



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD SALTILLO

**Efecto de nanopartículas sobre el crecimiento y desarrollo de frijol común
cultivado en invernadero y sobre la abundancia y colonización de hongos
micorrízicos arbusculares en trigo cultivado en campo**

TESIS

Que presenta

César Roberto Sarabia Castillo

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía

Director:

Dr. Fabián Fernández Luqueño

Ramos Arizpe, Coah.

Diciembre 2022

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño a mi mamá, que me dio la vida y ha estado conmigo en todo momento, y quien siempre me ha apoyado en cada una de mis decisiones `profesionales.

*“Gusto y compromiso son necesarios para ejercer la ciencia, vivo de ella y es lo que me da
felicidad”*

-Dr. Ricardo Rodríguez-Estrella-

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Monserrat Castillo por preocuparse por mi superación y preparación profesional y por el gran apoyo que siempre me ha brindado, eres mi pilar que me mantiene fuerte.

Al Dr. Fabián Fernández Luqueño por invitarme a desarrollar esta tesis de doctorado, así como por darme la oportunidad de ir creciendo profesionalmente, haciéndome parte de diversas actividades que todo investigador debe aprender durante su formación, desde la escritura de capítulos de libro, artículos, formar parte de comités científicos en congresos y revistas nacionales e internacionales, sinceramente, ¡muchas gracias!

Al CINVESTAV unidad Saltillo por la oportunidad que se me brindo de realizar mis estudios de Doctorado, así como al Grupo de SRNyE.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al COECYT, por el apoyo durante el primer año de doctorado.

A mis amigos y compañeros que han estado acompañándome durante este viaje llamado doctorado de los cuales he aprendido mucho y me llevo un grato recuerdo de todos.

A Alexis M. Porto, por estar conmigo en todo momento, por su apoyo y por su paciencia y por brindarme su gran amor incondicional.

ÍNDICE

LISTA DE ACRÓNIMOS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Frijol común: descripción e importancia	14
2.1.1. Etapas de desarrollo del frijol	14
2.2. Simbiosis rhizobia-leguminosa	16
2.3. Trigo: descripción e importancia	17
2.4. Interacción simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares	17
2.5. Nanotecnología y sus aplicaciones.....	19
2.5.1. Nanomateriales y nanopartículas.....	20
2.5.2. Producción, liberación e impactos ambientales de NMs	20
2.5.2.1. Fuentes de producción y liberación de NMs.....	20
2.5.2.2. Impactos ambientales de los NMs	21
2.5.2.3. Impacto de NMs en plantas	25
2.5.2.4. Impacto de NMs en las interacciones simbióticas planta-microorganismo	27
III. JUSTIFICACIÓN.....	29
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo general	30
5.2. Objetivos particulares.....	30
VI. METODOLOGÍA CIENTÍFICA.....	31
6.1. Materiales y métodos.....	31
6.1.1. Metodología del experimento en invernadero.....	31
6.1.1.1. Semillas.....	31

6.1.1.2.	Nanopartículas.....	31
6.1.1.3.	Muestreo y caracterización fisicoquímica del suelo.....	31
6.1.1.3.1.	Determinación de humedad inicial del suelo.....	32
6.1.1.3.2.	Determinación de textura del suelo.....	32
6.1.1.3.3.	Determinación de densidad aparente del suelo.....	33
6.1.1.3.4.	Determinación de porcentaje de materia orgánica del suelo.....	34
6.1.1.3.5.	Determinación de pH y conductividad eléctrica del suelo.....	35
6.1.1.4.	Montaje experimental en invernadero.....	35
6.1.1.5.	Muestreos y colecta de datos del experimento en invernadero.....	38
6.1.1.5.1.	Unidades SPAD.....	38
6.1.1.5.2.	Muestreos destructivos y toma de muestras en fresco.....	39
6.1.1.5.3.	Toma de muestras en seco.....	40
6.1.2.	Metodología del experimento en campo.....	41
6.1.2.5.	Semillas.....	41
6.1.2.6.	Nanopartículas.....	41
6.1.2.7.	Muestreo y caracterización fisicoquímica y biológica del suelo del experimento en campo	41
6.1.2.8.	Montaje experimental en campo.....	42
6.1.2.9.	Muestreos y colecta de datos del experimento en campo.....	44
6.1.2.9.1.	Conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	45
6.1.2.9.2.	Identificación de infección micorrízica arbuscular en raíces de trigo.....	46
6.2.	Análisis estadístico.....	47
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
7.1.	Resultados del experimento en invernadero.....	48
7.1.1.	Caracterización de NPs por difracción de rayos x y microscopia electrónica de barrido por emisión de campo.....	48

7.1.2.	Caracterización fisicoquímica del suelo.....	50
7.1.3.	Unidades SPAD.....	50
7.1.4.	Características morfológicas del cultivo de <i>P. vulgaris</i> L.....	53
7.1.5.	Análisis FTIR-ATR de tejido vegetal.....	56
7.1.5.1.	Espectros FTIR-ATR de hojas frescas.....	56
7.1.5.2.	Espectros FTIR-ATR de tallos frescos.....	58
7.1.5.3.	Espectros FTIR-ATR de raíces frescas.....	61
7.1.6.	Análisis de tejido por MEB.....	64
7.1.7.	Concentración elemental en tejido vegetal.....	69
7.1.8.	Análisis de componentes principales (ACP).....	74
7.1.9.	Determinación de pH y conductividad eléctrica del suelo después de cada muestreo.....	75
7.2.	Resultados del experimento en campo.....	78
7.2.1.	caracterización fisicoquímica y biológica del suelo del experimento en campo.....	78
7.2.2.	Determinación de pH y conductividad eléctrica después de cada muestreo.....	79
7.2.3.	Conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) después de cada muestreo.....	82
7.2.4.	Colonización micorrízica arbuscular en raíces de trigo.....	86
VIII.	CONCLUSIÓN.....	90
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de las etapas fenológicas del frijol común (<i>P. vulgaris</i> L.) durante las fases vegetativa y reproductiva [6].....	15
Tabla 2. Lista de nanomateriales usados en productos de consumo incluidos en el inventario de productos de consumo.	20
Tabla 3. Visión general de los efectos de diferentes tipos de nanomateriales sobre algunos organismos del medio.....	22
Tabla 4. Efectos tóxicos causados por diferentes nanomateriales en plantas cultivadas.	26
Tabla 5. Efectos de nanomateriales sobre las interacciones simbióticas planta-microorganismo .	28
Tabla 6. Factores de corrección para diferentes temperaturas de la suspensión.	33
Tabla 7. Tratamientos empleados en el experimento.	36
Tabla 8. Reactivos utilizados en la preparación de la solución nutritiva.	38
Tabla 9. Reactivos utilizados en la preparación de la solución stock.	38
Tabla 10. Tratamientos empleados en el experimento en campo.	42
Tabla 11. Características de plantas de frijol (<i>P. vulgaris</i> L.), cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹	55
Tabla 12. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para hojas de <i>P.vulgaris</i> L. a los 30, 60 y 90 DDS.....	58
Tabla 13. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para tallos de <i>P.vulgaris</i> L. a los 30, 60 y 90 DDS.....	61
Tabla 14. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para raíces de <i>P.vulgaris</i> L. a los 30, 60 y 90 DDS.....	64
Tabla 15. Concentración de K y P en diferentes secciones de plantas de frijol común cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹ a diferentes tiempos de muestreo.....	70
Tabla 16. Concentración de Ti, Zn y Fe en diferentes secciones de plantas de frijol común °cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹ a diferentes tiempos de muestreo.....	73
Tabla 17. Matriz de cargas de los componentes extraídos.	74

Tabla 18. Algunas Características químicas de suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO o Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹ al finalizar el experimento en invernadero a los 30, 60 y 90 DDS.	77
Tabla 19. Descripción general de los géneros de esporas de HMA identificados en el suelo de estudio.	79
Tabla 20. Algunas Características químicas de suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO, Fe ₂ O ₃ o Ag a concentraciones de 20 mg m ⁻² al finalizar el experimento en campo a los 60 y 120 DDS.	81
Tabla 21. Número promedio de esporas de hongos micorrízicos arbusculares encontradas en 100 g de suelo a los 60 y 120 DDS en la rizósfera de trigo.	83
Tabla 22. Porcentajes de colonización de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de trigo expuestas a NPs a los 60 y 120 DDS.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación gráfica de las fases de desarrollo del frijol común con sus respectivas etapas fenológicas. Adaptado de [7].	16
Fig. 2. Arbúsculos formados durante la infección por hongos micorrízicos arbusculares en raíces de trigo.....	18
Fig. 3. Tipos de asociación micorrízica arbuscular, a) tipo Arum, b) tipo Paris.....	19
Fig. 4. Fuentes de producción/liberación de nanomateriales naturales y antropogénicos..	21
Fig. 5. Distribución de las U.E. en invernadero..	37
Fig. 6. Diferentes muestras de tejido vegetal sobre portaobjetos de acero	40
Fig. 7. Distribución de parcelas completamente aleatorizado y sistema de riego por microaspersión.	43
Fig. 8. Aplicación de nanopartículas en cada unidad experimental de acuerdo con el diseño de tratamientos.	44
Fig. 9. Dispositivo empleado para realizar los muestreos de la rizósfera.	45
Fig. 10. Representación esquemática del proceso de aislamiento y cuantificación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.	46
Fig. 11. Representación esquemática del proceso de preparación de raíces de trigo para la identificación de la infección micorrízica arbuscular.	47
Fig. 12. Caracterización de nanopartículas por DRX y FESEM. Patrones de DRX y micrografías FESEM de TiO ₂ (a y e), ZnO (b y f), Fe ₂ O ₃ (c y g) y Ag (d y h).	49
Fig. 13. Unidades SPAD en hojas de plantas de frijol (<i>P. vulgaris</i> L.), cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹	51
Fig. 14. Comportamiento de las unidades SPAD a través del tiempo por tratamiento.	52
Fig. 15. Espectros infrarrojos de hojas frescas de frijol común. a) 30 DDS, b) 60 DDS and c) 90 DDS.	57
Fig. 16. Espectros infrarrojos de tallos frescos de frijol común. a) 30 DDS, b) 60 DDS and c) 90 DDS.	60
Fig. 17. Espectros infrarrojos de raíces frescas de frijol común. a) 30 DDS, b) 60 DDS and c) 90 DDS.	63

Fig. 18. Micrografías de la superficie adaxial en hojas de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 and g) F300.....	66
Fig. 19. Micrografías de la estructura interna de tallos de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 and g) F300.....	67
Fig. 20. Micrografías de la estructura interna de las raíces de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 and g) F300.....	68
Fig. 21. ACP realizado sobre las Unidades SPAD y concentración de nutrientes por plantas de frijol común cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO ₂ , ZnO y Fe ₂ O ₃ a concentraciones de 150 y 300 mg kg ⁻¹	75
Fig. 22. Algunos ejemplos de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas antes del montaje experimental.	78
Fig. 23. Ejemplares de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas a los 60 DDS en los diferentes tratamientos.	84
Fig. 24. Ejemplares de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas a los 120 DDS en los diferentes tratamientos.	85
Fig. 25. Colonización de HMA en raíces de trigo a los 60 DDS.	88
Fig. 26. Colonización de HMA en raíces de trigo a los 120 DDS.	89

LISTA DE ACRÓNIMOS

APE: Abundancia promedio de esporas

DDS: Días después de la siembra

DE: Desviación estándar

DPE: Densidad promedio de esporas

DRX: Difracción de rayos x

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

FESEM: Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (siglas en inglés)

HMA: Hongo micorrízico arbuscular

NM/NMs: Nanomaterial/nanomateriales

NP/NPs: Nanopartícula/nanopartículas

U.E.: Unidad experimental

RESUMEN

En esta investigación se caracterizaron los efectos de nanopartículas sobre el crecimiento y desarrollo del frijol común cultivado en invernadero durante 90 días y sobre la abundancia de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y su colonización en raíces de trigo duro cultivado en campo por 120 días, a través de dos experimentos *i*) Experimento con frijol: se emplearon tres tipos de nanopartículas (NPs; TiO_2 , ZnO o Fe_2O_3) en concentraciones de 0, 150 o 300 mg kg^{-1} . Se realizaron muestreos destructivos a los 30, 60 y 90 días después de la siembra (DDS), en los cuales se determinó la longitud de raíz y tallo, así como la producción de biomasa seca, además de la determinación de grupos funcionales por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR) y un análisis microestructural de segmentos de hojas, tallos y raíces por microscopia electrónica de barrido (MEB). *ii*) Experimento con trigo duro: se evaluaron cuatro tipos de NPs (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 o Ag) en concentraciones de 0 o 20 mg m^{-2} . A los 60 y 120 DDS se realizaron muestreos de suelo rizosférico y raíces de las plantas de trigo, en los cuales se determinó la abundancia promedio de esporas (APE) de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) mediante el método de tamizado en húmedo, así como el porcentaje de infección en las raíces, mediante el método de clareo-tinción con azul tripano.

En el experimento en invernadero se identificó que la longitud de las raíces de frijol en el tratamiento con NPs de TiO_2 a una concentración de 300 mg kg^{-1} , fue significativamente menor, comparada con las raíces del tratamiento control a los 60 DDS. La longitud del tallo se vio afectada significativamente al presentar longitudes menores en los tratamientos con NPs de Fe_2O_3 (150 mg kg^{-1}) y TiO_2 (300 mg kg^{-1}) a los 30 y 60 DDS, respectivamente. Las NPs de TiO_2 a los 30 DDS, incrementaron significativamente la producción de biomasa seca de raíz, en comparación con el tratamiento control. Las frecuencias obtenidas por espectroscopia FTIR se relacionan con estiramientos y flexiones de vibraciones características de los grupos funcionales de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos presentes en cada una de las secciones de planta analizadas.

En el experimento en campo, con trigo duro, la abundancia promedio de esporas de HMA fue significativamente menor en los tratamientos con NPs de TiO_2 , ZnO y Ag a los 60 DDS, registrándose valores promedios de 400.5, 459.33 y 427.5 esporas, respectivamente; sin embargo, a los 120 DDS todos los tratamientos acondicionados con NPs fueron significativamente superiores

a los valores obtenidos en el tratamiento control. El uso de NPs en la agricultura, puede modificar algunas características morfológicas de las plantas, así como las comunidades de HMA; sin embargo, las NPs no afectaron la composición química de plantas de frijol ni dañaron sus tejidos, así mismo, la presencia de NPs no afectó la interacción simbiótica micorrízica arbuscular a pesar de haber afectado significativamente la APE en el suelo rizosférico.

ABSTRACT

In this research, the effects of nanoparticles on the growth and development of common bean grown in greenhouses for 90 days and on the abundance of arbuscular mycorrhizal fungal spores and their colonisation in durum wheat roots grown in the field for 120 days were characterised in two experiments *i*) Bean experiment: three types of nanoparticles (NPs; TiO₂, ZnO or Fe₂O₃) were used at concentrations of 0, 150 or 300 mg kg⁻¹. Destructive sampling was carried out at 30, 60 and 90 days after sowing (DAS), in which root and stem length and dry biomass production were determined, in addition to the determination of functional groups by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and microstructural analysis of leaf, stem and root segments by scanning electron microscopy (SEM). *ii*) Durum wheat experiment: four types of NPs (TiO₂, ZnO, Fe₂O₃ or Ag) were evaluated at concentrations of 0 or 20 mg m⁻². At 60 and 120 DAS, rhizospheric soil and roots of wheat plants were sampled to determine the average spore abundance (ASA) of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) using the wet sieving method, as well as the percentage of infection of these fungi in the roots, using the trypan blue staining method. In the greenhouse experiment, it was found that the length of bean roots in the treatment with TiO₂ NPs at a concentration of 300 mg kg⁻¹ was significantly shorter compared to the roots of the control treatment at 60 DAS. Stem length was significantly affected by shorter lengths in the Fe₂O₃ (150 mg kg⁻¹) and TiO₂ (300 mg kg⁻¹) NPs treatments at 30 and 60 DAS, respectively. TiO₂ NPs at 30 DAS significantly increased root dry biomass production compared to the control treatment. The frequencies obtained by FTIR spectroscopy are related to stretching and bending of vibrations characteristic of the functional groups of lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids present in each of the plant sections analysed.

