llevó a cabo empleando tres técnicas diferentes.

El primer protocolo seguido fue el desarrollado por Hoffman y Winston (1987) que corresponden a una lisis química de las células empleando un detergente seguido por una ruptura mecánica. El segundo método correspondió a una lisis térmica de las células (Valenzuela-Encinas et al., 2008) y finalmente el método empleado por Sambrook y Rusell (2001) que usa lisozima para una lisis enzimática. Se mezcló el DNA extraído con cada una de las tres técnicas para finalmente obtener un DNA de un total de 1.5 g de suelo.

#### **5.5.1.1. Eliminación de proteínas y purificación de DNA**

La precipitación de proteínas y purificación del DNA se realizó empleando el protocolo descrito por Ceja-Navarro et al. (2010). Al DNA extraído se le agregó 1/5 de EDTA 0.5M pH 8 del volumen total final y 1/10 de acetato de potasio 5 M pH 5. Las muestras se incubaron a 4°C por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm, 4°C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se llevó a cabo un lavado con 400 µl de solución cloroformo-álcool isoamílico 24:1. Se centrifugó a 13,000 rpm, temperatura ambiente por

10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió este paso. Se agregó polietilenglicol (PEG) al 13% y dejando incubar a -20°C toda la noche.

Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se lavó la pastilla de DNA con etanol frío al 70%. Se centrifugó una vez más a las mismas condiciones y se colocaron las muestras en el concentrador para eliminar el exceso de etanol.

Finalmente se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

Se confirmó la calidad del DNA empleando electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1x (80V-20 min).

### **5.5.2. Desinfección de tejido vegetal**

Se empleó el protocolo modificado descrito por Sarria-Guzmán et al. (2016). Se recolectaron 10 g de muestra de raíz y parte aérea (tallo y hoja) que fueron colocados en matraces Erlenmeyer y se hizo un lavado con agua corriente para eliminar cualquier resto de suelo, posteriormente se agregó agua destilada y ésta se decantó. Las muestras se desinfectaron mediante inmersión en etanol 70% (v/v) durante 3 minutos, en hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto y finalmente se realizó un enjuague cuatro veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar.

#### **5.5.2.1. Comprobación de la desinfección de tejido vegetal**

Se guardó un volumen de 1.5 ml del último lavado con agua destilada estéril del protocolo de desinfección y se confirmó la eliminación de bacterias con la ausencia de crecimiento en medio LB. Por lo cual se llevó a cabo la incubación del agua del último lavado de cada muestra en cajas Petri con medio LB solidificado agar-agar al 1% (p/v). Éstas se incubaron a temperatura ambiente por una semana.

### **5.5.3. Extracción de DNA de parte aérea y raíces de la planta**

Para las muestras de la planta se empleó el protocolo utilizado en CIMMYT basado en el método de Saghai-Marroof et al. (1984).

En el caso de parte aérea se utilizó un buffer de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Se trituró una pequeña cantidad de muestra adicionando nitrógeno líquido en un mortero previamente esterilizado. Este polvo fue transferido a un tubo estéril de 1.5 ml que contenía el buffer previamente calentado a 65°C y se mezcló suavemente por inversión. Esta muestra se incubó a 65°C por 1 hora agitando cada 15 minutos. Se retiraron las muestras de la incubación y se agregaron 500 µl de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se dejó reposar durante 30 minutos. Se centrifugó durante 10 min a 9000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo, se repitieron los pasos a partir de los lavados con cloroformo: alcohol isoamílico y posteriormente se adicionaron 350 µl de isopropanol frío para después dejar a -20°C durante toda la noche.

Finalmente se centrifugó y decantó el líquido para dejar secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente la cual fue resuspendida con 50 µl de agua estéril.

La extracción de DNA de las raíces fue similar. En el caso de la lisis también se utilizó nitrógeno líquido. El polvo vegetal se transfirió a un tubo de 15 ml donde se agregaron 2 ml de buffer para lisozima y 160 µl de lisozima 10 mg/ml (Sambrook y Rusell, 2001), las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora, posteriormente se agregaron 2 ml de SDS 10% y un volumen de arena estéril equivalente a la cantidad de la muestra ocupada. Se agitó el tubo a máxima velocidad y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min para después recuperar 1600 µl del sobrenadante. Este volumen fue dividido en 2 tubos y a cada uno se le adicionaron 160 µl de EDTA 0.5 M pH 8 (1/5 del volumen) y 80 µl de acetato de potasio 5 M pH 5 (1/10

del volumen). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron con una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min y el proceso de lavado se repitió una vez más. Al nuevo sobrenadante se le agregó un volumen igual de PEG al 13% se agitó e incubó toda la noche a -20°C. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla formada con 500 µl de etanol frío al 70% que posteriormente se desechó y se dejó secar la pastilla. La pastilla de DNA se resuspendió empleando 50 µl de agua estéril.

La calidad del DNA se comprobó de la misma manera que para las muestras de suelo.

## **5.6. Amplificación del gen 16S rRNA específico de bacterias**

### **5.6.1. Amplificación del gen 16S rRNA de suelo y planta**

Se obtuvieron las librerías de los amplicones de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA empleando los cebadores 341-F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805-R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') que contiene el MID específico de *Illumina* (Dojka et al. 1998), utilizando el equipo *MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler* (Labnet International). Una vez obtenidas las muestras se verificó el tamaño de banda del amplicón corriendo un gel de agarosa al 1% (80V- 30 min, 90V-15 min).

Todas las muestras se purificaron empleando el kit *FastGene™ Gel/PCR Extraction kit* y se cuantificaron usando el ensayo de PicoGreen dsDNA en el fluoroespectrómetro *NanoDrop™ 3300* (Thermo Scientific™).

Las librerías construidas se enviaron a secuenciar a *Macrogen Inc. (DNA Sequencing Service Seoul, Korea)* en la plataforma *Illumina MiSeq System*.

## **6. Resultados**

### **6.1. Muestreo y caracterización fisicoquímica del suelo y adecuación del material**

#### **6.1.1. Parámetros fisicoquímicos del suelo**

El suelo agrícola presentó la siguiente composición textural: 33.9% de arcilla, 27.1% de arena y 39% de limo resultando un suelo de tipo franco arcilloso de acuerdo con el análisis de Bouyocus. El valor del pH fue de  $6.70 \pm 0.12$  que de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 corresponde a un suelo neutro, una conductividad electrolítica de  $1069 \pm 343 \mu\text{S/cm}$  clasificándose como un suelo con efectos despreciables de salinidad, humedad de  $14.7 \pm 0.9\%$ , capacidad de retención de agua (CRA)  $495 \pm 24 \text{ g kg ss}^{-1}$ , capacidad de intercambio catiónico  $243 \text{ meq kg ss}^{-1}$ , nitrógeno total  $2485 \pm 425 \text{ mg N kg ss}^{-1}$  y carbono total  $30,727 \pm 4081 \text{ mg C kg ss}^{-1}$ .

Considerándose un suelo apto para el crecimiento del frijol pinto var. Saltillo.

#### **6.1.2. Caracterización de las nanopartículas**

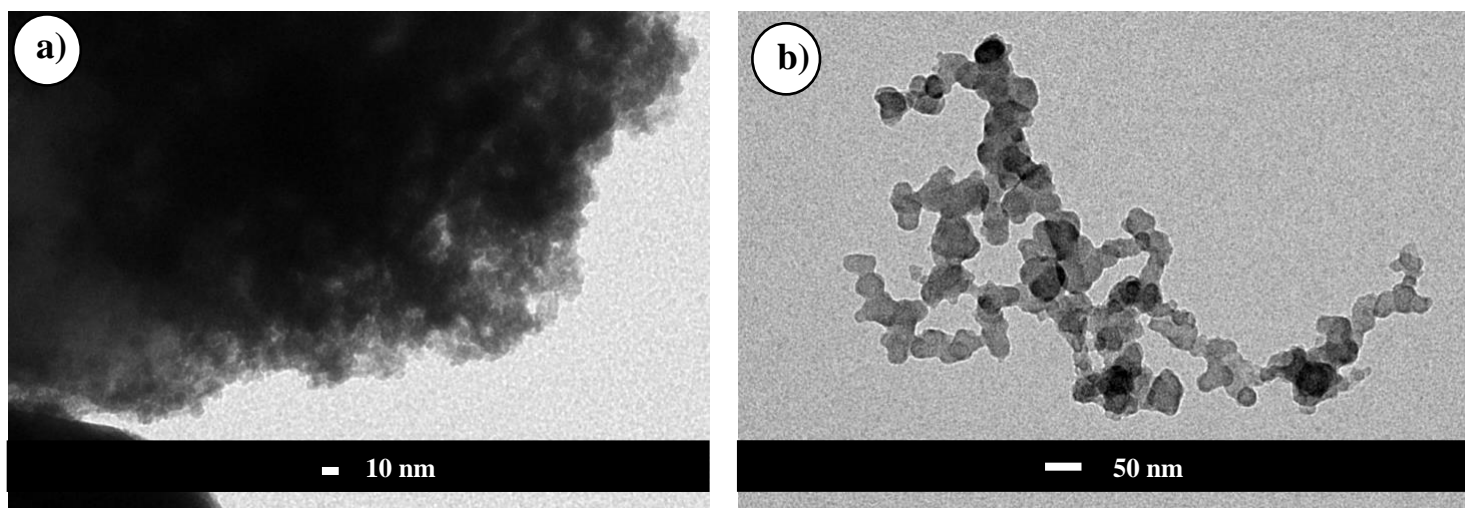
Se llevó a cabo la caracterización de las NPs empleando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca *JEOL JEM-1400*.

