



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD SALTILLO**

**“Infección Micorrizal en Plántulas de Maíz Cultivadas en un Suelo  
Contaminado con PAHs y Tratado con Nanopartículas de ZnO”**

**T E S I S**

Que presenta

**ANDREA YAKELIN PÉREZ MORENO**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN**

**SUSTENTABILIDAD DE LOS RECURSOS NATURALES Y  
ENERGÍA**

Directores de la Tesis:

Dr. Fabián Fernández Luqueño

Dr. Francisco Javier Rodríguez Varela

## **AGRADECIMIENTOS**

En este trabajo quiero agradecer a Dios, por la gracia de los hábitos adquiridos de las ciencias naturales y de la tecnología, entregados como el don de la ciencia.

Al Dr. Rafael Bujanos Muñiz, un amigo que no me permitió rendirme en la mediocridad, siempre desafiando mi intelecto, “Si sabe leer, sabe hacer más de lo que cree”.

A mis directores, el Dr. Fabián Fernández y Dr. Francisco J. Rodríguez, por brindarme la confianza para la realización del presente proyecto. A mi revisora la Dra. Dulce Y. Flores por sus comentarios. Todos ellos parte de mi formación profesional y personal.

A mis padres, José A. Pérez y Agripina Moreno, quienes me han guía con las palabras precisas, así también llenan mis sueños de esperanzas. A mis hermanos por sus buenos consejos y apoyo incondicional, y no pueden faltar mis sobrinas, por motivarme siempre a buscar más respuestas, con la inquietud que ellas poseen.

A mis grandes amigos y colegas, Andrés Arredondo y Juan Arriaga, siempre me ofrecen buenas charlas para debatir las necesidades del campo agrícola, mejorando la relación ciencia-campo, un motivo mutuo.

A mis amigos y compañeros del programa SRNYE, quienes con paciencia me compartieron su conocimiento.

Agradezco la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en conjunto con la Secretaría de Energía (SENER) para la realización de mis estudios de maestría. Así también a la beca CINVESTAV por el financiamiento otorgado para la realización de estancias de investigación, en conjunto con las universidades receptoras: Universidad Autónoma de Chapingo y Universidad Autónoma de Tlaxcala.

## **ABREVIACIONES.**

<b>AFA</b>	Solucion AFA; Alcohol,Formol, Ácido Acético
<b>ABTS</b>	2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
<b>ANTH</b>	Antraceno
<b>DPPH</b>	2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo
<b>EAA</b>	Miligramos equivalentes de ácido ascórbico
<b>EGA</b>	Miligramos equivalentes de ácido gálico
<b>EQ</b>	Miligramos equivalentes de Quercetina
<b>FESEM</b>	Field Emission Scanning Electron Microscopy
<b>HMA</b>	Hongo micorrízico arbuscular
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>PAHs</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>PHE</b>	Fenantreno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SMA</b>	Simbiosis micorrízica arbuscular
<b>SPAD</b>	Soil Plant Analysis Development
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>ZnO-NP</b>	Nanopartículas de oxido de zinc

## **GLOSARIO.**

### **A-**

**Adsorción.-** Incorporación y adhesión de un gas, un líquido o una sustancia disuelta a una fina capa de moléculas de la superficie de un sólido.

**Agente quelatante.-** Sustancia que posee varios sitios que pueden formar enlaces de coordinación con iones metálicos

### **B-**

**Bioacumulación.-** Acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en su medio.

**Biodegradación.-** Descomposición natural y no contaminante de una sustancia o producto por la acción de agentes biológicos.

### **C-**

**Calidad del suelo.-** Aptitud de este para un uso específico, por lo que se consideran tanto propiedades físicas y químicas como biológicas.

**Contaminante recalcitrante.-** Aquel que, por tener una estructura muy estable químicamente, se resisten al ataque de los microorganismos o de cualquier mecanismo de degradación, sea biológico o químico.

**Córtex radical.-** Región de la raíz comprendida entre la rizodermis y el cilindro vascular.

### **F-**

**Fitonanorremediación.-** El uso de nanomateriales manufacturados en conjunto con las plantas para facilitar la degradación y extracción de los contaminantes presentes en el suelo.

**Fitorremediación.-** Técnica que aprovecha la capacidad de las plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo.

**Fotocatálisis.-** Aceleración de una fotorreacción en presencia de un catalizador.

**Fotodegradación.-** Degradación causada por la absorción de luz visible y ultravioleta.

### **H-**

**Homeostasis.-** Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo.

### **I-**

**Inocuo.-** No produce algún daño.

**In situ.-** Expresión latina que significa “en el sitio”.

**L-**

**Lípido.-** Grasa, sustancia orgánica insoluble en agua que se encuentra en el tejido adiposo, constituida por una mezcla de ácidos grasos y ésteres de glicerina y sirve como reserva de energía.

**Lipofilico.-** Comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos

**Lixiviación.-** Proceso en el que un disolvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado produciéndose la disolución de uno de los componentes del sólido.

**N-**

**Nanomateriales.-** Son materiales con tamaños de 1 a 100 nm.

**O-**

**Oxidación química de contaminantes.-** Cuando se utilizan sustancias químicas oxidantes, para generar una reacción química que destruye los contaminantes y produce subproductos inocuos.

**P-**

**Persistentes.-** Existe por un tiempo mayor a lo habitual o de forma continua.

**Simbiosis.-** Asociación íntima de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital.

**R-**

**Resiliencia.-** Capacidad propia del suelo para regenerar su productividad.

**T-**

**Torotogénico.-** Produce malformaciones en el embrión o feto.

**U-**

**Ubicuo.-** Que está presente en todas partes.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	3
2.1.1. Estructuras básicas de los HMA.....	3
2.1.2. Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular.....	5
2.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	7
2.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos agrícolas.....	8
2.3. Remediación de suelos contaminados por PAHs.....	9
2.3.1. Fitorremediación de PAHs.....	10
2.3.2. Nanorremediación de PAHs.....	11
2.3.3. Técnicas de remediación asistidas por HMA.....	12
2.4. Respuesta del ecosistema simbiótico a la dosificación de nanopartículas.....	15
2.4.1. Relación nanopartículas y estrés oxidativo inducido.....	16
2.4.2. Actividad antioxidante.....	16
2.4.3. Evaluación por enfoque Metabolómico.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. METODOLOGÍA CIENTÍFICA.....	22
6.1. Materiales.....	22
6.1.1. Muestreo y caracterización del suelo experimental.....	22
6.1.2. Preparación del inoculante del Hongo Micorrízico Arbuscular (HMA).....	27
6.1.3. Evaluación de la viabilidad de la semilla de maíz ( <i>Zea mays</i> L.).....	27
6.1.4. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de ZnO (ZnO-NP).....	28
6.2. Ensayo experimental.....	29
6.2.1. Diseño de tratamientos.....	29

6.3.	Muestreo y análisis de laboratorio.....	31
6.3.1.	Análisis químico del suelo después del ensayo experimental.....	31
6.3.2.	Extracción de muestras para el análisis de PAHs en el suelo. ....	32
6.3.3.	Evaluación morfológica de las plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.). ....	33
6.3.4.	Unidades SPAD como indicador de clorofila. ....	33
6.3.5.	Caracterización de la infección micorrizal. ....	33
6.3.6.	Evaluación de la actividad antioxidante de las plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)...	34
6.3.7.	Determinación del perfil metabolómico no dirigido, por HPLC-MS. ....	37
6.4.	Análisis estadístico. ....	38
7.	RESULTADOS.....	39
7.1.	Caracterización inicial del material. ....	39
7.1.1.	Caracterización del suelo. ....	39
7.1.1.1.	Características fisicoquímicas.....	39
7.1.1.2.	Características de los HMA presentes en el suelo. ....	39
7.1.2.	Características de la semilla de maíz ( <i>Zea mays</i> L.). ....	41
7.1.3.	Características fisicoquímicas de ZnO-NP.....	41
7.1.4.	Curvas de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante en las plántulas de maíz.....	43
7.2.	Variables de respuesta evaluadas en el suelo. ....	45
7.2.1.	pH y CE. ....	45
7.2.3.	Concentración final de PAHs. ....	47
7.3.	Variables de respuesta evaluadas en plántulas. ....	49
7.3.1.	Unidades SPAD.....	49
7.3.2.	Resultados de la caracterización morfológica de las plántulas de maíz. ....	50
7.3.3.	Porcentaje de infección micorrizal en la raíz. ....	53
7.4.	Actividad antioxidante en las plántulas de maíz.....	57
7.5.	Producción de metabolitos secundarios por las plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.)..	58
8.	DISCUSIÓN.....	60
8.1.	Características del suelo.....	60
8.2.	Fitonanorremediación de PAHs. ....	60
8.3.	Desarrollo del cultivo. ....	61

8.3.1. Unidades SPAD.....	61
8.3.2. Caracterización morfológica de las plántulas de maíz. ....	62
8.4. Actividad antioxidante e infección micorrizal en la raíz. ....	64
8.5. Metabolómica. ....	66
9. CONCLUSIONES.....	67
10. BIBLIOGRAFÍA. ....	68



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de la relación beneficio-costo dentro de las posibles relaciones simbióticas HMA-Planta; descrita por Smith & S.E. Smith (2013) [25]. .....	6
<b>Tabla 2.</b> Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) sobre la degradación de fenantreno y antraceno (PAHs) y la infección por hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) cultivadas en un suelo agrícola. ....	30
<b>Tabla 3.</b> Composición química de las nanopartículas de ZnO (% e.p.), por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) y absorción atómica (AA). ....	43
<b>Tabla 4.</b> Características químicas del suelo: pH y CE, al final del ensayo experimental. Los datos son resultado del ANOVA de una vía (media $\pm$ error estándar). Diferentes letras indican los niveles de significancia entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	46
<b>Tabla 5.</b> Concentración final de fósforo (P), potasio (K) y zinc (Zn), al final del ensayo experimental. Los datos del ANOVA de una vía son la media $\pm$ error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). ....	47
<b>Tabla 6.</b> Efecto de los tratamientos sobre las características morfológicas de las plántulas de <i>Zea mays</i> L. Los datos del ANOVA de una vía son la media $\pm$ error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). ....	51
<b>Tabla 7.</b> Valores de F y $p$ de factores e interacciones de factores en variables morfológicas de plántulas en el análisis ANOVA de dos y tres vías. ....	52
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los tratamientos sobre los indicadores de la simbiosis micorrízica arbuscular en raíz de <i>Zea mays</i> L. Los datos del ANOVA de una vía son la media $\pm$ error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	54
<b>Tabla 9.</b> Valores de F y $p$ de factores e interacciones de factores en indicadores de asociación micorrízica arbuscular en el análisis ANOVA de dos y tres vías.....	55
<b>Tabla 10.</b> Efecto de los tratamientos sobre la producción de antioxidantes en <i>Zea mays</i> L. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en colonización. a) Crecimiento intracelular e intercelular de la hifa en la corteza de la raíz, b) Formación de arbusculos dentro de las células corticales [23].	4
<b>Figura 2.</b> Esporas de hongos micorrízicos arbusculares activas. a) Espora en contacto superficial, b) Espora con tubos germinativos [23].	5
<b>Figura 3.</b> Simbiosis con patrón de colonización <i>Paris</i> [23].	7
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. a) Forma lineal del antraceno, b) Forma angular del fenantreno [31].	8
<b>Figura 5.</b> Estrategias que componen a la técnica de Fitorremediación [42].	10
<b>Figura 6.</b> Fitorremediación asistida por hongos micorrízicos arbusculares para la disipación de PAHs (Modificado de Rajtor y Piotrowska-Seget (2016) [52]).	14
<b>Figura 7.</b> Parcela de muestreo de suelo ubicada en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.	23
<b>Figura 8.</b> Esporas de hongos micorrízicos arbusculares presentes en el conteo de caracterización del suelo experimental. a) Conjunto de esporas de hongos micorrízicos arbusculares observadas en microscopio estereoscópico, b) Espora madura de <i>Glomus</i> sp., c) Esporas de <i>Acaulospora</i> sp. [Montadas en PVLG (40 ×)].	40
<b>Figura 9.</b> Esporas de hongos micorrízicos arbusculares extraídos del suelo experimental. a) <i>Gigaspora</i> sp., muestra hifa sustentora, b) <i>Gigaspora margarita</i> , c) <i>Glomus</i> sp., d) <i>Rhizophagus irregularis</i> , e) <i>Gigaspora</i> sp., f) <i>Clareidoglomus</i> sp., g-h) <i>Rhizophagus irregularis</i> . [Montadas en PVLG (40 × y 100 ×)].	40
<b>Figura 10.</b> Prueba de germinación de semillas de maíz con tratamiento de lavado superficial (etanol-hipoclorito).	41
<b>Figura 11.</b> Micrografía (FESEM) de Nanopartículas de óxido de Zn a 100,000 ×.	42
<b>Figura 12.</b> Patrón de DRX de Nanopartículas de óxido de Zn (ZnO-NP).	43
<b>Figura 13.</b> Curvas de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante de las plántulas de maíz. a) Curva para la expresión de fenoles, empleando ácido gálico (AG), b) Curva para la expresión de flavonoides a partir de Quercetina (Q), c-d) Curva de calibración para los radicales DPPH y ABTS, respectivamente, utilizando ácido ascórbico (AA).	45

<b>Figura 14.</b> Concentración final de Antraceno en el suelo experimental. Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	48
<b>Figura 15.</b> Concentración final de Fenantreno en el suelo experimental. Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).....	49
<b>Figura 16.</b> Unidades SPAD en hoja de plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.), cultivadas en un suelo contaminado con antraceno y fenantreno (PAHs), tratado con nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Donde DDS refiere a los días después de la siembra. ....	50
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de infección micorrizal en raíces de plántulas de maíz ( <i>Zea mays</i> L.) en un suelo contaminado con antraceno y fenantreno (PAHs), tratado con nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). ....	53
<b>Figura 18.</b> Colonización micorrízica arbuscular. a) colonización tipo Arum en T8, interacción AMF + ZnO-NP (150 mg kg <sup>-1</sup> ) b) esporas en estado de latencia en T12 interacción PAHs + AMF + ZnO-NP (300 mg kg <sup>-1</sup> ), c) vesícula d) arbusculos maduros en T8. ....	56
<b>Figura 19.</b> Análisis jerárquico de conglomerados (hierarchical cluster analysis, HCA). El dendograma de distancia euclidiana asocia los tratamientos con abundancia similar respecto a las señales masa carga (m/z).....	59

## RESUMEN

La introducción de nanopartículas en los procesos de remediación ambiental debe cumplir con un diseño seguro y sustentable, que permita eliminar los riesgos ambientales. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de las ZnO-NP sobre la degradación de antraceno, fenantreno y la infección micorrizal de *Glomus intraradices* en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en un suelo agrícola, para caracterizar los efectos secundarios del uso de ZnO-NP sobre la simbiosis *Glomus intraradices*- *Zea mays* L. Treinta y seis plantas de maíz, en igual número de unidades experimentales, fueron cultivadas en un suelo agrícola bajo condiciones de invernadero con un diseño completamente aleatorizado. El diseño factorial de 12 tratamientos se llevó a cabo con ZnO-NP (0, 150 o 300 mg kg<sup>-1</sup>), dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs; 0 o 200 mg antraceno kg<sup>-1</sup> suelo seco + 400 mg fenantreno kg<sup>-1</sup> suelo seco) y con o sin la adición del inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Los resultados muestran que los PAHs disminuyeron significativamente la altura de planta. Los HMA y en interacción con las ZnO-NP (150 mg kg<sup>-1</sup>) incrementaron la remoción de PAHs, así como del porcentaje de infección micorrizal, respecto al control. Adicionalmente, las plantas tratadas con PAHs + HMA + ZnO-NP incrementaron la producción de fenoles cuando la dosis de ZnO-NP fue 300 mg kg<sup>-1</sup>. Los resultados sugieren que el suelo agrícola empleado en esta investigación es de buena calidad como se evidenció a través de su capacidad de resiliencia luego de ser tratado con PAHs, ZnO-NP y HMA. El grado de estrés oxidativo inducido por las diferentes dosis de ZnO-NP favoreció la síntesis bioquímica de las plantas e incrementó la comunicación bioquímica entre los simbioses. La fitonanorremediación no presentó una mayor degradación de antraceno y fenantreno en comparación con la fitorremediación sin aplicación de nanopartículas. El estrés generado por la presencia de PAHs favoreció la producción de metabolitos secundarios, a través de la actividad antioxidante, pero este estrés fue aliviado por los HMA, incrementando la actividad antioxidante y mitigando el efecto de los PAHs. El uso de HMA para asistir los procesos de fitorremediación representa una alternativa sustentable al ser ecológica y económicamente viable, debido a su capacidad para tratar contaminantes como los PAHs, distribuidos de manera variable a lo largo de los horizontes de suelos poco profundos.

## ABSTRACT

The introduction of nanoparticles in environmental remediation processes must have a safe and sustainable design, which allows the elimination of environmental risks. The objective of this research was to determine the effect of ZnO-NP on the degradation of anthracene and phenanthrene and mycorrhizal infection of *Glomus intraradices* in corn plants (*Zea mays* L.) cultivated in agricultural soil, to characterize the side effects of the use of ZnO-NP on the *Glomus intraradices*-*Zea mays* L. symbiosis. Thirty-six corn plants, in the same number of experimental units, were grown on agricultural soil under greenhouse conditions with a completely randomized design. The factorial design of 12 treatments was with ZnO-NP (0, 150 or 300 mg kg<sup>-1</sup>), two aromatic polycyclic hydrocarbons (PAHs; 0 or 200 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil + 400 mg phenanthrene kg<sup>-1</sup> dry soil) and with or without the addition of arbuscular mycorrhizal fungal inoculum (AMF). PAHs significantly decreased plant height. AMF and its interaction with ZnO-NP (150 mg kg<sup>-1</sup>) significantly increased the removal of PAHs. ZnO-NP significantly increased the percentage of mycorrhizal infection, compared to the control. Plants treated with PAHs + AMF + ZnO-NP significantly increased phenolic production when the dose of ZnO-NP was 300 mg kg<sup>-1</sup>. The agricultural soil used in this research has good quality, as witnessed its resilience after being amended with PAHs, ZnO-NP, and AMF. The degree of oxidative stress induced by the different doses of ZnO-NP favored the biochemical synthesis of the plants and increased the biochemical communication between the symbionts. Phytoremediation is not significantly better than the phytoremediation technique, in terms of degradation of anthracene and phenanthrene. The stress generated by the presence of PAHs favored the production of secondary metabolites, through antioxidant activity, but this stress was alleviated by the AMF, increasing antioxidant activity and mitigating the effect of PAHs. The use of AMF to assist phytoremediation processes represents a sustainable alternative to being ecologically and economically viable, due to its ability to treat pollutants such as PAHs, distributed in a variable way along the horizons of shallow soils.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La contaminación del suelo es una amenaza para la estabilidad de los agroecosistemas. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) son contaminantes orgánicos persistentes con propiedades mutagénicas, carcinogénicas y terotogénicas para todos los organismos vivos. La concentración de PAHs en el ambiente está relacionada con la calidad del suelo y asociada con la salud humana [1]. La mayoría de los PAHs alcanzan los suelos a través de la deposición atmosférica, por la cercanía con fuentes contaminantes, tales como, pozos de petróleo y gas, refinerías y sitios de producción de gas manufacturado [2]. De manera directa, en los suelos agrícolas, la aplicación de plaguicidas incrementa la concentración de PAHs [3], acumulándose entre sus agregados y el espacio poroso, lo que facilita la migración de estos componentes a través del perfil del suelo en función de la actividad enzimática y microbiana [4,5].

Se ha demostrado que un  $\text{cm}^3$  de suelo tiene entre 3000 y 5000 especies de microorganismos y un rango de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  células de microorganismos. De ellos, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) destacan por su relevancia agrícola y ambiental al entrar en simbiosis mutualista con más de 250,000 especies de plantas [6]. Esta simbiosis mutualista se describe como una interacción en la que ambos ‘socios’ se benefician; los HMA adquieren carbono de la planta, mientras que las plantas obtienen nutrientes a través del hongo [7]. Además, los HMA desempeñan un papel esencial para inducir en las plantas mecanismos de resistencia a diferentes tipos de estrés, como salinidad y contaminación [8].

Debido a que los PAHs están sujetos a procesos de fotodegradación [9] y oxidación, en los últimos años el uso de nanopartículas oxidativas dentro de las tecnologías de remediación, se ha convertido en un tema de investigación con carácter ambiental. Estos materiales de dimensión nana (1-100 nm de tamaño) permiten la remediación *in situ*, incluso en suelos profundos. De esta manera se reconoce la tecnología de nanorremediación y se puede integrar con la biorremediación, para mejorar la degradación de PAHs [10].

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) permiten la degradación de los compuestos orgánicos a través del proceso redox y a su vez forman parte de los nanomateriales fotocatalíticos más sintetizados y estudiados, debido a su bajo costo y estabilidad química [11,12]. A pesar de tan prometedoras características, las innovaciones nanotecnológicas aplicadas a la remediación del suelo y agua podrían implicar un impacto ambiental negativo, en términos de su capacidad de dispersión, efectos de ecotoxicidad en organismos, persistencia en el ambiente, bioacumulación y bioconcentración en organismos de orden superior, sin posibilidad de reversibilidad. Por lo que la aplicación de esta tecnología de remediación debe cumplir con un diseño seguro y sustentable que permita eliminar los riesgos ambientales [13].

El maíz (*Zea mays* L.), junto con el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) son los cultivos más importantes a nivel mundial [14]. Sin embargo, el centro de origen del maíz es México, mientras que los centros de origen del trigo y arroz son en Medio Oriente y China, respectivamente. En esta investigación se empleó el cultivo de maíz con base en su importancia histórica, económica y social en México y el mundo. La dieta humana y parte de la actividad ganadera e industrial está basada en el cultivo de maíz. Los principales países productores de maíz son EE. UU., China, Brasil y la Unión Europea [15]. El cultivo del maíz se ha empleado como planta modelo en múltiples ensayos para evaluar diversos factores contaminantes, principalmente metales y PAHs [16].

El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos de las ZnO-NP sobre la degradación de PAHs y la infección micorrizal en plántulas de maíz cultivadas en suelo agrícola, mediante: i) la cuantificación de remoción de PAHs del suelo, ii) la caracterización del proceso de infección de los HMA en raíz, iii) la identificación de metabolitos secundarios sintetizados en la plántula de maíz y iv) el comportamiento fisiológico de las plántulas.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).**

Este tipo de hongos son biotrofos obligados al depender completamente de la planta para su desarrollo; cuando no están asociados a una planta únicamente están en el suelo como esporas en reposo. Se consideran asexuales, aunque las hifas de cepas genéticamente distintas pueden anastomosar, es decir fusionarse e intercambiar material genético [17].

La interacción simbiótica-mutualista HMA-planta se ha descrito como fundamental para que las plantas prosperen en ambientes hostiles, especialmente en aquellos ecosistemas agrícolas donde las plantas se exponen a una gran variedad de tensiones [18]. En procesos de remediación, los HMA presentan la posibilidad de recombinar y expresar genes que inducen la hiperacumulación de moléculas orgánicas xenobióticas (herbicidas, insecticidas, acaricidas e hidrocarburos, entre otros) [19]. Existen informes que muestran mejores rendimientos fisiológicos y de producción en plantas con infección micorrizal aun estando sometidas a condiciones de estrés, tales como, salinidad y contaminación por metales pesados, evidenciando mayor eficiencia fotosintética, además de mejorar la absorción y el transporte de agua [20].