In the field experiment with durum wheat, the average abundance of AMF spores was significantly lower in the treatments with TiO₂, ZnO and Ag NPs at 60 DAS, with average values of 400.5, 459.33 and 427.5 spores, respectively; however, at 120 DAS all treatments conditioned with NPs were significantly higher than the values obtained in the control treatment. The use of NPs in agriculture can modify some morphological characteristics of plants as well as AMF communities; however, NPs did not affect the chemical composition of bean plants or damage their tissues, and the presence of NPs did not affect the arbuscular mycorrhizal symbiotic interaction despite significantly affecting the ASA in the rhizospheric soil.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se plantea la preocupación de los problemas ambientales y agronómicos que pudieran ocasionar los nanomateriales (NMs), debido a la producción y uso creciente de productos manufacturados, los cuales contienen diversos NMs en al menos uno de sus componentes. Cuando el ciclo de vida de esos productos concluya los NMs podrían ser liberados, desechados o dispuestos inadecuadamente. Lo anterior implica que estos NMs estarán en contacto directo con el suelo, viento y cuerpos de agua, para interactuar en el medio ambiente con factores bióticos y abióticos, provocando alteraciones o desequilibrios ecológicos.

Sin embargo, se han reportado implicaciones positivas para algunos sistemas agrícolas aislados en donde solo se evalúa el impacto de NMs sobre un solo organismo, dejando de lado las interacciones de este organismo con otros factores bióticos y abióticos, y esto, puede dar lugar a amenazas importantes para los sistema agrícolas, es decir, los NMs pueden dañar algunas interacciones de importancia agroambiental como la interacción simbiótica rhizobia- leguminosa o la simbiosis micorrízica arbuscular-gramínea.

Por lo anterior, el presente trabajo pretende identificar y caracterizar los efectos de las nanopartículas (NPs) sobre el crecimiento y desarrollo de frijol común cultivado en invernadero mediante el estudio de las alteraciones morfológicas y biológicas en la planta, así como caracterizar los efectos de las NPs sobre la abundancia y colonización de raíces de trigo duro (*Triticum durum* Desf.) por HMA mediante ensayos de conteo de esporas y estructuras formadoras de micorrizas.

II. ANTECEDENTES

2.1. Frijol común: descripción e importancia

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo que puede producirse en una gran variedad de sistemas, regiones y ambientes a lo largo de América Latina, África, Medio Oriente, Europa, EE. UU., China, Canadá, entre otros [1]. En este sentido, la producción de frijol a nivel mundial para el año 2019, fue de 28.9 millones de toneladas, de las cuales México contribuyó con el 5.6% de dicha producción, posicionándolo como el quinto productor mundial de este cultivo [2].

En la actualidad, el frijol común es considerado una leguminosa importante en términos económicos, nutricionales, agronómicos y ambientales, ya que al ser consumido por el ser humano proporciona múltiples nutrientes como proteínas (14 a 33%), fibra (15.5 a 21 g por cada 100 g de grano cocinado), lisina (1.2 a 1.5 g por 100 g de grano), almidón, así como macro y micronutrientes esenciales para su desarrollo [1], [3], [4].

2.1.1. Etapas de desarrollo del frijol

Durante el crecimiento y desarrollo de la planta de frijol común, se pueden apreciar cambios en la fisiología y morfología que evidencian las etapas por las que pasa el cultivo desde su siembra hasta su cosecha. Dichos cambios se clasifican de manera general en dos fases: la fase vegetativa y la fase reproductiva, en las cuales pueden apreciarse diez etapas fenológicas bien definidas (5 etapas en cada fase), que describen perfectamente su desarrollo. [5], [6].

La fase vegetativa inicia cuando la semilla cuenta con las condiciones necesarias para que ocurra la germinación y concluye cuando aparecen los primeros botones florales; cabe destacar que durante esta fase la planta forma la mayor parte de su estructura vegetal, *i.e.* tallos, hojas, ramas y nudos, necesarios para iniciar la fase reproductiva, la cual se inicia en el momento en el que aparecen los primeros botones florales y termina hasta que la planta alcanza la madurez de cosecha, estas fases con sus respectivas etapas fenológicas se describen en la Tabla 1 y Fig. 1 [5], [6].

Tabla 1. Descripción de las etapas fenológicas del frijol común (*P. vulgaris* L.) durante las fases vegetativa (V) y reproductiva (R) [6].

Fase	Etapas fenológicas	Denominación	Descripción
Vegetativa	V0	Germinación	La semilla está en condiciones favorables para iniciar la germinación.
	V1	Emergencia	Los cotiledones aparecen al nivel del suelo.
	V2	Hojas primarias unifoliadas	Las hojas primarias de la planta se encuentran desplegadas.
	V3	Primera hoja trifoliada	La primera hoja trifoliada de la planta está desplegada.
	V4	Tercera hoja trifoliada	Presencia de la tercera hoja trifoliada totalmente desplegada.
Reproductiva	R5	Prefloración	Las plantas presentan el primer racimo en cualquier nudo sobre el tallo principal.
	R6	Floración	Presencia de la primera flor abierta.
	R7	Formación de vainas	Las plantas presentan la primera vaina con corola de la flor, colgada o desprendida.
	R8	Llenado de vainas	Presencia de la primera vaina llena con granos de tamaño completo.
	R9	Maduración	Presencia de la primera vaina decolorada y seca, amarillamiento y pérdida de hojas.

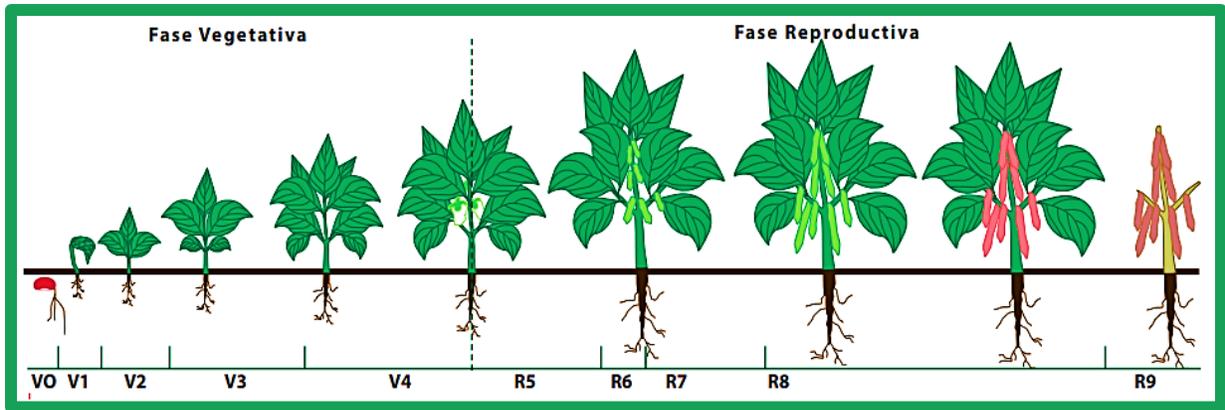


Fig. 1. Representación gráfica de las fases de desarrollo del frijol común con sus respectivas etapas fenológicas. Adaptado de [7].

2.2. Simbiosis rhizobia-leguminosa

En términos generales, una simbiosis es una interacción asociativa entre dos especies. La simbiosis mutualista es aquella en donde ambas especies se ven beneficiadas por dicha relación. Las plantas, por ejemplo, utilizan interacciones simbióticas con hongos o bacterias, lo que les permite nutrirse de manera más eficiente. Tal es el caso de las plantas leguminosas, como el frijol, cuya planta realiza una interacción simbiótica mutualista con bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae, permitiéndole cubrir sus necesidades de nitrógeno cuando este nutriente es escaso en el suelo, a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), el cual, se lleva a cabo mediante un órgano facultativo llamado nódulo, el cual es una estructura que se desarrolla en las raíces de las leguminosas como respuesta a la infección de las bacterias rhizobias indicando que se está llevando a cabo la interacción simbiótica mutualista [8], [9].

La simbiosis mutualista rhizobia-leguminosa, es un proceso altamente coordinado para el intercambio molecular en el suelo entre las bacterias nodulantes de las raíces y la planta leguminosa. En este sentido, las leguminosas que demanden nitrógeno para satisfacer sus necesidades, inician esta relación simbiótica mediante la secreción de ciertos compuestos llamados flavonoides mediante la raíz, los cuales, actúan como señales químicas que atraen a las bacterias y estas buscan puntos de invasión en las raíces de la planta; posteriormente se lleva a cabo la infección de las raíces de la planta, en este proceso las bacterias penetran en las raíces y forman un canal de infección, por medio del cual, avanzan hacia la corteza de la raíz donde las bacterias son liberadas logrando colonizar el citoplasma de las células, hasta este punto las bacterias sufren una serie de cambios morfológicos dando lugar los bacteroides, los cuales, al estar en el citoplasma,

inducen la división celular y estimulan el desarrollo anormal de las células corticales, deformando la raíz y dando lugar a estructuras capaces de fijar nitrógeno llamadas nódulos [10], [11], [12].

2.3. Trigo: descripción e importancia

El trigo duro (*Triticum durum* Desf.) es un cereal de gran importancia alimentaria y económica. Dadas sus características nutricionales, este cereal se emplea como materia prima en la elaboración de productos alimenticios como las pastas, cuscús y algunos tipos de panes planos, los cuales aportan fibra dietética considerable, que interviene en la promoción de la salud intestinal. Dentro de los componentes de la fibra dietética se encuentran los polisacáridos no almidonados y los arabinosilanos; además aportan micronutrientes como el selenio, hierro y zinc, minerales importantes en el metabolismo, síntesis de proteínas y fortalecen el sistema inmunológico. De igual manera es fuente de ácidos fenólicos los cuales son importantes debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [13], [14].

Por otro lado, a nivel mundial se estima que la superficie de cultivo de trigo es de 17 millones de hectáreas (ha) [13], de las cuales Canadá y Turquía se destacan como principales productores con un área de cultivo estimada de 2 millones de hectáreas cada uno, así mismo Italia, India y Argelia cuentan con alrededor de 1.5 millones de ha cultivadas cada uno. Por otro lado, países como Francia, Grecia, Portugal, Marruecos, España, Pakistán, Kazajistán y Rusia cultivan entre 0.5 y 0.8 millones de hectáreas cada uno al año. En México se cuentan con alrededor de 0.2 millones de ha para este cultivo, distribuido principalmente en el desierto de Sonora y otras pequeñas regiones del país. En este sentido se estima que la producción anual a nivel mundial es de 36 millones de toneladas de trigo duro [15].

2.4. Interacción simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares

La simbiosis micorrízica se define como una asociación mutualista entre hongos especializados de la rizósfera y las raíces de plantas, lo que permite el aumento de la disponibilidad de nutrientes a las plantas y a su vez la planta proporciona carbohidratos a los hongos micorrízicos. Las asociaciones micorrízicas se pueden clasificar en: ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorriza ericoide, micorriza arbutoide, micorriza monotrofoide, micorrizas orquideoide y micorriza arbuscular; las cuales se diferencian en gran medida de acuerdo con las estructuras que los hongos desarrollan en la raíz durante la simbiosis. De estos siete tipos de micorrizas se destaca la simbiosis

micorrízica arbuscular, la cual coloniza las raíces de alrededor del 76 % de plantas terrestres vasculares. Además, este tipo de micorriza se diferencia por la formación de estructuras muy específicas llamadas arbuscúlos (formadas por las hifas del hongo), con apariencia de arbusto altamente ramificado y que se van desarrollando intracelularmente por las células de la corteza de las raíces de la planta (Fig. 2) [16], [17].

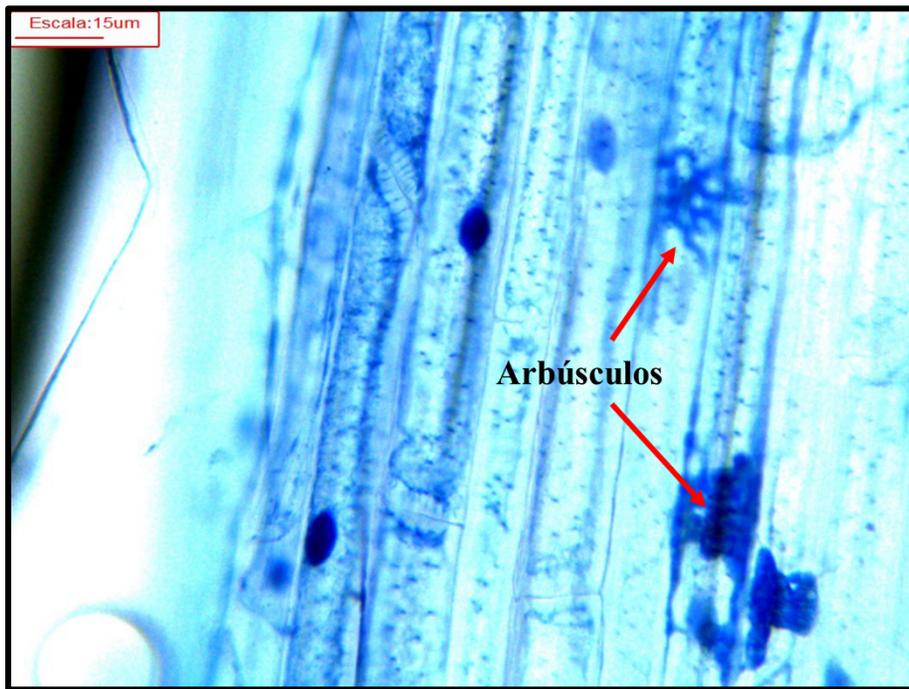


Fig. 2. Arbuscúlos formados durante la infección por hongos micorrízicos arbusculares en raíces de trigo

Por otro lado, el tipo de colonización que realizan los hongos micorrízicos arbusculares pueden ser de dos maneras, el primero llamado colonización tipo ‘Arum’ consiste en que las hifas del hongo se desarrollan de manera lineal de forma intercelular, es decir entre las células y a partir de estas hifas se desarrollan los arbuscúlos de manera intracelular (Fig. 3a). De manera contraria, el segundo tipo de colonización es ‘Paris’, que consiste en que las hifas del hongo se desarrollan en forma de espirales dentro de las células y a partir de ellos se desarrollan los arbuscúlos (Fig. 3b) [18], [19].