Se realizó la prueba empleando de 2500 a 120,000 aumentos.

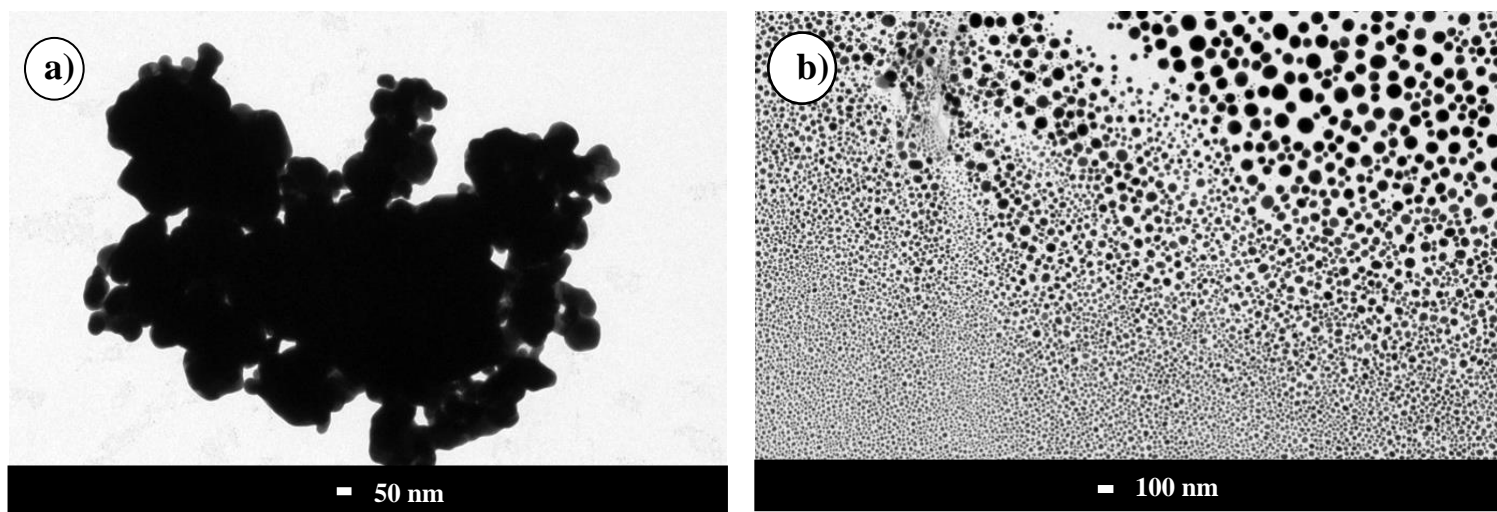
La Figura 4 muestra los resultados obtenidos para las NPs de hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) donde se puede observar un fenómeno de agregación por parte del óxido metálico en la suspensión (Figura 4a). Sin embargo, al diluir aun más la suspensión, el análisis mostró partículas individuales con forma casi esférica que se encuentran en el rango de la nanoescala, alrededor de los 20 a los 50 nm (Figura 4b).



Las NPs de plata presentaron un fenómeno similar de agregación (Figura 5a) cuando la dispersión se encontraba concentrada. A diferencia de la hematita, se encontró que, las NPs de Ag tienen un tamaño variable que va desde 5-10 nm hasta los 100 nm, lo cual se pudo observar al diluir aun más la dispersión (Figura 5b).



**Figura 4. Nanopartículas de hematita, a) Agregados de NPs b) NPs  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en dispersión diluida que presentan forma *quasiesférica***



**Figura 5. Nanopartículas de plata, a) Agregados de NPs b) NPs de Ag con una variación de tamaño desde 5-10 nm hasta 100 nm**

## 6.2. Determinaciones morfológicas y rendimiento de (*Phaseolus vulgaris* L.)

A los 100 DDS se llevó a cabo el muestreo destructivo y se seleccionaron 4 columnas al azar de cada parcela por tratamiento de las cuales se determinó la longitud de la raíz, longitud de parte aérea, el número de vainas, el número de semillas y el contenido de agua (diferencia entre peso húmedo y peso seco). En la Tabla 3 se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de vainas y el número de semillas para el tratamiento control con respecto a TFe y TAg. En el caso de las plantas de frijol que crecieron en presencia de NPs de Ag los valores de rendimiento de cultivo fueron mayores comparados con los otros tratamientos teniendo como resultado  $23.6 \pm 4.5$  semillas con respecto a  $5.2 \pm 6.2$  semillas de las plantas crecidas en un ambiente sin NPs. Es de destacar que, al no obtener una cantidad significativa de vainas para TC, los valores de las semillas fueron muy pobres obteniendo desviaciones estándar grandes que posiblemente puedan ser rectificadas si el número de muestras se aumentara; aun así, es de destacar que las NPs de Ag presentaron un efecto directamente relacionado con el fruto de nuestro cultivo de interés al igual que las NPs de Fe pero en una magnitud menor.

Por otro lado, el contenido de agua, la longitud de la raíz y la parte aérea no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de sus tratamientos. Para el contenido de agua los valores prácticamente fueron iguales. En el caso de la longitud de la raíz, se observó una tendencia en la disminución de ésta al emplear los tratamientos de ambos tipos de NPs y para la longitud del resto de la planta (tallo y hojas) fue el tratamiento con NPs de Ag que mostró valores de mayor longitud respecto a TC y TFe. Cabe destacar que, aunque no fue estadísticamente significativo el valor esta tendencia en ser más largas respecto a las demás se presentó, y además se pudo notar que estas plantas fueron más frondosas.

**Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos en las características del frijol común evaluado con y sin NPs. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1)**

Tratamientos	Concentración de NPs (g kg ss-1)	Rendimiento		Contenido de agua en muestra vegetal (g)	Longitud de raíz (cm)	Longitud de parte aérea (cm)
Frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)		Número de vainas	Número de semillas			
TC	0	1.3 ± 1.3 a	5.2 ± 6.2 a	19.3 ± 4.1 a	66.5 ± 3.6a	173.9 ± 18.0a
TAg	0.15	8.1 ± 2.8 b	23.6 ± 4.5 b	19.3 ± 6.8a	61.8 ± 6.3 a	179.8 ± 16.8 a
TFe	0.15	5.8 ± 2.8 b	20.1 ± 10.1 b	20.0 ± 6.1a	60.7 ± 6.5 a	175.6 ± 18.1 a

\* Letras iguales no hay diferencia estadísticamente significativa (p< 0.05)

### 6.3. Contenido de metales en la planta

Los resultados del análisis ICP para determinar la composición de metales en el tejido vegetal, mostraron que las raíces de las plantas que crecieron en presencia de NPs de Ag acumularon este metal en una cantidad de  $5.6 \pm 3.1 \mu\text{g g}^{-1}$  de tejido seco, sin embargo, las mismas plantas en su parte aérea mostraron resultados nulos para este mismo metal.

Por otro lado, de manera general, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la composición de micronutrientes en la raíz. En su mayoría se pudo observar una disminución del Fe, Zn, Cu y Mn, cuando las raíces estuvieron en contacto con los tratamientos TFe y TAg (Tabla 4). En el caso del Fe como micronutriente se obtuvo un resultado de  $15081.9 \pm 4121.4 \mu\text{g g}^{-1}$  de tejido seco el cual fue significativamente mayor que los encontrados para TFe ( $5993.8 \pm 2169 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y TAg ( $7186.9 \pm 2937.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ); resultados similares se muestran para Mn del cual se encontró una disminución de  $244.8 \mu\text{g g}^{-1}$  para TAg y  $276.9 \mu\text{g g}^{-1}$  para TFe con respecto a TC. La concentración de Cu en raíces se vio afectado por el tratamiento de Ag.