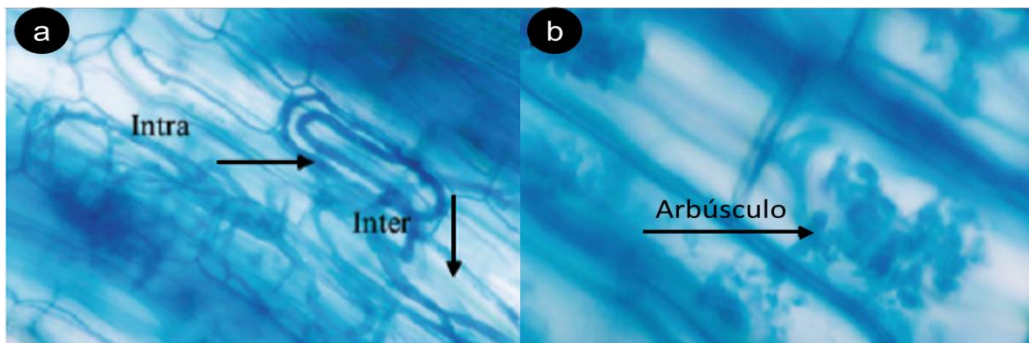
En cuanto a la abundancia y diversidad de los HMA, está se encuentra influenciada por factores como la calidad del suelo, de esta manera, aquellos suelos que se encuentran sujetos al uso de insumos químicos para la producción de cultivos, comúnmente, tienen poca diversidad de HMA [21].

#### **2.1.1. Estructuras básicas de los HMA.**

Los hongos glomeromicetos abarcan una enorme diversidad de estructuras con orígenes, morfologías y funciones variadas. El crecimiento de sus hifas puede ocurrir dentro de las células (intracelular) o entre las células (intercelular) del córtex radical (Figura 1a). Las hifas intracelulares son capaces de transferir nutrientes, metabolitos y agua del exterior de la raíz de quien funge como su huésped, intercambiando estas sustancias por recursos energéticos



[22]; al ingresar en las células del córtex radical se desarrollan los arbusculos, estructuras arbóreas que manifiestan ramificaciones dicotómicas repetidas (Figura 1b). La formación de arbusculos prolifera alrededor de las hifas ramificadas y se acompaña de la alteración en la morfología de la célula huésped *i.e.*, el volumen del citoplasma y de los orgánulos aumenta [17].

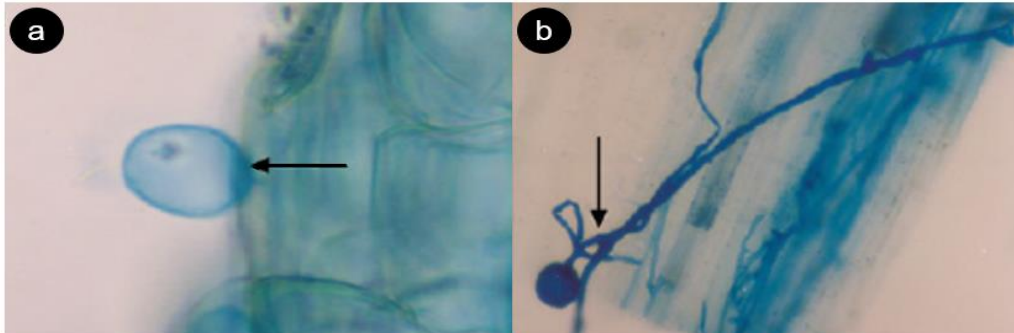


**Figura 1.** Estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en colonización. a) Crecimiento intracelular e intercelular de la hifa en la corteza de la raíz, b) Formación de arbusculos dentro de las células corticales [23].

En algunos casos, se forman órganos de almacenamiento intercelular, llamados vesículas, las cuales emplean lípidos como almacén de energía. Las vesículas se suelen formar en la parte terminal de las hifas, asumiendo formas de tipo globular, oblongo, lobulado irregular o rugoso. Estas estructuras no se presentan en algunos géneros del Orden Diversisporales, como es el caso de *Gigaspora* y *Scutellospora* [22,24] pero, tienden a desarrollar células auxiliares.

Las esporas son las principales estructuras de supervivencia que presentan los HMA; su formación en racimos o esporocarpios puede tomar lugar en el suelo o en las raíces. Las esporas pueden estar inactivas en un estado latente o activas, pero en HMA generalmente son activas infecciosas, ya que forman tubos germinativos (Figura 2a). Las esporas se componen de lípidos y citoplasma, adoptan formas globosas, subglobosas o irregulares, difiriendo en

tamaños y colores. Por lo general las esporas se forman en las primeras semanas posteriores al inicio de la colonización micorrízica (Figura 2b) [22].



**Figura 2.** Esporas de hongos micorrízicos arbusculares activas. a) Espora en contacto superficial, b) Espora con tubos germinativos [23].

### 2.1.2. Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular.

Todas las comunidades de HMA logran una interacción simbiótica, al generar relaciones asociativas permanentes con organismos de otra especie, la cual es conocida como simbiosis micorrízica arbuscular; esta se genera mediante el desarrollo de una extensa área de superficie de contacto entre la raíz de la planta y las células fúngicas [17]. La simbiosis micorrízica arbuscular (SMA) es considerada un mutualismo clásico, ya que al entrar en interacción ambos socios se benefician [7], de tal manera que los HMA obtienen de la planta el carbono necesario para completar su ciclo de vida, mientras que la principal contribución de los HMA hacia la planta es ayudar con la adquisición de nutrientes minerales [17].

Para evaluar la relación beneficio-costos de la SMA dentro de las posibles relaciones simbióticas entre hongos y plantas, se ha encontrado una posible asimetría ya que al analizar independientemente ambos socios (Tabla 1), el HMA resulta mayormente beneficiado al tener una respuesta siempre positiva, en el caso contrario, al analizar complementariamente la SMA se demuestra mayor beneficio que costo y un mejor desarrollo de aptitudes en la planta [25].

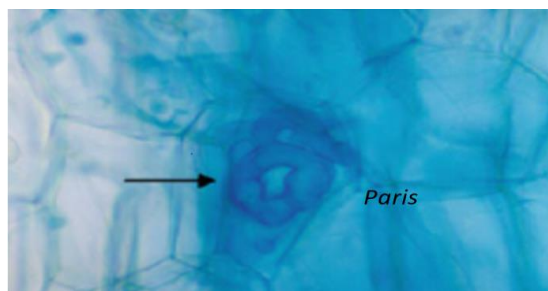
**Tabla 1.** Descripción de la relación beneficio-costo dentro de las posibles relaciones simbióticas HMA-Planta; descrita por Smith & S.E. Smith (2013) [25].

	Mutualismo	Comensalismo	Parasitismo
Definición	Relación que beneficia a ambas especies relacionadas	Uno de los socios resulta beneficiado mientras que el otro no se ve afectado	Relación en la que un socio se beneficia a expensas de otro
Relación beneficio-costo	Beneficio > costo	Beneficio = costo	Beneficio < costo
Respuesta individual del HMA	Positivo	Positivo	Positivo
Respuesta individual de la planta	Positivo	Neutral	Negativo
Resultado para la planta con HMA	Desarrollo de aptitudes superiores al interactuar con el HMA	No presenta cambios de aptitud al no interactuar con el HMA	Pérdida de aptitudes, por efecto negativo del HMA

El proceso de SMA inicia con la germinación de las esporas (*fase asimbiótica*), posteriormente se observa la *fase pre-simbiótica*, donde ambos simbioses (HMA y planta huésped) se comunican por señalizaciones químicas que estimulan cambios en el metabolismo del hongo. Las enzimas no agresivas de la pared celular se vuelven activas y ambos simbioses cambian su patrón de expresión genética y morfológica, de manera que este puede llegar al desarrollo del micelio y la ramificación de hifas, quienes serán las encargadas de establecer contacto físico con la raíz del huésped a través del ingreso a la epidermis, penetrando en las paredes celulares para extender sus arbusculos, este proceso es mejor conocido como *fase simbiótica* [26].

Es importante destacar que los arbusculos pueden asumir uno de los dos patrones de colonización, identificados como *Arum* y *Paris* [22]. El tipo *Arum* corresponde a una

propagación predominante por hifas intercelulares (se propagan dentro del córtex radical), mientras que el tipo *Paris* se diferencia por hifas intracelulares que toman una forma espiral para propagarse directamente de una célula a otra y de estas se pueden desarrollar arbuscúlos [7] (Figura 3).



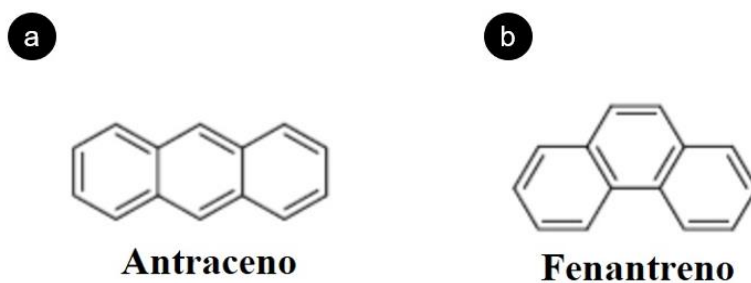
**Figura 3.** Simbiosis con patrón de colonización *Paris* [23].

## **2.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.**

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son una familia de compuestos que contienen dos o más anillos de benceno fusionados, clasificados como contaminantes orgánicos persistentes de clase ubicua, estos compuestos son formados por la combustión incompleta de hidrocarburos volátiles en carbón, petróleo, madera, tabaco, compuestos macromoleculares orgánicos y otros compuestos orgánicos. La intensificación industrial de la producción de sustancias agroquímicas, ha contaminado severamente el suelo, así como otras actividades antropogénicas. La pirólisis de materia orgánica, es una descomposición química inducida por calor en ausencia de oxígeno, donde los productos pueden ser gases residuales (metano, etano y pequeñas cantidades de hidrocarburos ligeros), condensados acuosos o aceitosos, y residuos sólidos carbonosos [27]. Las áreas con alta densidad de población urbana, muestran altas concentraciones de PAHs principalmente emitidas por el tráfico vehicular, mientras que las regiones rurales difieren su concentración según la proximidad a algunas fuentes directas de PAHs [28]. Los PAHs representan una amenaza para la salud humana y la seguridad ecológica, debido a la variabilidad y distribución de las fuentes contaminantes, así como por su transporte de largo alcance en el medio ambiente. En los últimos años, los PAHs se nombraron los contaminantes más importantes en los EE. UU. y China, donde la acumulación de PAHs en los suelos agrícolas implican mayor riesgo

carcinogénico para la salud humana. En estos países los suelos agrícolas tienen 45% de posibilidad de exceder el valor umbral aceptable ( $1 \times 10^{-6}$ ) de riesgo carcinogénico total estimado, en una escala en la que el valor máximo es  $1 \times 10^{-4}$  [29]; sin embargo la contaminación por PAHs no es un problema que se atribuya a un par de países, sino un problema mundial.

El antraceno se compone de tres anillos de benceno condensados de forma lineal (Figura 4a), es un compuesto policíclico tóxico utilizado en colorantes e insecticidas y se encuentra en abundancia en sitios de extracción de gas. Es esencialmente soluble en agua, exhibe un alto potencial de bioacumulación y es altamente recalcitrante al ataque nucleófilo, motivo por el cual resiste la biodegradación. El fenantreno es un isómero comúnmente detectado con tres anillos de benceno fusionados en forma angular (Figura 4b), los cuales le brindan alta resistencia a la fotodegradación [30].



**Figura 4.** Estructura molecular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. a) Forma lineal del antraceno, b) Forma angular del fenantreno [31].

### 2.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos agrícolas.

El suelo es un buen indicador de la contaminación por PAHs en el medio ambiente, dado que son escasamente solubles (de naturaleza hidrofóbica) y pueden ser adsorbidos por la materia orgánica contenida en este [32]. Los PAHs en el suelo pueden existir como fracción desorbida, débilmente adsorbida y fuertemente adsorbida [33].

Las principales fuentes de contaminación de los PAHs para los suelos agrícolas son la deposición atmosférica, el riego con aguas residuales o el uso de lodos residuales como

enmienda orgánica [34]. Por ello se espera que la mayoría de PAHs derivados de la combustión se encuentran en horizontes poco profundos del suelo, sin embargo, algunos datos muestran lo contrario y afirman que este tipo de contaminantes pueden lixivarse muy por debajo de los 15 cm de profundidad [35].

Este tipo de contaminantes afectan negativamente las propiedades biológicas y fisicoquímicas del suelo, como la biodiversidad microbiana, la actividad enzimática, la capacidad de retención del agua, la aireación del suelo y la disponibilidad de nutrientes. En el estudio de Liu *et al.*, (2016) [36] evaluaron la distribución y concentración de PAHs en los suelos agrícolas de la provincia de Shanxi en China, reportando principalmente la presencia de fluoranteno, benzo [ $\alpha$ ] pireno, acenaftileno, naftaleno y antraceno, de igual manera reconocieron que las actividades de los entornos influyen en los sitios de producción agrícola.

### **2.3. Remediación de suelos contaminados por PAHs.**

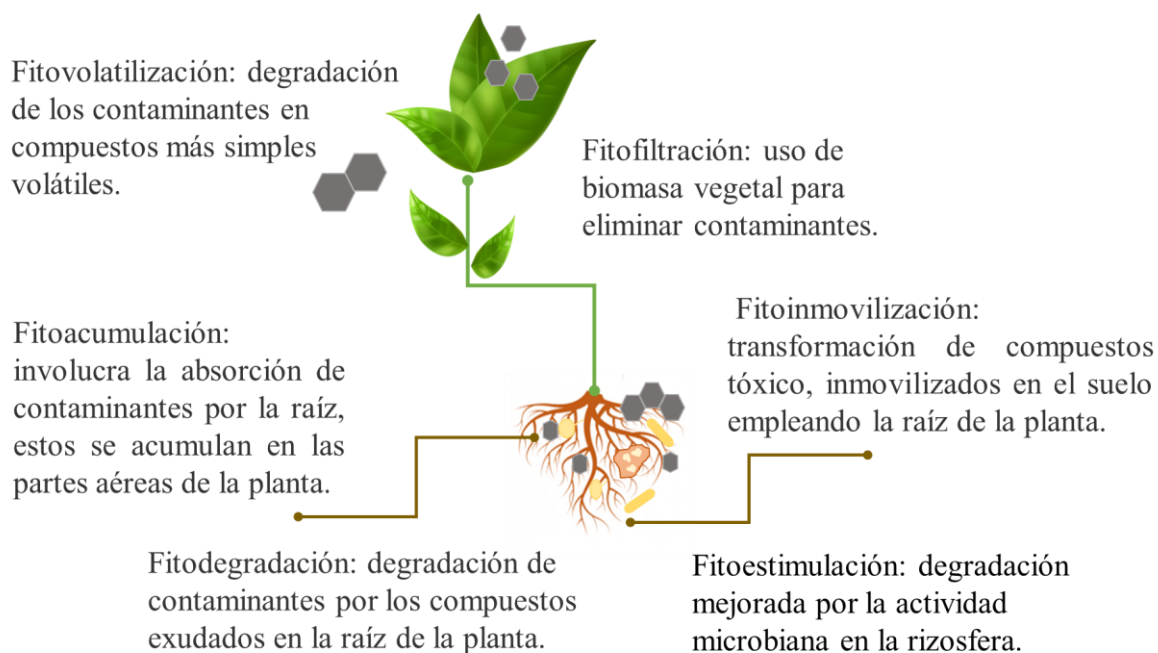
Las tecnologías de remediación se pueden clasificar generalmente como *in situ* o *ex situ*. Dentro de las tecnologías *in situ*, la biorremediación presenta un enfoque de remediación prometedor, económico y respetuoso con el medio ambiente [37]. Tanto las bacterias como las plantas pueden metabolizar los PAHs y los factores que influyen en la tasa de descomposición incluyen la presencia o ausencia de oxígeno, pH y tamaño de partícula del suelo. Otra forma de eliminar los PAHs del suelo es a través de varios procesos avanzados de oxidación, cuyo objetivo subyacente es generar iones de hidroxilo (OH<sup>-</sup>), que son extremadamente eficientes en la oxidación que conlleva a la ruptura de las estructuras de los anillos de benceno. Para reducir el costo de estos métodos, se pueden combinar con técnicas de biorremediación [38].

De acuerdo con Cecchin *et al.*, (2017) [39] se demostró por primera vez un análisis de la integración de los efectos oxido-reducción de los nanomateriales y la capacidad degradativa de los microorganismos, adjudicándole el nombre de nanobiorremediación, destacando que el uso de tecnologías complementarias permite superar las deficiencias individuales y reducir

los costos. Sin embargo, aún se sabe poco sobre el comportamiento de los nanomateriales en el suelo y su interacción con los microorganismos durante procesos de nanorremediación.

### 2.3.1. Fitorremediación de PAHs.

La Fitorremediación es una técnica que se ha considerado dentro de la biorremediación *in situ*, la cual emplea plantas para extraer, secuestrar y desintoxicar contaminantes ambientales existentes en el suelo [40]. Esta técnica se compone de diferentes estrategias como: fitoacumulación fitoextracción, fitodegradación, fitofiltración, fitoinmovilización, fitoestimulación y fitovolatilización (Figura 5).



**Figura 5.** Estrategias que componen a la técnica de Fitorremediación [42].

Por su carácter lipofílico los PAHs se transportan fácilmente por las lipoproteínas de la membrana celular, lo que les permite acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos [41]. Generalmente el ingreso de estos contaminantes a la planta se da por *fitoextracción* a través de las raíces siguiendo un transporte de tipo ascendente; tras la

absorción, los contaminantes se acumulan en las partes de las plantas, este proceso es mayormente conocido como *fitoacumulación* [42].

Las plantas emplean procesos biofísicos y bioquímicos tales como la manipulación de los contaminantes mediante la secreción de enzimas como deshidrogenasa, catalasa y polifenol oxidasa, las cuales actúan como surfactantes para aumentar la biodisponibilidad de estos rompiendo los anillos de benceno (*fitodegradación*) [43]. Se ha demostrado que los componentes de la raíz promueven la biomasa de los grupos microbianos, principalmente al proporcionar fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes, resultando una interacción sinérgica entre plantas y comunidades microbianas en la rizósfera, la cual resulta efectiva para la desintegración de compuestos orgánicos recalcitrantes (*fitoestimulación*) [44].

Wild *et al.*, (1992) [45], mencionan que los PAHs de bajo peso molecular como el antraceno y fenantreno, pueden ser más susceptibles a la absorción por las plantas, debido a que presentan mayor solubilidad que los compuestos de mayor peso molecular. Así, esos autores encontraron mayores concentraciones de fenantreno en su evaluación de muestras vegetales, principalmente en las raíces de las plantas, lo que a su vez se relacionó con la alta concentración del contaminante en el suelo. La extracción de antraceno del suelo por plantas de maíz se ha reportado efectiva, a los 22 días después del trasplante, con una remoción del 31.1 %, de una concentración inicial de 70 mg Kg<sup>-1</sup>, valor que disminuyó a 19.3 % en casos donde la contaminación por PAHs se acompañó de metales pesados como el Pb. Además, en la biomasa se observó mayor concentración de antraceno en las raíces que en el área foliar (66.9 y 20.8 µg g<sup>-1</sup> respectivamente, sin la presencia de Pb) [46].

### **2.3.2. Nanorremediación de PAHs.**

La nanorremediación incluye el uso de nanomateriales manufacturados, principalmente metales y óxidos de metal semiconductores, para limpiar los medios contaminados, como los suelos. En comparación con las técnicas de remediación *in situ* convencionales, la nanorremediación se ha convertido en un método eficaz, e incluso la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (por su siglas en inglés, USEPA) lo describe



como sustentable, al permitir tratar los contaminantes sin la adición de otros químicos, basándose en las propiedades peculiares de los materiales a nanoescala (1-100 nm), específicamente en su alta reactividad y área superficial [13].

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) se han convertido en un material de amplia aplicación comercial debido a su conocida sensibilidad fotocatalítica [47]. Este semiconductor presenta estructura de wurtzita hexagonal estable con un grupo espacial P6<sub>3</sub>mc, cuyo valor de la banda prohibida es de 3.37 eV [48]. El ZnO se activa generalmente por absorción de la luz, que excita electrones de la banda de valencia (BV) a la banda de conducción (BC), generando huecos en la BV dando origen a las reacciones de fotorreducción [49].

Durante el proceso de degradación fotocatalítica, el oxígeno adsorbido en la superficie de las nanoestructuras de ZnO genera radicales hidroxilos (HO•), los cuales son responsables de las reacciones oxido-reducción, siendo altamente eficientes y no selectivas [47]. Cuando las ZnO-NP y sus derivados como Zn<sup>+2</sup> están presentes en exceso en el suelo, pueden inducir toxicidad en las plantas [50]. Principalmente su estado iónico se ha destacado por sus efectos bactericidas [51], de manera que la citotoxicidad de este nanomaterial se ha evaluado a través de las especies de oxígeno reactivas que se generan a partir del ingreso de los iones Zn<sup>+2</sup> en las células.

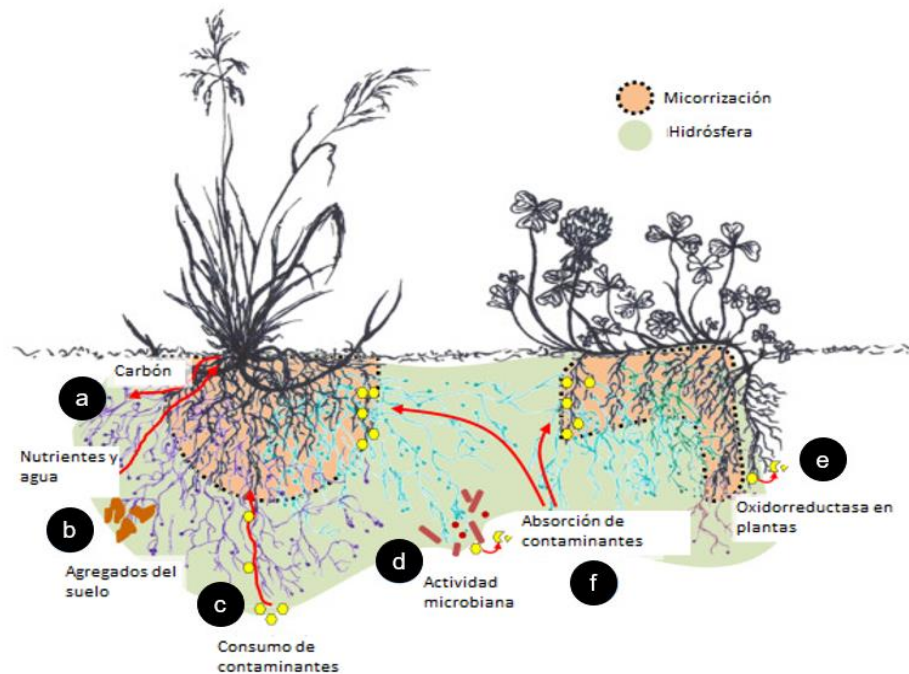
### **2.3.3. Técnicas de remediación asistidas por HMA.**

La eficacia de la fitorremediación depende de las interacciones de la planta con la microflora de la rizósfera, ya que presenta microorganismos que pueden degradar contaminantes orgánicos a través de procesos metabólicos y cometabólicos [52]. Los HMA son de especial interés para la *fitoacumulación* y *fitoestabilización* [19], al influir en la extensión de las raíces y en la concentración de antioxidantes en el suelo.

Joner & Leyval (2001) [53] estudiaron los efectos del HMA *Glomus mosseae*, respecto al desarrollo del trébol en competencia con ryegrass, en suelo contaminado con 500 mg kg<sup>-1</sup> de

antraceno,  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de criseno y  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de dibenz (a,h)antraceno. El crecimiento de los brotes y la raíz se mejoró con la adición de HMA, pero su abundancia se redujo en los tratamientos con PAHs, y se reflejó en la colonización micorrízica moderada; en el trébol se reportó del 20 al 40 % de infección en raíz, mientras que para el ryegrass la infección se definió como muy baja en un rango de 0.5 a 5 %; a pesar de ello, la concentración de P en las plantas fue mejorada por los HMA, siendo similar en suelos con y sin dosis de PAHs.

En la fitorremediación asistida por HMA para la disipación de PAHs (Figura 6), las plantas suministran C a través de azúcares (Figura 6a), las hifas mejoran la adquisición de nutrientes y absorción de agua por las plantas y brindan estabilidad a los agregados del suelo (Figura 6b), mejoran el crecimiento de las plantas a través de la absorción e inmovilización de contaminantes orgánicos en el suelo (Figura 6c). El carbono orgánico disuelto (DOC) liberado por las hifas más allá de la rizosfera estimula el desarrollo y la actividad enzimática de los microorganismos que degradan los hidrocarburos (Figura 6d). La colonización micorrízica altera el patrón de exudación de la raíz al aumentar la actividad de las oxidoreductasas, enzimas que son las principales responsables de la degradación oxidativa de los hidrocarburos aromáticos y además protegen a las plantas del estrés oxidativo (Figura 6e) y aumentar el contenido de lípidos y el volumen del área de absorción total del sistema radicular (Figura 6f).