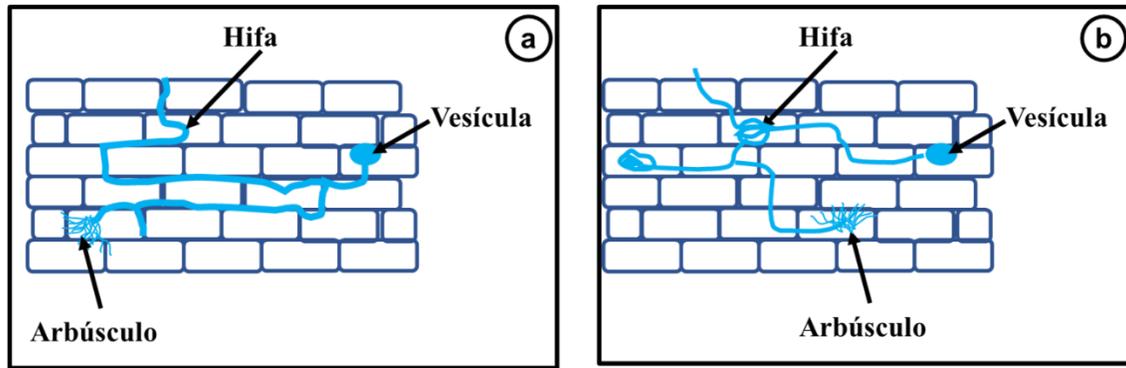


Fig. 3. Tipos de asociación micorrízica arbuscular, a) tipo Arum, b) tipo Paris.

2.5. Nanotecnología y sus aplicaciones

La nanotecnología surge como un nuevo campo de investigación e innovación, encargado del desarrollo de materiales y dispositivos a escala nanométrica. Sin embargo, esta nueva rama de la tecnología no solo se encarga de la miniaturización de dichos materiales, sino también de la manipulación precisa de átomos y moléculas, con la finalidad de diseñar y controlar las propiedades de los nanomateriales (NMs) y nanodispositivos, para ofrecer nuevas herramientas con capacidades que los materiales a granel no poseen y que además, logran ser económicas y rentables en el desarrollo de productos de uso diario [20], [21].

En la actualidad, la generación de productos a partir de NMs como principio activo va en ascenso, destacando los productos para el cuidado personal, generación de energía, medicamentos, productos agrícolas, entre otros. Hasta el año 2014, se tienen catalogados 1814 productos de los cuales el 53% contiene más de un NM de los 39 diferentes tipos listados en el inventario de productos de consumo (CPI por sus siglas en inglés), Tabla 2 [22].

Tabla 2. Lista de nanomateriales usados en productos de consumo incluidos en el inventario de productos de consumo [22].

Arcilla	Iridio	Óxido de zinc
Boro	Liposomas	Paladio
Calcio	Litio	Plata
Carbón	Magnesio	Platino
Cera de carnauba	Manganeso	Plomo
Cerámicas	Nano celulosa	Polímeros
Cobalto	Nano micelas	Retinol
Cobre	Nanotubos de carbono	Silicio
Cromo	Níquel	Titanio
Fullerenos	Orgánicos	Tungsteno
Grafeno	Oro	Yodo
Grafito	Óxido de aluminio	Zeolita
Hierro	Óxido de cerio	Zirconio

2.5.1. Nanomateriales y nanopartículas

Nanomaterial es todo aquel material con al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica, *i.e.* en un rango de 1 a 100 nm, dentro de los cuales, se pueden incluir agregados atómicos, nanofibras, nanotubos, fullerenos, películas delgadas, nanocápsulas, materiales nanoporosos, nanohilos, dendrímeros, puntos cuánticos, nanopolvos y nanopartículas (NPs); estas últimas se consideran materiales de dimensión cero (0-D) *i.e.* las tres dimensiones que las componen se ubican en el régimen nanométrico tales como las NPs de TiO₂, Fe₂O₃, ZnO, entre otras [4], [23], [24].

2.5.2. Producción, liberación e impactos ambientales de NMs

2.5.2.1. Fuentes de producción y liberación de NMs

Al hablar de producción y liberación de NMs, se debe tomar en cuenta su origen ya que estos pueden ser clasificados en dos tipos: los NMs naturales y los NMs artificiales, estos últimos también conocidos como NMs manufacturados, NMs antropogénicos o NMs sintetizados. Los del tipo natural pueden ser orgánicos o inorgánicos y son producidos por fenómenos geológicos,

combustión incompleta, precipitación abiótica y ciclos bioquímicos (Fig. 2). Por otro lado, los NMs artificiales generalmente son diseñados y producidos de manera intencional por el hombre para usarlos en aplicaciones muy específicas, por lo que pueden tener composiciones diferentes ya que pueden usarse en una gran variedad de materiales para su producción (metales, no metales, óxidos metálicos, carbón, polímeros, entre otros.). Sin embargo, las fuentes de producción/liberación se pueden clasificar en dos grupos: los NMs artificiales no intencionales y los NMs artificiales intencionales, Fig. 4 [25], [26].

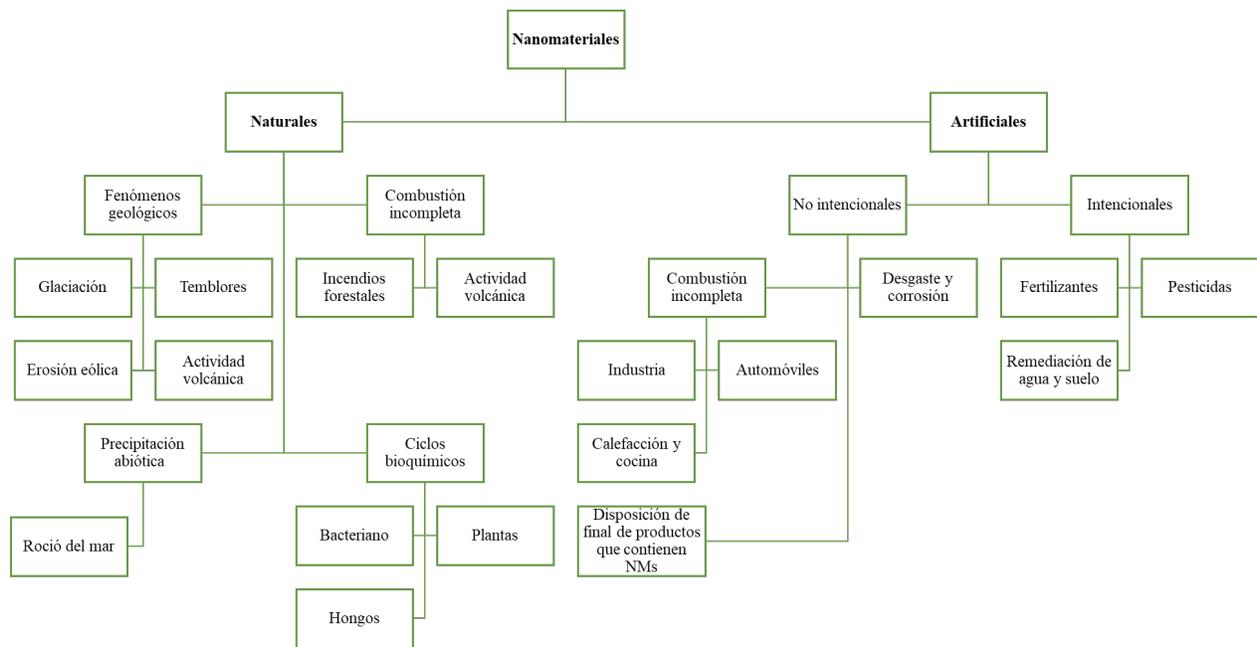


Fig. 4. Fuentes de producción/liberación de nanomateriales naturales y antropogénicos. Adaptado de [26].

2.5.2.2. Impactos ambientales de los NMs

Debido a la disponibilidad en el mercado de productos que cuentan con ingredientes nanométricos, se plantea la preocupación acerca de los impactos ambientales de los NMs, los cuales pueden depender de factores que incluyen el tamaño, la forma, estructura de superficie, composición química, etc. Como se menciona anteriormente, los NMs artificiales pueden ser liberados al ambiente por diferentes fuentes y distribuirse principalmente por corrientes de aire pudiendo viajar por largas distancias y depositarse en el suelo o cuerpos de agua e interactuar o sufrir transformaciones por los organismos presentes en estos ecosistemas (plantas, microorganismos,

animales, algas, etc.), así como por los factores abióticos del lugar (pH, temperatura, humedad, etc.) [27], [28], [29], [30].

La falta de conocimiento acerca de los posibles efectos (positivos o negativos) que pudieran tener los NMs al ser liberados al ambiente, ha hecho que surja la necesidad de evaluar estos riesgos potenciales, de tal modo que hoy en día se pueden encontrar evidencias donde se reporta el comportamiento de los NMs en diferentes organismos del medio, como se puede apreciar en la Tabla 3 [31].

Tabla 3. Visión general de los efectos de diferentes tipos de nanomateriales sobre algunos organismos del medio.

Organismo de estudio	Tipo de NMs	Concentración	Efecto observado	Ref.
a) Microorganismos y algas				
<i>Bacillus cereus</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	NPs de Ag	0.5 mgL ⁻¹	Causaron cambios morfológicos en las células de ambas colonias, así como inhibición en el crecimiento bacteriano	[32]
<i>Chlorella</i> sp.	NPs de TiO ₂ (anatasa) y NPs de ZnO	1000 mgL ⁻¹	Inhibieron significativamente el crecimiento de las algas	[33]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NPs de TiO ₂	5, 25 y 50 mgL ⁻¹	Inhibición en el crecimiento bacteriano a causa de la producción de ERO*	[34]
<i>Escherichia coli</i>	NPs de Al ₂ O ₃	1000 µgL ⁻¹	Se encontró un efecto inhibidor en el crecimiento bacteriano	[35]

b) Animales

<i>Haliotis diversicolor</i> supertexta	NPs de TiO ₂	1 y 10 mgL ⁻¹	No se encontró efecto tóxico agudo, sin embargo, aumento la actividad enzimática provocando estrés oxidativo en esta especie.	[36]
<i>Danio rerio</i>	NPs de Ag	30, 60 y 120 mgL ⁻¹	Provocó hepatotoxicidad en los peces, además de estrés oxidativo, daño en el ADN y apoptosis asociados a esta enfermedad inducida por NPs de Ag	[37]
<i>Oryzias latipes</i>	NPs de Ag	1 y 25 µgL ⁻¹	La presencia de estas NPs indujo daño celular y daños en la reparación del ADN y estrés oxidativo debido a las ERO* generadas por las partículas.	[38]

c) Plantas

<i>Spirodela polyrrhiza</i> (L.) Schleid	NPs de TiO ₂	0.05, 0.1, 1, 5 y 10 mgL ⁻¹	Disminución significativa en los parámetros de crecimiento, contenido de clorofila y en la	[39]
---	-------------------------	--	--	------

				actividad de la enzima peroxidasa.	
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	NPs de Ag	0.2 mgL ⁻¹		Se observaron valores significativamente altos en los parámetros de crecimiento de las plántulas.	[40]
<i>Vigna radiata</i> L.	NPs de CuO	100, 200 y 500 mgL ⁻¹		A concentraciones de 200 y 500 mgL ⁻¹ se redujo significativamente la longitud del tallo y la producción de biomasa. Y expuestas a concentraciones de 100, 200 y 500 mgL ⁻¹ se redujo el contenido total de clorofila de manera significativa.	[41]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	NPs de Fe ₂ O ₃ y ZnO	3 y 6 gL ⁻¹		Ambas NPs disminuyeron la longitud de la raíz de las plantas de frijol, de igual forma las NPs de ZnO disminuyeron significativamente la longitud del tallo.	[42]

*Especies reactivas de oxígeno.

2.5.2.3. Impacto de NMs en plantas

Como se observa en la Tabla 3, las plantas no están exentas de la exposición a los NMs; Sin embargo, el efecto que los NMs pudieran tener sobre estos organismos es poco conocido, ya que este depende en gran medida de la especie vegetal así como el tamaño, tipo, composición química y estabilidad de los NMs, pudiendo provocar alteraciones en el crecimiento, fisiología, rasgos bioquímicos, así como en la producción y calidad de los alimentos provenientes de las plantas, debido a que estas son el componente esencial de los ecosistemas, y representan el punto de entrada de los NMs a la cadena trófica.[43], [44], [45].

Por lo anterior diversas investigaciones se han centrado en el estudio de los posibles efectos de los NMs sobre el desarrollo y crecimiento de diversas especies vegetales; por ejemplo, diversas investigaciones revelan que la exposición de plantas a NPs de TiO₂ afectan negativamente de manera significativa la tasa de germinación de semillas, la producción de biomasa y particularmente el desarrollo de la raíz en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y pasto varilla (*Panicum virgatum* L.). Además, estas NPs provocaron alteraciones genéticas al disminuir la expresión de micro-ARN encargado de la regulación genética en cuanto a la tolerancia a estreses abióticos; de igual manera, se reportó que este tipo de NPs disminuye la cantidad de carbohidratos y la concentración de clorofila en plantas de albahaca [46], [47], [48].

Por otro lado, resultados similares fueron reportados por Garcia-Gomez *et. al.* [49], al exponer plantas de maíz (*Zea mays* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), trigo (*Triticum aestivum*), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y betabel (*Beta vulgaris* L.) a NPs de ZnO. Los autores reportan que la presencia de estas NPs, alteraron negativamente varios parámetros que se relacionan con el estrés oxidativo (función de cloroplastos y contenido proteico) lo que sugiere una modificación en la actividad enzimática antioxidante de las plantas como respuesta al estrés por Zn. Estos resultados concuerdan con otra investigación en donde plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. contender) y tomate cherry (*Solanum lycopersicon* L. var. Cerasiforme) se expusieron a diferentes fuentes de Zn, donde se evidenció que la exposición a Zn provocó efectos negativos sobre los pigmentos fotosintéticos, se incrementaron los niveles de EROs y se alteró las actividades enzimáticas[50].

Así como los casos descritos anteriormente, existen otros estudios en los que se describen los efectos de diferentes NMs sobre diferentes características físicas y bioquímicas durante el crecimiento y desarrollo de plantas cultivadas, Tabla 4.

Tabla 4. Efectos tóxicos causados por diferentes nanomateriales en plantas cultivadas.

Planta expuesta	Tipo de nanomaterial	Efecto causado	Ref.
Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	TiO ₂ y Ag	En ambos casos la planta experimento disminución en el crecimiento de las raíces.	[51]
Rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.)	TiO ₂ y Ag	Las NPs de TiO ₂ Redujeron significativamente la longitud de la raíz, sin embargo, no hubo diferencias significativas en la longitud de la raíz al exponerse a NPs de Ag.	[51]
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	γ -Fe ₂ O ₃	Redujeron notablemente la longitud de la raíz, además de inducir estrés oxidativo en la raíz de planta	[52]
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	TiO ₂	Disminución en la biomasa de la planta, así como un aumento en la actividad antioxidante para combatir el estrés causado por las NPs, semas de disminuir el contenido de carbohidrato lo que puede dar como resultado un bajo rendimiento y calidad del arroz.	[53]
Soya (<i>Glycine max</i> (L.) Merr)	ZnO y Ag	El crecimiento de la planta, así como la rigidez de las raíces y viabilidad de las células de la raíz se vieron afectados significativamente por el estrés provocado por estas NPs.	[54]
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	NiO	Reprimió de manera significativa el crecimiento de la raíz, además de provocar estrés oxidativo y disfunción mitocondrial provocando muerte celular.	[55]
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	ZnO	Disminución en el peso fresco, longitud y diámetro de tallos y raíces.	[56]
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	CuO	Disminución en la longitud y peso fresco de los brotes, así como disminución en la longitud de las raíces	[57]

2.5.2.4. Impacto de NMs en las interacciones simbióticas planta-microorganismo

La importancia de los microorganismos del suelo y sus interacciones directas con las plantas recae principalmente por su papel dentro del ciclo de los nutrientes del suelo, la mineralización de la materia orgánica y las interacciones que se forman entre plantas y microorganismos, lo que conlleva al incremento en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de salvaguardar la funcionalidad de los ecosistemas. Dentro de las interacciones planta-microorganismos más importantes de la tierra se encuentran las simbiosis de rizobios con leguminosas y la micorrízica arbuscular, las cuales pueden verse afectadas por la presencia de NPs liberadas de manera antropogénica de forma intencional o que llegan al suelo como contaminantes, sin embargo, al igual que los estudios realizados en organismos superiores, se han encontrado que la presencia de NPs en el suelo pueden presentar efectos positivos, negativos o nulos (Tabla 5), por lo que se sugiere que el tipo de efectos sobre estas interacciones dependen de diversos factores como la composición química, el tamaño de la NP, la concentración, la especie de microorganismo así como las propiedades físicas y químicas del suelo [58], [59].