**Tabla 4. Resultados del cambio en la composición de micronutrientes en raíz. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1)**

Tratamientos	Concentración de NPs (g kg ss-1)	Micronutrientes en raíz ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
		Fe	Zn	Cu	Mn
Frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)					
TC	0	15081.9 ± 4121.4 <sub>a</sub>	49.6 ± 7.9 <sub>a</sub>	21.8 ± 5.4 <sub>a</sub>	402.1 ± 115.1 <sub>a</sub>
TAg	0.15	7186.9 ± 2937.4 <sub>b</sub>	31.8 ± 11.1 <sub>ab</sub>	13.8 ± 2.3 <sub>b</sub>	157.3 ± 71.5 <sub>b</sub>
TFe	0.15	5993.8 ± 2169.0 <sub>b</sub>	32.7 ± 6.1 <sub>b</sub>	18.5 ± 2.6 <sub>ab</sub>	125.2 ± 44.2 <sub>b</sub>

\*Letras iguales no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

Por otro lado, para el caso de la parte aérea del frijol, a excepción del Cu, todos los micronutrientes mostraron la misma tendencia en disminuir su composición cuando la planta crece en presencia de NPs. Sin embargo, los resultados para esta parte de tejido vegetal no mostraron una diferencia estadísticamente significativa como se puede observar en la Tabla 5.

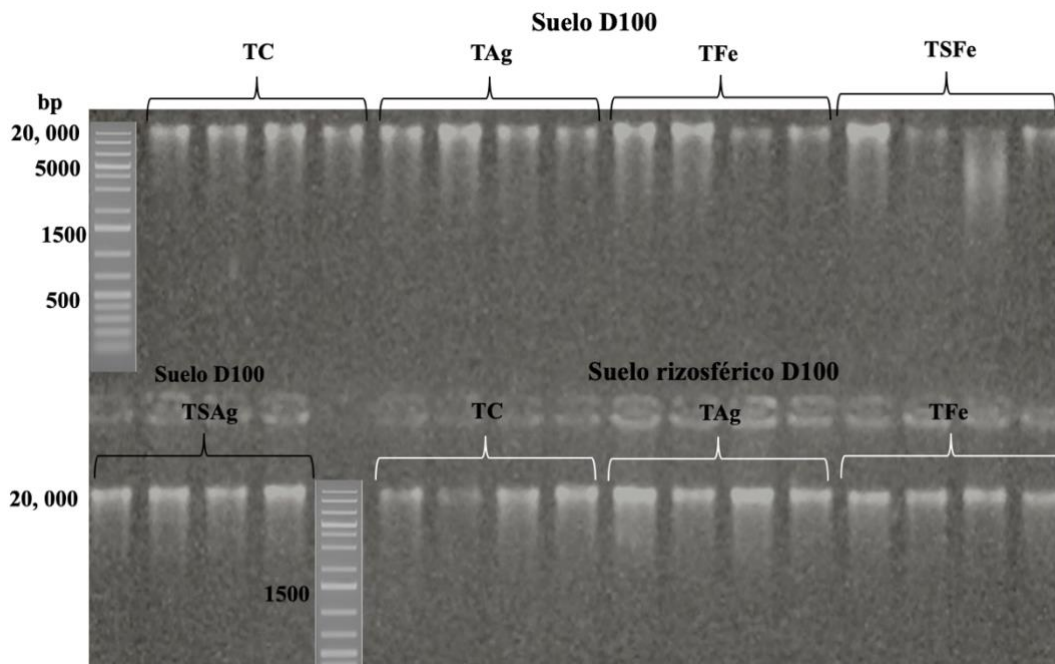
**Tabla 5. Resultados del cambio en la composición de micronutrientes en la parte aérea. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1)**

Tratamientos	Concentración de NPs (g kg ss-1)	Micronutrientes en parte aérea del frijol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
		Fe	Zn	Cu	Mn
Frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)					
TC	0	718.1 ± 458.4 <sub>a</sub>	43.0 ± 7.8 <sub>a</sub>	12.8 ± 4.6 <sub>a</sub>	102.6 ± 10.8 <sub>a</sub>
TAg	0.15	484.5 ± 216.0 <sub>a</sub>	38.8 ± 13.1 <sub>a</sub>	10.8 ± 4.9 <sub>a</sub>	85.2 ± 11.0 <sub>a</sub>
TFe	0.15	648.7 ± 146.5 <sub>a</sub>	41.6 ± 11.6 <sub>a</sub>	13.7 ± 7.0 <sub>a</sub>	90.3 ± 24.8 <sub>a</sub>

\*Letras iguales no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

#### 6.4. Aislamiento y obtención de DNA metagenómico

Se llevó a cabo la extracción de DNA metagenómico por tres métodos distintos para el caso del suelo y se hizo una mezcla de material genómico por muestra con cada DNA obtenido. El resultado se muestra en la Figura 6. Las primeras líneas muestran el DNA extraído de muestras de suelo tomado el día 100 después de la siembra, mientras que, las últimas 12 líneas corresponden a un suelo rizosférico de las plantas en la etapa adulta. Para el caso del DNA extraído del suelo recolectado el día 0 (día del montaje del experimento) los resultados fueron similares al suelo D100.

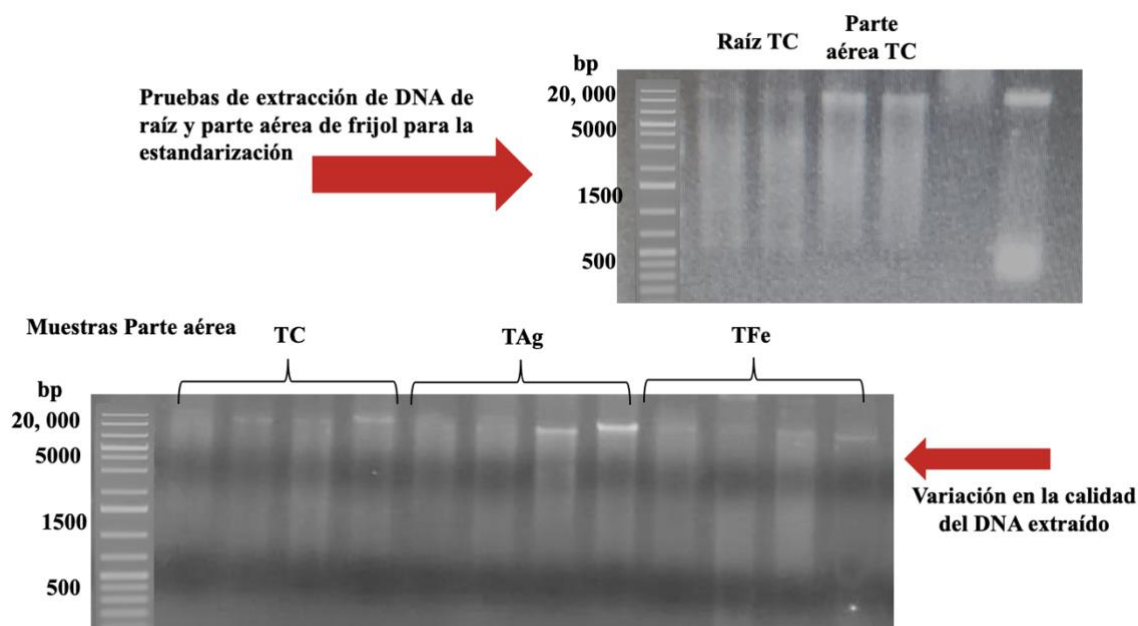


**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (80V-20 min) para DNA extraído de suelo y suelo rizosférico al día 100 de la siembra del frijol común. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss<sup>-1</sup>) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss<sup>-1</sup>) TSFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss<sup>-1</sup> en suelo sin planta) TSAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss<sup>-1</sup> en suelo sin planta)

En el caso del tejido vegetal, la extracción del DNA fue más compleja. La Figura 7 muestra las pruebas de extracción que se hicieron para raíz y parte aérea. En el caso de la raíz se obtenía DNA, pero la calidad fue bastante inferior con respecto a la de tallo y hoja. Por otra

parte, aun después de diversas adecuaciones en el protocolo para la estandarización, el resultado de la calidad del DNA varió entre muestra y muestra independientemente de la NPs o la parcela.

Independientemente de las diferentes dificultades, fue posible obtener el DNA de todas las muestras de suelo y tejidos. Esto pudo demostrarse con la presencia de una banda de alto peso molecular obtenida en los geles de agarosa. De esta manera, el resultado del aislamiento del DNA total para cada muestra fue positivo.