**Figura 6.** Fitorremediación asistida por hongos micorrízicos arbusculares para la disipación de PAHs (Modificado de Rajtor y Piotrowska-Seget (2016) [52]).

Gao *et al.*, (2011) [54] evaluaron la remediación de fenantreno (PHE) y pireno (PYR) con la técnica de fitorremediación empleando alfalfa (*Medicago sativa* L.), la cual fue asistida con HMA del género *Glomus*. El resultado fue 88.1 % de remoción en el caso del PHE, cuya concentración en plantas con inoculación fue ~ 40.2 % más que en las plantas control. En un estudio similar Wu *et al.*, (2011) [55] emplearon maíz inoculado con micorriza (*Glomus mosseae*) y el crecimiento del cultivo no se vio afectado por la concentración de PHE y PYR (50 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco, respectivamente), mejorando el crecimiento de las plantas.

Lenoir *et al.*, (2016) [8] mencionan que la asociación de trigo (*Triticum aestivum*) con *Rhizophagus irregularis* (antes *Glomus intraradices*) permitió una mejor disipación de PAHs, lo cual se atribuyó a la capacidad de los HMA para almacenar estos contaminantes en los cuerpos lipídicos de sus hifas. Además, se observó un aumento de la biomasa bacteriana obteniendo altos contenidos de peroxidasa en las raíces.

## 2.4. Respuesta del ecosistema simbiótico a la dosificación de nanopartículas.

La interacción entre los HMA y las nanopartículas (NP) ha llamado mucho la atención, tanto por los efectos inhibidores como benéficos que estos nanomateriales presentan sobre la simbiosis [56]. De igual manera se han observado alteraciones fisiológicas positivas como negativas en las plantas. Por ello, es necesario comprender el mecanismo exacto en el que las NP interfieren con el metabolismo de ambos organismos.

En un experimento realizado por Wang *et al.*, (2016) [50] observaron que a medida que la dosis de las ZnO-NP aumentó, las tasas de colonización de la raíz mostraron una tendencia decreciente, disminuyendo significativamente a concentraciones  $\geq$  de 800 mg kg<sup>-1</sup>, pero no cambiaron significativamente entre la dosis cero y la dosis de 400 mg kg<sup>-1</sup>. Al evaluar la respuesta de la planta a los efectos de las ZnO-NP, la altura de planta, el peso seco de los brotes y raíces, disminuyó a dosis  $\geq$  800 mg Kg<sup>-1</sup>. La interacción ZnO-NP – *Glomus versiforme* obtuvo los mejores rendimientos a la menor dosis (400 mg Kg<sup>-1</sup>), presentó mayor crecimiento, absorción de nutrientes, contenido de pigmentos fotosintéticos y actividad de la enzima superóxido dismutasa en las hojas. La interacción de HMA con nanopartículas ayudó a disminuir la biodisponibilidad y acumulación de Zn, aumentando así los nutrientes minerales y la capacidad antioxidante de la planta [56].

Ghasemi *et al.*, (2017) [57], evaluaron el papel del HMA *Rhizophagus irregularis* en la toxicidad de ZnO-NP respecto al cultivo de fenugreco (*Trigonella foenum-gracum* L.), bajo diversas concentraciones (0, 125, 250, 375 y 500  $\mu$ g g<sup>-1</sup>). Reportaron que las plantas en presencia de HMA dieron mejor respuesta a los efectos inhibidores de las ZnO-NP, mediante la promoción de secreciones de la glicoproteína “glomalina”, un potente quelatante de metales dentro de la rizósfera, lo que redujo significativamente la absorción de Zn por la raíz y la posterior translocación al brote. Las plantas en los tratamientos con ZnO-NP mostraron disminución del tamaño de brote y de la biomasa de raíz a una concentración  $\geq$  375  $\mu$ g g<sup>-1</sup>; a esta misma concentración los tratamientos que describían la interacción HMA-ZnO-NP evidenciaron una disminución en la colonización de HMA en las raíces.

#### **2.4.1. Relación nanopartículas y estrés oxidativo inducido.**

Actualmente se debate la relación que existe entre las nanopartículas con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a que esta actividad conduce a la inhibición de los procesos celulares, perjudicando el crecimiento de la planta y la homeostasis, una regulación interna que permite a los seres vivos compensar los cambios en su entorno [58]. El estrés oxidativo es un fenómeno complejo de tipo fisiológico, bioquímico y molecular, producto del desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes [59].

Se sabe que la liberación de nanopartículas en el ambiente puede llegar a tener un impacto negativo en el metabolismo general de las plantas; para dar explicación a estos efectos se han realizado diversas hipótesis respecto al mecanismos de interacción Nanopartícula-planta. Así, estudios recientes informan que la exposición de las plantas a nanopartículas de óxidos de metal, induce en ellas la sobreproducción y acumulación de ROS [59]; sin embargo, aún se debate si la activación de ROS en realidad se deriva de la nanopartícula, o bien, de los iones liberados, que pueden participar en reacciones de óxido-reducción de un electrón y generar la peroxidación de los lipopolisacáridos y proteínas de la membrana celular, a través de la sobreproducción de ROS específicos, como el radical aniónico superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), los radicales hidroxilos ( $OH^{\cdot}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Cuando los ROS irrumpen la permeabilidad de la membrana celular, facilitan la entrada de iones tóxicos provocando la muerte celular [60]. A pesar de ello, los ROS mantienen un papel importante como moléculas de señalización, formando parte de la regulación y desarrollo de las respuestas de la planta al estrés biótico y abiótico [61]; de igual manera, los ROS están involucrados en los procesos de relación simbiótica entre los HMA y la planta [58].

#### **2.4.2. Actividad antioxidante.**

El estrés es un proceso inevitable que puede producir alteraciones significativas en el metabolismo de las plantas. Para mantener la homeostasis metabólica, las plantas producen numerosos metabolitos que combaten el estrés. Siendo el mismo estrés el que induce la primera activación de las redes de señalización en la planta, que a su vez son seguidas por

una vía de transducción de señales, así la planta induce un ajuste osmótico, activa la generación de diversas proteínas y metabolitos, que ayudan a lograr un nuevo estado de equilibrio (homeostasis metabólica) [62]. Los metabolitos secundarios son compuestos que se involucran en la supervivencia y defensa del tejido de la planta contra cualquier ambiente estresante, sin correlacionarse con las funciones de crecimiento y desarrollo del tejido vegetal.

Una vía importante del metabolismo secundario de la planta es la vía fenilpropanoide, que logra producir una gama de compuestos fenólicos, que comprenden a los flavonoides, ácidos fenólicos y algunas ligninas [63], compuestos por dos anillos de fenol unidos por un puente de propano. Estos compuestos se producen en todas las plantas en concentraciones variables, como parte del metabolismo secundario de defensa y logran proteger a los componentes celulares del daño causado por el estrés oxidativo, debido a la presencia de nanopartículas en plantas [64]. Cuando los compuestos fenólicos eliminan los radicales libres, se producen radicales fenoxilo, que tienen un bajo potencial de reducción de electrones en comparación con los radicales de oxígeno. En un estudio reciente, Javed *et al.*, (2018) evaluaron la actividad antioxidante (contenido fenólico total, contenido total de flavonoides, capacidad antioxidante total y actividad de eliminación de radicales libres de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)) generada en callos de *Stevia rebaudiana* cultivada bajo diferentes dosis de nanopartículas de ZnO (NP-ZnO) (0.1, 1.0, 10, 50, 100, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup>). La mejor actividad antioxidante se observó en los tratamientos con 100 mg L<sup>-1</sup> de NP-ZnO, mientras que dosis más elevadas resultaron tóxicas, de manera que la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentó al incrementar la concentración de nanopartículas [65].

#### **2.4.3. Evaluación por enfoque Metabolómico.**

Actualmente el uso de la metabolómica en plantas resulta imperativo para adquirir un punto de vista inclusivo de cómo se regulan su redes i.e., y la síntesis de metabolitos en las plantas, por lo que la metabolómica de cultivos ha sido empleada por numerosos investigadores [62]. Los niveles de concentración de metabolitos de bajo peso molecular, reflejan la respuesta de los sistemas biológicos a los cambios ambientales, al ser considerados el producto final de

los procesos de regulación celular [66]. Si se lograra describir la acción de las nanopartículas en relación con la respuesta antioxidante de las plantas, se podría determinar la presencia y el efecto de las NP en el medio ambiente, vía la activación de la producción de metabolitos secundarios específicos [67].

Desde la perspectiva metabolómica, se consideran al menos tres tipos diferentes de metabolitos: I. Metabolitos implicados en los procesos de defensa (antioxidantes u osmoprotectores), II. Metabolitos subproductos del estrés que aparecen en las células debido a la alteración de la homeostasis normal por la alteración en las condiciones de crecimiento, y III. Moléculas de transducción de señales implicadas en el arbitraje de la respuesta de aclimatación [62].

El perfil metabolómico cualitativo y cuantitativo de una célula, tejido u organismo es muy importante, ya que representan un gran desafío para la tecnología analítica. Las tecnologías analíticas mayormente utilizadas en metabolómica incluyen la cromatografía de capa fina (TLC), HPLC con detección de rayos ultravioleta y de fotodiodos (LC/UV/PDA) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS). Estas técnicas son sensibles y capaces de detectar metabolitos de baja abundancia, presentan un enfoque robusto y resultan técnicamente reproducibles. Además, en etapas iniciales del estudio se conciben como plataformas adecuadas para realizar el perfilado de metabolitos polares no dirigidos [68].

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

La nanorremediación es una rama emergente para la degradación de los contaminantes del suelo, sin embargo, aún no se tienen claros los efectos secundarios de introducir nanomateriales en los ecosistemas y agroecosistemas. En la última década se ha evaluado el efecto de NPs sobre la interacción suelo-planta-microorganismos y se han reportado efectos positivos, negativos y nulos. Por lo anterior, la presente investigación se enfocó en evaluar los efectos de las ZnO-NP en el proceso de degradación de PAHs, respecto al desarrollo de plántulas de maíz y el porcentaje de infección micorrizal. Los resultados obtenidos en esta investigación contribuirán a complementar los conocimientos actuales referentes a los efectos ambientales del uso de ZnO-NP en la remediación de antraceno y fenantreno en suelos agrícolas, con la finalidad de generar criterios para el diseño de técnicas de remediación complementarias, con un enfoque de sustentabilidad.



## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1. Objetivo general.**

Determinar el efecto de las ZnO-NP sobre la degradación de PAHs y la infección micorrizal de *Glomus intraradices* en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en un suelo agrícola, así como caracterizar los efectos secundarios del uso de ZnO-NP sobre la simbiosis *Glomus intraradices*- *Zea mays* L.

### **4.2. Objetivos específicos.**

1. Cuantificar la remoción de PAHs de un suelo agrícola tratado con ZnO-NP.
2. Caracterizar y registrar el proceso de infección de los HMA en las raíces de plántulas de maíz tratadas con ZnO-NP.
3. Caracterizar los metabolitos secundarios sintetizados en plántulas de maíz cultivadas en un suelo contaminado con PAHs y tratado con ZnO-NP.
4. Identificar las alteraciones fisiológicas de las plántulas de maíz cultivadas en un suelo contaminado con PAHs y tratado con ZnO-NP.

## **5. HIPÓTESIS.**

La fitonanorremediación con dosis alta ( $300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de ZnO-NP, reducirá la concentración de PAHs en el suelo, mejorando las características morfológicas de la plántula sin dañar la infección micorrizal.

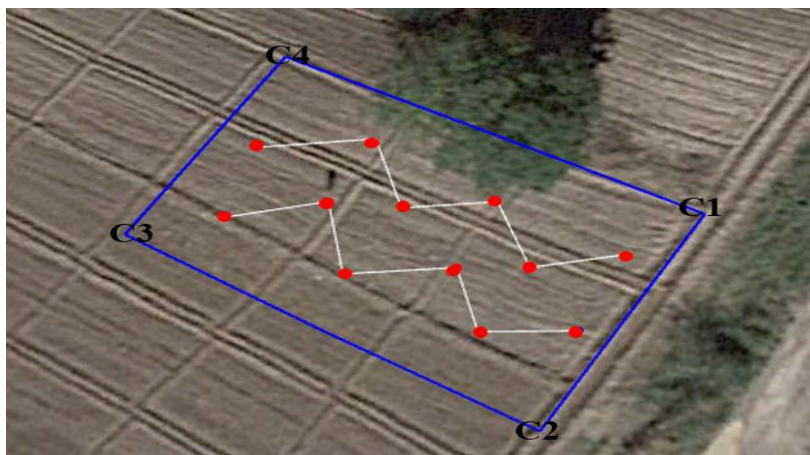
## **6. METODOLOGÍA CIENTÍFICA.**

### **6.1. Materiales.**

Se utilizaron nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP), obtenidas del Centro de Investigación y Desarrollo de Nanomateriales (ID-nano). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), antraceno y fenantreno, se adquirieron de Sigma-aldrich con una pureza del 97 y 98 %, respectivamente. El inoculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se produjo a partir de esporas nativas del suelo experimental, las cuales se cultivaron en semillas de trigo variedad Borlaug 100, cosecha 2015, adquiridas en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Bajío). Las semillas de maíz correspondieron a la variedad Jaguan (2013) con registro MAZ-1213-240511 en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

#### **6.1.1. Muestreo y caracterización del suelo experimental.**

El suelo se muestreó en septiembre del 2018, en una parcela  $\sim 700 \text{ m}^2$ , la cual fue cultivada con maíz (*Zea mays* L.) durante el último ciclo agrícola. La parcela se ubica dentro de los terrenos experimentales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ( $25^\circ 21' 30.01''\text{N}$ ,  $101^\circ 02' 2$  y  $25^\circ 21' 29.95''\text{N}$ ,  $101^\circ 02' 22.56''\text{O}$ ). Se realizó un muestreo compuesto con el método de zig-zag, con doce puntos de recolección de los cuales se extrajeron núcleos rizosféricos, a una profundidad de 0 a 0.25 m, debido a que la mayor población de esporas de HMA, se concentra en los primeros 10 cm de profundidad de la zona rizosférica (Figura 7). El manejo constante del suelo en esta parcela, es con fines experimentales y no de producción extensiva agrícola, no se observó deshierbe al momento del muestreo.



**Figura 7.** Parcela de muestreo de suelo ubicada en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

En el invernadero del CINVESTAV Saltillo ( $25^{\circ}33' N$ ;  $100^{\circ}56' O$ ; 1391 msnm) se realizó una mezcla de las muestras recolectadas, estas se extendieron sobre una lona de  $3.24 \text{ m}^2$ , para secarse en condiciones ambientales. Se trabajaron dos movimientos de homogeneización por día durante 15 días, hasta reducir la humedad inicial. Posteriormente se pasó por un tamiz de 5 mm de apertura. Posterior al secado y tamizado, quedaron 180 kg de suelo para la presente investigación. Para realizar la caracterización fisicoquímica, se tomó una submuestra de 1Kg.

La metodología correspondiente a la determinación de los parámetros de caracterización de la muestra de suelo se describe a continuación.

#### **6.1.1.1. Humedad inicial.**

La humedad al tiempo del muestreo se determinó por el método gravimétrico, el cual se basa en la diferencia de peso del suelo húmedo (Psh) y del suelo seco (Pss). Se trabajaron tres muestras de 50 g en horno de secado (VICHÍ Mod. HSE-250A) a una temperatura constante de  $105^{\circ} \text{C}$  por 24 h.

### 6.1.1.2. Textura.

Para la determinación de la textura se siguió el procedimiento de Bouyoucos [69], el cual refiere a una agrupación de las partículas del suelo según sus dimensiones. Se trabajaron muestras de 50 g de suelo seco (Pss) cribado con tamiz de apertura 2 mm, en 10 ml del dispersante hexametáfosfato de sodio (concentración, 1N). Las lecturas con el hidrómetro se tomaron en dos tiempos de reposo, a los 40 s (L1) y a las 2 h (L2), ambas acompañadas del registro de temperatura (T1 y T2). Para el cálculo del porcentaje de las fracciones del suelo se emplearon las Ecuaciones 1, 2 y 3. Después de cuantificar los porcentajes de arena, limo y arcilla, la textura del suelo se determinó con base en el triángulo de texturas.

$$\% \text{ Limo + Arcilla} = \frac{L1 + [(T1 - 20) 0.36]}{Pss} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ Limo + Arcilla}) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\% \text{ Arcilla} = \frac{L2 + [(T2 - 20) 0.36]}{Pss} \times 100 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

### 6.1.1.3. Densidad aparente.

Esta determinación se realizó en base al método descrito por Soto & V.P. Marti (2004) [70]. Se pesaron tres matraces aforados de 50 mL, secos y limpios (P1). Cada uno se llenó con suelo seco y cribado con malla de apertura 2 mm, el contenido se apelmazó con golpeteos firmes y finalmente se enrasó al cuello; posteriormente, se pesó el matraz con suelo (P2). A continuación, los matraces se limpiaron y llenaron con agua destilada hasta el enrase, estos se pesaron (P3) y se tomó la temperatura del agua. El valor de la densidad aparente se calculó con la Ecuación 4, donde  $\rho_a$  corresponde al valor de la densidad del agua a la temperatura registrada en el procedimiento.

$$\text{Densidad aparente} = \frac{P2 - P1}{P3 - P1} \times \rho_a \quad \text{(Ecuación 4)}$$

#### **6.1.1.4. pH.**

La lectura del pH se basa en una evaluación electrométrica en la que se determina la actividad de los iones ácidos ( $H^+$ ), para ello se siguió el procedimiento descrito por Thomas (1996) [71], realizando una suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo y agua 1:2, utilizando un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific).

#### **6.1.1.5. Porcentaje de materia orgánica.**

El valor de este parámetro se obtuvo por el método de combustión seca, descrito por Cargua *et al.*, (2017) [72], el cual se basa en la detección del contenido de carbón orgánico en el suelo. Se tomaron tres muestras de 5 g de suelo cribado en malla con 250  $\mu m$  de apertura y secado a una temperatura constante de 105  $^{\circ}C$  por 2 h, este peso se consideró como valor inicial ( $P_i$ ). Enseguida las muestras se llevaron a la mufla con una temperatura constante de 430  $^{\circ}C$  por un periodo de 3 h, tiempo suficiente para que se perdiera la humedad de las arcillas, logrando la calcinación del carbón orgánico presente en la muestra como lo describe Hoogsteen *et al.*, (2015) [73]. Las muestras se retiraron de la mufla y se colocaron en un desecador, posteriormente se pesaron y se registró el valor como peso final ( $P_f$ ). El contenido de materia orgánica se calculó mediante la siguiente ecuación porcentual (Ecuación 5).

$$\% \text{ materia orgánica} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

#### **6.1.1.6. Concentración total de nitrógeno, fósforo, potasio y zinc.**

Para la realización de estos análisis la muestra de suelo se preparó previamente, con un tratamiento de pulverización y cribado con malla de apertura 150  $\mu m$ . La concentración total elemental en el suelo se determinó en el laboratorio de análisis químicos de CINVESTAV Saltillo. En la determinación de nitrógeno total se utilizó el método de combustión rápida (Método de Dumas Modificado) con detección por conductividad térmica, empleando un analizador elemental Thermo Scientific Mod. FlashSmart.

Para la determinación de las concentraciones totales de P, K y Zn, se preparó una extracción ácida con una solución de ácido nítrico y ácido clorhídrico a una proporción 3:1 [v/v] como lo reportan Rizwan *et al.*, (2019) [74]. Se emplearon 0.5 g de suelo, 15 mL de HNO<sub>3</sub> y 5 mL de HCl. La reacción se colocó en agitación constante por 3 h a 150 °C, posteriormente se filtró con papel Hatman # 41 y finalmente se llevó a un volumen aforado de 100 mL. Lo anterior corresponde al método modificado 3050 B de la EPA. La extracción se analizó de acuerdo al elemento solicitado. Fosforo se determinó en un equipo de absorción atómica Termo Scientific Mod. ICE 3300), mientras que Potasio y Zinc se utilizó emisión atómica por plasma (Perkin Elmer Mod. Optima 8300).

#### **6.1.1.7. Aislamiento y caracterización de HMA.**

Para determinar el contenido de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el suelo, se realizó un conteo directo, empleando el método de tamizado húmedo descrito por Soka & Ritchie (2018) [75], con algunas modificaciones en base al procedimiento de Sánchez de Prager *et al.*,(2010) [76]. Se tomó una muestra de 20 g del suelo previamente cribado con malla de 2 mm; se colocó en un vaso de precipitado, se añadieron 50 mL de agua común filtrada y se agitó por 5 min. Posteriormente la muestra se pasó a través de una columna de tamices superpuestos de mayor a menor apertura (250, 60 y 38 µm). El contenido de los tamices 60 y 38 µm se colectó de manera individual en tubos falcón de 50 mL, a los cuales se les añadieron 30 mL de sacarosa al 70 % [p/v] y se centrifugaron a 900 g (2 min). El sobrenadante de ambos tubos se pasó a través del tamiz 25 µm, con lavados de agua destilada y se recolectó en papel filtro, el cual se transfirió a una caja de Petri para realizar el conteo empleando estereoscopio a una ampliación de 4 ×.

Las esporas observadas se recolectaron por color y tamaño, posteriormente se montaron en portaobjetos utilizando PVGL (alcohol polivinílico, 8.33 g; agua destilada, 50 mL; ácido láctico, 50 mL; glicerina, 5 mL). Se observaron en microscopio óptico y describieron a 40 y 100 ×. Las claves taxonómicas descritas por el INVAM (International Culture Collection of –versicular- Arbuscular Mycorrhizal Fungi) se emplearon para identificar las esporas.

### **6.1.2. Preparación del inoculante del Hongo Micorrízico Arbuscular (HMA).**

Para la preparación del inoculante se realizó un segundo muestreo en la parcela experimental, seleccionando aleatoriamente tres plantas para la extracción de núcleos rizosféricos (0 a 0.25 m), de los cuales se tomaron las raíces y se lavaron vigorosamente en un contenedor con 5 L de agua común, los restos suspendidos en el agua, se agitaron manualmente por 10 min, en seguida se dejaron reposar por 3 min y el sobrenadante se pasó a través de una columna de tamices superpuestos de mayor a menor apertura (250, 60 y 38  $\mu\text{m}$ ), las partículas retenidas en las mallas se vertieron en cajas de Petri y se observaron en un estereomicroscopio para recolectar esporas viables, procurando *Rhizophagus irregularis* (antes *Glomus intraradice*). Como cultivo trampa se seleccionó trigo (*Triticum aestivum* L.).

Las semillas de trigo recibieron un tratamiento de lavado superficial antes de su siembra. La siembra se realizó en una mezcla 1:1 [v/v] de vermiculita y suelo, la cual se esterilizó por tres días consecutivos (a 20 bar, 125 °C por 1h) en un autoclave. Posteriormente se prepararon seis macetas con 1.6 kg de sustrato (en peso seco); en cada uno se extendieron 200 g del suelo muestreado, se colocaron 21 semillas de trigo tratadas, las cuales se inocularon con las esporas extraídas de los núcleos rizosféricos. El cultivo se mantuvo por 30 días con riegos de 600 mL de agua cada tercer día, posteriormente se cosecharon las raíces, se molieron y cribaron en tamiz de apertura 250  $\mu\text{m}$ , obteniendo un polvo inoculante.

### **6.1.3. Evaluación de la viabilidad de la semilla de maíz (*Zea mays* L.).**

Para asegurar la viabilidad (capacidad de germinar) de las semillas de maíz y evaluar la respuesta de estas al tratamiento de lavado superficial, se realizaron dos pruebas de germinación, cada una con tres replicas, siguiendo los protocolos de las Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas (2016) [77]. En la primera prueba se colocaron 10 semillas de maíz de la variedad Jaguan, sobre papel filtro humedecido, en una caja Petri de cristal. La segunda prueba se realizó con semillas de maíz sometidas a un tratamiento de lavado superficial, el cual consistió en sumergirlas en etanol al 70 % [v/v] con agitación constante por 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril;



después se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % [v/v] durante 3 min, y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Ambas pruebas se realizaron a una temperatura controlada de 25 °C, empleando una incubadora (VICHI Mod. INC-C). Los conteos se registraron a los tres días de incubación.