Tabla 5. Efectos de nanomateriales sobre las interacciones simbióticas planta-microorganismo

Socios simbióticos o micorrícicos	Nanomaterial	Concentración	Sustrato	Efecto	Descripción	Ref.
<i>Pisum sativum</i> L./ <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Funneliformis constrictum</i> , <i>Gigaspora margarita</i> y <i>Rhizophagus irregularis</i>	ZnFe ₂ O ₄	5 mM	Suelo arcilloso	Nulo	Las NPs provocaron una ligera disminución en la colonización de las raíces, sin embargo, su aplicación aumento la producción de biomasa aérea y raíces	[58]
<i>Oryza sativa</i> L./ <i>Diversispora versiformis</i> , <i>Funneliformis dimorphicus</i> , <i>Glomus indicum</i> Blazk	TiO ₂ dopado con Ce	25, 50 y 100 mg	Suelo arenoso	Negativo	Inhibición de estructuras fúngicas (vesículas y arbusculos) en las raíces de arroz	[60]
<i>Medicago sativa</i> L./ <i>Sinorhizobium meliloti</i>	ZnO	12.5, 25, 50 y 100 µg ml ⁻¹	Medio Jensen libre de N	Negativo	Disminución en el número y tamaño de nódulos simbióticos y disminución de la longitud de la planta	[61]
<i>Medicago sativa</i> L./ <i>Sinorhizobium meliloti</i>	Ag	1.25, 2.5, 5 y 10 µg ml ⁻¹	Medio Jensen libre de N	Negativo	Disminución en el número y tamaño de nódulos simbióticos y disminución de la longitud de la planta	[61]
<i>Zea mays</i> L./comunidad de HMA	Fe ₂ O ₄	0.1, 1 y 10 mg kg ⁻¹	Suelo agrícola	Negativo	La concentración de 10 mg kg ⁻¹ impacto en la diversidad de HMA, así como en su estructura comunitaria además de disminuir la biomasa de la planta y el carbono fotosintético	[62]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L./ <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Fe ₃ O ₄	2000 mg L ⁻¹	Suelo de textura franca	Positivo	Las plantas tratadas mostraron un mejor rendimiento simbiótico reflejándose en el aumento de la actividad de la nitrogenasa, mayor leghemoglobina en nódulos y en el número de nódulos simbióticos dando como resultado una mayor fijación de N ₂	[63]
<i>Lotus japonicus</i> L.	NTCPM	50, 100, 150, 200, 500 µg mL ⁻¹	Perlita/vermiculita	Positivo	Aumento en el número de nódulos y mejora en la actividad de la nitrogenasa, lo que mejoro el crecimiento y desarrollo de las plantas al aumentar la biomasa vegetal	[64]

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad la producción, uso y liberación de NMs al ambiente ha ido en ascenso, se plantea la preocupación acerca de los impactos que estos pueden ocasionar en los sistemas biológicos, por lo que se tiene la necesidad de realizar investigaciones donde se determinen las posibles implicaciones de los NMs en el ambiente. Sin embargo, existe poca información que describa el comportamiento de los NMs liberados, así como de los posibles efectos (positivos o negativos) que pudieran tener en el ambiente y principalmente sobre plantas vasculares de alto valor nutricional y económico como lo son el frijol común y el trigo.

Por lo anterior, la presente investigación se centrará en evaluar el efecto de NPs metálicas sobre los procesos simbióticos y su absorción y acumulación durante todas las etapas de crecimiento y desarrollo de plantas de frijol común y trigo duro para contribuir con la generación de nuevo conocimiento, con la intención de explicar el comportamiento y distribución de los nanomateriales en el tejido de las plantas leguminosas y gramíneas.

IV. HIPÓTESIS

1. Las NPs de TiO_2 , ZnO y Fe_2O_3 son absorbidas y acumuladas en las diferentes estructuras vegetales de las plantas de *P. vulgaris* L., provocando alteraciones bioquímicas, morfológicas y biológicas durante la germinación, crecimiento y desarrollo de la planta
2. Las NPs de TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 y Ag alterarán las comunidades de HMA y disminuirán negativamente la interacción simbiótica micorrízica arbuscular con plantas de trigo.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar los efectos de las nanopartículas sobre el crecimiento y desarrollo de frijol común cultivado en invernadero mediante el estudio de las alteraciones morfológicas y biológicas en la planta, así como caracterizar los efectos de las NPs sobre la abundancia y colonización de raíces de trigo por HMA mediante ensayos de conteo de esporas y estructuras formadoras de micorrizas en raíces.

5.2. Objetivos particulares

- Analizar el desarrollo morfológico de las plantas de frijol común para identificar el efecto de las NPs durante su germinación y crecimiento
- Registrar las unidades SPAD en plantas de frijol común para determinar el efecto de las NPs sobre la actividad.
- Determinar la concentración de Ti, Zn, Fe o Ag para deducir la absorción y acumulación de NPs en diferentes tejidos de las plantas.
- Estimar el número de esporas de HMA en suelos con NPs para determinar la influencia de las NPs sobre las comunidades de HMA.
- Determinar el efecto de la aplicación de las NPS sobre Calcular el porcentaje de infección por HMA en raíces de trigo para determinar los efectos de las NPs sobre la simbiosis micorrízica arbuscular.
- Identificar las alteraciones sobre las características Caracterizar el suelo con y sin NPs para identificar cambios en algunas propiedades fisicoquímicas del suelo como resultado de la aplicación de NPs.

VI. METODOLOGÍA CIENTÍFICA

Para la presente investigación se realizaron pruebas en laboratorio, invernadero y campo, dichas actividades y experimentos se desarrollaron en el laboratorio de Interacciones Ambiente-Planta y en un invernadero tipo capilla, ambos ubicados en las instalaciones del Cinvestav Unidad Saltillo. Las actividades de campo se llevaron a cabo en la Hacienda San Isidro, localizada en el municipio de General Cepeda, Coahuila de Zaragoza, México.

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Metodología del experimento en invernadero

6.1.1.1. Semillas

Para el experimento en invernadero se emplearon semillas de frijol común (*P. vulgaris* L.) variedad pinto Saltillo, las cuales se adquirieron del Campo Experimental Saltillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y se mantuvieron en bolsas plásticas dentro de un frasco ámbar en refrigeración a 4 °C, hasta su uso.

6.1.1.2. Nanopartículas

Para el presente estudio se evaluaron los efectos de tres tipos de NPs comerciales a base de óxidos de metal: TiO₂, ZnO, Fe₂O₃, las cuales se obtuvieron a partir de Investigación y Desarrollo de Nanomateriales S.A. de C.V., San Luis potosí, S.L.P., México (ID-nano). Estas se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) y por microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (MEB de emisión de campo; FESEM por sus siglas en ingles).

6.1.1.3. Muestreo y caracterización fisicoquímica del suelo

El suelo utilizado en el experimento en invernadero se muestreó al azar en zig-zag a una profundidad de 20 cm con doce puntos de muestreo, para obtener una muestra compuesta y representativa de una parcela agrícola ubicada en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en las coordenadas 25° 21' 28.83" de latitud norte y 101° 02' 16.57" de longitud oeste, con una superficie de 728.5 m².

El suelo muestreado se llevó al invernadero ubicado en las instalaciones del CINVESTAV-Saltillo para ser secado a temperatura ambiente y posteriormente ser tamizado por una malla de abertura de 4 mm para separar raíces y piedras de gran tamaño para después ser caracterizado.

Los análisis realizados para caracterizar el suelo fueron: determinación de pH, conductividad eléctrica, densidad aparente, porcentaje de materia orgánica, humedad, textura y la determinación de la presencia de los siguientes elementos: P, K, Mn, Mg, Zn, Ca, Fe, Ti totales por medio de la técnica de ICP-OES y/o AA y N total por medio de la técnica de combustión “flash”.

6.1.1.3.1. Determinación de humedad inicial del suelo

El porcentaje de humedad inicial de suelo se determinó mediante el método gravimétrico [65], el cual consistió en pesar 10 g de suelo tamizado en malla Tyler # 10 en un crisol de porcelana limpio y seco (por triplicado) y se colocan en una estufa a 105 °C por 24 h o hasta que la muestra registre un peso contante, una vez que tengan peso constante, se tapan los crisoles y se dejan enfriar en un desecador con agente secante activo, una vez fríos se pesan inmediatamente y se calcula el porcentaje de humedad con la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$\% \text{ humedad} = \frac{a - b}{b - c} \times 100$$

Donde:

a = peso en gramos del suelo + el peso del crisol

b = peso en gramos del suelo seco a 105 °C + el crisol

c = peso en gramos del crisol

6.1.1.3.2. Determinación de textura del suelo

La textura del suelo fue determinada mediante el método de Bouyoucos (método del hidrómetro) [66], para el cual se emplearon 50 g de suelo seco y tamizado en una malla Tyler #10 (2 mm), el cual se coloca en una probeta de 1000 mL, se agrega agua de la llave hasta la mitad de la probeta y se agregan 10 mL de agente dispersante (hexametafosfato de sodio al 5 %) y se agita vigorosamente por 1 min., posteriormente se termina de llenar la probeta hasta los 1000 mL con agua de la llave y se agita nuevamente de manera vertical por 1 min. Tan pronto como se termine de agitar sumergir el hidrómetro en la suspensión y dejarlo por 40 segundos y tomar la lectura del hidrómetro. Retirar el hidrómetro cuidadosamente y tomar la temperatura de la suspensión y dejar

reposar por 2 horas y volver a tomar lectura con el hidrómetro y temperatura. Para determinar las fracciones de arena, arcilla y limo se emplean las Ecuaciones 2, 3 y 4.

Ecuación 2

$$\% \text{ de arena} = 100 - \frac{\text{lectura 1} + \text{FC de T1}}{\text{Peso de muestra en g}} \times 100$$

Ecuación 3

$$\% \text{ de arcilla} = \frac{\text{Lectura 2} + \text{FC de T2}}{\text{Peso de muestra en g}} \times 100$$

Ecuación 4

$$\% \text{ de limo} = 100 - (\% \text{ de arcilla} + \% \text{ de arena})$$

Donde:

Lectura 1 = lectura del hidrómetro a los 40 s.

Lectura 2 = lectura del hidrómetro a las 2 h.

FC = factor de corrección a la temperatura dada, los cuales se registran en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores de corrección para diferentes temperaturas de la suspensión.

Temperatura (°C)	Factor de corrección (FC)
19.44	0
22	0.18
21	0.52
22	0.86
23	1.23
24	1.61
25	2.00
26	2.41
27	2.85
28	3.28
29	3.74
30	4.20

6.1.1.3.3. Determinación de densidad aparente del suelo

Para realizarse esta determinación, se pesó un matraz volumétrico de 50 mL asegurándose de que estuviera limpio y seco. Este se llenó con suelo seco y tamizado con una malla Tyler del #10, el suelo se compacto dando ligeros golpeteos sobre la mesa, para finalmente enrazar al cuello del matraz; posteriormente se registró el peso del matraz con suelo. En seguida, se vació el matraz que contenía el suelo y se limpió, para después llenarlo con agua, enrazando el matraz y se registró el peso del matraz con agua y se registró la temperatura de esta. Esta prueba se realizó por triplicado y los datos de cada repetición se emplearon en la Ecuación 5 [65].

Ecuación 5

$$\rho_a = \frac{P_2 - P_1}{P_3 - P_1} \times \rho_{\text{agua}}$$

Donde:

ρ_a = densidad aparente

P1 = peso del matraz vacío

P2 = peso del matraz con suelo

P3 = peso del matraz con agua

ρ_{agua} = densidad del agua a la temperatura registrada en el procedimiento

6.1.1.3.4. Determinación de porcentaje de materia orgánica del suelo

El porcentaje de materia orgánica (% MO) se determinó por el método de ignición [67], para el cual se tomó una muestra de 5 g de suelo tamizado en malla Tyler # 10 y se dispusieron en un crisol de porcelana previamente tarado. La muestra se dejó secar en estufa a 105 °C por 2 horas para eliminar el agua higroscópica y se dejó enfriar en desecador para luego tomar su peso el cual se consideró como peso inicial. Posteriormente la muestra se llevó a mufla a una temperatura de 400 °C por un periodo de 4 h, pasado este tiempo se dejaron enfriar las muestras y se dispusieron en un desecador, para luego ser pesadas, a este peso se le registro como peso final. Con estos datos se calculó el % MO con la Ecuación 6.

Ecuación 6

$$\% \text{ MO} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

Donde:

% MO = porcentaje de materia orgánica

P1= peso inicial de la muestra

P2= peso final de la muestra

6.1.1.3.5. Determinación de pH y conductividad eléctrica del suelo

Se determinó el pH del suelo, empleando el método de potenciometría, para la cual se preparó una solución de agua-suelo en relación 2:1, para la cual se pesaron 10 g de suelo seco previamente tamizado en una malla Tyler # 10 (2 mm) y se agregaron 20 mL de agua desionizada, la mezcla se agito por 30 min en un agitador orbital, posteriormente se deja reposar por 15 min. Para realizar la medición, se empleó un potenciómetro Thermo Fisher modelo Orion Star A211, el cual se calibró empleando soluciones reguladoras de pH 4.00, 7.00 y 10.00 y se realiza la lectura introduciendo el electrodo a la solución preparada de agua-suelo (todas las mediciones se realizaron por triplicado) [68].

Para el caso de la medición de la conductividad se emplearon las soluciones de agua-suelo usadas en la determinación de pH, para esto se dispusieron en un embudo equipado de un filtro hasta recuperar la mayor cantidad de la solución filtrada a la cual se le determino la CE usando un conductímetro Thermo Fisher modelo Orion Star A222, el cual se calibro con soluciones reguladoras de $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$ y 12.9 mS cm^{-1} (todas las mediciones se realizaron por triplicado) [69]

6.1.1.4. Montaje experimental en invernadero

Para cumplir con los objetivos de esta investigación, se montó un experimento completo en condiciones de invernadero por un periodo de 90 días, con un total de 7 tratamientos (Tabla 7) con 27 réplicas cada uno, obteniéndose un total de 189 unidades experimentales (U.E.), las cuales se distribuyeron en un diseño completamente al azar (Fig. 5). Cada unidad experimental consistió de una bolsa plástica para cultivo ($30 \times 24.5 \text{ cm}$), la cual se llenó con 3 kg de la muestra compuesta de suelo; cada U.E. se humedeció hasta saturar el suelo con agua potable y se dejó reposar por tres días, pasado este tiempo, se aplicaron las dosis de NPs de acuerdo al diseño de tratamientos, para este experimento se empleó la metodología empleada por Kibbey y Strevett (2019) [70], la cual consistió en usar las NPs como se recibieron del proveedor, adicionándose al suelo sin sonificar,

con la intención de imitar las condiciones en las que las NPs se depositan al suelo al ser liberadas al ambiente, es decir, en forma de agregados, ya que las NPs no se encuentran como partículas primarias en el ambiente.

Tabla 7. Tratamientos empleados en el experimento.