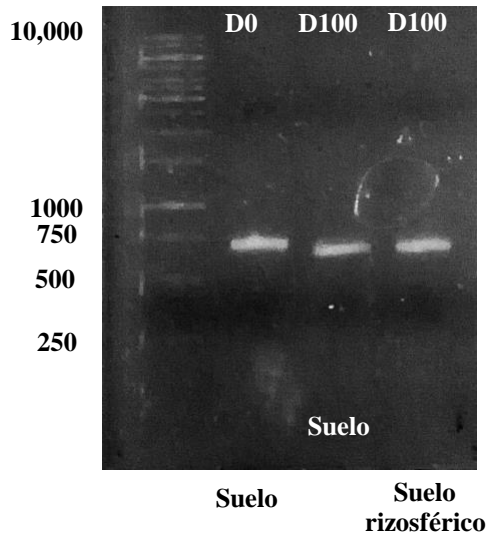


**Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% (80V-20 min) para DNA extraído de raíz y parte aérea del frijol común en etapa adulta. TC (tratamiento control, sin NPs) TAg (tratamiento de 0.15 g NPs Ag kg ss-1) TFe (tratamiento de 0.15 g NPs Fe kg ss-1)**

### **6.5. Amplificación del gen 16s rRNA y construcción de librerías de DNA extraído de muestras de suelo**

Posterior a la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA utilizando los primers 341-F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805-R, se llevó a cabo la formación de tres

librerías que corresponden a muestras de suelo: suelo día cero D0, suelo día 100, D100, y suelo rizosférico del día 100, D100RIZ (Figura 5).



**Figura 8. Construcción de librerías para muestras de suelo y suelo rizosférico. Banda ~ 700 pb. D0 (día cero del experimento/día de montaje) D100 (día 100 después de la siembra)**

## 7. Discusión de resultados

En este trabajo se empleó la especie *Phaseolus vulgaris* L. la cual se sometió a dos tipos de NPs que bien, pueden referirse como contrastante entre ellas: Ag y  $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$  (hematita), sin embargo, estas se utilizaron en la misma concentración (0.15 g kg ss<sup>-1</sup>) y se midieron los parámetros a un solo tiempo de exposición (100 días después de la siembra).

Durante los últimos años se ha hablado acerca de efectos antagónicos en el ambiente a causa de las NPs, ya que, las plantas interactúan con el suelo y el agua, las cuales son rutas potencialmente expuestas a la entrada de estos nanomateriales (Shalaby et al., 2016). De esta manera existe una estrecha relación entre las NPs y las plantas generando resultados y cambios en su morfología y fisiología.

Estudios previos demuestran que los efectos dependen directamente del tipo de NP y especie de la planta y se ha reportado que el efecto de los tratamientos con NPs de óxidos metálicos en la germinación de semillas dependen del tiempo de exposición y la concentración de las NPs (De la Rosa et al., 2013; Shalaby et al., 2016; Thul et al., 2013).

La finalidad de llevar a cabo la caracterización fisicoquímica del suelo agrícola consiste en cerciorarse que este presenta las propiedades adecuadas para un óptimo crecimiento y desarrollo de la planta en cuestión. En este trabajo, se empleó un suelo de tipo franco arcilloso que presentó un pH de  $6.70 \pm 0.12$  bueno para el crecimiento del frijol ya que, de acuerdo con Restrepo et al. (2007) en datos reportados por La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) el frijol común necesita un suelo de textura franco-limoso pero puede tolerar suelos franco arcillosos con valores de pH entre 5.5 y 6.5.



El pH es un factor que influye en el efecto que las NPs pueden presentar en la planta, aun más para las NPs de Fe, ya que, su forma  $Fe_{3+}$  es poco soluble en el suelo y necesita de suelos con bajo pH para poder ayudar a la planta a asimilarlo. Aunado a esto, la capacidad de intercambio catiónico obtenida ( $243 \text{ meq kg ss}^{-1}$ ) indica que se tiene un suelo que es capaz de captar cationes debido a su contenido de arcilla, lo cual puede ser un factor influyente para que la NP interactúe con las partículas del suelo. Por otro lado, es necesario considerar el tamaño de las NPs empleadas en el experimento, en este caso para Fe (promedio 20-50 nm, forma redondeada) y Ag (5-100 nm, forma esférica), debido a que se ha reportado que, el tamaño y forma de las NPs influye en su interacción con la planta. Dos estudios emplearon hematita en el crecimiento de maíz, en el primero (Pariona et al., 2017) se encontró que existe un aumento en el crecimiento de la planta al utilizar hematita a  $6 \text{ g L}^{-1}$  (100 nm, forma ovoide) en caja Petri, mientras que, Mansouri et al. (2017) concluyeron que se reduce la concentración de fósforo así como el peso seco de raíz y parte aérea de maíz cuando se aplica hematita ( $< 30 \text{ nm}$ , forma romboédrica) en un suelo con pH 8. Lo cual indica que, el tamaño y la forma son parámetros a considerar pues los efectos son diferentes aun cuando se trabajó con la misma especie de planta. Por otro lado, Lee et al. (2012) y Zuverza-Mena et al. (2016) coinciden en que, las NPs de Ag en un diámetro promedio de 2 a 25 nm impactan negativamente el crecimiento de *Phaseolus radiatus* L., *Sorghum bicolor* L. y *Raphanus sativus* L.

Las NPs de Ag usadas ampliamente por sus efectos antimicrobianos y antisépticos presentan diversos efectos de acuerdo con la especie de planta. En *Arabidopsis thaliana* L. las NPs Ag son tóxicas, disminuyen la longitud de raíz y ocasionan un daño estructural en hojas, al igual que para la morfología del rábano expuesto a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  donde las longitudes de raíz y brotes disminuyen en un 47.7 % y 40% respecto al control (Zuverza-Mena et al., 2016).

Pocos estudios hablan de eventos donde la Ag resulta benéfica para la planta. Se ha encontrado una mejor eficiencia en parámetros fisiológicos como crecimiento y biomasa de la planta a 200 y 400 ppm para *Brassica juncea*, pero no efectos a 25, 50 y 100 ppm (Sharma et al., 2012), al igual que Song et al. (2013) quienes determinaron que en su experimento con *Solanum lycopersicum* la Ag no afectó la germinación incluso a 5000 mg L<sup>-1</sup>.

En este estudio se encontró que *Phaseolus vulgaris* L. en presencia de Ag a los 100 días después de la siembra (DDS) presenta efectos benéficos con respecto al rendimiento de la planta (producción de vainas y consecuentemente semillas), obteniendo  $8.1 \pm 2.8$  vainas y  $23.6 \pm 4.5$  semillas para el tratamiento de plata mientras que, para TC se obtuvo  $1.3 \pm 1.3$  y  $5.2 \pm 6.2$  vainas y semillas, respectivamente.

De esta manera se reconoce la actuación de la NP de Ag como factor importante en este experimento para un gran rendimiento del fruto del frijol. Se sugiere que esto pueda deberse al estrés producido por la NP en la planta y/o pueda tener interacciones con proteínas y/u otras moléculas y termine actuando como cofactor para algún proceso metabólico importante que resulte en la mejora de la producción del fruto. Un ejemplo es la hormona del etileno. Se ha reportado que es una hormona vegetal que participa en diversos procesos fisiológicos, entre ellos, la maduración de la planta y/o fruto. Si el tallo de una planta es cortado, inmediatamente la producción del etileno aumenta para que los órganos reproductivos maduren y asegurar su sobrevivencia. El etileno es producido por las plantas pero también está en la atmósfera y puede aumentar bajo condiciones de estrés: estrés hídrico, baja intensidad lumínica, daños mecánicos, entre otros (Balaguera-López et al., 2014; Cubillos et al., 2001). A lo largo de los años se han empleado compuestos retardantes que interfieren con la acción del etileno ya que éste puede llegar a perjudicar el valor del cultivo si es producido

en grandes cantidades. Los iones de Ag(I) compiten por el sitio activo del receptor de etileno, sustituye al ión Cu(I) interfiriendo en la oxidación del etileno y por lo tanto en su acción (Baldenegro, 2011) . De esta manera, se pensaría que, al trabajar con las NPs de plata ( $Ag_{+1}$ ), este elemento debería inhibir la acción del etileno, por lo tanto no existiría la maduración que se obtuvo en el experimento. Sin embargo, se sugiere que, la cantidad agregada de la NPs no es suficiente para que pueda existir este fenómeno; el valor encontrado en raíces corresponde apenas a un 4% del valor total adicionado a la columna con suelo. De alguna manera, las NPs de Ag provocan estrés en el frijol, que quizá las detecta como agente extraño y/o tóxico y como consecuencia, la posible producción de etileno obteniendo el mayor número de vainas y semillas para este tratamiento.