#### **6.1.4. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de ZnO (ZnO-NP).**

Para la caracterización morfológica de las ZnO-NP, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, por sus siglas en inglés), empleando un equipo JEOL modelo JSM-7800F PRIME.

Su composición química se determinó en el mismo equipo mediante espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Además, se realizó un análisis cuantitativo por absorción atómica (AA) con el equipo Thermo Scientific modelo ICE300. El análisis estructural se realizó por difracción de rayos X (DRX), en un equipo Bruker modelo D8 Advance, con una fuente CuK $\alpha$   $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  en el intervalo de 20 a 75 ( $2\theta$ ). Para determinar el tamaño de cristalita ( $d$ ) de las ZnO-NP se utilizó la ecuación de Debye-Scherrer (Ecuación 6):

$$d = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta_{hkl}} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde  $k$  es un factor adimensional con un valor cercano a 0.9, empleado para partículas con geometría esférica,  $\lambda$  corresponde a la longitud de onda de la fuente de rayos X,  $\theta$  es el ángulo de difracción de Bragg y  $\beta$  el ancho total del pico de difracción [78]. Para la obtención de  $d$ , se emplearon los datos del plano (101) a  $2\theta = 36.28^\circ$ .

## **6.2. Ensayo experimental.**

### **6.2.1. Diseño de tratamientos.**

Con la finalidad de cuantificar la remoción de PAHs en un suelo agrícola contaminado y a su vez identificar los efectos de las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP) sobre la infección micorrízica, se establecieron doce tratamientos correspondientes a un diseño factorial, con tres factores (Tabla 2), tomando como primer factor las nanopartículas de ZnO con tres niveles correspondientes a las dosis; 0, 150 y 300 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco, por segundo factor los PAHs a una concentración de 200 mg de antraceno y 400 mg de fenantreno kg<sup>-1</sup> de suelo seco, manejando dos niveles; con y sin dosificación, y como tercer factor una dosis de 9 g Kg<sup>-1</sup> de inóculo de HMA, con dos niveles; con y sin inóculo. Los tratamientos, se realizaron por triplicado, obteniendo un total de 36 unidades experimentales. El diseño experimental empleado en el invernadero correspondió a un diseño completamente al azar.

**Tabla 2.** Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) sobre la degradación de fenantreno y antraceno (PAHs) y la infección por hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en un suelo agrícola.

Tratamiento	Descripción
T1	Suelo <sup>Ø</sup> + Planta
T2	Suelo + Planta + PAHs <sup>€</sup>
T3	Suelo + Planta + HMA
T4	Suelo + Planta + ZnO-NP <sup>↓</sup>
T5	Suelo + Planta + ZnO-NP <sup>↑</sup>
T6	Suelo + Planta + PAHs + ZnO-NP <sup>↓</sup>
T7	Suelo + Planta + PAHs + ZnO-NP <sup>↑</sup>
T8	Suelo + Planta + HMA + ZnO-NP <sup>↓</sup>
T9	Suelo + Planta + HMA + ZnO-NP <sup>↑</sup>
T10	Suelo + Planta + PAHs + HMA
T11	Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP <sup>↓</sup>
T12	Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP <sup>↑</sup>

Ø: 3.5 kg de suelo seco, €: 200 mg de antraceno y 400 mg de fenantreno kg<sup>-1</sup> de suelo seco, ↓: 150 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco, ↑: 300 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco.

### 6.2.2 Montaje del ensayo experimental y manejo agrícola.

Las unidades experimentales se prepararon en bolsas de polipropileno, cada una con 3 kg de suelo seco, el cual se llevó a condiciones de saturación de humedad y se dejó reposar por tres días. Se pesaron las dosis de PAHs (400 mg de antraceno y 200 mg de fenantreno por kg<sup>-1</sup> de suelo seco), posteriormente se diluyeron en 50 mL de acetona pura [79] y fueron vertidas directamente sobre los tratamientos señalados. Para asegurar una buena distribución del tratamiento, las unidades experimentales se mantuvieron con dos movimientos homogéneos diarias por un periodo de tres días, lo que permitió la evaporación del solvente (acetona).

Las dosis de nanopartículas se suspendieron en 10 mL de agua empleando un baño ultrasónico (AUTO SCIENCE Mod. AS2060B), posteriormente se adicionaron al suelo con

movimientos de homogenización. En la siembra se emplearon semillas con tratamiento de lavado superficial, el cual fue descrito previamente. El experimento se realizó en el invernadero con iluminación solar natural.

El manejo agronómico correspondió a riegos cada tercer día, según las necesidades del cultivo y una dosis de fertilización 120-60-60 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente, aplicada a los 26 días después de la siembra para reducir los efectos de deficiencia nutricional, sin comprometer la acción de los microorganismos. La duración del ensayo experimental correspondió a 56 días después de la siembra (DDS).

### **6.3. Muestreo y análisis de laboratorio.**

Al finalizar el periodo del ensayo experimental (56 DDS), se removieron las unidades experimentales del invernadero. Las plántulas se retiraron completamente del sustrato, estas se lavaron con una solución de tween al 0.05 %, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada y se escurrieron.

Para fines del análisis de infección micorrízica, se muestrearon tres raíces secundarias de cada plántula, las cuales se mantuvieron en solución AFA (5 ml de ácido acético glacial, 50 ml de alcohol etílico al 95 %, 35 ml de agua destilada y 10 ml de formol), para preservar y endurecer los tejidos. El resto del tejido vegetal se trató de manera manual en una molienda criogénica, para ello se utilizó mortero cerámico y nitrógeno líquido.

#### **6.3.1. Análisis químico del suelo después del ensayo experimental.**

Al término del ensayo experimental (56 DDS), se tomó una submuestra de suelo de 200 g en peso fresco, por unidad experimental, la cual se mantuvo en refrigeración (4 °C) y condiciones de oscuridad para inhibir la actividad microbiana y la degradación fotocatalítica de PAHs. El resto de suelo de cada unidad experimental se secó a condiciones ambientales; posteriormente el suelo se molió para homogenizar el tamaño de partículas y se cribó con malla de apertura 150 µm para determinar la concentración final de P, K y Zn, con la

metodología de Rizwan M. *et al.*, (2019) [74] empleada en la caracterización inicial del suelo experimental.

### **6.3.2. Extracción de muestras para el análisis de PAHs en el suelo.**

Las concentraciones de PAHs (antraceno y fenantreno) se analizaron por el método de Song *et al.*, 1995, descrito por Fernandez-Luqueño *et al.*, 2008 [79]. La extracción de PAHs se realizó a partir de las muestras previamente refrigeradas. Se tomaron 1.5 g de suelo y se mezclaron con 3 g de sulfato de sodio anhidro en un mortero de ágata, posteriormente se colocaron en tubo Pyrex y se realizó una suspensión añadiendo 5 mL de acetona. Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de ultrasonido (AUTO SCIENCE Mod. AS2060B) en potencia máxima a un rango de temperatura de 35 a 40 °C durante 20 min, posteriormente se agitaron mecánicamente en un vortex durante 15 s, al concluir se ingresaron nuevamente al baño de ultrasonido por 20 min más. Para la obtención del extracto, las suspensiones se centrifugaron a 3500 g durante 15 min. El proceso de extracción se repitió por triplicado en cada muestra, y al finalizar se mezclaron obteniendo 15 mL de extracto por muestra. Los extractos se evaporaron por 6 h en horno (Heratherm OGS180) a 50 °C.

#### **6.3.2.1. Determinación de la concentración de PAHs por cromatografía de gases.**

Los extractos evaporados se resuspendieron en 2 mL de acetona. Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 4890-D (EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama. La columna utilizada correspondió a un modelo HP-5 de Hewlett-Packard (0.53 mm × 15 m, 1.5 µm); para separar los PAHs el equipo fue acondicionado con gas helio a 80 psi. La validación del método se realizó por linealidad, para ello se realizó una curva de calibración para cada hidrocarburo, esta se preparó, a partir de concentraciones conocidas de PAHs (antraceno y fenantreno; 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm), donde el tiempo de retención para antraceno fue a los 8.75 min y para fenantreno a los 8.43 min. La temperatura del horno se programó a 140 °C en el arranque y esta se incrementó a 170 °C durante la operación y determinación de la concentración de PAHs en las muestras.

### **6.3.3. Evaluación morfológica de las plántulas de maíz (*Zea mays* L.).**

Para describir los efectos de los tratamientos sobre las plántulas de maíz, se determinaron los siguientes parámetros como variables de respuesta: altura de planta (ALT-P), longitud de raíz (LON-R), peso fresco de planta (PFP), peso fresco de raíz (PFR), peso seco de planta (PSP) y peso seco de raíz (PSR).

### **6.3.4. Unidades SPAD como indicador de clorofila.**

Las Unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development) permiten estimar el nivel de clorofila en las hojas de las plantas mediante un método no destructivo. Los valores de SPAD se obtienen en función de un principio en el que se considera que parte de la luz que llega a la hoja de la planta es absorbida por la clorofila, mientras que el resto de luz se refleja e ingresa la celda del equipo SPAD-502 Plus, donde esta se transforma en señal eléctrica. Las Unidades SPAD varían en función del tono verde de las hojas [80].

En el transcurso del ensayo experimental se realizó la medición de Unidades SPAD, para ello se seleccionaron tres hojas completamente expandidas y representativas de los tres estratos del follaje (bajo, medio y superior) de la planta. En cada unidad experimental se observó la concentración de clorofila utilizando un medidor portátil Minolta SPAD-502 Plus, obteniendo un concentrado de lecturas a través del tiempo (35, 38, 41, 44, 47 y 50 DDS).

### **6.3.5. Caracterización de la infección micorrizal.**

Las raíces preservadas en solución AFA, se enjuagaron con agua destilada y se sometieron a un proceso de clareo-tinción descrito por Philips & Hayman [81]; las raíces frescas se hirvieron en hidróxido de potasio (KOH) al 1 M a 90 °C por 15 min para eliminar el citoplasma y núcleos celulares. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se acidificaron con ácido clorhídrico (HCl) diluido (al 10 %) por 10 min. La tinción se llevó a cabo con azul de tripano al 0.05 %, reposando el material por 12 horas, pasado el tiempo se retiraron el exceso de colorante y finalmente las raíces se reposaron en lactoglicerol durante tres horas.

Para la evaluación microscópica, se realizó el montaje de 10 segmentos de 1 cm en cada portaobjetos, con dimensiones de 26 × 76 mm. Además, se realizó un triplicado por cada repetición dentro de los tratamientos. La evaluación de los segmentos se realizó con el microscopio óptico, con observaciones desde la parte superior hacia la inferior, con un aumento de 40 ×. En la bitácora se describieron las características principales de las estructuras observadas. Los porcentajes de infección se registraron según las siguientes ecuaciones:

Porcentaje de colonización total por HMA.

$$\% \text{ Colonización HMA} = \frac{\text{número de segmentos colonizados por HMA}}{\text{número de segmentos observados}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Porcentaje de colonización por arbusculos.

$$\% \text{ Arbusculos} = \frac{\text{número de segmentos colonizados por arbusculo de HMA}}{\text{número de segmentos observados}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 8)}$$

### **6.3.6. Evaluación de la actividad antioxidante de las plántulas de maíz (*Zea mays* L.).**

#### **6.3.6.1. Preparación de las muestras vegetales.**

Como se mencionó anteriormente, las plantas se retiraron completamente del sustrato y tuvieron un lavado, posteriormente se sometieron a una molienda criogénica empleando nitrógeno líquido. El material de consistencia fina se colocó en un desecador con vacío para eliminar humedad. Las muestras compuestas (hoja, tallo y raíz) se mantuvieron refrigeradas y protegidas de la luz hasta su análisis.

### **6.3.6.2. Extracción de compuestos bioactivos del tejido vegetal.**

La extracción se realizó conforme el procedimiento de Saéñz *et al.*, (2009) [82] con algunas modificaciones. Se pesaron 250 mg de la muestra vegetal, se colocaron en un tubo de ensayo y se mezclaron con 10 mL de solución de etanol-agua en una relación 50:50 [v/v]. Para homogenizar la suspensión se sometió a un baño de ultrasonido durante 20 min; posteriormente, el material se centrifugó a 13,900 g en un lapso de 15 min a 4 °C; el sobrenadante obtenido se almacenó en refrigeración y bajo condiciones de obscuridad hasta su análisis, en un periodo no mayor a 12 horas.

### **6.3.6.3. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.**

El ensayo desarrollado por Folin-Ciocalteu es utilizado por su sensibilidad y reproducibilidad para medir cuantitativamente los compuestos fenólicos totales, el cual se fundamenta en su mecanismo básico de reducción; para ello se emplea una mezcla de ácidos, fosfowolfrámico y fosfomolibdico en un medio básico, los cuales se reducen al oxidar compuestos fenólicos, lo que produce una tonalidad azul cuantificable por espectrofotometría. Para este estudio se utilizó la adaptación realizada por Singleton *et al.*, 1999 [83].

Las muestras se prepararon realizando una dilución en relación 1:10 del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), como se describe a continuación. En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del sobrenadante obtenido en la extracción previa y se adicionaron 5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1:10 [v/v]) y se mezcló. La solución se dejó reposar por 7 min, se añadieron 4 mL de carbonato de sodio al 7.5 % [p/v] y se dejó en reposo durante 120 min. Transcurrido este tiempo las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro marca Jenway 6715 UV – Vis (EE. UU.) a una longitud de onda de 760nm, utilizando como blanco agua destilada. Los datos son expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG).



#### **6.3.6.4. Determinación de flavonoides totales.**

La concentración de flavonoides se determinó siguiendo la metodología descrita por Arvouet-Grand *et al.*, (1994) [84] empleando un complejo flavonoide- $\text{AlCl}_3$ , donde el tricloro de aluminio se preparó en una solución con metanol al 2%. Se colocaron 2 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo, a continuación, se adicionaron 2 mL de la solución de metanol con  $\text{AlCl}_3$  y se dejó reposar en oscuridad durante 20 min, transcurrido el tiempo, la muestra se colocó en una celda de cuarzo para realizar la lectura de absorbancia, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm utilizando como blanco metanol. Los resultados se expresan en mg equivalentes de Quercetina (mg EQ) por cada 100 g de muestra vegetal.

#### **6.3.6.5. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH'.**

El radical libre DPPH' permite cuantificar la actividad de compuestos que se pueden disolver en medios orgánicos. El método se basa en la decoloración del radical DPPH' por los antioxidantes. Se preparó una solución de DPPH 0.2 M (Sigma-Aldrich) pesando 7.8 mg de 2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo (DPPH) en metanol al 80 %, la cual se mantuvo en agitación durante dos horas, en condiciones de oscuridad.

Para la determinación de la actividad antioxidante se colocaron 0.5 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo y se le adicionaron 2.5 mL de la solución de DPPH, se agitó y se dejó reposar en completa oscuridad durante 60 min. Las lecturas se efectuaron a 515 nm en espectrofotómetro, utilizando como blanco metanol al 80%. Los resultados obtenidos se expresan como mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA) por cada 100 g de muestra vegetal de acuerdo con Reyes-Munguía *et al.*, 2009 [85].

#### **6.3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante por la técnica ABTS<sup>++</sup>.**

Este método se basa en la evaluación de la decoloración de los radicales libres ABTS<sup>++</sup> por la actividad de los antioxidantes. El catión radical ABTS<sup>++</sup> (2,2-Azino-bis(3-

etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se obtuvo mediante la reacción de una solución del reactivo ABTS (Sigma-Aldrich) a una concentración 7mM (10 mL) y persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) de una concentración de 2.45 mM (10mL). La mezcla se colocó en agitación, en un ambiente de completa oscuridad, durante 16 h.

Una vez concluido el tiempo de agitación del catión radical, éste se ajustó con etanol al 20% y se tomó lectura de su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm hasta obtener un valor de  $0.7 \pm 0.1$ . Se tomaron 2 mL del  $ABTS^{++}$  ajustado y se le adicionaron 200  $\mu$ L del sobrenadante dejando reaccionar la mezcla durante 6 min para realizar la lectura de la absorbancia (Re *et al.*, 1999 [86]). Los resultados obtenidos se expresan en mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA) por cada 100 g de muestra vegetal.

### **6.3.7. Determinación del perfil metabolómico no dirigido, por HPLC-MS.**

#### **6.3.7.1. Extracción de compuestos metabolómicos.**

Para el perfil metabolómico se realizó una extracción metanólica del material vegetal, para ello se tomaron 50 mg de polvo vegetal y 1000  $\mu$ L de una solución de metanol grado HPLC con ácido fórmico (75 % y 0.15 % [v/v]). La mezcla se sonicó durante 15 min y se centrifugó a 10000 g durante 10 min, el sobrenadante se colocó en tubos eppendorf® protegidos de la luz, posteriormente estos se colocaron en un desecador hasta perder la humedad.

#### **6.3.7.2. Reconstitución y análisis de extractos.**

Las muestras extraídas previamente, se reconstituyeron con una mezcla de agua y metanol (70 % y 30 % [v/v]), empleando 1000  $\mu$ L por muestra como lo describe Rendón-Anaya *et al.*, (2017) [87]. Las soluciones se agitaron en vortex durante 1 minuto y posteriormente se colocaron 5 min en el sonicador a una temperatura constante de 25 °C; una vez homogenizadas las muestras, estas se filtraron a través de un filtro 0.2  $\mu$ m.

La separación cromatográfica se logró en un sistema Acquity UPLC (Waters, Milford) empleando una columna analítica BHC C18 (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm). La muestra se trabajó con un caudal de inyección de 10 µL, mientras que la elución de los compuestos se realizó a una velocidad de flujo de 500 µL min<sup>-1</sup>, donde la fase móvil (A) correspondió a una solución de agua con 0.1 % de ácido fórmico, como fase móvil (B) se empleó acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico, esta última se suministró en un gradiente lineal de 2 al 100 %. El tiempo de retención fue de 16 min, empleando 4 min para el lavado y reequilibrio de la columna entre muestra y muestra.

La espectrometría de masas se realizó con un QTOF Synapt G1 ortogonal, acoplado al equipo UPLC. Las condiciones de operación fueron 3.0 KV en el voltaje capilar, a una temperatura de desolvatación de 300 °C. El compuesto Leucina-encefalina ( $M + H^+$ ) = 556.2771 se utilizó como referencia de calibración de masa, el cual se infundió a una velocidad de flujo de 5 µL min<sup>-1</sup> a una concentración de 2 ng mL<sup>-1</sup>.

#### **6.4. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el software Statistica. Las variables de respuesta evaluadas en el suelo y plántulas se analizaron mediante el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA), todas las variables se probaron para determinar la normalidad. En el caso de las Unidades SPAD se analizaron las diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las fechas de evaluación, mediante ANOVAS.

Posteriormente el efecto de los factores: PAHs, HMA, ZnO y sus interacciones, se determinaron mediante ANOVA de dos y tres vías en variables de respuesta morfológica de las plántulas (ALT-P, LON-R, PSP y PSR) y de infección micorrizal en la raíz (arbúsculos, vesículas y esporas).

Finalmente se evaluaron las diferencias significativas (HSD; Honestly-Significant-Differenced) de Tukey como prueba post hoc ( $p < 0.05$ ).

El análisis de datos metabólicos se realizó mediante la transformación y proceso de los espectros obtenidos, utilizando Pregenesis QI. Los datos numéricos de cada tratamiento se analizaron estadísticamente respecto al control con un análisis de medias t-student, posteriormente se filtraron los datos considerando únicamente aquellos con *p-value* menor a 0.05. Los datos conglomerados se procesaron en el software MetaboAnalyst para obtener análisis jerárquico (hierarchical cluster analysis, HCA).

## **7. RESULTADOS.**

### **7.1. Caracterización inicial del material.**

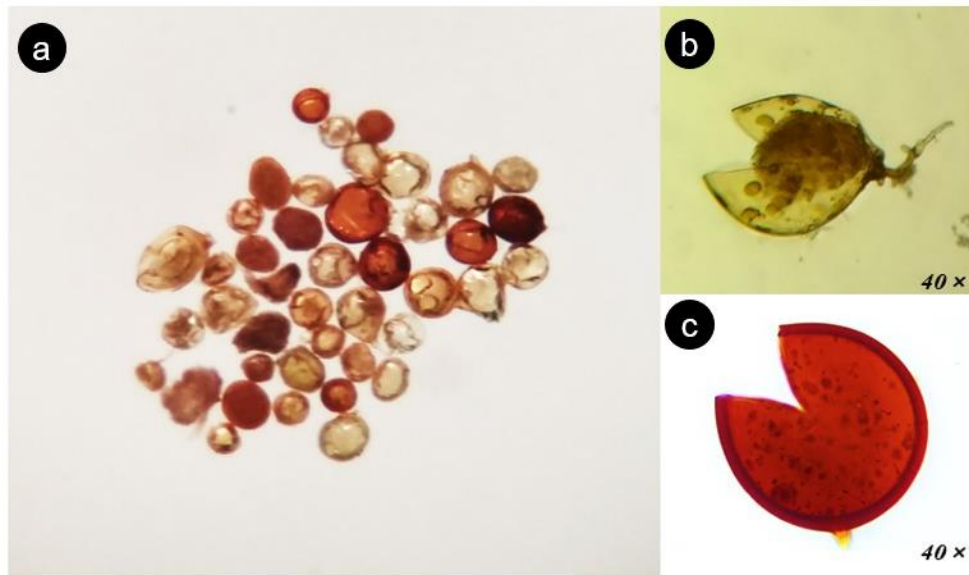
#### **7.1.1. Caracterización del suelo.**

##### **7.1.1.1. Características fisicoquímicas.**

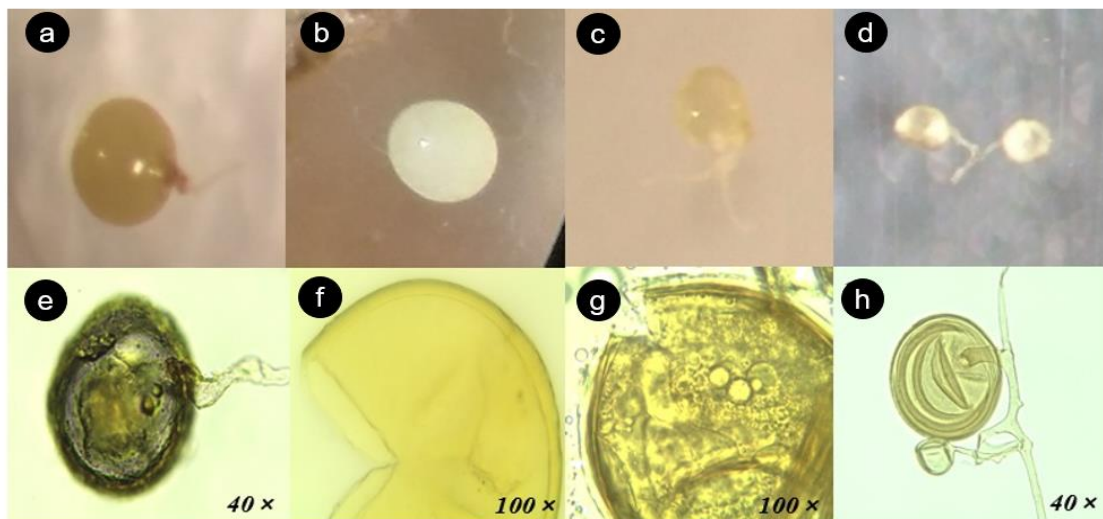
El suelo experimental se extrajo con una humedad inicial del 72 %. La textura se determinó como Migajón-Arcilloso (32.4 % arena, 24.16 % arcilla y 43.44 % limo), lo que se relaciona con el valor obtenido de densidad aparente ( $1.25 \text{ g cm}^{-3}$ ). El suelo se clasificó como alcalino al presentar un valor de pH de 8.2, con un ligeramente alto contenido de materia orgánica (2.7 %). El análisis químico del suelo reportó un contenido nutrimental de 1.78 g N total  $\text{kg}^{-1}$  suelo seco, 1.31 g P total  $\text{kg}^{-1}$  suelo seco, 1.60 g K total  $\text{kg}^{-1}$  suelo seco y 0.048 g Zn total  $\text{kg}^{-1}$  suelo seco.