Tratamiento	Suelo (kg)	Nanopartículas de TiO ₂ (mg kg ⁻¹)	Nanopartículas de ZnO (mg kg ⁻¹)	Nanopartículas de Fe ₂ O ₃ (mg kg ⁻¹)
T150	3	150	---	---
T300	3	300	---	---
Z150	3	---	150	---
Z300	3	---	300	---
F150	3	---	---	150
F300	3	---	---	300
Control	3	---	---	---

Posteriormente se sembraron tres semillas de *P. vulgaris* L. por U.E. previamente desinfectadas (inmersión por 1 minuto en etanol al 70 % v/v y enjuagar 2 veces con aguas destilada esterilizada, y se hace un segundo lavado por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 1 % v/v por 10 minutos, finalmente se retira el exceso de hipoclorito de sodio con dos enjuagues con agua destilada esterilizada), a una profundidad aproximada de 1.5 cm, cada U.E. se regó al momento de la siembra. Durante su permanencia en invernadero, se realizaron riegos con agua potable según las necesidades del cultivo, así como con riegos adicionales con 250 mL de solución nutritiva una vez a la semana (Tabla 8 y 9), al igual que la rotación completa de las U.E. para asegurar las mismas condiciones de crecimiento. A los 15 DDS se realizó un raleo para ajustar en número de plantas dejando una sola planta por U.E.



Fig. 5. Distribución de las U.E. en invernadero. T150 = Suelo con NPs de TiO_2 a concentración de 150 mg kg^{-1} , T300 = Suelo con NPs de TiO_2 a concentración de 300 mg kg^{-1} , Z150 Suelo con NPs de ZnO a concentración de 150 mg kg^{-1} , Z300 = Suelo con NPs de ZnO a concentración de 300 mg kg^{-1} , F150 = Suelo con NPs de Fe_2O_3 a concentración de 150 mg kg^{-1} , F300 = Suelo con NPs de Fe_2O_3 a concentración de 300 mg kg^{-1} , C= Suelo sin NPs (control).

Tabla 8. Reactivos utilizados en la preparación de la solución nutritiva.

Reactivo	Cantidad
Ca(NO ₃) • 4H ₂ O	2.30 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	16.36 g
CaSO ₄ • 2H ₂ O	14.25 g
K ₂ SO ₄	18.00 g
NaFeEDTA	0.65 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ • 2H ₂ O	3.18 g
Agua destilada	50 L
Solución stock*	10 mL

*Los reactivos se describen en la tabla 8

Tabla 9. Reactivos utilizados en la preparación de la solución stock.

Reactivo	Cantidad
KCl	27.9 g
H ₃ BO ₃	25.0 g
MnSO ₄ • H ₂ O	12.5 g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2.7 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	5.5 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	2.5 g
H ₂ SO ₄	10.8 Ml
Agua destilada	1.99 L

6.1.1.5. Muestreos y colecta de datos del experimento en invernadero

6.1.1.5.1. Unidades SPAD

A los 20 DDS, se tomó la primera lectura de unidades SPAD *in situ*, utilizando un medidor de clorofila MINOLTA SPAD-502 Plus y se hicieron mediciones subsecuentes a los 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90 DDS, para lo cual se tomaron tres lecturas por U.E. a través de la superficie de las hojas seleccionadas, las cuales fueron hojas ubicadas en la altura media de cada U.E. completamente expandida y se calculó la media de las lecturas.

6.1.1.5.2. Muestreos destructivos y toma de muestras en fresco

Se realizaron tres muestreos durante la permanencia del experimento en invernadero, a los 30, 60 y 90 DDS, los cuales consistieron en seleccionar nueve U.E. al azar de cada tratamiento. A cada unidad se le retiró la columna de suelo teniendo cuidado de no dañar el sistema radicular, el cual se lavó con agua común y luego con agua destilada. Posteriormente se separará la raíz del tallo y se midió, la longitud del tallo y raíz, además de realizar un conteo de nódulos en las raíces.

Al término de cada muestreo se tomaron segmentos de hoja, tallo, raíz y fruto (para el caso del muestreo de 90 DDS) de plantas elegidas al azar, de alrededor de 3×3 mm, las muestras de hoja, tallo y raíz se analizaron sin ningún tratamiento previo, empleando un Espectrómetro FTIR Perkin Elmer modelo Frontier con accesorio ATR de diamante en un rango de $400-4000\text{ cm}^{-1}$

Así mismo, de las mismas plantas seleccionadas, se extrajeron muestras mediante cortes longitudinales de los diferentes tejidos con ayuda de un bisturí, es decir, segmentos de hoja, tallo, raíz y fruto si lo presentaba la planta, en el caso de las hojas se tomaron muestras de la superficie de la hoja y en el caso de tallo y raíz se tomaron cortes del interior de los mismos, para ser analizados por microscopía electrónica de barrido (MEB), las cuales se hicieron pasar por una serie de pasos para la preparación óptima previa al análisis. El proceso consistió en la extracción de muestra de tejido como se mencionó anteriormente, la fijación, la deshidratación, montaje y recubrimiento y observación.

Fijación: Los cortes obtenidos previamente lavados con agua destilada, se colocaron en tubos Eppendorf® con solución de Trump's que sirvió como conservante y agente fijador de las muestras, dicha solución consistió en mezclar 4 mL de glutaraldehído grado I al 25%, 10 mL de formaldehído al 37%, 1 g de fosfato de sodio monobásico anhidro y 0.27 g de hidróxido de sodio y se afora a 100 mL con agua destilada. Una vez hecho esto las muestras pueden conservarse en refrigeración hasta su uso.

Deshidratación y montaje: Para este procedimiento, las muestras estuvieron por lo menos 24 horas en la solución de Trump's, pasado este tiempo se lleva a cabo la deshidratación de la muestra, la cual consistió en pasar cada muestra por una serie graduada de etanol de 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% y dos veces en 100 % v/v durante 30 min. en cada solución. Posteriormente las

muestras deshidratadas se adhieren a un porta muestras de acero con cinta de carbón y se dejan en desecador por 24 h (Fig. 6).



Fig. 6. Diferentes muestras de tejido vegetal sobre portaobjetos de acero

Recubrimiento y observación: las muestras después de ser deshidratadas se recubrieron con una capa fina de Au/Pd mediante pulverización catódica (sputtering) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido en condiciones de bajo vacío, un voltaje de aceleración de 15 a 20 kV dependiendo de la muestra, distancia de trabajo de 10 mm y un diámetro de haz de electrones (spotsize) de entre 4 y 5.

6.1.1.5.3. Toma de muestras en seco

El sistema radicular y tallos de tres plantas seleccionadas al azar (no alteradas por cortes) se colocaron en bolsas de papel y se deshidrataron en un horno de aire forzado Thermo Scientific a 70°C por 72 h, para después registrar el peso seco de cada muestra.

Para la determinación de concentración elemental en tejido vegetal, se tomaron las muestras secadas a 70 °C y se dispusieron por separado (tallo, hojas y raíz) por planta y se molieron a polvo fino en un mortero de porcelana y el polvo obtenido se tamizo por una malla Tyler #100 (150 µm). Las muestras obtenidas pasaron por un proceso de digestión acida por vía húmeda de acuerdo con lo reportado por [71]. La concentración de los elementos (K, P, Ti, Zn y Fe), fue medida por espectrometría de emisión de plasma de acoplamiento inductivo empleando un espectrómetro ICP-OES, Perkin Elmer modelo Optima 8300.

La columna de suelo restante se dispuso en bolsas plásticas y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se pasaron por una malla Tyler # 10 (2 mm) y se tomó una muestra para la determinación de pH y conductividad eléctrica siguiendo la metodología anteriormente descrita, así mismo, se tomó una muestra representativa de cada U.E. para determinar el estado nutricional del suelo así como la concentración de los elementos de las NPs mediante la técnica de ICP-OES y en el caso de N total se empleó el método de combustión “flash”.

6.1.2. Metodología del experimento en campo

6.1.2.5. Semillas

Para el experimento en campo se emplearon semillas de trigo duro (*Triticum durum* Desf.) variedad Samayoa C2004, las cuales se obtuvieron de Molinos del Sudeste S.A. de C.V. y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

6.1.2.6. Nanopartículas

Para el presente estudio, se evaluaron los efectos de cuatro tipos de nanopartículas (NPs) comerciales: TiO₂, ZnO, Fe₂O₃ y Ag, las cuales se obtuvieron a partir de Investigación y Desarrollo de Nanomateriales S.A. de C.V., San Luis potosí, S.L.P., México (ID-nano).

6.1.2.7. Muestreo y caracterización fisicoquímica y biológica del suelo del experimento en campo

El experimento se estableció en la hacienda San Isidro de Gómez, localizada en el municipio de General Cepeda (Latitud 25°10'05”, Longitud -101°23'26”). En el cual se realizó un muestreo y caracterización de suelo antes de la siembra. Para esto, se tomaron muestras mediante un muestreo al azar en zig-zag a una profundidad de 20 cm, con doce puntos de muestreo, para obtener una muestra compuesta y representativa de la parcela.

De la muestra compuesta se tomaron tres réplicas de suelo fresco y se conservaron a 4 °C para realizar caracterización biológica antes de establecer el experimento la cual se describe en la sección 6.1.2.9.1. Con los datos obtenidos, se determinaron los siguientes parámetros: número de esporas, número de géneros encontrados, número de esporas por género encontrado, distribución porcentual. Con estos datos se determinó el índice de diversidad Shannon-Wiener mediante la Ecuación 7.

$$H' = - \sum_i P_i (\log P_i)$$

Donde:

H' = Índice de Shannon-Wiener

P_i = Proporción del número total de individuos en la especie i

El resto del suelo muestreado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se tamizó por una malla de abertura de 2 mm para separar raíces y piedras de gran tamaño para después ser caracterizado. Los análisis realizados para caracterizar el suelo fueron: pH, conductividad eléctrica, densidad aparente y porcentaje de materia orgánica con los métodos previamente descritos.

6.1.2.8. Montaje experimental en campo

Para el experimento que se llevó a cabo en campo, se contaron con 5 tratamientos (Tabla 10) incluido un tratamiento control, con cinco repeticiones cada uno, en un arreglo completamente al azar, teniendo un total de 25 unidades experimentales de 9 m² como se muestra en la Fig. 7. Para cada unidad experimental se empleó una densidad de siembra de 140 kg ha⁻¹ (126 g de semilla de trigo) y se agregaron las dosis de NPs empleando un aspersor manual a una profundidad de 6 cm, previamente suspendidas en agua y sometidas a baño de ultrasonido por 10 min (Fig. 8).

Durante la permanencia del cultivo, se realizaron riegos de acuerdo con las necesidades del mismo empleado un sistema de riego por microaspersión, el cual, se instaló empleando poliducto negro de ½" de diámetro y un micro aspersor en cada unidad experimental.

Tabla 10. Tratamientos empleados en el experimento en campo.

Tratamiento	Descripción	Dosis de NPs (g ha ⁻¹)	Equivalencia por UE (mg m ⁻²)
Control	Suelo + trigo	0	0
NPs-Ti	Suelo + NP TiO ₂ + trigo	200	20
NPs-Zn	Suelo + NP ZnO + trigo	200	20
NPs-Fe	Suelo + NP Fe ₂ O ₃ + trigo	200	20
NPs-Ag	Suelo + NP Ag + trigo	200	20

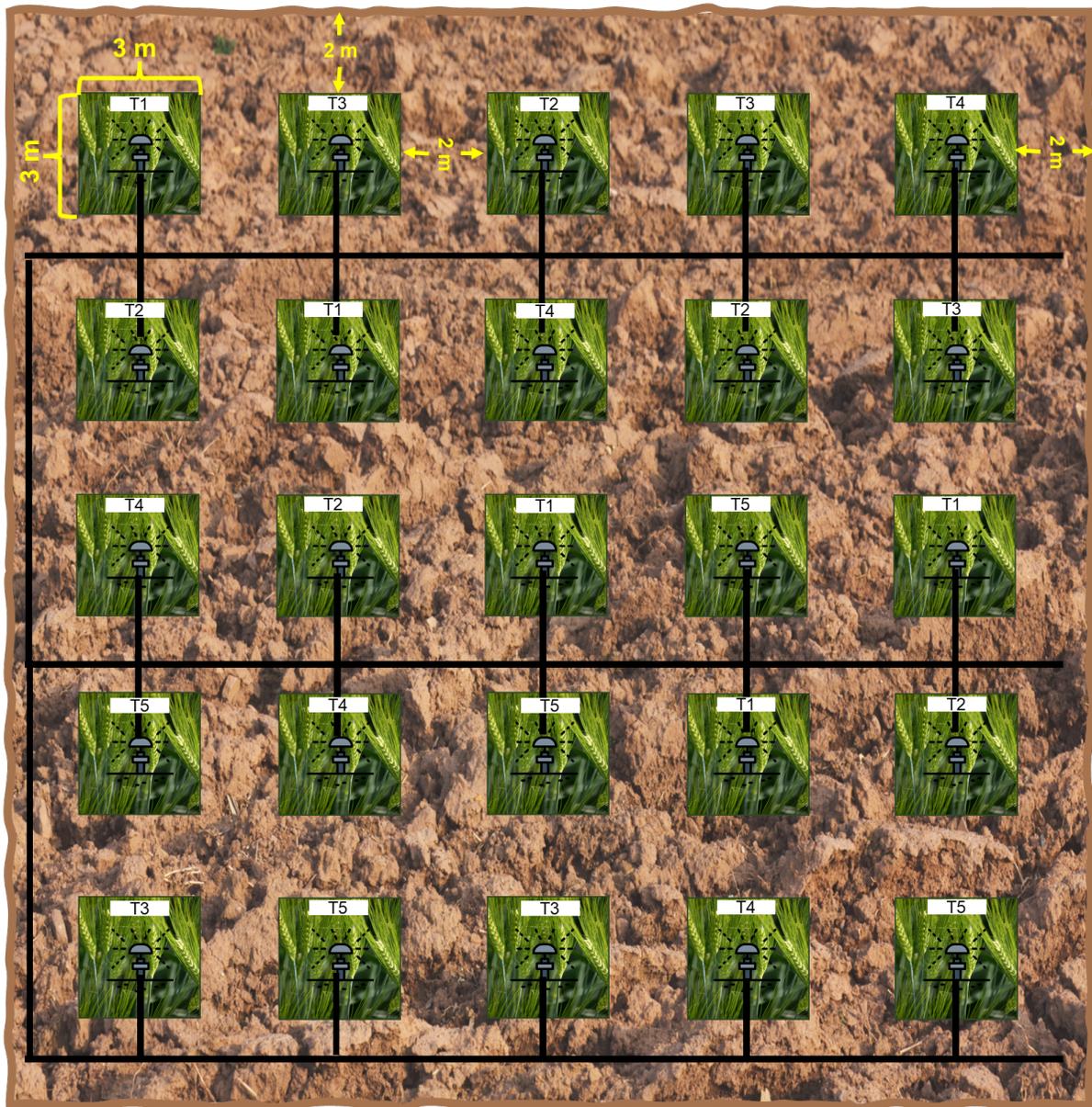


Fig. 7. Distribución de parcelas completamente aleatorizado y sistema de riego por microaspersión.