Por otra parte, con respecto a la longitud de la raíz y el contenido de agua no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al emplear Ag con el frijol. Lo cual nos mostró que, esta NP no presenta efectos fisiológicos y morfológicas contraproducentes al menos para la concentración empleada.

Debido a su costo, fácil síntesis y las propiedades que presentan, útiles principalmente en la remediación ambiental, las NPs Fe tales como goethita, hematita, maghemita, magnetita y hierro cero-valente, han aumentado en sistemas ambientales siendo producidos principalmente por el sector industrial lo cual las hace susceptibles y potenciales para una incorporación al medio ambiente.

Cabe destacar que, específicamente solo una pequeña parte de estudios sobre NPs-Fe han investigado los efectos que presenta en algunos cultivos agrícolas como arroz, trigo, maíz y soya (Gillispie et al., 2019). Sin embargo, la mayoría de los autores que han estudiado esta NP en sus diferentes formas y estados han encontrado efectos que benefician a cierta planta, sin embargo, las variaciones entre la concentración y el tipo de NP son grandes. En trigo al

emplear  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  a una concentración de 100 ppm aumentó la tasa de germinación y biomasa de raíz, con respecto a las plantas sin NP (Gillispie et al., 2019), con 25 ppm la longitud de la espiga de trigo fue mayor al igual que la producción de granos (Yasmeen et al., 2015). A diferentes concentraciones de hematita (1000, 2000, 4000, 6000 ppm) y un tamaño de 100 nm se mostró un aumento en la germinación de semilla, crecimiento de raíz y contenido de clorofila del maíz (Pariona et al., 2017).

Para nuestro estudio el parámetro morfológico más relevante donde se vio un efecto por el Fe fue la longitud de la raíz donde ésta fue menor ( $60.7 \pm 6.5$  cm) respecto al control ( $66.5 \pm 3.6$  cm). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para esta NP, tanto en la morfología como en el rendimiento de la planta. Lo que lleva a pensar que la hematita a la concentración empleada ( $0.15 \text{ g kg ss}^{-1}$ ) para el frijol común bajo las condiciones descritas no fue particularmente distintiva.

De acuerdo con los estándares nacionales de seguridad alimentaria de China el límite permisible de exposición a la Ag a través de la ingesta dietética es aproximadamente  $35 \text{ mg g}^{-1}$ . Según lo descrito por Abbas et al. (2019), hay estudios previos que demuestran que, puede existir una transferencia de NPs a través del consumo de alimentos contaminados con éstas; pueden viajar a diferentes miembros de la cadena trófica y biomagnificarse en los ecosistemas.

Como anteriormente se mencionó, en nuestro estudio se encontró la presencia de NPs de Ag en tejido seco de raíz del frijol ( $5.6 \pm 3.1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), el mismo efecto fue obtenido para brotes de rábano ( $900 \pm 150 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) cuando las semillas de esta planta fueron tratadas con  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs Ag. Además, se encontró una disminución en Ca, Mg, B, Cu, Mn y Zn, lo cual

mostró que la plata podría afectar significativamente el contenido de nutrientes de crecimiento y la conformación de macromoléculas (Zuverza-Mena et al., 2016).

Se sugiere que, el tiempo y el contacto directo del tratamiento de las NPs con las semillas permitió una mayor acumulación de estas en la planta de rábano. Debido a nuestro montaje y propósito del experimento, las semillas de frijol común no tuvieron un contacto directo ni prolongado, aun así, se demuestra que este no es necesario para una acumulación de NPs independientemente de la cantidad final en el tejido.

Por otro lado, es simple la incorporación de NPs en las plantas. Algunos autores mencionan que esto puede ser una razón para que exista un efecto y disminución en los micronutrientes de éstas tal como se mostró en los resultados obtenidos del contenido de metales en raíces.

Como se mostró en la sección 6.1.2. las NPs empleadas presentan tamaños variables, sin embargo, tanto Ag como Fe presentan tamaños menores a los 100 nm lo cual puede permitir la adsorción y/o absorción por la planta.

En este trabajo se encontró que, al emplear TFe (0.15 g kg ss<sup>-1</sup>) la concentración del hierro como nutriente disminuyó en comparación a los otros dos tratamientos (TC y TAg), lo cual podría ser un resultado consecuente para la planta ya que, presentó una tendencia en la disminución de la longitud de raíz, además de clorosis, mientras que las plantas de los otros dos tratamientos no tuvieron efecto en esto. No solo el Fe como nutriente disminuyó al emplear TFe, también el Mn y en menor cantidad Cu y Zn. Para las plantas, la forma ferrosa del hierro Fe<sub>+2</sub> es fisiológicamente la más importante. Además, el Fe tiene un papel como grupo prostético, el grupo hemo, que son capaces de unirse de manera reversible al oxígeno o de ceder y tomar electrones; el Fe es un grupo prostético de diferentes enzimas, entre ellas el citocromo que es parte funcional de los sistemas respiratorios y fotosintéticos, al estar en contacto con el O<sub>2</sub>, el Fe<sub>+2</sub> se oxida a Fe<sub>+3</sub>, pero esta forma es poco soluble y tiende a

precipitar, de tal manera que, las plantas tienen medios para solubilizar esta forma del hierro, una de ellas es mediante la disminución del pH en la rizósfera a partir de la excreción de protones y mezcla de ácidos orgánicos (Mendoza, 1999). En el caso de la hematita, el hierro se encuentra en su forma  $Fe^{+3}$ , lo cual se asume que no es fácil para la planta tener una asimilación inmediata, combinado con el resultado de pH del suelo ( $6.70 \pm 0.12$ ) que impide aun más la solubilización (Granja and Covarrubias, 2018). Esto indica que posiblemente las NPs de Fe estén precipitando o quizá interactuando con otros componentes del suelo que interfieren con el transporte y la asimilación de micronutrientes.

Nuestro estudio muestra resultados contrarios a lo sugerido por Ghafariyan et al. (2013) quienes elaboran un reporte donde mencionan que las NPs de óxido de hierro favorecen de manera significativa el crecimiento de soja (*Glycine max* L.), además Shuai y Yost (2010) afirman que, a grandes concentraciones de NPs  $Fe_2O_3$ , la nanopartícula se adhiere a la fracción arcillosa del suelo y, por lo tanto, los electrones se acumulan en el borde de esta lo cual reduce la pérdida de nutrientes y mejora la eficiencia como fertilizante de hierro.

Además, se ha encontrado que  $Fe_2O_3$  no solo aumenta el desarrollo de la planta (longitud de raíz, altura de planta, biomasa) sino también aumenta el contenido de Fe en brotes y raíces de cacahuete (Rui et al., 2016) lo cual no es afín a nuestro estudio.

Normalmente el Fe aumenta la disponibilidad de nutrientes y no presenta efectos tóxicos por debajo de los ~100 ppm, lo cual explica el hecho de que, dependiendo del tipo de planta y concentración de NP los resultados pueden variar (Gillispie et al., 2019).

Finalmente, se mencionó que los microorganismos, especialmente los del suelo son de vital importancia para los ciclos geoquímicos ya que se encargan de la regulación de estos. Por consiguiente, cualquier factor que pueda afectar la biomasa microbiana del suelo y su actividad afectaría la calidad y sostenibilidad de este sistema ambiental (Dinesh et al., 2012).

Algunas NPs como la Ag que presentan actividad antimicrobiana ha mostrado efectos antagónicos. Existen estudios *in vitro* sobre el efecto de las NPs de Ag en microorganismos con actividad benéfica, pero hay poca información disponible de cómo estas NPs afectan a las comunidades microbianas en el suelo en condiciones de campo. Hänsch y Emmerling (2010) fueron uno quienes iniciaron con el estudio de los efectos a mediano plazo de las concentraciones ambientalmente relevantes de las NPs de Ag (3.2–320.0  $\mu\text{g NPs Ag kg ss}^{-1}$ ) en los microorganismos y su actividad en el suelo. En el trabajo de Grün et al. (2018) se demostraron los efectos negativos significativos en la población de *Proteobacteria* después de un año de exposición a 0.01 mg NPs Ag kg ss<sup>-1</sup>, mientras que *Acidobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* fueron significativamente estimulados.

Por otro lado, a lo largo de los últimos años se le ha dado mayor énfasis al estudio de microorganismos de las plantas ya que estos contribuyen al estado fisiológico de éstas, así como a su salud y resistencia al estrés biótico y abiótico, tales como plagas, estrés hídrico, cambios de temperatura radicales, etc (Berg et al., 2009).