##### **7.1.1.2. Características de los HMA presentes en el suelo.**

Con el conteo directo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se determinó una densidad promedio de 85 esporas  $\text{g}^{-1}$  suelo seco. Las esporas obtenidas en el conteo se sometieron a caracterización descriptiva, lo que permitió identificarlas dentro de los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Glomus*. En las Figuras 8 y 9 se muestran algunas de las esporas observadas en el conteo de caracterización del suelo experimental.



**Figura 8.** Esporas de hongos micorrízicos arbusculares presentes en el conteo de caracterización del suelo experimental. a) Conjunto de esporas de hongos micorrízicos arbusculares observadas en microscopio estereoscópico, b) Espora madura de *Glomus* sp., c) Esporas de *Acaulospora* sp. [Montadas en PVLG (40 ×)].



**Figura 9.** Esporas de hongos micorrízicos arbusculares extraídos del suelo experimental. a) *Gigaspora* sp., muestra hifa sustentora, b) *Gigaspora margarita*, c) *Glomus* sp., d) *Rhizophagus irregularis*, e) *Gigaspora* sp., f) *Clareidoglomus* sp., g-h) *Rhizophagus irregularis*. [Montadas en PVLG (40 × y 100 ×)].

### 7.1.2. Características de la semilla de maíz (*Zea mays* L.).

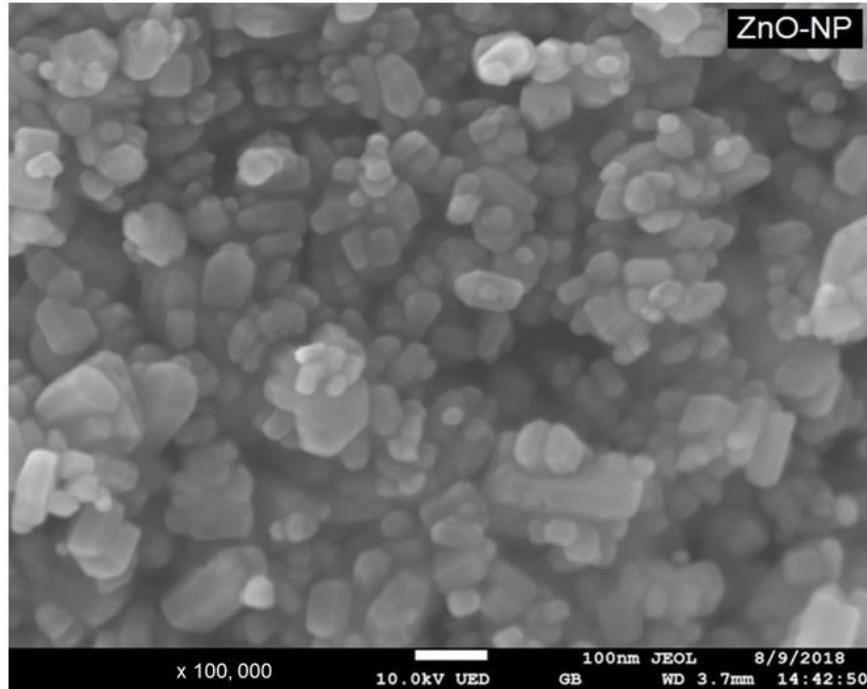
Las semillas de maíz, variedad Jaguan, se describen como viables al mostrar 100 % de germinación en la primera prueba realizada, sin tratamiento. Por otro lado, en una segunda prueba, las semillas recibieron un tratamiento de lavado superficial con etanol e hipoclorito de sodio (Figura 10), el cual redujo 10 % la germinación, al menos una de cada diez semillas no germino.



**Figura 10.** Prueba de germinación de semillas de maíz con tratamiento de lavado superficial (etanol-hipoclorito).

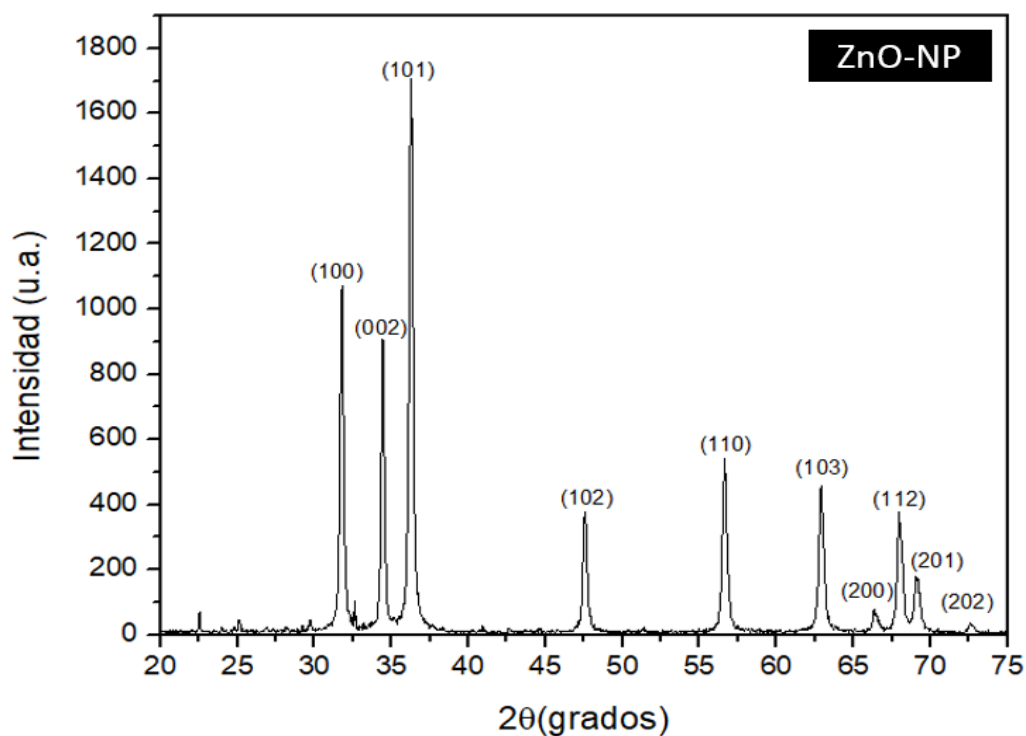
### 7.1.3. Características fisicoquímicas de ZnO-NP.

En la imagen obtenida por FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) se puede observar que las ZnO-NP presentan una morfología heterogénea (Figura 11). Las nanopartículas presentan forma irregular y amplia distribución de tamaño de partícula. ZnO-NP presentan tendencia a la formación de aglomerados, comportamiento común de las nanopartículas metálicas debido a su alta energía superficial [65].



**Figura 11.** Micrografía (FESEM) de Nanopartículas de óxido de Zn a 100,000  $\times$ .

El patrón de DRX de ZnO-NP muestra su alta cristalinidad (Figura 12), con varias reflexiones indexadas con base en la carta JCPDS 00-036-1451. Los planos corresponden a estructura de wurtzita hexagonal [66]. El tamaño de cristalita determinado a partir de la Ecuación 5 fue de 30 nm ( $2\theta = 36.28^\circ$ ). La composición química, se muestran en la Tabla 3.



**Figura 12.** Patrón de DRX de Nanopartículas de óxido de Zn (ZnO-NP).

**Tabla 3.** Composición química de las nanopartículas de ZnO (% e.p.), por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) y absorción atómica (AA).

Equipo	Composición química (% e.p.)	
	Zn	O
EDS	74.24	25.76
AA	73.00	ND

ND: no determinado

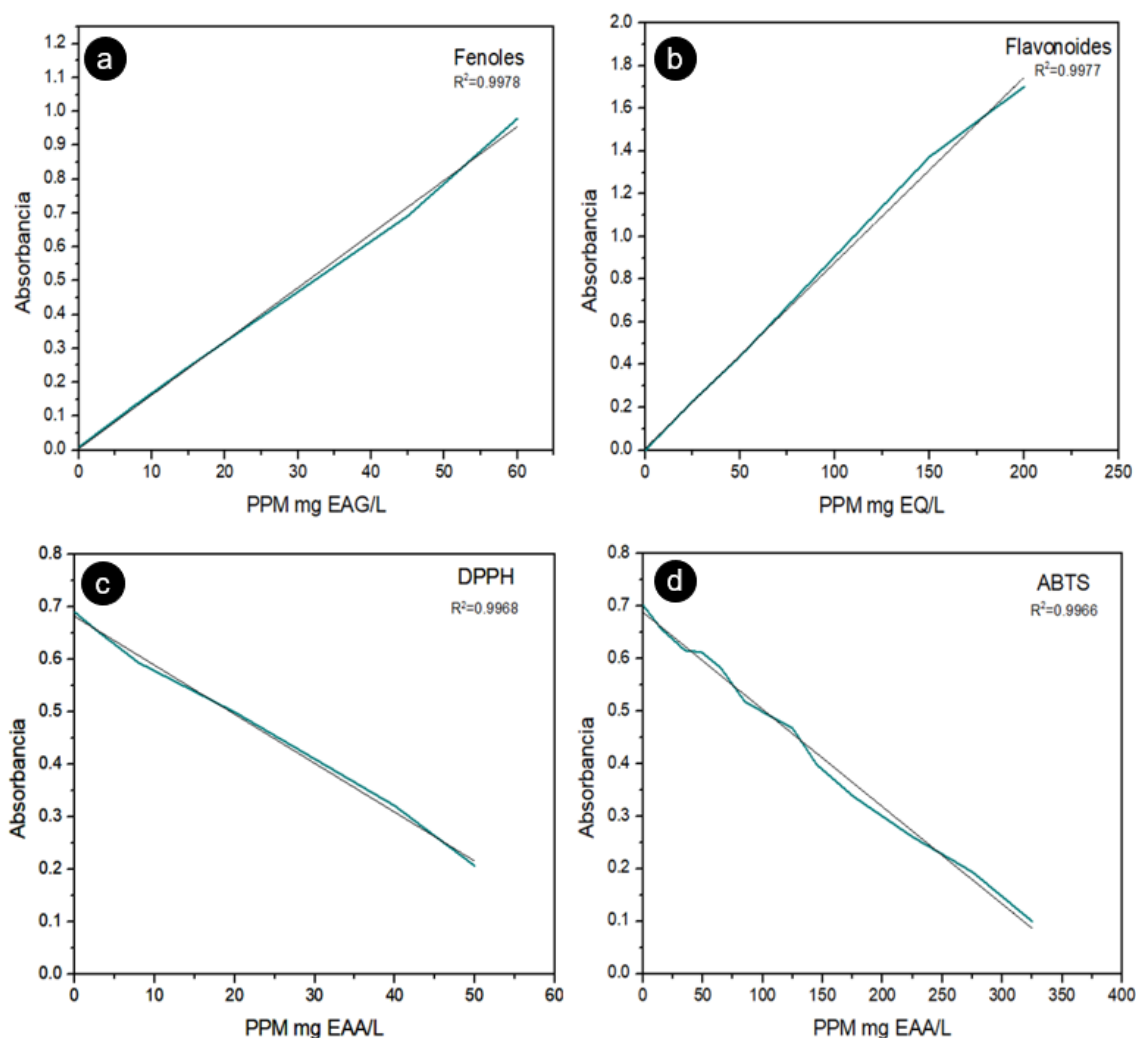
#### 7.1.4. Curvas de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante en las plántulas de maíz.

Para expresar la concentración de fenoles como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG), se realizó una curva de calibración preparando una solución madre de ácido gálico a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> y se realizaron las diluciones necesarias hasta obtener las concentraciones presentadas en la curva (Figura 13a). De igual manera para obtener el valor



real de la concentración de flavonoides totales, los resultados se convirtieron y expresaron en mg equivalentes de Quercetina (mg EQ) por cada 100 g de muestra vegetal, para ello se elaboró una curva de calibración, preparando una solución madre de Quercetina a una concentración de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir de esta solución madre se realizaron las diluciones necesarias hasta obtener la curva de calibración (Figura 13b).

En el caso de los radicales libres, DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>, su concentración se expresa como mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA) por cada 100 g de muestra vegetal, para ello la curva patrón se realizó utilizando ácido ascórbico, iniciando con una solución madre de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , a partir de ella se realizaron diluciones y se obtuvieron las curvas que se muestran en la Figuras 13c y 13d.



**Figura 13.** Curvas de calibración para la evaluación de la actividad antioxidante de las plántulas de maíz. a) Curva para la expresión de fendoles, empleando ácido gálico (AG), b) Curva para la expresión de flavonoides a partir de Quercetina (Q), c-d) Curva de calibración para los radicales DPPH y ABTS, respectivamente, utilizando ácido ascórbico (AA).

## 7.2. Variables de respuesta evaluadas en el suelo.

### 7.2.1. pH y CE.

Al término del ensayo, el pH del suelo experimental disminuyó ligeramente en el tratamiento control (T1) respecto al valor inicial (8.20), pero el valor del pH del tratamiento control (T1) fue estadísticamente igual a los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ; Tabla 4). La CE del suelo no

fue afectada por los tratamientos, como se evidencia al comparar el tratamiento control (T1) con el resto de los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos T4 (Suelo + Planta + ZnO-NP<sup>↓</sup>), T5 (Suelo + Planta + ZnO-NP<sup>↑</sup>) y T9 (Suelo + Planta + HMA + ZnO-NP<sup>↑</sup>) incrementaron significativamente la CE en comparación con el tratamiento T7 (Suelo + Planta + PAHs + ZnO-NP<sup>↑</sup>).

**Tabla 4.** Características químicas del suelo: pH y CE, al final del ensayo experimental. Los datos son resultado del ANOVA de una vía (media  $\pm$  error estándar). Diferentes letras indican los niveles de significancia entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	pH	CE [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]
T1	7.60 $\pm$ 0.50a	974.67 $\pm$ 166.14ab
T2	7.99 $\pm$ 0.04a	990.97 $\pm$ 110.86ab
T3	7.89 $\pm$ 0.05a	957.77 $\pm$ 27.48ab
T4	7.97 $\pm$ 0.03a	1028.63 $\pm$ 115.44a
T5	8.01 $\pm$ 0.02a	1006.60 $\pm$ 15.49a
T6	7.95 $\pm$ 0.09a	811.87 $\pm$ 54.11ab
T7	7.88 $\pm$ 0.02a	763.10 $\pm$ 42.90b
T8	7.76 $\pm$ 0.02a	979.87 $\pm$ 74.93ab
T9	7.77 $\pm$ 0.02a	1025.07 $\pm$ 49.72a
T10	7.93 $\pm$ 0.16a	880.83 $\pm$ 71.91ab
T11	7.80 $\pm$ 0.06a	791.17 $\pm$ 69.96ab
T12	7.89 $\pm$ 0.03a	825.97 $\pm$ 58.24ab

### 7.2.2. Concentración final de fósforo, potasio y zinc.

La concentración elemental de fósforo, potasio y zinc en el suelo, al final del ensayo experimental, no mostro diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el ANOVA de una vía, como se puede apreciar en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Concentración final de fósforo (P), potasio (K) y zinc (Zn), al final del ensayo experimental. Los datos del ANOVA de una vía son la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

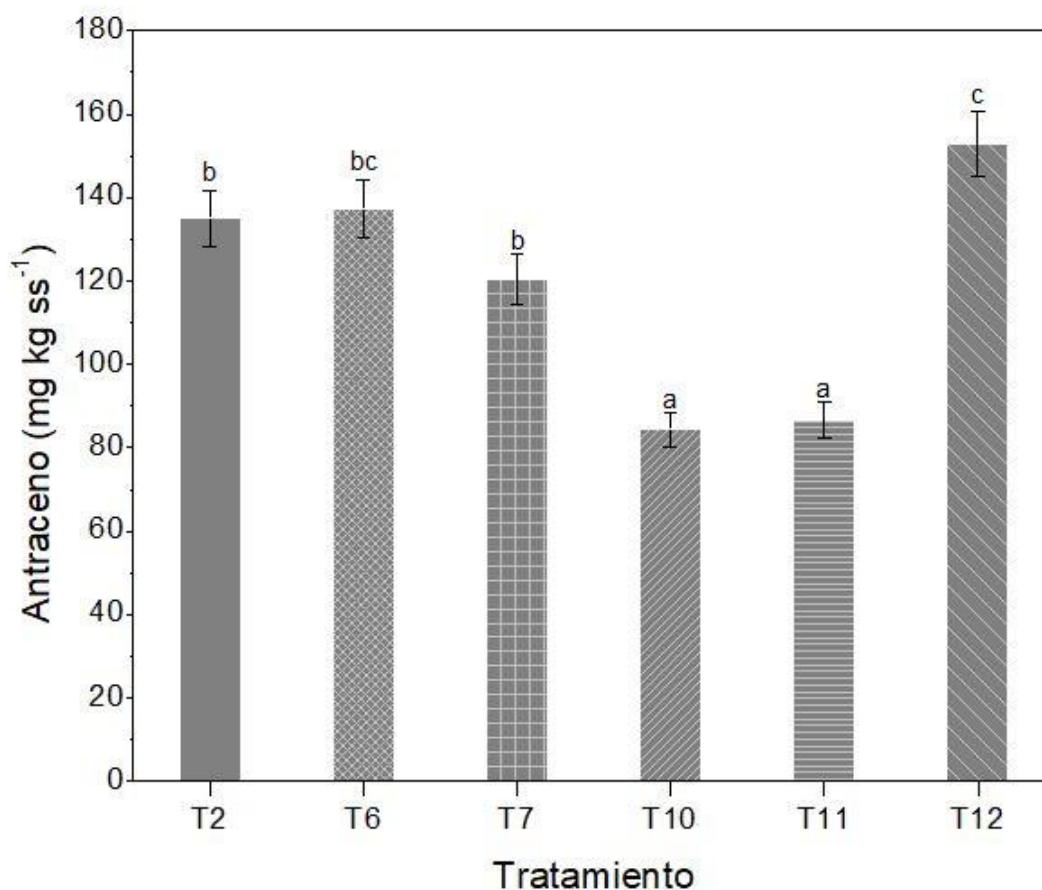
Tratamiento	P (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	Zn (g kg <sup>-1</sup> )
T1	0.88 $\pm$ 0.05a	2.23 $\pm$ 0.20a	0.09 $\pm$ 0.01a
T2	0.85 $\pm$ 0.06a	2.26 $\pm$ 0.31a	0.09 $\pm$ 0.00a
T3	0.81 $\pm$ 0.10a	2.22 $\pm$ 0.14a	0.13 $\pm$ 0.05a
T4	0.72 $\pm$ 0.02a	2.09 $\pm$ 0.03a	0.18 $\pm$ 0.02a
T5	0.85 $\pm$ 0.11a	2.55 $\pm$ 0.75a	0.22 $\pm$ 0.04a
T6	0.73 $\pm$ 0.17a	2.72 $\pm$ 0.52a	0.18 $\pm$ 0.01a
T7	0.91 $\pm$ 0.02a	2.89 $\pm$ 0.53a	0.31 $\pm$ 0.07a
T8	0.90 $\pm$ 0.04a	2.66 $\pm$ 0.35a	0.17 $\pm$ 0.01a
T9	0.81 $\pm$ 0.14a	2.68 $\pm$ 0.55a	0.25 $\pm$ 0.02a
T10	0.91 $\pm$ 0.02a	2.55 $\pm$ 0.07a	0.35 $\pm$ 0.45a
T11	0.90 $\pm$ 0.03a	2.86 $\pm$ 0.17a	0.17 $\pm$ 0.00a
T12	0.77 $\pm$ 0.19a	2.54 $\pm$ 0.18a	0.26 $\pm$ 0.02a

### 7.2.3. Concentración final de PAHs.

Al evaluar la concentración de antraceno y fenantreno en el suelo, al término del ensayo experimental i.e. 56 DDS, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, donde T2 representa el control relacionado con la aplicación de PAHs, sin la interacción con algún otro factor.

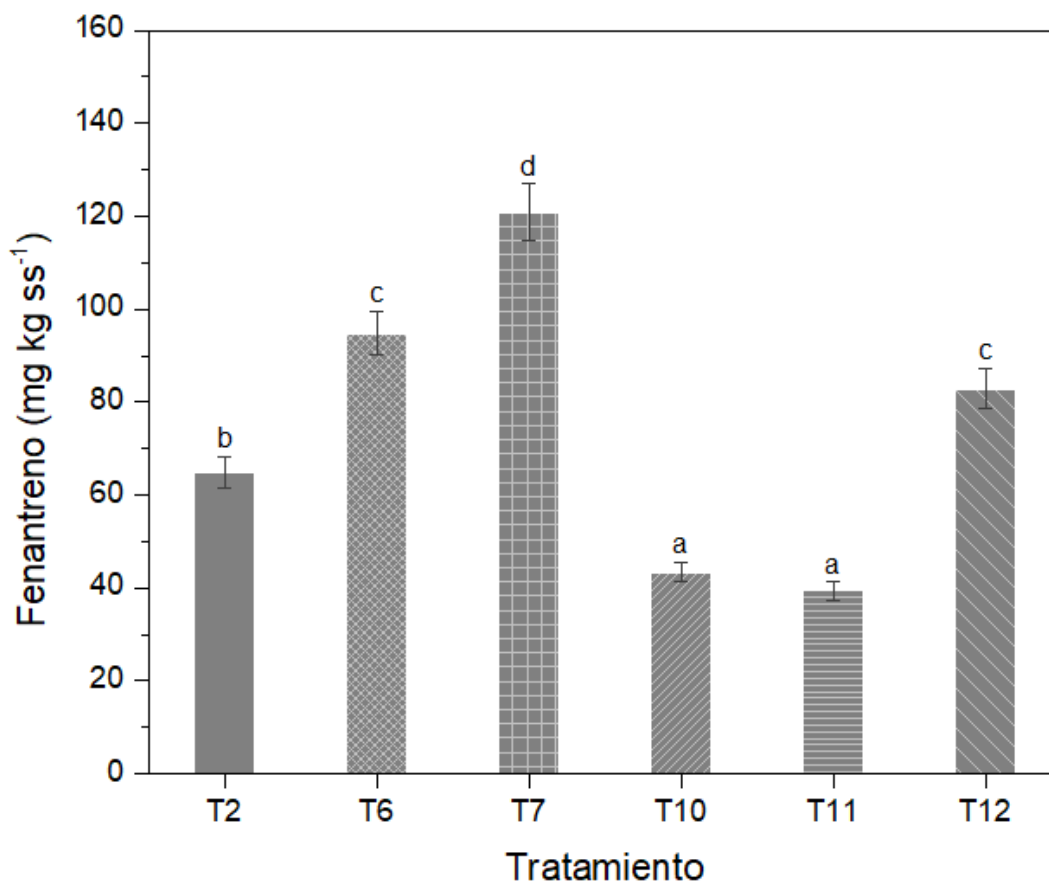
La concentración final de antraceno fue significativamente menor en los tratamientos T10 (Suelo + Planta + PAHs + HMA) y T11 (Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>1</sup>), con 84.3 y 86.4 mg antraceno kg ss<sup>-1</sup>, respectivamente, en comparación con el T2 (Suelo + Planta + PAHs; Figura 14). Es decir, la adición conjunta de HMA y ZnO-NP en dosis de 150 mg kg<sup>-1</sup> (T11, Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>1</sup>) mejoró la remoción del antraceno en

comparación con el tratamiento similar pero acondicionado con 300 mg ZnO-NP kg<sup>-1</sup> (T12, Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>↑</sup>).



**Figura 14.** Concentración final de Antraceno en el suelo experimental. Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

La disipación de fenantreno alcanzo c.a. el 70% en el T2 (Suelo + Planta + PAHs); sin embargo, los tratamientos T10 (Suelo + Planta + PAHs + HMA) y T11 (Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>↓</sup>) fueron los que significativamente degradaron más fenantreno (c.a. 90%) en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento T7 (Suelo + Planta + PAHs + ZnO-NP<sup>↑</sup>) fue el que significativamente degradó menos PAHs, con apenas el 70% (Figura 15). La inoculación con HMA removi6 89.17 % de fenantreno (T10), mientras que la adici6n conjunta HMA y ZnO-NP logr6 90.15 % de remoci6n (T11).