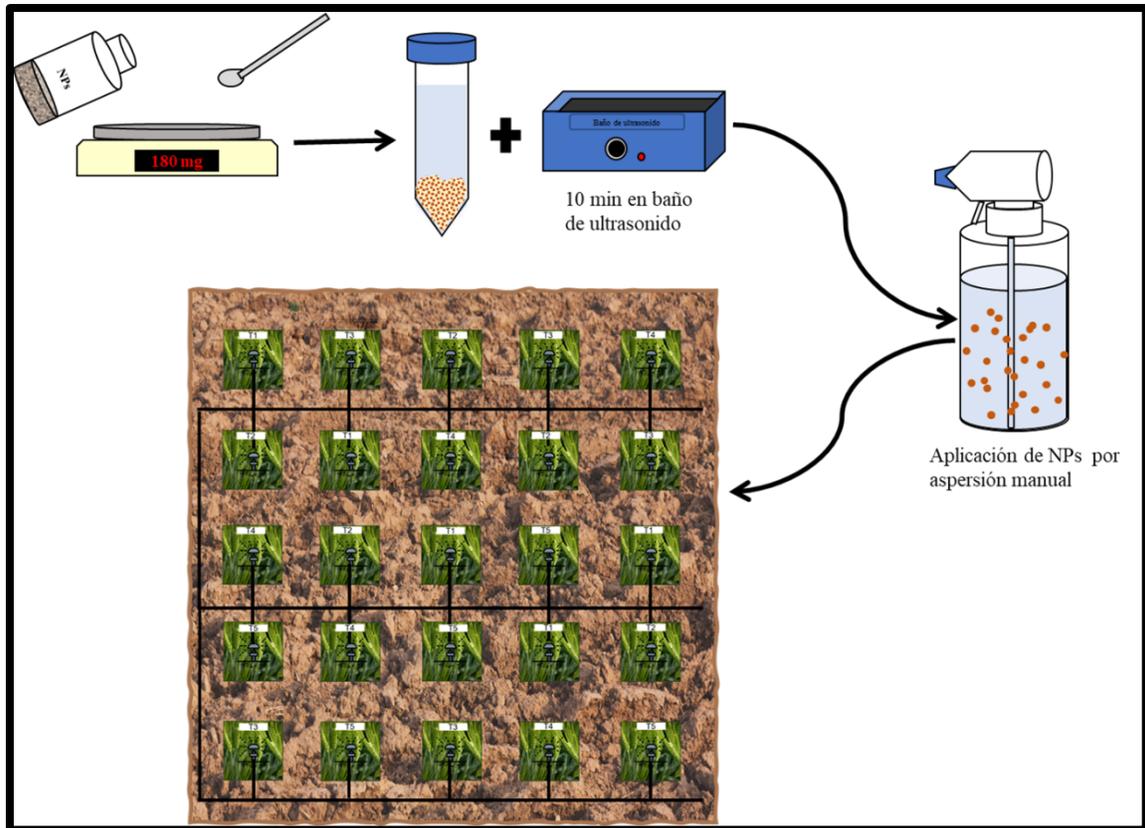


Fig. 8. Aplicación de nanopartículas en cada unidad experimental de acuerdo con el diseño de tratamientos.

6.1.2.9. Muestreos y colecta de datos del experimento en campo

A los 60 y 120 días después de la siembra (DDS) se realizó un muestreo de la rizósfera empleando un cilindro de PVC de 10 cm de diámetro (Fig. 9), seleccionando aleatoriamente cinco puntos de muestreo en cada U.E teniendo cuidado de no dañar el sistema radicular de las plantas de trigo. Del suelo muestreado se tomaron 3 submuestras de suelo las cuales se emplearon para determinar pH y conductividad del suelo, además de realizar un conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares. Se emplearon las raíces de trigo muestreadas, las cuales se lavaron y se conservaron en refrigeración a 4°C en solución AFA (ácido acético-formaldehído-alcohol etílico) hasta su uso [72].



Fig. 9. Dispositivo empleado para realizar los muestreos de la rizósfera.

6.1.2.9.1. Conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Para el conteo e identificación de esporas se empleó la técnica de tamizado de suelo en húmedo y llevándose a cabo por triplicado. Este método consiste en mezclar 100 g de suelo en 1 L de agua y se agita manualmente por 5 min., posteriormente se deja reposar la mezcla por 1 min y el sobrenadante se hace pasar por una columna de tamices, y se hacen lavados con agua hasta que esta salga limpia de la columna de tamices. Para este experimento de emplearon tamices de acero inoxidable con aperturas de 250, 90 y 38 micras, se recolectó lo retenido en cada tamiz y se suspendieron en 100 ml de agua, posteriormente, la suspensión se agitó y se dejó reposar por 1 min. para posteriormente ser filtrada usando papel filtro Whatman # 40, lo retenido en el filtro se observa bajo un microscopio estereoscopio a 4X. Las esporas observadas fueron contadas y aisladas sobre un portaobjetos usando PVGL (alcohol polivinílico-glicerol-ácido láctico), para después ser observadas en un microscopio óptico a 40X para poder realizar su posterior identificación (Fig. 10).

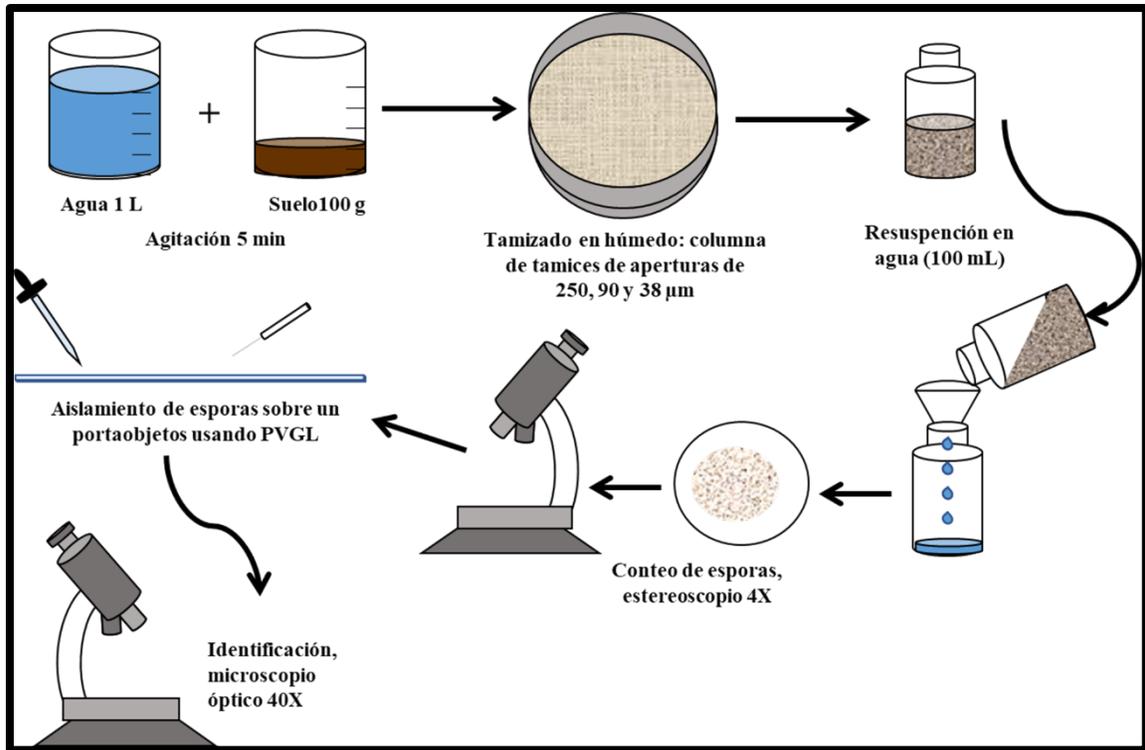


Fig. 10. Representación esquemática del proceso de aislamiento y cuantificación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

6.1.2.9.2. Identificación de infección micorrízica arbuscular en raíces de trigo

Las raíces previamente conservadas en solución AFA se lavaron con agua destilada hasta retirar el exceso de solución AFA, se dejaron escurrir en una toalla de papel y fueron cortadas en segmentos de 1 cm de longitud. Posteriormente las raíces previamente cortadas se sometieron a un proceso de clareo-tinción de acuerdo con lo reportado por Phillips y Hayman (1970) [73], el cual consiste en someter las raíces en una solución de hidróxido de potasio (KOH) 1 M por 24 h, pasado este tiempo se lavan las raíces con agua destilada y se procede a sumergirlas en una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% y se agita por 10 min y se decantó el exceso de HCl para después teñir con azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol y se dejaron reposar por 12 h. Tras este lapso las raíces se mantuvieron en lactoglicerol por 3 h para retirar el exceso de colorante.

Para la identificación de la infección por HMA, se realizó un montaje de 10 segmentos de raíz de 1 cm sobre un portaobjetos (por triplicado) y se cubrieron con un cubreobjetos realizando una ligera presión sobre este (Fig. 11). Cada segmento de raíz se observó en un microscopio óptico a 40X en tres puntos: arriba, en medio y abajo obteniendo 30 campos por cada repetición y se registró la

presencia o ausencia de estructuras fúngicas para luego determinar el porcentaje de colonización mediante la ecuación 8.

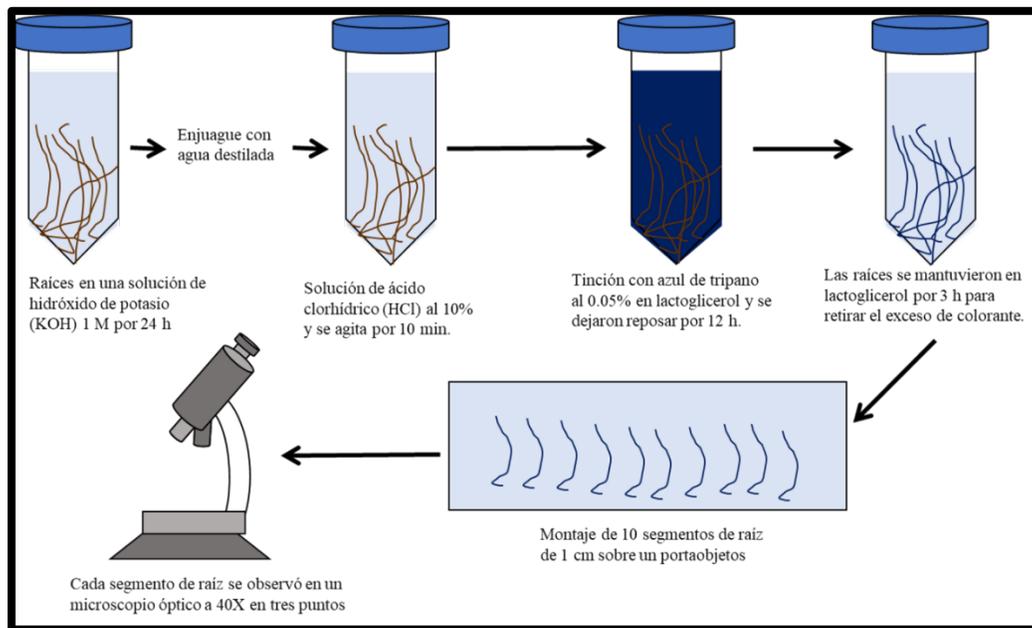


Fig. 11. Representación esquemática del proceso de preparación de raíces de trigo para la identificación de la infección micorrízica arbuscular.

Ecuación 8

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{No. de campos colonizados}}{\text{No. de campos totales}} \times 100$$

6.2. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias aritméticas mediante el método de Tukey ($\alpha= 0.05$), utilizando el software Minitab 18. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP), empleando el software Origin 8.0.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Resultados del experimento en invernadero

7.1.1. Caracterización de NPs por difracción de rayos x y microscopia electrónica de barrido por emisión de campo

En la Fig. 4, se observan los espectros de DRX y micrografías de las diferentes NPs empleadas en esta investigación. Las NPs de TiO_2 muestran la presencia de dos fases cristalinas que se pueden identificar como fase anatasa con los planos (100), (004), (200), (211), (204) y (215), correspondientes a la carta número 96-900-8215. La segunda fase que se encuentra es la fase brookita con los planos (121) y (233) correspondientes a la carta número 96-900-4140 (Fig. 12 a); en la micrografía (Fig. 12 e), se puede observar una morfología irregular y heterogénea, con tendencia a la formación de aglomerados.

En el caso del patrón de difracción de las NPs de ZnO (Fig. 12 b), se puede observar que todos los picos de difracción son bien definidos en los cuales se identificaron los planos (100), (002), (101), (102) comparados con la carta número 00-901-1662, lo que indica que se cuenta con la estructura hexagonal de la fase wurtzita; en cuanto a su morfología, en la micrografía (Fig. 12 f), se observan partículas alargadas en forma de barra prismática.

Por su parte, el patrón de difracción de las NPs de Fe_2O_3 (Fig. 12 c) presentan dos fases cristalinas, la fase hematita que se representa con la presencia de los planos (42-2), (51-4) y (44-4), correspondientes a la carta número 96-900-0140; la fase magnetita con los planos (-220), (222) y (440) de la carta número 96-900-2317; en cuanto a su morfología (Fig. 12 g) se pueden observar partículas de forma esférica o semi esféricas con un alto grado de aglomeración.

Por último, en el patrón de difracción de las NPs de Ag (Fig. 12 d), se muestran cuatro picos de difracción (111), (200), (220) y (311) comparados con la carta 01-089-3722, correspondientes a los planos de difracción de la plata de estructura FCC; se puede observar que la morfología de las NPs de Ag (Fig. 12 h) es irregular con una alta formación de aglomerados.

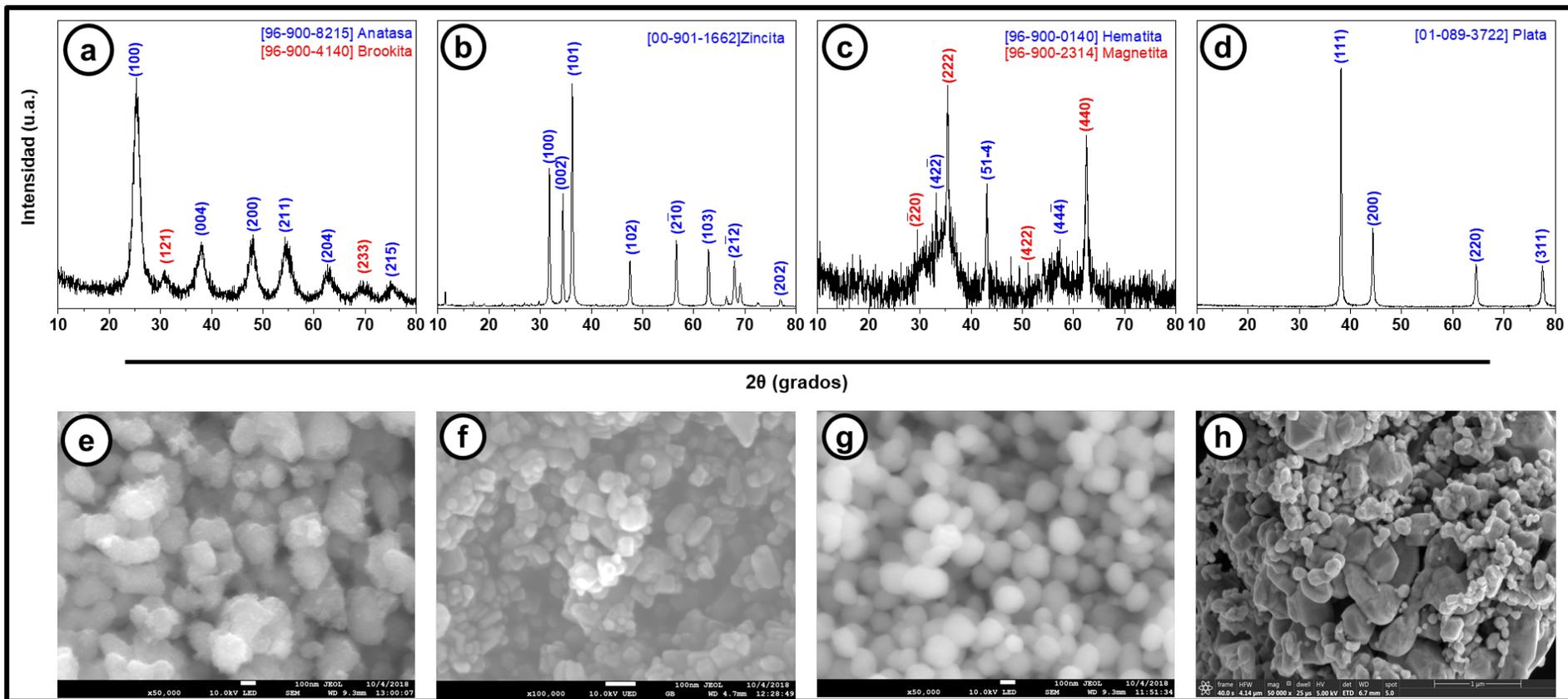


Fig. 12. Caracterización de nanopartículas por DRX y FESEM. Patrones de DRX y micrografías FESEM de TiO_2 (a y e), ZnO (b y f), Fe_2O_3 (c y g) y Ag (d y h).