Los endófitos bacterianos se encuentran en casi todas las plantas del mundo y algunos pueden promover el crecimiento de las plantas. Los mecanismos de promoción del crecimiento son similares a los utilizados por bacterias rizosféricas, de hecho, se han comenzado a comparar los genomas de estos organismos y por ende se han podido revelar los factores genéticos involucrados en un estilo de vida endofítico (Santoyo et al., 2016). Se considera una bacteria como endófito si esta puede ser aislada de una superficie desinfectada de tejido de planta o extraída del interior de la planta (Hall-man et al., 1997). Los endófitos de cada planta van a depender de la etapa de crecimiento de esta, el tejido analizado, la salud de la planta, estado nutricional, tipo de suelo y otras condiciones ambientales (Hardoim et al., 2008).

Debido a la notable importancia que presentan los estudios que buscan determinar los efectos de NPs tanto en plantas como microorganismos este trabajo podría ser un parteaguas para continuar con futuros análisis que permitan complementar los resultados obtenidos para las características de las plantas. En el caso del frijol común, los endófitos ya han sido ampliamente estudiados (Costa et al., 2012; Parsa et al., 2016), sin embargo, las condiciones siempre varían y es de interés evaluar los cambios que presentan ante la presencia de NPs.



## **8. Perspectivas y estudios posteriores**

Únicamente se construyeron las librerías para las muestras de suelo (D0 y D100), sin embargo, se espera la continuidad del trabajo para las muestras de planta por parte del grupo de investigación del laboratorio.

Una vez construidas las librerías del gen 16S específico para bacterias tanto de suelo como de plantas, se enviarán a secuenciar a *Macrogen Inc. (DNA Sequencing Service Seoul, Korea)* en la plataforma *Illumina MiSeq System* con el fin de llevar a cabo el análisis de biología molecular y poder evaluar los efectos que presentan las NPs de Ag y Fe en las comunidades microbianas del suelo y planta (diversidad y abundancia de microorganismos).

Como parte de las perspectivas se espera que, se pueda ampliar el estudio y llevar a cabo un análisis metagenómico de las muestras recolectadas y de esta manera poder correlacionar los diferentes resultados obtenidos y por obtener.

Se espera y considera que, en estudios posteriores (nuevos montajes de experimentos) se aumente el número de muestras y poder apreciar valores diferentes en las desviaciones estándar que corresponden a las variables morfológicas y de rendimiento medidas.

## 9. Conclusión

Lo expuesto anteriormente permite concluir que, como muchas otras plantas, *Phaseolus vulgaris* L. presenta efectos particulares cuando crece en presencia de NPs metálicas, por lo tanto, se sujeta el argumento de que el efecto depende de la planta y la NP, así como de otras variables.

Con los resultados obtenidos se pudieron evaluar los cambios en el crecimiento y la morfología del frijol común en la etapa adulta cultivado en un suelo agrícola tratado con NPs de hematita y plata, los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control, por lo tanto, se destaca que a la concentración empleada (0.15 g NP kg ss-1) *P. vulgaris* L. no presentó efectos en el crecimiento. Por otro lado, se estimaron los componentes de rendimiento de la planta y estos mostraron valores significativamente mayores para el tratamiento de Ag, hasta 4.5 veces más, respecto al control para el número de vainas, por lo cual se sugiere que esta NP indujo una situación de estrés a la planta teniendo como resultado mayores rendimientos del fruto, sin embargo se necesitan más estudios específicos para poder obtener información sobre qué proceso metabólico se ve involucrado con este resultado. Finalmente, se pudo cuantificar la acumulación de plata en raíz, la cual resultó ser el 4% del total de las NPs adicionadas al suelo, además, se presentó una disminución en la composición de los cuatro micronutrientes analizados (Fe, Zn, Cu, Mn) al estar involucradas las NPs.

Las NPs han demostrado que podrían ser la clave para un futuro sustentable en el desarrollo de nuevos productos que promuevan la protección y mejora de cultivos, para tal fin se requiere ampliar los estudios que permitan determinar los efectos antagónicos que las NPs presenten sobre un tipo de planta. Se necesitan estudios a largo plazo en campo abierto para determinar los riesgos que esto pueda tener. Además con la actual demanda mundial en la

industria alimenticia, así como el continuo uso y gran producción de NPs con diferentes fines industriales, es necesario entender los mecanismos de toxicidad en plantas y microorganismos, y no dejar a un lado la búsqueda del conocimiento para comprender el comportamiento de las NPs y su transformación y/o llegada a la cadena trófica.

## 10. Referencias

Abbas, Q., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M. U., Ullah, H., & Ahmed, R. (2019). Effects of biochar on uptake, acquisition and translocation of silver nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to growth, photosynthetic traits and nutrients displacement. *Environmental Pollution*, 250, 728-736.

Amato, M. (1983). Determination of carbon 12 C and 14 C in plant and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(5), 611-612.

Arnaout, C. L., & Gunsch, C. K. (2012). Impacts of silver nanoparticle coating on the nitrification potential of *Nitrosomonas europaea*. *Environmental science & technology*, 46(10), 5387-5395.

Aslani, F., Bagheri, S., Muhd Julkapli, N., Juraimi, A. S., Hashemi, F. S. G., & Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *The Scientific World Journal*, 2014.

Ayala-Garay, A. V., Schwentesius-Rindermann, R., Preciado-Rangel, P., Almaguer-Vargas, G., & Rivas-Valencia, P. (2013). Profitability analysis of maize production in the Tulancingo region, Hidalgo, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 10(4), 381-395.

Balaguera-López, H. E., Salamanca-Gutiérrez, F. A., García, J. C., & Herrera-Arévalo, A. (2014). Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2), 302-313.

Baldenegro, Q. C. V. G. (2011). Expresión de genes involucrados en la síntesis de carotenoides en el fruto de tomate por la aplicación de oligogalacturónidos y ethephon (Doctoral dissertation, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo)

Bastani, S., Hajiboland, R., Khatamian, M., & Saket-Oskoui, M. (2018). Nano iron (Fe) complex is an effective source of Fe for tobacco plants grown under low Fe supply. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18(2), 524-541.

Ben-Moshe, T., Frenk, S., Dror, I., Minz, D., & Berkowitz, B. (2013). Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere*, 90(2), 640-646.

Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.

Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608-13619.

Ceja-Navarro, J. A., Rivera-Orduna, F. N., Patino-Zúniga, L., Vila-Sanjurjo, A., Crossa, J., Govaerts, B., & Dendooven, L. (2010). Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3685-3691.

Colman, B. P., Arnaout, C. L., Anciaux, S., Gunsch, C. K., Hochella Jr, M. F., Kim, B., ... & Unrine, J. M. (2013). Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. *PloS one*, 8(2), e57189.

Costa, L. E. D. O., Queiroz, M. V. D., Borges, A. C., Moraes, C. A. D., & Araújo, E. F. D. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1562-1575.

Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., & Sharma, N. (2016). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 147-163.

Cubillos, E., Molina, V., Flórez, V. J., & Fischer, G. (2001). Efecto de inhibidores de etileno en la longevidad floral del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) como probables sustitutos del tiosulfato de plata (STS). *Agronomía Colombiana*, 18(1-3), 89-96.

de la Rosa, G., López-Moreno, M. L., de Haro, D., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure and Applied Chemistry*, 85(12), 2161-2174.

Dhineshbabu, N. R., Rajendran, V., Nithyavathy, N., & Vetumperumal, R. (2016). Study of structural and optical properties of cupric oxide nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 6(6), 933-939.

Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., & Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, *173*, 19-27.

Doolette, C. L., Gupta, V. V., Lu, Y., Payne, J. L., Batstone, D. J., Kirby, J. K., ... & McLaughlin, M. J. (2016). Quantifying the sensitivity of soil microbial communities to silver sulfide nanoparticles using metagenome sequencing. *PloS one*, *11*(8), e0161979.

European Commission Environment EU Commission (2017) Nanomaterials. Recuperado de [https://ec.europa.eu/commission/index\\_en](https://ec.europa.eu/commission/index_en)

Fernández-Luqueño, F., Espinosa, D., Munive, A., Corlay, L., Serrano, L. (2008) Nodule senescence and biomass components in common bean cultivars. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *31*(3), 195-201

Ghafariyan, M. H., Malakouti, M. J., Dadpour, M. R., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2013). Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environmental science & technology*, *47*(18), 10645-10652.

Gillispie, E. C., Taylor, S. E., Qafoku, N. P., & Hochella, M. F. (2019). Impact of iron and manganese nano-metal-oxides on contaminant interaction and fortification potential in agricultural systems—a review. *Environmental Chemistry*, *16*(6), 377-390.