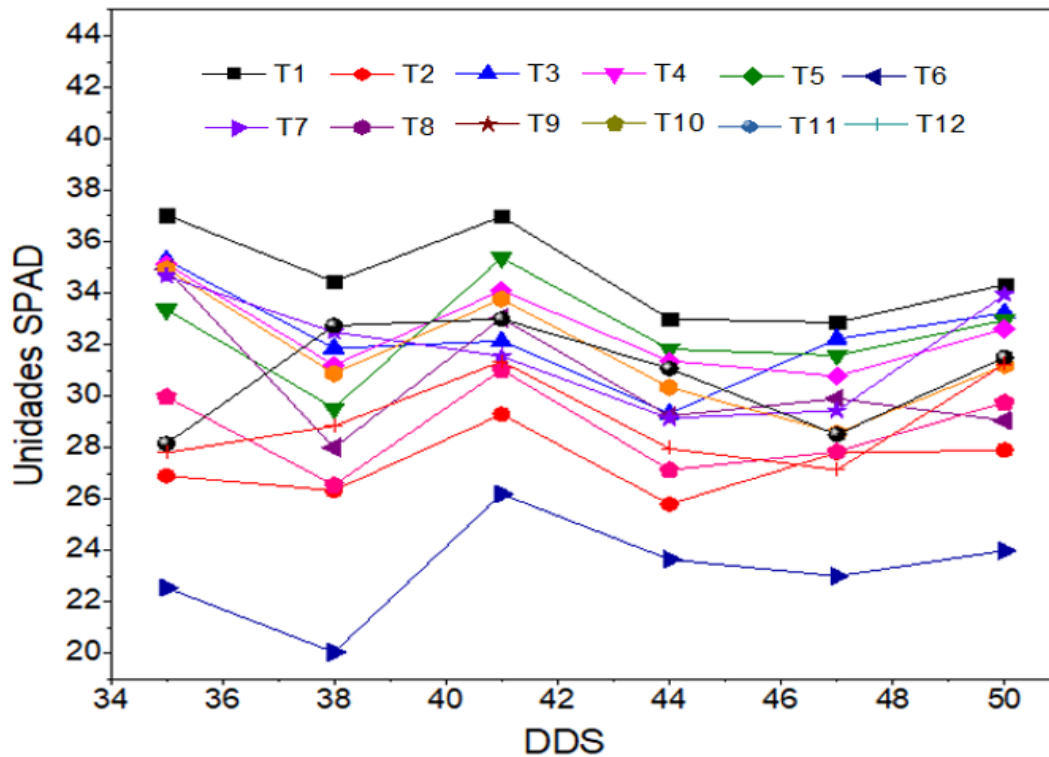


**Figura 15.** Concentración final de Fenantreno en el suelo experimental. Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 7.3. Variables de respuesta evaluadas en plántulas.

#### 7.3.1. Unidades SPAD.

La concentración de clorofila en las hojas de las plántulas de maíz se muestra en la Figura 16 como unidades SPAD. No existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos a los 35, 41 y 44 días después de la siembra (DDS). Mientras que a los 38, 47 y 50 DDS T7 (Suelo + Planta + PAHs + ZnO-NP<sup>†</sup>) presento unidades SPAD significativamente menores al control T1 (Suelo+Planta).



**Figura 16.** Unidades SPAD en hoja de plántulas de maíz (*Zea mays* L.), cultivadas en un suelo contaminado con antraceno y fenantreno (PAHs), tratado con nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Donde DDS refiere a los días después de la siembra.

### 7.3.2. Resultados de la caracterización morfológica de las plántulas de maíz.

A nivel morfológico, la altura de planta disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos T2, T11 y T12 (Tabla 6) en comparación con T1. Por el contrario, al evaluar la longitud de raíz no se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a T1.

En cuanto a las variables peso fresco de planta, peso fresco de raíz, peso seco de planta y peso seco de raíz, no se identificaron diferencias significativas en el ANOVA de una vía.

**Tabla 6.** Efecto de los tratamientos sobre las características morfológicas de las plántulas de *Zea mays* L. Los datos del ANOVA de una vía son la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Parámetros morfológicos					
	ALT-P (cm)	LON-R (cm)	PFP (g)	PFR (g)	PSP (g)	PSR (g)
T1	29.17 $\pm$ 5.54ab	24.33 $\pm$ 6.66ab	7.56 $\pm$ 3.30abc	6.09 $\pm$ 2.30abc	1.16 $\pm$ 0.50abc	0.48 $\pm$ 0.18abc
T2	14.70 $\pm$ 1.54cd	9.33 $\pm$ 1.15b	3.48 $\pm$ 1.68bc	4.04 $\pm$ 2.34abc	0.53 $\pm$ 0.26bc	0.32 $\pm$ 0.18abc
T3	26.14 $\pm$ 5.81abc	24.17 $\pm$ 5.86ab	10.31 $\pm$ 0.61ab	8.21 $\pm$ 2.66ab	1.58 $\pm$ 0.09ab	0.65 $\pm$ 0.21ab
T4	30.72 $\pm$ 5.92a	23.27 $\pm$ 3.78ab	6.60 $\pm$ 2.58abc	5.64 $\pm$ 2.59abc	1.01 $\pm$ 0.39abc	0.45 $\pm$ 0.20abc
T5	29.57 $\pm$ 5.22ab	19.78 $\pm$ 0.60ab	6.07 $\pm$ 0.64abc	5.19 $\pm$ 1.52abc	0.93 $\pm$ 0.10abc	0.41 $\pm$ 0.12abc
T6	17.83 $\pm$ 3.88bcd	17.07 $\pm$ 4.19ab	2.67 $\pm$ 1.31c	2.78 $\pm$ 0.35bc	0.41 $\pm$ 0.20c	0.22 $\pm$ 0.03bc
T7	19.25 $\pm$ 0.75abcd	17.75 $\pm$ 1.25ab	2.26 $\pm$ 0.05c	3.19 $\pm$ 0.35abc	0.35 $\pm$ 0.01c	0.25 $\pm$ 0.03abc
T8	30.80 $\pm$ 0.56a	24.70 $\pm$ 6.75ab	11.70 $\pm$ 1.67a	8.73 $\pm$ 2.78a	1.79 $\pm$ 0.26a	0.69 $\pm$ 0.22a
T9	31.27 $\pm$ 7.34a	29.71 $\pm$ 9.64a	10.37 $\pm$ 6.54ab	8.80 $\pm$ 3.07a	1.59 $\pm$ 1.00ab	0.70 $\pm$ 0.24a
T10	20.60 $\pm$ 4.08abcd	21.64 $\pm$ 6.37ab	4.60 $\pm$ 1.54abc	3.86 $\pm$ 1.63abc	0.70 $\pm$ 0.23abc	0.31 $\pm$ 0.13abc
T11	13.05 $\pm$ 1.68d	9.74 $\pm$ 3.84b	1.17 $\pm$ 0.33c	1.54 $\pm$ 0.57c	0.18 $\pm$ 0.05c	0.12 $\pm$ 0.04c
T12	15.72 $\pm$ 1.60cd	17.57 $\pm$ 5.96ab	1.84 $\pm$ 0.83c	2.33 $\pm$ 1.01bc	0.28 $\pm$ 0.13c	0.18 0.08bc



Las variables morfológicas de plántula se mostraron principalmente sensibles a la presencia de PAH, solo la longitud de raíz (LONG-R) se vio afectada por la triple interacción de los factores, HMA, ZnO y PAHs, mientras que los pesos secos, tanto de plántula (PSP) como de raíz (PSR), fueron afectados por la interacción HMA×PAHs (Tabla 7).

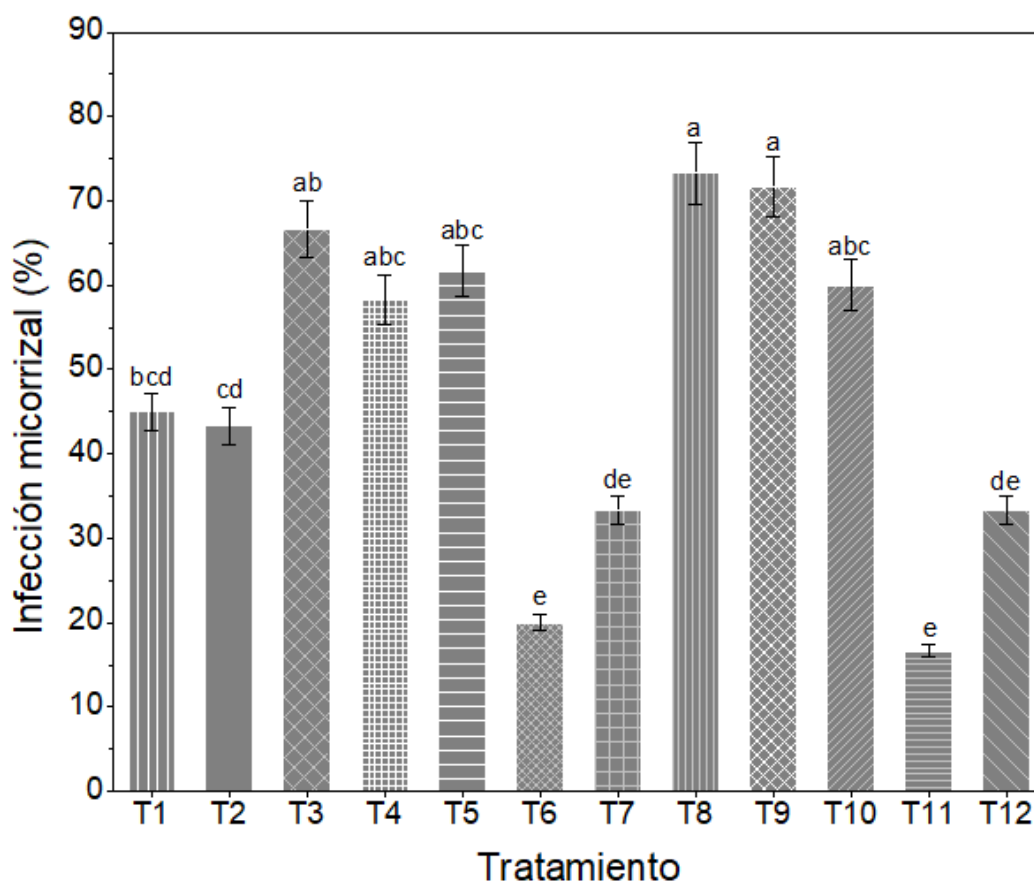
**Tabla 7.** Valores de  $F$  y  $p$  de factores e interacciones de factores en variables morfológicas de plántulas en el análisis ANOVA de dos y tres vías.

Variables morfológicas de plántulas														
Variables	HMA		ZnO		PAHs		HMA×ZnO		HMA×PAHs		ZnO×PAHs		HMA×ZnO×PAHs	
	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$
ALT-P	0.181	0.6739	0.283	0.7560	79.503	<0.001*	0.596	0.5587	0.019	0.8920	1.153	0.3325	2.653	0.0910
LON-R	2.237	0.1478	0.661	0.5257	24.428	<0.001*	2.515	0.1019	0.357	0.5559	0.320	0.7292	4.209	0.0271*
PSP	5.410	0.0288*	0.975	0.3917	56.154	<0.001*	0.003	0.9971	7.031	0.0140*	0.688	0.5123	0.794	0.4634
PSR	2.669	0.1153	0.626	0.5430	38.623	<0.001*	0.046	0.9551	7.644	0.0108*	0.627	0.5426	0.274	0.7624

Nivel de significancia \* ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.3. Porcentaje de infección micorrizal en la raíz.

La infección micorrízica se detectó en todos los tratamientos establecidos, al no someter el suelo a procesos de esterilización inicial, sin embargo, de acuerdo al ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) se obtuvieron diferencias significativas (Figura 17). La infección micorrízica fue significativamente superior en los tratamientos T8 y T9, en 62.95 y 59.26 % respecto al tratamiento control (T1). Por el contrario, en los tratamientos T6 y T11 el porcentaje de infección micorrizal fue significativamente menor en 44.00 y 37.77 %, respecto al tratamiento T1.



**Figura 17.** Porcentaje de infección micorrizal en raíces de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) en un suelo contaminado con antraceno y fenantreno (PAHs), tratado con nanopartículas de ZnO (ZnO-NP) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Niveles de significancia establecidos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje de esporas y vesículas de los distintos tratamientos mostraron diferencias significativas de acuerdo al ANOVA de una vía (Tabla 8).

**Tabla 8.** Efecto de los tratamientos sobre los indicadores de la simbiosis micorrízica arbuscular en raíz de *Zea mays* L. Los datos del ANOVA de una vía son la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Indicadores de asociación		
	Arbúsculos	Vesículas	Esporas
	[%]		
T1	45.56 $\pm$ 6.94bcd	0.89 $\pm$ 0.84a	20.00 $\pm$ 3.33bcde
T2	33.33 $\pm$ 3.33cd	0.67 $\pm$ 0.33a	35.00 $\pm$ 1.67ab
T3	55.56 $\pm$ 6.94ab	0.56 $\pm$ 0.69a	16.67 $\pm$ 5.77cde
T4	54.44 $\pm$ 5.09abc	0.33 $\pm$ 0.33a	13.33 $\pm$ 5.77cde
T5	43.33 $\pm$ 8.82abc	0.33 $\pm$ 0.33a	25.56 $\pm$ 1.92abcd
T6	15.00 $\pm$ 1.67e	0.22 $\pm$ 0.38a	10.00 $\pm$ 10.00de
T7	21.67 $\pm$ 1.67de	0.22 $\pm$ 0.38a	14.07 $\pm$ 5.25cde
T8	58.89 $\pm$ 15.03a	0.89 $\pm$ 0.77a	20.00 $\pm$ 3.33bcde
T9	66.67 $\pm$ 12.02a	3.00 $\pm$ 3.38a	21.67 $\pm$ 1.67bcde
T10	15.00 $\pm$ 5.00abc	0.33 $\pm$ 0.33a	40.00 $\pm$ 12.02a
T11	0.00 $\pm$ 0.00e	0.00 $\pm$ 0.00a	5.56 $\pm$ 1.92e
T12	0.00 $\pm$ 0.00de	0.00 $\pm$ 0.00a	28.33 $\pm$ 1.67abc

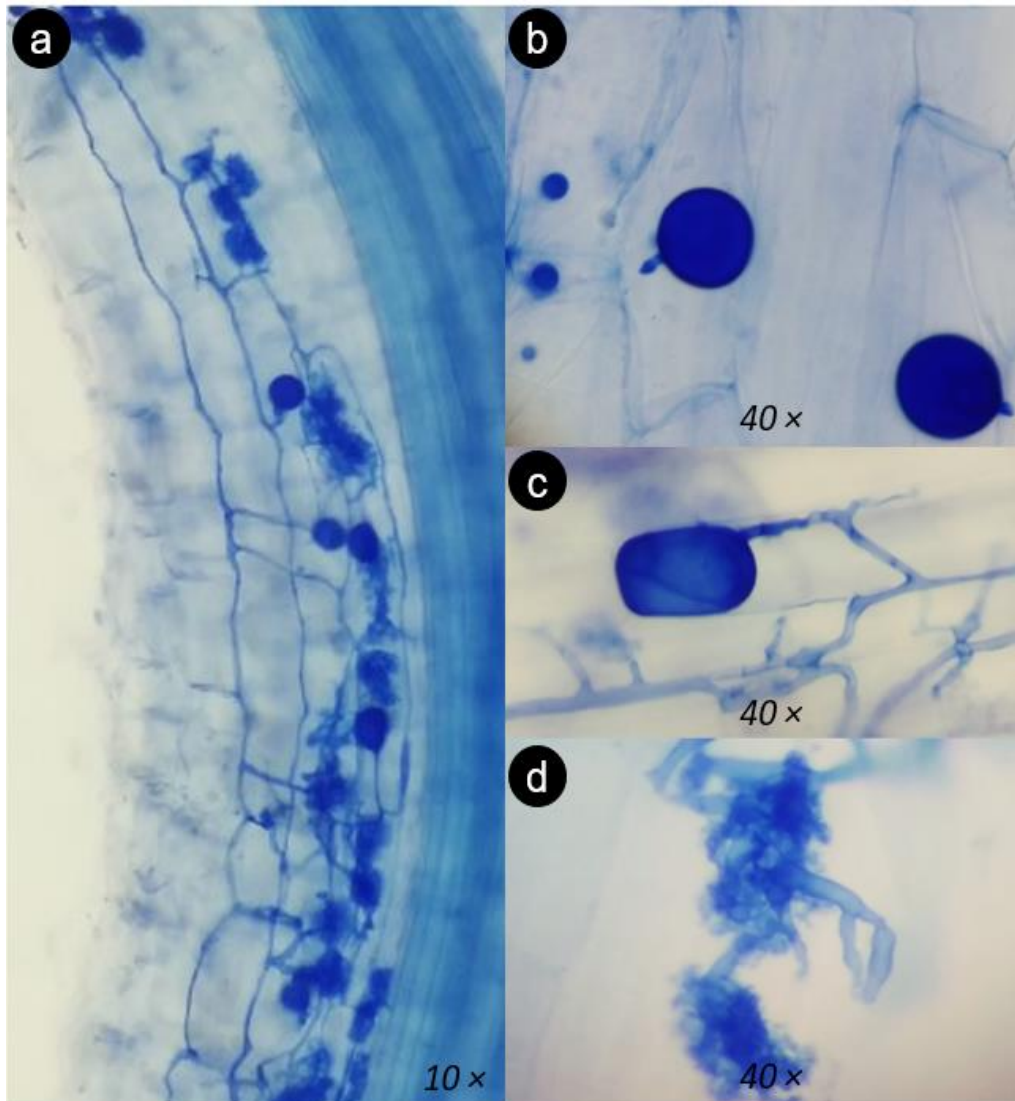
Por otra parte, la presencia de arbusculos se observó afectada por la contaminación de PAHs, tanto de manera individual como en interacción con los HMA (HMA×PAHs) o con ZnO (ZnO×PAHs). Mientras que ZnO como factor individual y en interacción con los PAHs intervino en la presencia de esporas, seguido por la triple interacción HMA×ZnO×PAHs (Tabla 9).

**Tabla 9.** Valores de  $F$  y  $p$  de factores e interacciones de factores en indicadores de asociación micorrízica arbuscular en el análisis ANOVA de dos y tres vías.

Indicadores de asociación micorrízica arbuscular														
Variables	HMA		ZnO		PAHs		HMA×ZnO		HMA×PAHs		ZnO×PAHs		HMA×ZnO×PAHs	
	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{1,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$	$F_{2,35}$	$p$
Arbusculos	0.866	0.3618	1.176	0.3265	270.252	<0.001*	0.568	0.5742	45.513	<0.001*	9.631	0.009*	2.485	0.1054
Vesículas	1.277	0.2701	0.750	0.4835	3.547	0.0724	1.257	0.3033	3.360	0.0798	1.497	0.2448	1.121	0.3430
Esporas	1.188	0.2870	23.714	<0.001*	1.484	0.2354	0.674	0.5193	2.175	0.1538	17.559	<0.001*	5.315	0.0127*

Nivel de significancia \* ( $p < 0.05$ ).

A nivel simbiótico la infección por HMA se identificó como de tipo *Arum* (Figura 18a), al presentar hifas desarrolladas en los espacios intercelulares y arbuscúlos como ramificaciones terminales intracelulares (Figura 18d).



**Figura 18.** Colonización micorrízica arbuscular. a) colonización tipo *Arum* en T8, interacción AMF + ZnO-NP ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) b) esporas en estado de latencia en T12 interacción PAHs + AMF + ZnO-NP ( $300 \text{ mg kg}^{-1}$ ), c) vesícula d) arbuscúlos maduros en T8.

#### 7.4. Actividad antioxidante en las plántulas de maíz.

En la Tabla 10 se presentan los datos obtenidos del ANOVA de una vía, la prueba de Tukey reveló que la producción de fenoles fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en T12 (Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>†</sup>) comparado con T1 (Suelo + Planta), mientras que el resto de los tratamientos se agrupan conforme la dosis de PAHs.

**Tabla 10.** Efecto de los tratamientos sobre la producción de antioxidantes en *Zea mays* L. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Antioxidantes no enzimáticos			
	Fenoles [mg EAG 100g <sup>-1</sup> ]	Flavonoides [mg EQ 100g <sup>-1</sup> ]	DPPH [mg EAA 100g <sup>-1</sup> ]	ABTS [mg EAA 100g <sup>-1</sup> ]
T1	67.61 ± 4.87d	33.86 ± 0.84 a	58.96 ± 3.78bc	51.04 ± 0.93efg
T2	72.74 ± 4.34cd	38.34 ± 0.71a	63.96 ± 3.77b	50.42 ± 0.41efg
T3	59.34 ± 1.17e	41.73 ± 0.39b	31.37 ± 0.22f	53.68 ± 3.26def
T4	49.56 ± 0.59fg	29.79 ± 0.14f	42.48 ± 1.32d	48.79 ± 2.95fg
T5	45.37 ± 1.72g	34.73 ± 0.23e	34.30 ± 3.07ef	49.80 ± 1.07fg
T6	76.79 ± 2.44c	33.74 ± 0.82e	63.08 ± 3.05b	57.35 ± 2.87cde
T7	79.50 ± 2.76cb	35.72 ± 0.59de	57.09 ± 3.65bc	59.99 ± 1.34bcd
T8	57.31 ± 2.84ef	39.36 ± 1.46bc	41.48 ± 1.88de	66.54 ± 1.89ab
T9	59.73 ± 3.79e	38.18 ± 0.67cd	21.76 ± 0.86g	63.40 ± 2.68abc
T10	88.77 ± 1.01b	35.84 ± 0.67de	53.28 ± 1.38bc	46.43 ± 3.54g
T11	77.14 ± 0.78c	28.00 ± 0.16f	56.71 ± 2.56bc	51.16 ± 1.01efg
T12	120.49 ± 0.64a	46.21 ± 2.22a	96.73 ± 2.72a	69.13 ± 3.83a

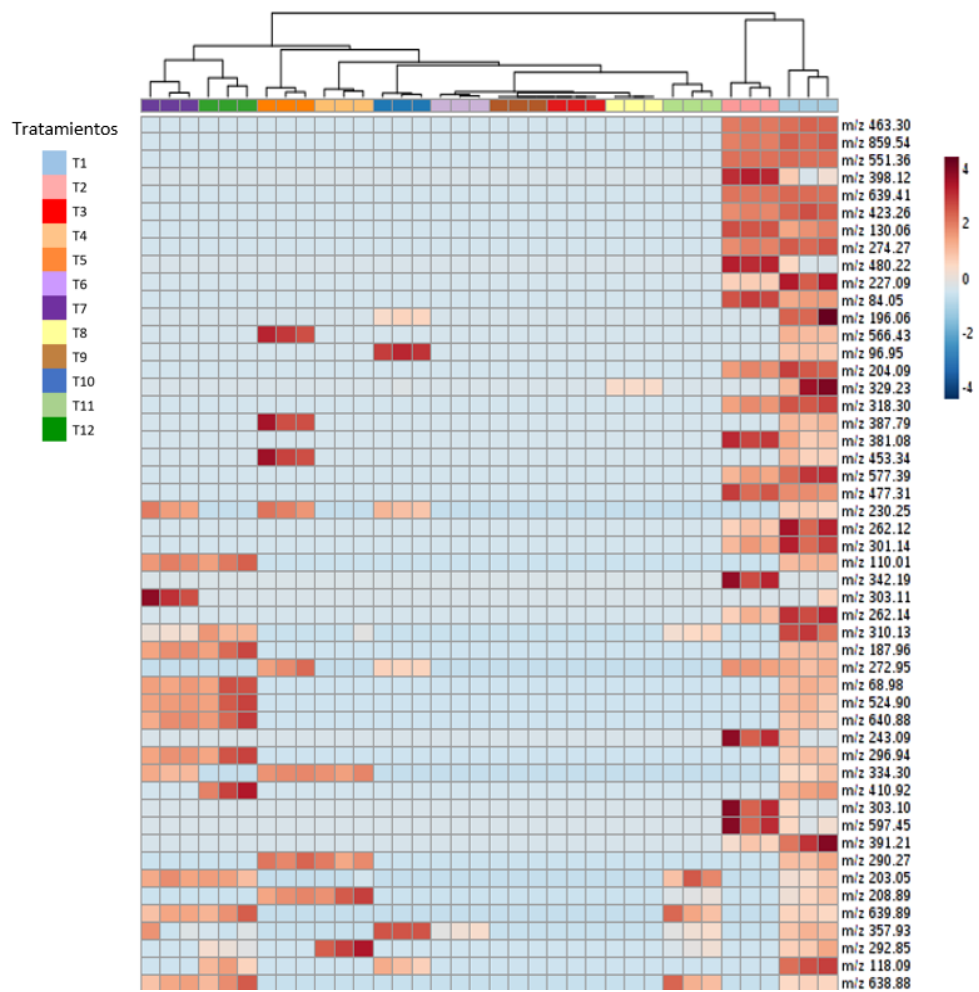
En el caso de los flavonoides T2 y T12 (38.34 y 46.21 mg EQ 100g<sup>-1</sup>ps, respectivamente) mostraron un comportamiento estadísticamente similar a T1 (33.86 mg EQ 100g<sup>-1</sup>ps), siendo estas las mayores concentraciones respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte, en la actividad de inhibición de DPPH, en el T12 la actividad fue significativamente mayor que en

T1. En los tratamientos T3, T4, T5, T8 y T9 la actividad de inhibición de DPPH disminuyó significativamente respecto al tratamiento T1. La producción de radicales ABTS resultó estadísticamente mayor en T8, T9 y T12, en comparación con T1.