7.1.2. Caracterización fisicoquímica del suelo

El suelo empleado en esta investigación se extrajo con una humedad al inicio de $70.3 \% \pm 0.25$. Presenta una textura migajón-arenosa con el $72.35 \% \pm 2.95$ de arena, $9.84 \% \pm 1.10$ de arcillas y $17.81 \% \pm 1.89$ de limos. Su densidad aparente fue de $0.918 \text{ g cm}^{-3} \pm 0.019$, con un alto contenido de materia orgánica ($6.22 \% \pm 0.34$), el pH del suelo fue de 8.45 ± 0.05 , clasificándolo como alcalino, así mismo la conductividad eléctrica medida fue de $531.8 \mu\text{S cm}^{-1} \pm 1.90$, lo que indica que se trata de un suelo no salino. Por otro lado, del análisis elemental se obtuvo el contenido nutricional de $1.07 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.02$ de P total, $1.64 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.19$ de K total, $0.099 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.00064$ de Mn, $2.31 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.20$ de Mg, $191.2 \text{ g kg}^{-1} \pm 3.05$ de Ca, $2.6 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.15$ de N total, $0.05 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.006$ de Ti, $0.065 \pm 0.0095 \text{ g kg}^{-1}$ de Zn y $6.06 \text{ g kg}^{-1} \pm 0.07$ de Fe.

7.1.3. Unidades SPAD

Los valores de las unidades SPAD cuantificadas en hojas de *P. vulgaris* L., cultivado en un suelo agrícola acondicionado con diferentes dosis de NPs de acuerdo con el diseño experimental se muestran en la Fig. 13. Las mediciones realizadas en los diferentes tiempos de muestreo no mostraron diferencias significativas en comparación con el tratamiento control. Se pudo observar que en los primeros muestreos (20, 25, 30 y 35 DDS) se obtuvieron lecturas inferiores a los demás tiempos de muestreo, lo anterior coincide con lo reportado por Medina-Pérez *et al.* (2018) [74], quienes detallan que las lecturas inferiores se pueden deber a que la planta no se encontraba en la plenitud del proceso fotosintético. Por otro lado, el comportamiento de las unidades SPAD a través del tiempo para cada tratamiento se observa en la Fig. 14. En todos los tratamientos se puede observar que las mayores lecturas de unidades SPAD se dieron a partir de los 40 DDS hasta los 80 DDS en la mayoría de los casos, lo que coincide con lo antes mencionado ya que se observa que en los muestreos realizados antes de los 40 DDS las lecturas de las unidades SPAD son significativamente menores en comparación con los demás tiempos de muestreo.

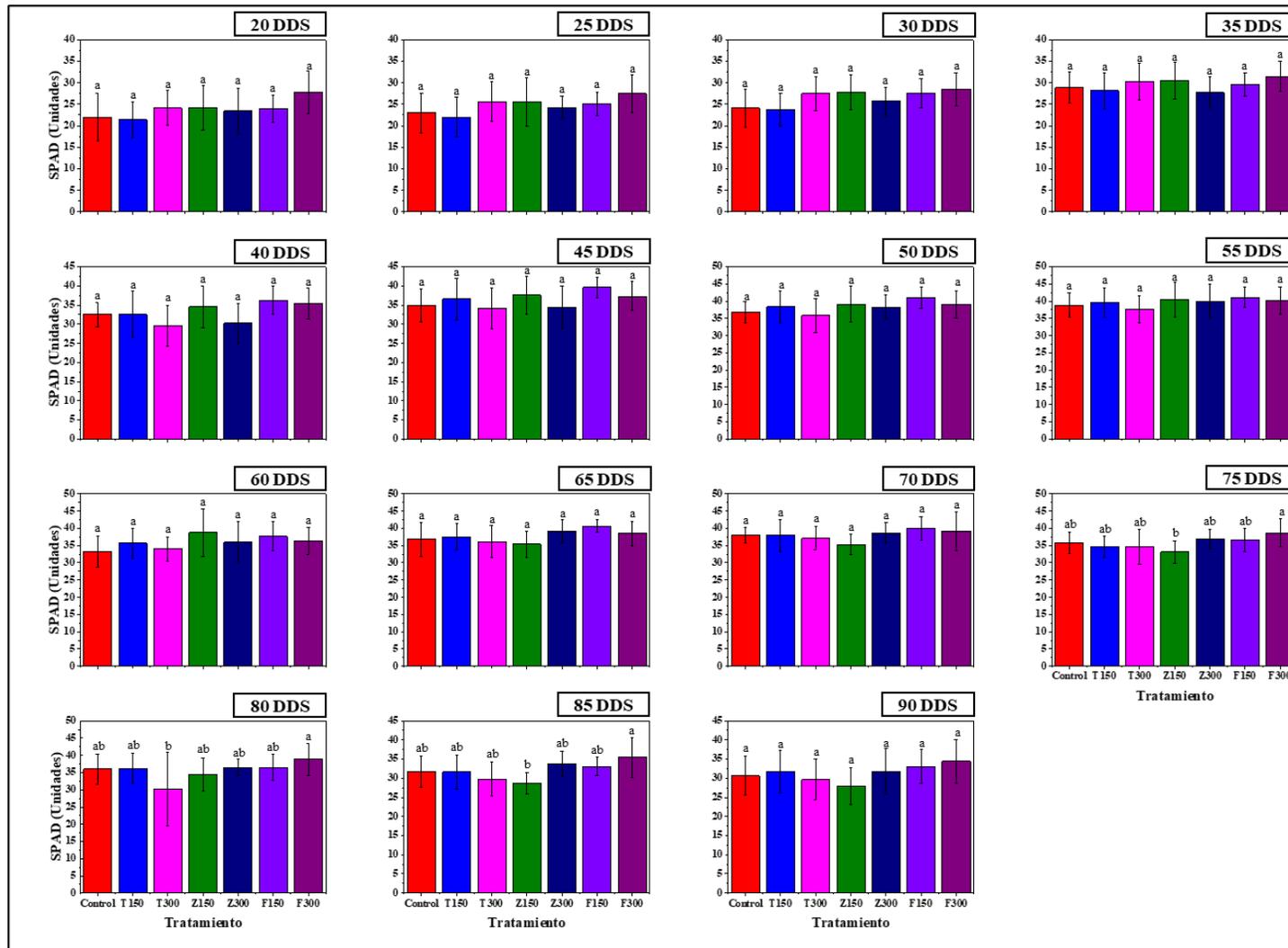


Fig. 13. Unidades SPAD en hojas de plantas de frijol (*P. vulgaris* L.), cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO_2 , ZnO o Fe_2O_3 a concentraciones de 150 o 300 mg kg^{-1} . Valores medios con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$, $n=9$).

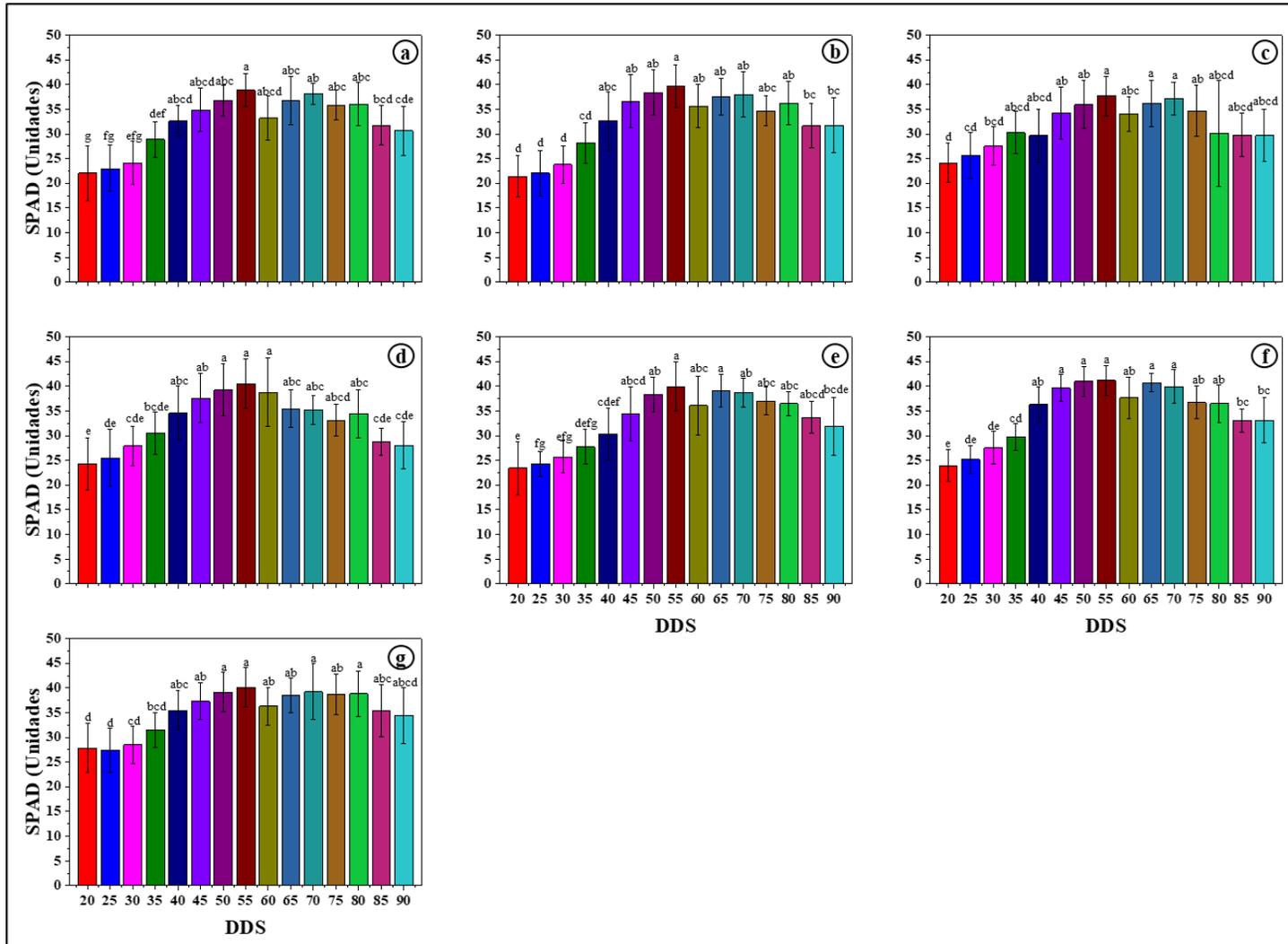


Fig. 14. Comportamiento de las unidades SPAD a través del tiempo por tratamiento; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150, g) F300. DDS= Días después de la siembra. Valores medios con diferente letra indican diferencia estadística entre los tiempos de muestreo por tratamiento (Tukey $\alpha= 0.05$, $n=9$).

7.1.4. Características morfológicas del cultivo de *P. vulgaris* L.

Las características evaluadas de la planta se muestran en la Tabla 11. En el caso de la longitud de la raíz se pudo observar que a los 30 y 90 DDS, no hubo diferencias significativas en los tratamientos acondicionados con los diferentes tipos de NPs. Sin embargo, a los 60 DDS, se observó que en el tratamiento acondicionado con NPs de TiO₂ a 300 mg kg⁻¹ disminuyó significativamente (28.08 %) la longitud de la raíz comparado con el tratamiento control, resultado que coincide con lo reportado por Kibbey y Strevett (2019) [70], quienes encontraron que la dosis de 100 mg L⁻¹ de NPs de TiO₂ reduce la longitud de raíces en plántulas de lechuga a los 21 días de exposición.

Por otro lado, la altura del tallo a los 30 y 60 DDS se redujo significativamente en el tratamiento con NPs de Fe₂O₃ a 150 mg kg⁻¹ y TiO₂ a 300 mg kg⁻¹, respectivamente, en comparación con el control, caso similar lo reportan Sarabia-Catillo y Fernández-Luqueño (2016) [42], quienes obtuvieron longitudes de tallo de *P. vulgaris* L. menores en comparación con el control empleando NPs de Fe₂O₃ y ZnO a 6 y 3 g L⁻¹, respectivamente, en un tiempo de exposición de 35 DDS. De igual manera, Kibbey y Strevett (2019) [70], encontraron que la longitud del tallo de plántulas de lechuga se vio fuertemente afectado al exponerse por un periodo de 21 días a NPs de TiO₂ a una concentración de 100 mg L⁻¹. Sin embargo, Boutchuen *et al.*, (2019) [75], reportaron que las NPs de Fe₂O₃ en concentraciones de 0.022 g L⁻¹ y 1.1 g L⁻¹, aumentan significativamente el crecimiento de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) sosteniendo que los efectos de las NPs dependían directamente de la especie de la leguminosa.

En cuanto a los pesos secos, las NPs de TiO₂ a ambas concentraciones, incrementaron significativamente el peso seco de la raíz a los 30 DDS en comparación con el control, a diferencia de los tiempos de 60 y 90 DDS en donde ninguna NPs afectó esta variable respuesta, siendo este resultado similar a lo reportado por Sarabia-Catillo y Fernández-Luqueño (2016) [42], quienes evidencian el incremento del peso seco de la raíz de plantas de frijol tratadas con NPs de TiO₂ a concentración de 3 g L⁻¹, a los 35 DDS. En contraste, en el peso seco de la parte aérea no se registraron diferencias en ninguno de los tratamientos en los diferentes tiempos de muestreo, en comparación a su control.

Por otro lado, en cuanto a la interacción simbiótica, se pudo observar que se llevó a cabo después de los 30 DDS ya que antes de este tiempo no se tuvo evidencia de la formación de nódulos, Sin

embargo, a los 60 DDS se observó que solo el tratamiento con NPs de Fe_2O_3 a 300 mg kg^{-1} , presentó desarrollo de nódulos simbióticos en las raíces (Tabla 11). Por otro lado, a los 90 DDS se pudo observar que el desarrollo de nódulos se llevó a cabo en todos los tratamientos sin presentar diferencias significativas (Tabla 11). Cabe resaltar que diversas investigaciones relacionadas al estudio de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), han demostrado que algunos nanomateriales pueden retrasar o interrumpir el proceso de formación de nódulos inhibiendo el mecanismo de la FBN [76]. Casos específicos son los reportados por Abd-Alla *et al.*, (2016) [77], quienes evaluaron la respuesta de la aplicación de NPs de plata a una concentración de $800 \mu\text{g kg}^{-1}$ a un cultivo de habas (*Vicia faba* L.) inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, demostrando que este tipo de NPs retardan considerablemente el proceso de nodulación. De igual forma, Moll *et al.* (2016) [78], demostró que la exposición de trébol (*Trifolium pretense* L.) a NPs de TiO_2 , reduce la nodulación por parte de su simbiote *Rhizobium trifolii*, por lo que los efectos de las NPs podrían ser específicos de especies de plantas y rhizobios.