Granja, F., & Covarrubias, J. I. (2018). Evaluation of acidifying nitrogen fertilizers in avocado trees with iron deficiency symptoms. *Journal of soil science and plant nutrition*, *18*(1), 157-172.

Grün, A. L., Manz, W., Kohl, Y. L., Meier, F., Straskraba, S., Jost, C., ... & Emmerling, C. (2019). Impact of silver nanoparticles (AgNP) on soil microbial community depending on functionalization, concentration, exposure time, and soil texture. *Environmental Sciences Europe*, *31*(1), 15.

Grün, A. L., Straskraba, S., Schulz, S., Schloter, M., & Emmerling, C. (2018). Long-term effects of environmentally relevant concentrations of silver nanoparticles on microbial biomass, enzyme activity, and functional genes involved in the nitrogen cycle of loamy soil. *Journal of Environmental Sciences*, *69*, 12-22.

Guo, Y., Cichocki, N., Schattenberg, F., Geffers, R., Harms, H., & Müller, S. (2019). AgNPs change microbial community structures of wastewater. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3211.

Hänsch, M., & Emmerling, C. (2010). Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(4), 554-558.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.

Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5), 580-592.

He, S., Feng, Y., Ren, H., Zhang, Y., Gu, N., & Lin, X. (2011). The impact of iron oxide magnetic nanoparticles on the soil bacterial community. *Journal of Soils and Sediments*, 11(8), 1408-1417.

He, X., Deng, H., & Hwang, H. M. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 1-21.

Hernandez-Viezcas, J. A., Castillo-Michel, H., Andrews, J. C., Cotte, M., Rico, C., Peralta-Videa, J. R., ... & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). In situ synchrotron X-ray fluorescence mapping and speciation of CeO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil cultivated soybean (*Glycine max*). *ACS nano*, 7(2), 1415-1423.

Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.

Holden, P. A., Schimel, J. P., & Godwin, H. A. (2014). Five reasons to use bacteria when assessing manufactured nanomaterial environmental hazards and fates. *Current opinion in biotechnology*, 27, 73-78.

Hong, J., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Nanomaterials in agricultural production: benefits and possible threats?. In *Sustainable nanotechnology and the environment: advances and achievements* (pp. 73-90). American Chemical Society.

Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2017). Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 443-447.

Jeyasubramanian, K., Thoppey, U. U. G., Hikku, G. S., Selvakumar, N., Subramania, A., & Krishnamoorthy, K. (2016). Enhancement in growth rate and productivity of spinach grown in hydroponics with iron oxide nanoparticles. *RSC advances*, 6(19), 15451-15459.

Johansen, A., Pedersen, A. L., Jensen, K. A., Karlson, U., Hansen, B. M., Scott-Fordsmand, J. J., & Winding, A. (2008). Effects of C60 fullerene nanoparticles on soil bacteria and protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1895-1903.

Jubb, A. M., & Allen, H. C. (2010). Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2(10), 2804-2812.

Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194-209.

Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS nano*, 6(3), 2128-2135.

Kolen'ko, Y. V., Bañobre-López, M., Rodríguez-Abreu, C., Carbó-Argibay, E., Sailsman, A., Piñeiro-Redondo, Y., ... & Rivas, J. (2014). Large-scale synthesis of colloidal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles exhibiting high heating efficiency in magnetic hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(16), 8691-8701.

Kookana, R. S., Boxall, A. B., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., ... & Lynch, I. (2014). Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4227-4240.

Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47(4), 651-658.

Kumar, A., Rakshit, R., Bhowmik, A., Mandal, N., Das, A., & Adhikary, S. (2019). Nanoparticle-induced changes in resistance and resilience of sensitive microbial indicators towards heat stress in soil. *Sustainability*, 11(3), 862.

Kumari, J., Kumar, D., Mathur, A., Naseer, A., Kumar, R. R., Chandrasekaran, P. T., ... & Chandrasekaran, N. (2014). Cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles towards freshwater



sediment microorganisms at low exposure concentrations. *Environmental research*, 135, 333-345.

Kurwadkar, S., Pugh, K., Gupta, A., & Ingole, S. (2015). Nanoparticles in the environment: occurrence, distribution, and risks. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 19(3), 04014039.

Lara-Flores, M. (2015) El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria* 16(2). Fecha de consulta 2/15 Julio 2020. Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/#>

Lee, W. M., Kwak, J. I., & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491-499.

Liu, R., & Lal, R. (2015). Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, 514, 131-139.

Logothetidis, S. (Ed.). (2012). *Nanostructured materials and their applications*. Springer Science & Business Media.

Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P., & Xing, B. (2015). Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental science & technology*, 49(12), 7109-7122.

Mansouri, T., Golchin, A., & Neyestani, M. R. (2017). The effects of hematite nanoparticles on phytoavailability of arsenic and corn growth in contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(7), 1525-1534.

Martinez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11-23.

McGee, C. F., Storey, S., Clipson, N., & Doyle, E. (2017). Soil microbial community responses to contamination with silver, aluminium oxide and silicon dioxide nanoparticles. *Ecotoxicology*, 26(3), 449-458.

Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Trejo-Téllez, L., López-Valdez, F., Pampillón-González, L. (2018) Growth and development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pinto Saltillo exposed to iron, titanium, and zinc oxide nanoparticles in an agricultural soil. *Applied Ecology and Environmental Research* 16(2):1883-1897.

Mendoza, D. A. B. Absorción y Asimilación de Hierro en las plantas.(1999) Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/242120755\\_ABSORCION\\_Y\\_ASIMILACION\\_DE\\_HIERRO\\_EN\\_LAS\\_PLANTAS](https://www.researchgate.net/publication/242120755_ABSORCION_Y_ASIMILACION_DE_HIERRO_EN_LAS_PLANTAS)

Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., ... & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental science & technology*, 42(23), 8959-8964.

NOM-021-RECNAT-2000 NORMA OFICIAL MEXICANA, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES DE FERTILIDAD, SALINIDAD Y CLASIFICACIÓN DE SUELOS. ESTUDIOS, MUESTREO Y ANÁLISIS. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002

Nosengo, N. (2003) Fertilized to death. *Nature*, 425, 894-895.

Pallavi, M. C., Srivastava, R., Arora, S., & Sharma, A. K. (2016). Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *3 Biotech* 6 (2): 254.

Pariona, N., Martinez, A. I., Hdz-García, H. M., Cruz, L. A., & Hernandez-Valdes, A. (2017). Effects of hematite and ferrihydrite nanoparticles on germination and growth of maize seedlings. *Saudi journal of biological sciences*, 24(7), 1547-1554.

Parsa, S., García-Lemos, A. M., Castillo, K., Ortiz, V., López-Lavalle, L. A. B., Braun, J., & Vega, F. E. (2016). Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal biology*, 120(5), 783-790.

Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K. R., ... & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of plant nutrition*, 35(6), 905-927.

Ramesh, M., Palanisamy, K., Babu, K., & Sharma, N. K. (2014). Effects of bulk & nano-titanium dioxide and zinc oxide on physio-morphological changes in *Triticum aestivum* Linn. *Journal of Global Biosciences*, 3(2), 415-422.

Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.

Rashid, M. I., Shahzad, T., Shahid, M., Imran, M., Dhavamani, J., Ismail, I. M., ... & Almeelbi, T. (2017). Toxicity of iron oxide nanoparticles to grass litter decomposition in a sandy soil. *Scientific Reports*, 7, 41965.

Raskar, S. V., & Laware, S. L. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 467-473.

Restrepo, J. H. A., Martínez, T. R., & Carmona, M. J. Buenas prácticas agrícolas (bpa) en la producción de frijol voluble (2007). [internet]. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO); [actualizado 3 nov 2014; fecha de consulta 3 de agosto 2020].

Rodrigues, S. M., Trindade, T., Duarte, A. C., Pereira, E., Koopmans, G. F., & Römken, P. F. A. M. (2016). A framework to measure the availability of engineered nanoparticles in soils: Trends in soil tests and analytical tools. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 129-140.

Rui, M., Ma, C., Hao, Y., Guo, J., Rui, Y., Tang, X., ... & Zhu, S. (2016). Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in plant science*, 7, 815.

Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. L. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 8014-8018.

Sambrook J, Rusell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, eds)

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.

Sarria-Guzmán, Y., Chávez-Romero, Y., Gómez-Acata, S., Montes-Molina, J. A., Morales-Salazar, E., Dendooven, L., & Navarro-Noya, Y. E. (2016). Bacterial communities associated with different *Anthurium andraeanum* L. plant tissues. *Microbes and environments*, ME16099.