#### **7.5. Producción de metabolitos secundarios por las plántulas de maíz (*Zea mays* L.).**

Se recuperaron alrededor de 500 señales de masa carga (m/z) diferentes. Al realizar el filtrado estadístico y la identificación de las señales m/z con las bibliotecas del software Progenesis QI, se mantuvieron 101 señales con carga positiva y 20 en negativa. En la Figura 19, se muestra el mapa de calor del análisis jerárquico de conglomerados (hierarchical cluster analysis, HCA) donde se representan los 50 metabolitos más abundantes en las muestras analizadas para los doce tratamientos.

En los tratamientos control (T1) y T2, coinciden la producción de un gran número de metabolitos, lo que jerárquicamente los agrupa, mientras que el resto de los tratamientos forman otro gran grupo, donde es menor la coincidencia de metabolitos producidos respecto al tratamiento T1. No obstante, los tratamientos con T3, T8, T9 y T11, todos con presencia de HMA, podrían tener un comportamiento diferente a T1.



**Figura 19.** Análisis jerárquico de conglomerados (hierarchical cluster analysis, HCA). El dendrograma de distancia euclidiana asocia los tratamientos con abundancia similar respecto a las señales masa carga (m/z).



## **8. DISCUSIÓN.**

### **8.1. Características del suelo.**

La textura y el pH son propiedades críticas que regulan la solubilidad de las nanopartículas y la movilidad de los iones metálicos en el suelo. García Gómez *et al.*, [88] reportaron que las dosis altas de ZnO-NP (900 mg Kg<sup>-1</sup>) incrementan el valor del pH en suelos ácidos o calcáreos. En suelos ácidos (pH 4-5.4) las ZnO-NP podrían solubilizarse e incrementar la biodisponibilidad del Zn pero, también podría incrementar la toxicidad, en función de la concentración. Además, estos autores reportaron que en suelos calcáreos con alto contenido de arcilla (39 %) el Zn se inmoviliza. No obstante, en este estudio el valor de pH se mantuvo estadísticamente igual en todos los tratamientos. Lo anterior debido a que el suelo tiene 24.16% de arcillas, las cuales podrían haber inmovilizado el Zn<sup>+2</sup> al ser adsorbido de forma intercambiable en las arcillas [89, 90], promoviendo el transporte y degradación de los PAHs [91].

De manera similar, no se identificaron cambios significativos en la CE del suelo. Lo anterior debido a la buena calidad del suelo, como se evidencia por su valor de pH, contenido de materia orgánica y concentración de nutrientes. Lo anterior evidencia que el suelo agrícola se mantuvo en un constante manejo agrícola, especializado en la producción experimental, lo cual no daña la capacidad de resiliencia [92].

### **8.2. Fitonanorremediación de PAHs.**

Somtrakoon *et al.*, [46] evaluaron el efecto de los PAHs (antraceno y fenantreno a 20 y 2 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) durante la germinación y emergencia de plántulas de maíz ceroso. Con ambas concentraciones se generó un estado de latencia significativo en la tasa de germinación, por lo que las plantas de maíz se consideran sensibles ante la contaminación por PAHs. En el presente estudio, la aplicación de PAHs en el suelo retrasó la emergencia de las plántulas por 12 días, respecto al tratamiento control, lo que confirma el efecto negativo de antraceno y fenantreno. Este efecto negativo en maíz varía en función de las diferentes etapas de crecimiento o desarrollo, de la toxicidad del contaminante y de su capacidad de respuesta vía estrés oxidativo [93].

Los HMA mejoran las condiciones de fitorremediación de suelos contaminados por PAHs, En esta investigación los HMA mejoraron significativamente la remoción de antraceno y fenantreno en los tratamientos de fitorremediación asistida con HMA y ZnO. De acuerdo con Ren *et al.*, [94], se detectó más del 97 % de remoción de fenantreno y 85-87 % en el caso de pireno, en suelos contaminados y remediados por fitorremediación de *Sesbania cannabina* asistida con HMA y rizobia. Lo anterior coincide con la remoción lograda en los tratamientos de fitorremediación asistida por HMA (T10), aun en el tratamiento donde la inoculación se acompañaba por la adición de 150 mg ZnO-NP kg<sup>-1</sup> de suelo seco (T11). La dosis alta de ZnO-NP con 300 mg kg<sup>-1</sup> y la inoculación con HMA (T12) no favoreció la degradación de PAHs. Sin embargo, los tratamientos con ZnO-NP (T6 y T7) no afectaron la degradación de PAHs. Wu *et al.*, [95] reportaron que nanopartículas de hierro cero valente (Fe<sub>nano</sub>) disminuyeron la absorción de metales por las plantas de maíz pero inhibieron el desarrollo de los HMA y sus funciones en la rizosfera. Además, esos autores indicaron que los HMA aliviaron el estrés fisiológico causado por Fe<sub>nano</sub> pero inhibieron la eficiencia de la absorción de metales pesados i.e. se identificó un efecto antagonista entre las Fe<sub>nano</sub> y los HMA.

### **8.3. Desarrollo del cultivo.**

#### **8.3.1. Unidades SPAD.**

Zhao *et al.*, [96] demostraron que la tasa fotosintética neta, reportada como unidades SPAD, tiende a disminuir significativamente (12%) en plantas tratadas con dosis de hasta 800 mg kg<sup>-1</sup>, cambios que a su vez desaparecen cuando se cumplen los 40 días del cultivo, logrando una producción estable de clorofila hasta la madurez, alcanzando valores al redor de las 50 unidades SPAD. Adicionalmente, esos mismos autores reportaron que las ZnO-NP disminuyeron la conductancia estomática (15%). Sin embargo, se ha reportado que las unidades SPAD de un cultivo de maíz con el manejo agronómico adecuado debe estar entre 52.0 y 56.0 unidades SPAD [97]. Los valores SPAD registrados en esta investigación oscilaron entre 20.03 y 37.00 unidades en todos los tratamientos. Lo que indica que estos valores se encuentran por debajo del rango de suficiencia i.e. las plantas de maíz en la presente investigación estaban en las primeras etapas fenológicas del cultivo (finales del

desarrollo vegetativo), considerando que la variedad JAGUAN es de ciclo intermedio (presenta floración entre los 83 y 90 DDS).

Este estudio demostró que en plantas utilizadas para procesos de fitonanorremediación de suelos (T6 y T7), solo la dosis alta *i.e.* 300 mg kg<sup>-1</sup> de ZnO-NP (T7), disminuyó significativamente la tasa fotosintética respecto al control e incluso, la tasa fotosintética del T7 fue menor que en el T2, el cual no fue tratado con HMA ni ZnO-NP. Tang *et al.*, [98] reportaron que la tasa fotosintética aumentó del 1.88 % al 38.79 % en plantas de maíz inoculadas con HMA, respecto a aquellas plantas sin el inoculo, al cultivar en un suelo contaminado con diésel. Los mismos autores reportaron valores de unidades SPAD entre 16.10 y 31.38 a los 60 DDS, los cuales no superan los reportados en esta investigación a los 50 DDS. Se ha reportado que los HMA incrementan significativamente la actividad fotosintética en condiciones de estrés como salinidad [99] pero, no se ha reportado su efecto en plantas contaminadas con PAHs y enmendadas con ZnO-NP. Además, Wang *et al.*, 2015 [100] reportaron que plantas de arabis (*Arabidopsis thaliana* L.) disminuyeron significativamente (50%) la actividad fotosintética, respecto al control, cuando fueron tratadas con 300 mg ZnO-NP L<sup>-1</sup>.

### **8.3.2. Caracterización morfológica de las plántulas de maíz.**

Las plantas tratadas con PAHs (T2) y aquellas enmendadas con PAHs, HMA y ZnNP (T11 y T12), disminuyeron significativamente la altura de la planta, en comparación con el tratamiento control. En el caso de los tratamientos T11 y T12 las dosis de ZnO-NP (150 y 300 mg kg<sup>-1</sup>) no atenuaron los efectos del estrés inducido por la contaminación de PAHs, de manera que se puede considerar que la combinación de HMA y ZnO-NP no favorece la altura de las plantas. En esta investigación no se identificaron diferencias significativas en peso fresco de planta, peso fresco de raíz, peso seco de planta y peso seco de raíz. Sin embargo, Zhang *et al.*, [101] reportaron que la adición de ZnO-NP promovió la producción de biomasa en plantas de arroz cultivadas bajo estrés inducido por cadmio (Cd) y alivió los efectos tóxicos del contaminante. Por el contrario, Wang *et al.*, 2015 [100] concluyeron que dosis de 200 y 300 mg ZnO-NP L<sup>-1</sup> disminuyeron significativamente el crecimiento de arabis en ~20 y 80 %, respectivamente, comparado con el tratamiento control.

Así mismos Zhang *et al.*, [102] reportaron que ZnO-NP a 1,000 mg L<sup>-1</sup> redujeron significativamente la longitud de raíz de maíz y pepino en 17 y 51%, respectivamente. Sin embargo, en esta investigación la longitud de raíz de las plantas de maíz tratadas con 150 o 300 mg ZnO-NP kg<sup>-1</sup> fue estadísticamente igual al control. Lo anterior se puede atribuir a las dosis empleadas, considerando que el efecto de las NPs sobre un cultivo específico está en función de las dosis empleadas [103].

Es importante indicar que el Zn es un micronutriente esencial para los cultivos y estos lo requieren en pequeñas cantidades (10-70 mg kg<sup>-1</sup>) [104]. Suresh *et al.*, (2013) [105] reportaron que las nanopartículas de ZnO influyen en el equilibrio de nutrientes del suelo, mejorando su fertilidad. Por consiguiente, las ZnO-NP en dosis de 100 a 200 mg kg<sup>-1</sup> ejercen un efecto estimulante en las plantas, mismo que se neutraliza hasta los 400 mg kg<sup>-1</sup> y llega a generar toxicidad entre los 800 y 3200 mg kg<sup>-1</sup> [106]. Liu *et al.*, [107], reportaron que las ZnO-NP ejercen diversos efectos sobre el crecimiento y nutrición del maíz como se evidenció en las variables de biomasa, pigmentos fotosintéticos y actividad de las raíces. Ellos demostraron que los efectos de ZnO-NP difieren en función de las características y condiciones del suelo. En este estudio, en el que se empleó un suelo agrícola de la UAAAN, diferente al de Liu *et al.*, [107], se demostró que las ZnO-NP dosificadas al suelo a 150 o 300 mg ZnO-NP kg<sup>-1</sup> no afectaron significativamente la producción de biomasa (peso fresco de planta, peso fresco de raíz, peso seco de planta y peso seco de raíz).

La biología del suelo también influye en el destino y efecto de las nanopartículas y los contaminantes [108]. En el caso particular de los HMA, estos alivian los efectos desfavorables debido a tensiones inducidas por contaminantes en el suelo, mejorando el crecimiento de las plantas, protegiendo y aliviando el daño oxidativo inducido por los contaminantes metálicos, ya que se reconoce que el micelio extra-radical puede inmovilizar metales pesados [109]. Rostami *et al.*, [110] encontraron que el fluoranteno a 300 mg kg<sup>-1</sup> disminuyó significativamente el número de brotes y la biomasa de la raíz de pasto (*Festuca arundinacea* Schreber), no obstante, al incluir ácido salicílico (AS) y HMA en sus tratamientos, se incrementó significativamente la producción de biomasa y se estimuló la producción de enzimas antioxidantes, las cuales fungen como surfactantes al potencializar la

fitorremediación. En esta investigación, los HMA no aliviaron los efectos de los PAHs sobre las variables de biomasa pero, sí favorecieron la remoción de PAHs en el suelo cuando se empleó una dosis baja de ZnO-NP (150 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco).

#### **8.4. Actividad antioxidante e infección micorrizal en la raíz.**

Los cultivos generan ROS cuando son sometidos a cualquier tipo de estrés, biótico o abiótico. En respuesta a las altas concentraciones de ROS en las células de la planta, ésta activa mecanismos bioquímicos de defensa antioxidante enzimático o no enzimático para eliminar el exceso de ROS [111] mediante la producción de fenoles, flavonoides, DPPH y ABTS. Tanto el AS como las ZnO-NP son utilizados en la agronomía para incrementar la actividad antioxidante de las plantas. En cambio, en este experimento la dosificación conjunta PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>†</sup> (T12) generó un efecto cruzado, el cual resultó en una sobreproducción de ROS que no favoreció la producción de biomasa de *Zea mays* L., debido a un efecto fitotóxico. Las plantas cultivadas en fitonanorremediación asistida por HMA (T10, T11 y T12) incrementaron significativamente la producción de fenoles, en función de la concentración de ZnO-NP. Resultados similares en experimentos en los que también emplearon ZnO-NP fueron reportados por García-López *et al.*, [111] y Zafar *et al.*, [112] en plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) y mostaza negra (*Brassica nigra* L.) respectivamente. García-López *et al.*, [111] reportaron la inhibición en la longitud de la raíz de chile tratado con ZnO-NP, no obstante, disminuyó la concentración de radicales DPPH y aumentó la producción de compuestos fenólicos.

Los fenoles como antioxidantes no enzimáticos juegan un papel importante en el rendimiento y la adaptación de las plantas y se asocian con el estrés oxidativo inducido por la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [111], el cual podría estar relacionado con la reducida presencia de arbusculos y vesículas, los cuales son indicadores de asociación simbiótica mutualista HMA-Planta. Está reportado que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede acumular en las paredes de las hifas de los HMA [113]. En concordancia con lo anterior, la presente investigación reportó una alta producción de antioxidantes no enzimáticos en los tratamientos T10, T11 y T12, pero sin presencia de indicadores de asociación simbiótica mutualista HMA-Planta. Por otra parte, la coexistencia HMA y ZnO-NP (tratamientos T8 y T9), favoreció la infección micorrizal, destacando la

presencia de arbusculos. Por lo anterior, los resultados sugieren que el grado de estrés oxidativo inducido por las diferentes dosis de ZnO-NP afectaron la bioquímica de las plantas e incrementaron la comunicación bioquímica entre los simbiontes, el cual se asume como un incremento en la producción de ROS de comunicación HMA-planta [100, 114].

Para conceptualizar la acción de los factores evaluados, es necesario retomar la capacidad oxidativa de las ZnO-NP. Cuando las ZnO-NP liberan iones de oxígeno, estos se transforman en radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y ionizan el agua disponible de los poros del suelo y de las células radiculares. De esta forma, se obtienen y liberan iones de hidrogeno ( $H^+$ ) y radicales hidróxidos ( $OH^{\cdot}$ ), estos últimos desencadenan la hidroxilación de los PAHs [115]. Es decir, esta acción de oxidoreducción incrementó en las plantas el contenido de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), en concentraciones que superaron la producción normal de los orgánulos celulares dificultando la comunicación bioquímica HMA-planta, como se evidencia por los bajos indicadores de asociación [98]. Adicionalmente, se ha reportado que los HMA mejoran la tolerancia de las plantas hospederas a estrés ambiental a través de la reducción de la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  [113]. Por otra parte, si la concentración de  $H_2O_2$  es alta en los arbusculos ( $130 \mu M H_2O_2 \text{ g peso seco}^{-1}$ ), estos podrían colapsar, degradarse o perder sus ramificaciones aún durante el desarrollo de los HMA [113]. Incluso, si bajo condiciones de estrés las células de la planta acumulan gran cantidad de ROS, estas activan la peroxidación lipídica de membranas, dañando el sistema de membranas e incluso produciendo la muerte de la planta. La concentración de ROS fue alta en las plantas de este experimento inoculadas con HMA y tratadas con PAHs (T10, T11 y T12), considerando las concentraciones de antioxidantes que sintetizaron (Tabla 8). Lo anterior disminuyó la infección micorrizal y favoreció la degradación de PAHs, salvo en el tratamiento T12 (Suelo + Planta + PAHs + HMA + ZnO-NP<sup>†</sup>).

Una mayor acumulación de metabolitos secundarios es el resultado de una mayor liberación de iones  $Zn^{+2}$  [116]. Los factores bióticos o abióticos que afectan el desarrollo de las plantas pueden alterar su diversidad metabólica causando la biosíntesis o la degradación de varios compuestos, entre ellos los antioxidantes [117]. Un ejemplo típico de factor biótico es la simbiosis mutualista planta-HMA que se estudió en la presente investigación.

## 8.5. Metabolómica.

El análisis metabolómico con enfoque no dirigido permitió identificar diversos compuestos únicamente a través de su masa carga ( $m/z$ ; Figura 18). Con base en el mapa de color de análisis jerárquico de conglomerados, los tratamientos T1 y T2 son similares en más del 50% de los compuestos. Esto implica que los PAHs afectaron la síntesis de metabolitos en esos tratamientos. Chroma *et al.*, [118], reportaron que las enzimas peroxidasa y citocromo P450 están involucradas en los mecanismos de degradación de PAHs y bifenilos policlorados en plantas de maíz. Por su parte Sivaram *et al.*, [119] identificaron cambios en compuestos relacionados con el metabolismo de la galactosa y la biosíntesis del aminoácido ARNt en hojas de plantas de maíz, lo cual interpretaron como un mecanismo adaptativo de defensa para PAHs con cinco anillos bencénicos y para mezclas de PAHs. Adicionalmente, Zhao *et al.*, [120] reportaron que las nanopartículas de cobre afectaron significativamente la síntesis de metabolitos en los frutos de pepino. En particular, identificaron cambios en metilnicotinamida, trigonelina, imidazol y quinolinato vía análisis dirigido por resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -NMR) y GC-MS.

Para identificar los metabolitos involucrados es necesario realizar un análisis metabolómico dirigido con el fin de identificar la fórmula y nombre de los metabolitos  $m/z$  y correlacionarlos con los compuestos antioxidantes que en esta investigación se reportan. Además, debe considerarse que existe un vínculo entre las ROS y los mensajeros de señalización secundaria, los cuales conducen a la regulación de transcritores del metabolismo secundario en las plantas [121].

## 9. CONCLUSIONES.

Los HMA favorecieron la remoción de PAHs del suelo tratado con PAHs + HMA y en suelo acondicionado con PAHs + HMA + 150 mg ZnO-NP kg<sup>-1</sup> de suelo seco. Lo que evidencia que una dosis baja de ZnO-NP (150 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco) no afecta el proceso de biorremediación pero, una la dosis alta (300 mg kg<sup>-1</sup> de suelo seco) sí disminuye la eficiencia de la biorremediación. La fitonanorremediación no es significativamente mejor a la técnica aplicada de fitorremediación, en términos de degradación de antraceno y fenantreno.

Los resultados sugieren que el grado de estrés oxidativo inducido por las diferentes dosis de ZnO-NP favoreció la síntesis bioquímica de las plantas e incrementó la comunicación bioquímica entre los simbioses. En este sentido, las ZnO-NP, incrementaron el porcentaje de infección micorrízica, incluso en dosis de 300 mg kg<sup>-1</sup>, mejorando la actividad del HMA.

El estrés generado por la presencia de PAHs favoreció la producción de metabolitos secundarios, a través de la actividad antioxidante pero, este estrés fue aliviado por los HMA los cuales mejoraron las características de la planta, quizás reduciendo su consumo al almacenar el contaminante en sus estructuras hifales, lo que promueve un mejor crecimiento de la planta aun ante el estrés causado por el contaminante, reduciendo el daño celular. El uso de HMA para asistir los procesos de fitorremediación representa una alternativa sustentable al ser ecológica y económicamente viable.

La respuesta antioxidante y los cambios inducidos por ZnO-NP en la bioquímica de las plantas inducen la producción de metabolitos secundarios.

La confirmación final de los metabolitos identificados, requerirán de una serie de estándares puros en formula de los candidatos tentativos, que se pueden obtener en bibliotecas especializadas, lo que en este caso exploratorio no se observó como factible, por lo que se debe continuar realizando el estudio de estos compuestos metabólicos, de manera individual a fin de explicar las vías metabólicas que se involucran con la respuesta al estrés oxidativo que se induce por el ambiente generado en la aplicación de los factores tanto de manera individual como en interacción.



## 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. A. Cachada, T. Rocha-Santos, A.C. Duarte. Soil and Pollution: An Introduction to the Main Issues. In: A.C. Duarte, A. Cachada, T. Rocha-Santos (Eds). Soil Pollution: From Monitoring to Remediation. Academic Press, 2018, pp. 1-28.
2. M.I.A Khan, B. Biswas, E. Smith, R. Naidu, M. Megharaj. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. Chemosphere. 212 (2018) 755-767.
3. S. Zeng, J. Ma, Y. Yang, S. Zhang, Gang-Jun Liu, F. Chen. Spatial assessment of farmland soil pollution and its potential human health risks in China. Sci. Total. Environ. 687 (2019) 642-653.
4. E. Aranda, J.M. Scervino, P. Godoy, R. Reina, J.A. Ocampo, R.-M. Wittich, I. García-Romera. Role of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus custos* in the dissipation of PAHs under root-organ culture conditions. Environ. Pollut. 181 (2013) 182-189.
5. S.N. Sushkova, T. Minkina, I. Deryabkina, S. Mandzhieva, I. Zamulina, T. Bauer, G. Vasilyeva, E. Antonenko, V. Rajput. Influence of PAH contamination on soil ecological status. J. Soils Sediment. 18 (2018) 2368-2378.
6. N.C. Johnson, J. Jansa. Mycorrhizas: At the Interface of Biological, Soil, and Earth Sciences. In: N.C. Johnson, C. Gehring, J. Jansa (Eds). Mycorrhizal mediation of soil fertility, structure, and carbon storage. Elsevier, 2017, pp. 1-6.
7. A. Hodge, T. Helgason, A.H. Fitter. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi; Mini-review. Fungal Ecol. 3 (2010) 267-273.
8. I. Lenoir, J. Fontaine, A. Lounès-Hadj Sahraoui. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses; A review. Phytochem. 123 (2016) 4-15.

9. A. Cristaldi, G.O. Conti, E.H. Jho, P. Zuccarello, A. Grasso, C. Copat, M. Ferrante. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs; A brief review. *Environ. Technol. Innov.* 8 (2017) 309-326.
10. S. Kuppusamy, P. Thavamani, K. Venkateswarlu, Y.B. Lee, R. Naidu, M. Megharaj. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions; A review. *Chemosphere.* 168 (2017) 944-968.
11. M.A. Hernández-Carrillo, R. Torres-Ricárdez, M.F. García-Mendoza, E. Ramírez-Morales, L. Rojas-Blanco, L.L. Díaz-Flores, G.E. Sepúlveda-Palacios, F. Paraguay-Delgado, G. Pérez-Hernández. Eu-modified ZnO nanoparticles for applications in photocatalysis. *Catal. Today.* (2018) 1-7.
12. D.S. Read, M. Matzke, H.S. Gweon, L.K. Newbold, L. Heggelund, M.D. Ortiz, E. Lahive, D. Spurgeon, C. Svendsen. Soil pH effects on the interactions between dissolved zinc, non-nano- and nano-ZnO with soil bacterial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 4120-4128.
13. S.S. Patil, U.U. Shedbalkar, A. Truskewycz, B.A. Chopade, A.S. Ball. Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environ. Technol. Innov.* 5 (2016) 10-21.
14. I. Corsi, M. Winther-Nielsen, R. Sethi, C. Punta, C. De. Torre, G. Libralato, G. Lofrano, L. Sabatini, M. Aiello, L. Fiordi, F. Cinuzzi, A. Caneschi, D. Pellegrini, I. Buttino. Ecofriendly nanotechnologies and nanomaterials for environmental applications: Key issue and consensus recommendations for sustainable and ecosafe nanoremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154 (2018) 237-244.
15. Statista. The Statistics Portal. Global corn production in 2018/2019, by country. <https://www.statista.com/statistics/254292/global-corn-production-by-country/>. Accedido el 21 de febrero del 2019.