Sedghi, M., Hadi, M., & Toluie, S. G. (2013). Effect of nano zinc oxide on the germination parameters of soybean seeds under drought stress. *Annales of West University of Timisoara. Series of Biology*, 16(2), 73.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020) Cierre de producción agrícola <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Consultado 8/20 julio 2020

Shah, V., Collins, D., Walker, V. K., & Shah, S. (2014). The impact of engineered cobalt, iron, nickel and silver nanoparticles on soil bacterial diversity under field conditions. *Environmental Research Letters*, 9(2), 024001.

Shalaby, T. A., Bayoumi, Y., Abdalla, N., Taha, H., Alshaal, T., Shehata, S., ... & El-Ramady, H. (2016). Nanoparticles, soils, plants and sustainable agriculture. In *Nanoscience in Food and Agriculture 1* (pp. 283-312). Springer, Cham.

Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(8), 2225-2233.

Shuai, X., & Yost, R. S. (2010). Kinetics of Ion-Pair Formation on Variable-Charge Minerals Using the Frequency Domain Method. *Soil Science Society of America Journal*, 74(5), 1568-1576.

Simonin, M., Guyonnet, J. P., Martins, J. M., Ginot, M., & Richaume, A. (2015). Influence of soil properties on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on carbon mineralization and bacterial abundance. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 529-535.

Smita, S., Gupta, S. K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A. C., & Rahman, Q. (2012). Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health*, 11(1), 1-11.

Sodano, V., Gorgitano, M. T., Quaglietta, M., & Verneau, F. (2016). Regulating food nanotechnologies in the European Union: Open issues and political challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 216-226.

Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., & Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 93, 60-67.

Syu, Y. Y., Hung, J. H., Chen, J. C., & Chuang, H. W. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57-64.

Thomas, S., Kumar Mishra, P., & Talegaonkar, S. (2015). Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 21(42), 6165-6188.

Thul, S. T., Sarangi, B. K., & Pandey, R. A. (2013). Nanotechnology in agroecosystem: implications on plant productivity and its soil environment. *Expert Opinion on Environmental Biology Journal*, 2, 2-7.

Tong, Z., Bischoff, M., Nies, L., Applegate, B., & Turco, R. F. (2007). Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environmental Science & Technology*, 41(8), 2985-2991.

Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., ... & Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, 12(2), 247-254.

Vázquez Núñez, E., & de la Rosa-Álvarez, G. (2018). Environmental behavior of engineered nanomaterials in terrestrial ecosystems: Uptake, transformation and trophic transfer. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 6, 42-46.

Vinković, T., Novák, O., Strnad, M., Goessler, W., Jurašin, D. D., Parađiković, N., & Vrček, I. V. (2017). Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) exposed to silver nanoparticles. *Environmental research*, 156, 10-18.

Yang, Y., Quensen, J., Mathieu, J., Wang, Q., Wang, J., Li, M., ... & Alvarez, P. J. (2014). Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag<sup>+</sup> on the microbial community structure of activated sludge. *Water research*, 48, 317-325.

Yasmeen, F., Razzaq, A., Iqbal, M. N., & Jhazab, H. M. (2015). Effect of silver, copper and iron nanoparticles on wheat germination. *International journal of biosciences*, 6(4), 112-117.

Yata, V. K., Tiwari, B. C., & Ahmad, I. (2018). Nanoscience in food and agriculture: research, industries and patents. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 79-84.

Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., ... & Bernhardt, E. S. (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental science & technology*, 45(6), 2360-2367.

Zhai, Y., Hunting, E. R., Wouters, M., Peijnenburg, W. J., & Vijver, M. G. (2016). Silver nanoparticles, ions, and shape governing soil microbial functional diversity: nano shapes micro. *Frontiers in microbiology*, 7, 1123.

Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in plant science*, 7, 90.

# Anexos

**Tabla. A1 Efectos de nanopartículas de plata y hematita sobre plantas**

Nanopartículas	Efectos	Concentración	Tamaño	Modo de aplicación	Referencias
$\alpha - Fe_2O_3$	Aumento en longitud de raíz, tallo y hoja en maíz. Localización de hematita en xilema y floema. Aumento del contenido de hierro en hojas.	1, 2, 4 g/L	100 nm	Soluciones. Crecimiento en cajas Petri	Pariona et al. (2017)
	<i>Cynodon dactylon</i> . Reducción del contenido de N mineral, colonias de hongos y biomasa microbiana	2000 mg kg <sup>-1</sup>	< 50 nm	Aplicación en suelo	Rashid et al. (2017)
	Aumento en la concentración total de N en raíz, retoños, número de semillas y rendimiento. Disminución en peso fresco de vainas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	1, 3, 6, g/L	80-94 nm	Aplicación en suelo durante irrigación	Medina-Perez et al. (2018)
	Aumento en longitud de tallo y raíz, y producción de biomasa en <i>Spinacia oleracea</i> L.				
Ag	Favorece la tasa de crecimiento de espinada en dosis y tiempo dependiente. La longitud de tallo y raíz fue mayor que el control. También un efecto positivo en producción de biomasa	100, 150, 200 mg	—	Crecimiento en hidroponia	Jeyasubramanian et al. (2016)
	AgNPs promueven el número de hojas, longitud de raíz y tallo y germinación de semillas.	200µl for each seed	8-21 nm	Soluciones	Jasim et al. (2017)
	Acumulación de AgNPs como resultado de raíces marrones en <i>P. radiatus</i> and <i>S. bicolor</i>	5, 10, 20 and 40 mg/L	10 nm	Suspensiones de NPs y crecimiento	Lee et al. (2012)



---

Inhibición en crecimiento de <i>P. radiatus</i> and <i>S. bicolor</i> bajo la máxima concentración	100, 300, 500, 1000 and 2000 mg kg <sup>-1</sup>	10 nm	en cajas Petri. Medio agar Aplicación en suelo	Lee et al. (2012)
Respuesta positiva en crecimiento de <i>B. juncea</i> and <i>V. unguiculate</i>	50 and 75 ppm	35-30 nm	Aplicación foliar	Pallavi et al. (2016)
Mejor crecimiento de <i>Bacopa monnieri</i> en comparación con AgNO <sub>3</sub>	100 ppm	2-50 nm	Aplicación en suelo	Krishnaraj et al. (2012)
Inhibición del crecimiento de cotiledones y aumento de estrés oxidativo en <i>Arabidopsis</i>	-----	8 nm	Soluciones	Syu et al. (2014)
Disminución en crecimiento de <i>Capsicum annuum</i>	0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mg/L	—	—	Vinkovic et al. (2017)

---

**Table A2. Efectos de nanopartículas de Fe y Ag en poblaciones microbianas a diferentes concentraciones**

Nanopartícula	Concentración	Efecto	Referencia
Ag NPs	0.14 mgkg <sup>-1</sup>	Modificación de comunidad bacteriana y riqueza de unidades taxonómicas operacionales	Colman et al. (2013)
	40 mg L <sup>-1</sup>	Disminuye la abundancia de bacterias nitrificantes en lodos	Yang et al. (2014)
	20 mg L <sup>-1</sup>	Disminuye la producción de nitrato en medio de cultivo cuando <i>Nitrosomonas europaea</i> , se expuso a AgNPs	Arnaout and Gunsch (2012)
	0.01 mg kg <sup>-1</sup>	Después de un año de exposición se observe un efecto negative en la biomasa microbianay en la abundancia de microorganismos fijadores de N	Grün et al. (2018)
	50 mg kg <sup>-1</sup>	Cambios en composición de comunidades bacterianas en suelo: disminución en abundancia relativa de Acidobacteria y Verrucomicrobia y un aumento en Proteobacteria	McGee et al. (2017)
$\overline{\gamma - Fe_2O_3}$	1.26 mg g <sup>-1</sup>	Los perfiles DGGE revelan efectos dependientes de la concentración (impacto beneficioso) sobre la estructura de la comunidad bacteriana en el suelo agrícola	He et al. (2011)

---

Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10 mg kg <sup>-1</sup>	El recuento microbiano presenta valores de resistencia más altos. Reducción de <i>Pseudomonas</i>	Kumar et al. (2019)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10 g kg <sup>-1</sup>	Las NPs afectan la composición de la comunidad bacteriana del suelo con base a las huellas digitales de DGGE, lo que sugiere toxicidad	Ben-Moshe et al. (2013)
Fe-NP	550 mg	No existe un efecto sobre la riqueza bacteriana, pero algunos géneros se vieron afectados: las <i>Sphingomonas</i> y <i>Lysobacter</i> disminuyeron	Shah et al. (2014)

---