16. I. Hussain, M. Puschenreiter, S. Gerhard, P. Schöftner, S. Yousaf, A. Wang, J.H. Syed, T.G. Reichenauer. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: Improvement opportunities and field applications. *Environ. Exper. Bot.* 147 (2018) 202-219.
17. S. Javeria, V. Kumar, P. Sharma, L. Prasad, M. Kumar, A. Varma. Mycorrhizal Symbiosis: Ways Underlying Plant–Fungus Interactions. In: A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja (Eds). *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*. Springer International Publishing, Cham., 2017, pp. 183-207.
18. M.J. Goss, M. Carvalho, I. Brito, Diversity in Arbuscular Mycorrhizal Fungi With Clarisse Brígido. In: M.J. Goss, M. Carvalho, I. Brito (Eds). *Functional Diversity of Mycorrhiza and Sustainable Agriculture*. Academic Press, 2017, pp. 59-79.
19. M. Vosátka, J. Rydlová, R. Sudová, M. Vohník. Mycorrhizal Fungi as Helping Agents in Phytoremediation of Degraded and contaminated Soils. In: M. Mackova, D. Dowling, T. Macek (Eds). *Phytoremediation Rhizoremediation*. Springer Netherlands, Dordrecht, 2006, pp. 237-257.
20. M. Kumar, R. Prasad, V. Kumar, N. Tuteja, A. Varma. Mycorrhizal Fungi Under Biotic and Abiotic Stress. In: A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja (Eds). *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*. Springer International Publishing, Cham, 2017, pp. 57-69.
21. H. Liao, Y.C. Zhang, Q.Y. Zuo, B.B. Du, W.L. Chen, D. Wei, Q.Y. Huang. Contrasting responses of bacterial and fungal communities to aggregate-size fractions and long-term fertilizations in soils of northeastern China. *Sci. Total. Environ.* 635 (2018) 784-792
22. T. Souza. AMF's Main Structures. In: T. Souza (Eds). *Handbook of Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 43-63.

23. S. Singh, A. Prakash. Tripartite Association Among Plant, Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Bacteria. In: T. Satyanarayana, B.N. Johri (Eds). *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht, 2012, pp. 243-259.
24. H. Yu, T. Li, Y. Liu, L. Ma. Spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in urban soil of China. *Chemosphere*. 230 (2019) 498-509.
25. S.E. Barrer. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Boletín, Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 7 (2009) 124-132.
26. F.A. Smith, S.E. Sminth. How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning?. *Plant Soil*. 363 (2013) 7-18.
27. A.C. Ramos, A.R. Façanha, P.T. Lima, J. Feijó. pH signature for the responses of arbuscular mycorrhizal fungi to external stimuli. *Plant. Signal. Behav.* 3 (2008) 850-852.
28. D. Martens, J. Maguhn, P. Spitzauer, A. Kettrup. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural ecosystem. *Fresenius J. Anal. Chem.* 359 (1997) 546-554.
29. R. Tong, X. Yang, H. Su, Y. Pan, Q. Zhang, J. Wang, M. Long. Levels, sources and probabilistic health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in the agricultural soils from sites neighboring suburban industries in Shanghai. *Sci. Total Environ.* 616-617 (2018) 1365-1373.
30. K. Hayakawa, *Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons (NPAHs) and Other Oxidative Derivatives of PAHs*. In: K. Hayakawa (Eds). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Springer Singapore, Singapore, 2018, pp. 3-10.

31. M. Rani, U. Shanker. Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Nanomaterials. In: G. Crini, E. Lichtfouse (Eds). Green Adsorbents for Pollution Removal. Springer International Publishing, Cham., 2018, pp. 343-387.
32. F.J. Rivas. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. *J. Hazard. Mater.* 138 (2006) 234-251.
33. M. Crampon, J. Bodilis, F. Le Derf, F. Portet-Koltalo. Alternative techniques to HPCD to evaluate the bioaccessible fraction of soil-associated PAHs and correlation to biodegradation efficiency. *J. Hazard. Mater.* 314 (2016) 220-229.
34. M. Guo, Z. Gong, R. Miao, J. Rookes, D. Cahill, J. Zhuang. Microbial mechanisms controlling the rhizosphere effect of ryegrass on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in an aged-contaminated agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 113 (2017) 130-142.
35. S.R. Wild, K.C. Jones. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88 (1995) 91-108.
36. G. Liu, J. Niu, W. Guo, X. An, L. Zhao. Ecological and health risk-based characterization of agricultural soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons in the vicinity of a chemical plant in China. *Chemosphere.* 163 (2016) 461-470.
37. A.P. Ingle, A.B. Seabra, N. Duran, M. Rai. 9 - Nanoremediation: A New and Emerging Technology for the Removal of Toxic Contaminant from Environment. In: S. Das (Eds). *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, Oxford, 2014, pp. 233-250.
38. D.W. Sparling. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: D.W. Sparling (Eds). *Ecotoxicology Essentials: Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants*. Academic Press, San Diego, 2016, pp. 193-223.

39. I. Cecchin, K.R. Reddy, A. Thomé, E.F. Tessaro, F. Schnaid. Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119 (2017) 419-428.
40. S. Gan, E.V. Lau, H.K. Ng. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 532-549.
41. P. Zhang, Y. Chen. Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in surface soil of China: A review. *Sci. Total Environ.* 605-606 (2017) 1011-1020.
42. Y.K. Kumar, N. Gupta, A. Kumar, L.M. Reece, N. Singh, S. Rezanian, K.S. Ahmad. Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecol. Eng.* 120 (2018) 274-298.
43. J. Wei, X. Zhang, X. Liu, X. Liang, X. Chen. Influence of root components of celery on pyrene bioaccessibility, soil enzymes and microbial communities in pyrene and pyrene-diesel spiked soils. *Sci. Total Environ.* 599-600 (2017) 50-57.
44. A. Wawra, W.F. Hanl, A. Jäger, M. Puschenreiter, G. Soja, T. Reichenauer, A. Watzinger. Investigations of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons based on <sup>13</sup>C-labeled phenanthrene in a soil co-contaminated with trace elements using a plant assisted approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 6364-6377.
45. S.R. Wild, M.L. Berrow, S.P. McGrath, K.C. Jones. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. *Environ. Pollut.* 76 (1992) 25-32.
46. K. Somtrakoon, W. Chouychai, H. Lee. Removal of Anthracene and Fluoranthene by Waxy Corn, Long Bean and Okra in Lead-Contaminated Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 95 (2015) 407-413.

47. W. Song, J. Zhang, J. Guo, J. Zhang, F. Ding, L. Li, Z. Sun. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 199 (2010) 389-397.
48. S. Bhatia, N. Verma. Photocatalytic activity of ZnO nanoparticles with optimization of defects. *Mater. Res. Bull.* 95 (2017) 468-476.
49. K. Qi, B. Cheng, J. Yu, W. Ho. Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *J. Alloys Compd.* 727 (2017) 792-820.
50. F. Wang, X. Liu, Z. Shi, R. Tong, C.A. Adams, X. Shi. Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants – A soil microcosm experiment. *Chemosphere.* 147 (2016) 88-97.
51. A. Joe, S.-H. Park, D.-J. Kim, Y.-J. Lee, K.-H. Jhee, Y.-K. Sohn, E.-S. Jang. Antimicrobial activity of ZnO nanoplates and its Ag nanocomposites: insight into an ROS-mediated antibacterial mechanism under UV light. *J. Solid. State. Chem.* 267 (2018). 124-133.
52. M. Rajtor, Z. Piotrowska-Seget. Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere.* 162 (2016) 105-116.
53. E.J. Joner, C. Leyval (2001) Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza.* 10 (2001) 155-159.
54. Y. Gao, Q. Li, W. Ling, X. Zhu. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *J. Hazard. Mater.* 185 (2011) 703-709.

55. F.Y. Wu, X.Z. Yu, S.C. Wu, X.G. Lin, M.H. Wong. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *J. Hazard. Mater.* 187 (2011) 341-347.
56. A. Ingle, D. Rathod, A. Varma, M. Rai. Understanding the Mycorrhiza-Nanoparticles Interaction. In: A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja (Eds). *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials.*, Springer International Publishing, Cham., 2017, pp. 311-324.
57. N.S. Ghasemi, S. Fallah, L.R. Pokhrel, A. Rostamnejadi. Natural amelioration of Zinc oxide nanoparticle toxicity in fenugreek (*Trigonella foenum-gracum*) by arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) secretion of glomalin. *Plant. Physiol. Biochem.* 112 (2017) 227-238.
58. M. Nath, D. Bhatt, R. Prasad, N. Tuteja. Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism and Signaling in Plant-Mycorrhizal Association Under Biotic and Abiotic Stress Conditions. In: A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja (Eds). *Mycorrhiza - Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials.* Springer, Cham, 2017, pp. 223-232.
59. C.A. Ferreira, D. Ni, Z.T. Rosenkrans, W. Cai. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res.* 11 (2018) 4955-4984.
60. E. Lefevre, N. Bossa, M.R. Wiesner, C.K. Gunsch. A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities. *Sci. Total Environ.* 565(2016) 889-901.
61. A.A.H.A Latef, C. He. Arbuscular mycorrhizal influence on growth, photosynthetic pigments, osmotic adjustment and oxidative stress in tomato plants subjected to low temperature stress. *Acta Physiol. Plant.* 33 (2011) 1217-1225.
62. S. Jan, P. Ahmad. Chapter 3 - Metabolomics Studies of Stress in Plants. In: S. Jan and P. Ahmad (Eds). *Ecometabolomics: Metabolic Fluxes versus Environmental Stoichiometry.* Academic Press, 2019, pp. 127-178.



63. S. Şirin, B. Aslim. Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Med. Chem. Res.* 28 (2019) 229-238.
64. V. Kumar, M. Sharman, T. Khare, S. H. Wani. Chapter 17 - Impact of Nanoparticles on Oxidative Stress and Responsive Antioxidative Defense in Plants. In: D.K. Tripathi, P. Ahmad, S. Sharma, D.K. Chauhan, N.K. Dubey (Eds). *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. Academic Press, 2018, pp. 393-406.
65. R. Javed, B. Yucesan, M. Zia, E. Gurel. Elicitation of Secondary Metabolites in *Callus* Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown Under ZnO and CuO Nanoparticles Stress. *Sugar Tech.* 20 (2018) 194-201.
66. Y. Huang, A. S. Adeleye, L. Zhao, A. S. Minakova, T. Anumol, A. A. Keller. Antioxidant response of cucumber (*Cucumis sativus*) exposed to nano copper pesticide: Quantitative determination via LC-MS/MS. *Food Chem.* 270 (2019) 47-52.
67. G. Marslin, C.J. Sheeba, G. Franklin. Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst. *Front. Plant Sci.* 8:832 (2017).
68. A. Ghatak, P. Chaturvedi, W. Weckwerth. Metabolomics in Plant Stress Physiology. In: R. Varshney, M. Pandey, A. Chitikineni (Eds). *Plant Genetics and Molecular Biology: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Cham., 2018, pp. 187-236.
69. G.W. Gee, D. Or. Particle-size analysis. In: Dane JH, Topp GC (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 4. Physical Methods* American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 2002, pp. 255-294.
70. Ma. D.S. Soto, V. P. Marti. *Prácticas de Edafología y Climatología*. Alfaomega. 2002.
71. G.W. Thomas. Soil pH and soil acidity. In: Sparks DL (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods* Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1996, pp. 475-490.

72. F.E. Cargua, M.V. Rodríguez, D.A. Damián, C.G. Recalde, G.P. Santillán. Analytical methods comparison for soil organic carbon determination in Andean Forest of Sangay National Park Ecuador. *Acta Agron.* 66 (2017) 408-413.
73. M.J.J. Hoogsteen, E.A. Lantinga, E.J. Bakker, J.C.J. Groot, P.A. Tittone. Estimating soil organic carbon through loss on ignition: effects of ignition conditions and structural water loss. *Eur. J. Soil Sci.* 66 (2015) 320-328.
74. M. Rizwan, S. Ali, B. Ali. M. Adrees, M. Arshad, A. Hussain, M. Zia ur Rehman, A.A. Waris. Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere.* 214 (2019) 269-277.
75. G.E. Soka, M.E. Ritchie. Arbuscular mycorrhizal spore composition and diversity associated with different land uses in a tropical savanna landscape, Tanzania. *Appl. Sci. Ecol.* 125 (2018) 222-232.
76. M. Sánchez de Prager, A.R. Posada, P.A. Velásquez, C.M. Nравáez. Metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular. 1er ed., Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2010.
77. ISTA. Reglas Internacionales para el Análisis de las Semillas. International Seed Testing Association. Zürich, 2016.
78. M.-B. Bouzourâa, A. En Naciri, A. Moadhen., H. Rinnert., M. Guendouz, Y. Battie, A. Chaillou, M.-A. Zaïbi, M. Oueslati. Effects of silicon porosity on physical properties of ZnO films. *Mater. Chem. Phys.* 175 (2016) 233-240.
79. F. Fernández-Luqueño, R. Marsch, D. Espinosa-Victoria, F. Thalasso, M.E. Hidalgo, A. Munive, M.L. Luna-Guido, L. Dendooven. Remediation of PAHs in a saline–alkaline soil amended with wastewater sludge and the effect on dynamics of C and N. *Sci. Total Environ.* 402 (2008) 18-28.

80. E. Hurtado, F. González-Vallejos, C. Röper, E. Bastías, P. Mazuela. Propuesta para la determinación del contenido de clorofila en hojas de tomate. B. NOTAS CIENTÍFICAS / SCIENTIFIC NOTES. 35 (2017) 129-130.
81. J.M. Phillips, D.S. Hayman. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55 (1970) 158-IN18.
82. C. Saénz, S. Tapia, J. Chávez, P. Robert. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). Food Chemistry. 114 (2009) 616–622.
83. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Reventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods enzymology. 299 (1999) 152-178
84. A. Arvouet-Grand, B. Vennat, A. Pourrat, P. Legret. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. Journal de Pharmacie de Belgique. 49 (1994) 462–468.
85. A. Reyes-Munguía, E. Azúara-Nieto, C. Beristain. Purple maguey (*Rhoeo discolor*) antioxidant properties. CyTA- Journal of Food, 7:3 (2009) 209-216.
86. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolonization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26 (1999) 1231–1237.
87. M. Rendón-Anaya, J.M. Montero-Vargas, S. Saburido-Álvarez, A. Vlasova, S. Capella-Gutierrez, J.J. Ordaz-Ortiz, O. M. Aguilar, R.A. Vianello-Brandoni, A. Delgado-Salas, A. Herrera-Estrella. Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. Genome Biology. 18:60 (2017).

88. C. García-Gómez, A. Obrador, D. González, M. Babín, M.D. Fernández. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown in a calcareous soil and an acidic soil. *Sci. Total Environ.* 644 (2018) 770-780.
89. C.O. Dimkpa. Soil properties influence the response of terrestrial plants to metallic nanoparticles exposure. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* 6 (2018) 1-8.
90. H. Sturikova, O. Krystofova, D. Huska, V. Adam. Zinc, zinc nanoparticles and plants. *J. Hazard. Mater.* 349 (2018) 101-110.
91. F. Liu, B. Xu, Y. He, P. C. Brookes, J. Xu. Co-transport of phenanthrene and pentachlorophenol by natural soil nanoparticles through saturated sand columns. *Environ. Pollut.* 249 (2019) 406-413.
92. M. Ludwig, P. Wilmes, S. Schrader. Measuring soil sustainability via soil resilience. *Sci. Total Environ.* 626 (2018) 1484-1493.
93. J. Dupuy, P. Leglize, Q. Vincent, I. Zelko, C. Mustion, S. Ouvrard, T. Sterckeman. Effect and localization of phenanthrene in maize roots. *Chemosphere.* 149 (2016) 130-136.
94. C.G. Ren, C.C. Kong, B. Bian, W. Liu, Y. Li, Y.M. Luo, Z.H. Xie. Enhanced phytoremediation of soils contaminated with PAHs by arbuscular mycorrhiza and rhizobium. *Int. J. Phytoremediat.* 19:9 (2017) 2921-2928.
95. S.L. Wu, M. Vosatka, K. Vogel-Mikus, A. Kavcic, M. Kelemen, L. Sepec, P. Pelicon, R. Skala, A.R.V. Powter, M. Teodoro. Nano Zero-Valent Iron Mediated Metal(loid) Uptake and Translocation by Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 7640-7651.
96. L. Zhao, Y. Sun, J.A. Hernandez-Viezcas, J. Hong, S. Majumdar, G. Niu, M. Duarte-Gardea, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey. Monitoring the Environmental Effects of CeO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles Through the Life Cycle of Corn (*Zea mays*) Plants and in Situ  $\mu$ -XRF Mapping of Nutrients in Kernels. *Environ. Sci. Technol.* 49:5 (2015) 2921-2928.

97. W.P. Piekielek, R. H. Fox, J. D. Toth, K.E. Macneal. Use of a Chlorophyll Meter at the Early Dent Stage of Corn to Evaluate Nitrogen Sufficiency. *Agron. J.* 87:3 (1995) 403-408.
98. M. Tang, H. Chen, J.C. Huang, Z.Q. Tian. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol. Biochem.* 41 (2009) 936-940.
99. M. Sheng, M. Tang, H. Chen, B.W. Yang, F.F. Zhang, Y.H. Huang. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mychorrhiza.* 18 (2008) 287-296.
100. X. Wang, X. Yang, S. Chen, Q. Li, W. Wang, C. Hou, X. Gao, L. Wang, S. Wang. Zinc Oxide Nanoparticles Affect Biomass Accumulation and Photosynthesis in *Arabidopsis*. *Front. Plant. Sci.* 6 (2015) 1243.
101. W. Zhang, J. Long, J. Li, M. Zhang, G. Xiao, X. Ye, W. Chang, H. Zeng. Impact of ZnO nanoparticles on Cd toxicity and bioaccumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Sci. Pollut. R.* 26 (2019) 23119-23128.
102. R.C. Zhang, H.B. Zhang, C. Tu, X.F. Hu, L.Z. Li, Y.M. Luo, P. Christie. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn (II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 11109-11117.
103. G. Medina-Pérez, F. Fernández-Luqueño, R.G. Campos-Montiel, F. López-Valdez, E. Vazquez-Nuñez, H. Pérez-Hernández, S. Loera-Serna, G. Salas-Herrera, A. Zavala-Cortés. Chapter 9. Effect of nanoparticles on plants, earthworms, and microorganisms. In: F. López-Valdez y F. Fernández-Luqueño (Eds). *Agricultural Nanobiotechnology, Modern Agriculture for a Sustainable Future*. Springer, 2018, pp. 161-181.
104. F. López-Valdez, F. Fernández-Luqueño, M.F. Valerio-Rodríguez. Mineral fertilizers, bio-fertilizers and PGPRs: Advantages and disadvantages of its implementation.

In: S. Sinha, K.K. Pant and S. Bajpai (Eds). Fertilizer Technology II, Biofertilizers. Studium Press, USA, 2015, pp. 277-294.

105. A.K. Suresh, D.A. Pelletier, M.J. Doktycz. Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. *Nanoscales*. 5 (2013) 463-74.
106. N. Garg, S. Singh. Arbuscular Mycorrhiza *Rhizophagus irregularis* and Silicon Modulate Growth, Proline Biosynthesis and Yield in *Cajanus cajan* L. Millsp. (pigeonpea) Genotypes Under Cadmium and Zinc Stress. *J. Plant Growth Regul.* 37 (2018) 46-63.
107. X. Liu, F. Wang, Z. Shi, R. Tong, X. Shi. Bioavailability of Zn in ZnO nanoparticle-spiked soil and the implications to maize plants. *J. Nanopart. Res.* 175:17 (2015) 1-11.
108. K. Xu, Y.X. Liu, C.X. Lu, J.M. Cheng. A Review: Toxicity Effects and Influence Factors of the Nanomaterials Used in Stabilizing/Immobilizing Heavy Metals in Soils. *Nanosci. Nanotech. Let.* 11 (2019) 601-610.
109. I. Lenoir, A.L.H. Sahraoui, J. Fontaine. Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: a review. *Eur. J. Soil Sci.* 67 (2016) 624-640.
110. M. Rostami, S. Rostami. Effect of salicylic acid and mycorrhizal symbiosis on improvement of fluoranthene phytoremediation using tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Chemosphere*. 232 (2019) 70-75.
111. J.I. García-López, F. Zavala-García, E. Olivares-Sáenz, R.H. Lira-Saldívar, E. D. Barriga-Castro, N.A. Ruiz-Torres, E. Ramos-Cortez, R. Vázquez-Alvarado, G. Niño-Medina. Zinc Oxide Nanoparticles Boosts Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Capsicum annuum* L. during Germination. *Agronomy*. 8 (2018) 215.
112. H. Zafar. A. Ali, J.S. Ali. I. U. Haq. MU. Zia. Effect of ZnO Nanoparticles on *Brassica nigra* Seedlings and Stem Explants: Growth Dynamics and Antioxidative Response. *Front. Plant. Sci.* 7 (2016) 535.

113. W. Qiang-Sheng, Z. Ying-Ning, E.F. Abd-Allah. Chapter 15 - Mycorrhizal Association and ROS in Plants. In: P. Ahmad (Eds). *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. Academic Press, 2014, pp. 453-475.
114. G. Marlin, C.J. Sheeban, G. Franklin. Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst. *Front. Plant. Sci.* 8 (2017) 832.
115. F. Korte, G. Kvesitadze, D. Ugrekhelidze, M. Gordeziani, G. Khatisashvili, O. Buadze, G. Zaalishvili, F. Coulston. Review: Organic Toxicants and Plants. *Ecotox. Environ. Safe.* 47 (2000) 1-26.
116. S.D. Ebbs, S.J. Bradfield, P. Kumar. J.C. White, C. Musante, X. Ma. Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions. *Environ. Sci.: Nano.* 3 (2016) 114-126.
117. R. Fokom, S. Adamou, D. Essono, D.P. Ngwasiri, P. Eke, C.T. Mofor, F. Tchoumboungang, B.F. Fekam, P.H.A Zollo, D. Nwaga, A.K. Sharma. Growth, essential oil content, chemical composition and antioxidant properties of lemongrass as affected by harvest period and arbuscular mycorrhizal fungi in field conditions. *Ind. Crop. Prod.* 138 (2019) 111477.
118. L. Chroma, M. Mackova, P. Kucerova, C.I. Wiesche, C. Burkhard, T. Macek. Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta. Biotechnol.* 22 (2002) 35-41.
119. A.K. Sivaram, S.R. Subashchandrabose, P. Logeshwaran, R. Lockington, R. Naidu, M. Megharaj. Metabolomics reveals defensive mechanisms adapted by maize on exposure to high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere.* 214 (2018) 771-780.
120. L. Zhao, J. Hu, Y. Huang, H. Wang, A. Adeleye, C. Ortiz, A.A. Keller. <sup>1</sup>H NMR and GC-MS based metabolomics reveal nano-Cu altered cucumber (*Cucumis sativus*) fruit nutritional supply. *Plant. Physiol. Biochem.* 110 (2017) 138-146.

121. T.F. Jorge, T. Tohge, R. Wendenburg, J.C. Ramalho, F.C. Lidon, A.I. Ribeiro-Barros, A.R. Fernie, C. António. Salt-stress secondary metabolite signatures involved in the ability of *Casuarina glauca* to mitigate oxidative stress. *Environ. Exp. Bot.* 166 (2019) 10308.