Tabla 11. Características de plantas de frijol (*P. vulgaris* L.), cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃ a concentraciones de 150 o 300 mg kg⁻¹

Características ^Ω	DDS ^ϕ	Tratamiento ^μ						
		T150	T300	Z150	Z300	F150	F300	Control
Longitud de raíz (cm)	30	31.7 ± 5.21 ^{A†b‡}	29.9 ± 4.25 ^{Aba}	21.7 ± 8.79 ^{ABb}	23.5 ± 8.01 ^{ABb}	20.1 ± 7.58 ^{Bb}	23.4 ± 6.43 ^{ABb}	22.6 ± 8.44 ^{ABc}
	60	39.6 ± 3.15 ^{Aba}	33.3 ± 8.34 ^{Ba}	39.7 ± 6.41 ^{ABa}	40.5 ± 4.04 ^{Aba}	43.2 ± 7.12 ^{Aa}	46.6 ± 8.17 ^{Aa}	46.3 ± 3.4 ^{Aa}
	90	37.5 ± 8.27 ^{Aab}	32.2 ± 9.51 ^{Aa}	34.8 ± 11.14 ^{Aa}	32.0 ± 9.52 ^{Aab}	39.4 ± 7.19 ^{Aa}	38.5 ± 7.93 ^{Aa}	37.1 ± 8.06 ^{Ab}
Altura de tallo (cm)	30	8.2 ± 1.13 ^{ABc}	9.5 ± 1.83 ^{Ab}	9.0 ± 1.81 ^{ABc}	7.7 ± 1.02 ^{ABc}	6.9 ± 1.32 ^{Bc}	8.8 ± 2.12 ^{ABc}	8.5 ± 2.34 ^{ABb}
	60	13.7 ± 2.84 ^{Ab}	10.8 ± 2.44 ^{Bb}	11.7 ± 1.82 ^{ABb}	12.3 ± 1.97 ^{ABb}	13.1 ± 1.85 ^{ABb}	13.7 ± 1.81 ^{Ab}	14.1 ± 1.56 ^{Aa}
	90	20.0 ± 4.00 ^{Aa}	14.3 ± 2.56 ^{Ba}	18.1 ± 2.92 ^{ABa}	16.7 ± 3.54 ^{Aba}	16.5 ± 2.04 ^{Aba}	19.4 ± 4.01 ^{Aa}	15.5 ± 2.89 ^{ABa}
Peso seco de raíz (g)	30	0.28 ± 0.06 ^{Ab}	0.17 ± 0.06 ^{Ab}	0.12 ± 0.02 ^{Bb}	0.09 ± 0.01 ^{Bb}	0.06 ± 0.04 ^{Bb}	0.13 ± 0.01 ^{Bb}	0.12 ± 0.04 ^{Ba}
	60	0.64 ± 0.07 ^{Aab}	0.55 ± 0.09 ^{Aa}	0.44 ± 0.11 ^{Aab}	0.51 ± 0.09 ^{Aa}	0.56 ± 0.17 ^{Aab}	0.52 ± 0.13 ^{Aab}	0.50 ± 0.18 ^{Aa}
	90	1.22 ± 0.50 ^{Aa}	0.63 ± 0.13 ^{Aa}	0.83 ± 0.33 ^{Aa}	0.42 ± 0.06 ^{Aa}	0.96 ± 0.32 ^{Aa}	1.01 ± 0.56 ^{Aa}	0.79 ± 0.59 ^{Aa}
Peso seco parte aérea (g)	30	0.38 ± 0.10 ^{Ab}	0.31 ± 0.03 ^{Aa}	0.29 ± 0.14 ^{Ab}	0.22 ± 0.01 ^{Ab}	0.16 ± 0.10 ^{Ab}	0.31 ± 0.09 ^{Aa}	0.29 ± 0.06 ^{Ab}
	60	1.92 ± 0.37 ^{Aa}	1.30 ± 0.53 ^{Aa}	1.33 ± 0.58 ^{Aab}	1.57 ± 0.84 ^{Aab}	1.62 ± 0.65 ^{Aa}	1.11 ± 0.17 ^{Aa}	1.41 ± 0.21 ^{Aa}
	90	2.32 ± 0.84 ^{Aa}	1.20 ± 0.58 ^{Aa}	1.50 ± 0.43 ^{Aa}	1.03 ± 0.11 ^{Aa}	1.44 ± 0.60 ^{Aa}	1.91 ± 1.45 ^{Aa}	1.13 ± 0.52 ^{Aa}
Numero de nódulos (unidades) ^θ	30	0	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	0	0	0	37	0
	90	2	1	1	1	3	11	1

^Ω Longitud de raíz, altura de tallo, número de vainas y número de nódulos n= 9; peso seco de raíz y peso seco parte aérea n= 3.

^ϕ Días después de la siembra.

^μ T150= TiO₂-NP-150, T300= TiO₂-NP-300, Z150= ZnO-NP-150, Z300= ZnO-NP-300, F150= Fe₂O₃-NP-150, F300= Fe₂O₃-NP-300.

± Desviación estándar.

[†] Valores medios con diferente letra mayúscula en cada fila, indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey α= 0.05).

[‡] Valores medios con diferente letra minúscula en cada columna, por cada característica de la planta, indican diferencia estadística a través del tiempo a excepción del número de vainas (Tukey α= 0.05).

^θ El número de nódulos se representa como la suma total de nódulos encontrados

7.1.5. Análisis FTIR-ATR de tejido vegetal

7.1.5.1. Espectros FTIR-ATR de hojas frescas

Los espectros FTIR-ATR de las hojas frescas de *P. vulgaris* L. de todos los tratamientos a los 30, 60 y 90 DDS se muestran en la Fig. 15 (a, b y c, respectivamente) y en la Tabla 12 se muestran las asignaciones de frecuencias de los espectros a los diferentes tiempos de muestreo. Las bandas en $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ en todas las muestras, se asignan al estiramiento simétrico de CH_2 [79]. La banda en $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ se asocia a la vibración de tensión en $\text{C}=\text{O}$ atribuida al grupo carbonilo de esteres; además, se puede observar una banda en $\sim 1462\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la flexión del CH_2 la cual disminuye su intensidad en los tratamientos T300, F150 y F300 a los 30 DDS, teniendo un comportamiento similar en los tratamientos Z150, F150 y F300 a los 60 DDS y en el caso de los 90 DDS solo se pueden apreciar estas bandas en los tratamientos control y T150. La banda en $\sim 1425\text{ cm}^{-1}$ que se puede apreciar en todas las muestras se asigna como la flexión simétrica del grupo CH_3 , por lo anterior y de acuerdo a lo reportado por Warren *et al.* (2015) [80], Barraza-Garza *et al.* (2013) [81] y Peña *et al.* (2019) [82], todas estas señales se relacionan con la presencia de lípidos que se encuentran presentes en la cutícula de la hoja.

Por otro lado, las bandas relacionadas con las proteínas se pueden apreciar en $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ asignada al estiramiento asimétrico de CH_2 y se logra apreciar en $\sim 1533\text{ cm}^{-1}$ la presencia de una señal correspondiente a la flexión simétrica del enlace N-H de una amida secundaria la cual solo se detecta en los tratamientos T300, Z150 y Z300, además de no apreciarse en ninguno de los tratamientos a los 60 DDS, reapareciendo solo en el tratamiento T150 a los 90 DDS, lo que sugiere disminución en el contenido total de proteínas [79] [83]. Por otra parte, se puede apreciar $\sim 1153\text{ cm}^{-1}$ una señal que corresponde a la flexión del enlace C-O asociada a la producción de carbohidratos en las hojas [79] [83] y en ~ 1008 a 1050 cm^{-1} flexiones de enlace relacionados a sustancias ricas en polisacáridos [79], [84].

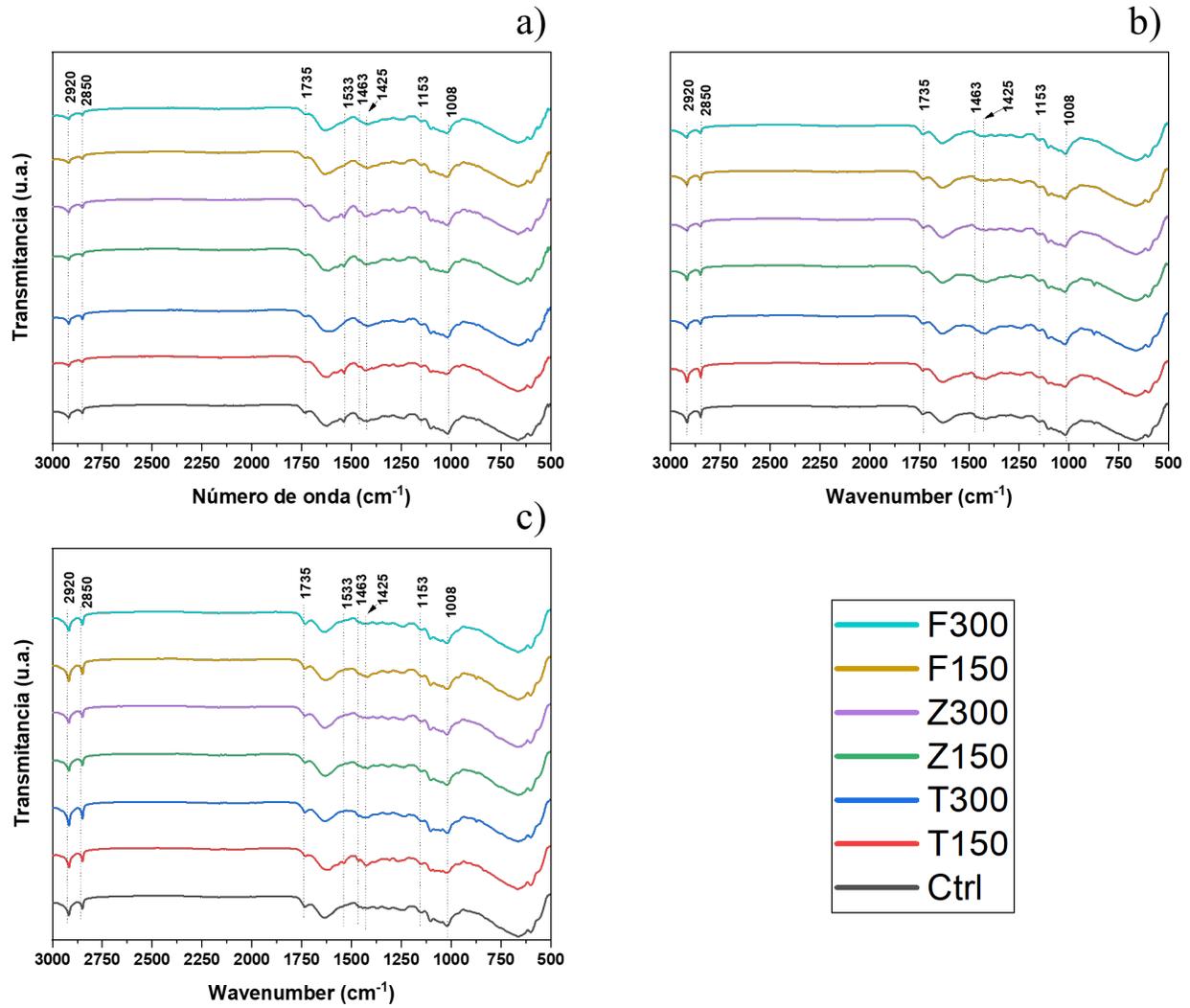


Fig. 15. Espectros infrarrojos de hojas frescas de frijol común. a) 30 días después de la siembra (DDS), b) 60 DDS and c) 90 DDS.

Tabla 12. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para hojas de *P. vulgaris* L. a los 30, 60 y 90 DDS.

DDS	Región espectral (cm ⁻¹)							Asignación de frecuencia tentativa
	Control	NPs de TiO ₂		NPs de ZnO		NPs de Fe ₂ O ₃		
		T150	T300	Z150	Z300	F150	F300	
30	2917	2918	2918	2917	2918	2918	2919	
60	2921	2921	2914	2921	2914	2921	2921	Tensión simétrica de CH ₂
90	2919	2915	2916	2920	2919	2916	2915	
30	2850	2849	2849	2848	2849	2849	2849	
60	2852	2846	2852	2851	2852	2846	2851	Tensión asimétrica de CH ₂
90	2850	2852	2851	2850	2850	2850	2852	
30	1729	1728	1732	1728	1729	1733	1732	
60	1736	1734	1733	1735	1726	1733	1739	Tensión del carbonilo C=O
90	1738	1732	1733	1738	1733	1735	1734	
30	1538	1535	-	1535	1535	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	Amida II: Flexión simétrica de N-H
90	-	1533	-	-	-	-	-	
30	1460	1462	-	1464	1459	-	-	
60	1463	1464	1463	-	1459	-	-	Flexión de CH ₂
90	1458	1458	-	-	-	-	-	
30	1423	1429	1415	1420	1420	1415	1420	
60	1425	1424	1419	1412	1420	1425	1425	Flexión simétrica de CH ₃
90	1418	1422	1418	1419	1418	1419	1417	
30	1149	1149	1149	1147	1147	1156	1150	
60	1156	1155	1152	1146	1149	1146	1156	Flexión del enlace C-O, flexión de enlace C-N o flexión del enlace S=O de sulfóxidos, todos componentes de la pared celular
90	1160	1151	1151	1153	1154	1144	1149	
30	1008	1012	1008	1012	1012	1008	1012	
60	1017	1017	1016	1014	1018	1011	1016	Intensidad característica asociada con sustancias ricas en polisacáridos
90	1017	1014	1017	1015	1017	1017	1018	

7.1.5.2. Espectros FTIR-ATR de tallos frescos

Los espectros FTIR-ATR del tallo a los 30, 60 y 90 DDS, se presentan en la Fig. 16 (a, b y c, respectivamente), en cuanto a la asignación de frecuencias se enlistan en la Tabla 13. Las principales bandas que se lograron detectar en relación con los lípidos fueron en ~2920 cm⁻¹

correspondientes a vibraciones de tensión simétrica del CH₂ [79], la cual solo se presenta en el tratamiento Z300 a los 30 DDS. Sin embargo, a los 60 DDS esta señal desaparece en todos los tratamientos y no es hasta los 90 DDS que solo en los tratamientos control, F150 y F300 esta señal se expresa nuevamente. Por su parte, otra de las señales detectadas fue la señal entre 1425 y 1440 cm⁻¹ atribuida a la flexión simétrica del CH₃ [81].

En cuanto a las señales relacionadas a la producción de proteínas, se puede observar que en ~2850 cm⁻¹ la banda relacionada a vibraciones asimétricas de CH₂ solo se logra apreciar en el tratamiento Z300 a los 30 DDS [79]. Entre 1610 y 1634 cm⁻¹ se aprecia una banda la cual se asigna a la tensión del enlace C=O de una amida primaria la cual se puede observar en todos los tratamientos en todos los tiempos de muestreo [81] [79]; en ~1540 cm⁻¹ una señal perteneciente a la flexión simétrica del enlace N-H de una amida secundaria [81], la cual solo puede apreciarse en el tratamiento F300 a los 30 DDS, sin embargo, a los 60 DDS esta señal se logra apreciar en casi todos los tratamientos a excepción del tratamiento T150, pero en los 90 DDS esta señal se inhibe en los tratamientos control, T150 y F300 y expresándose en el resto de los tratamientos.

Por otro lado, entre los 1249 y 1269 cm⁻¹ se logra observar una pequeña señal asociada al grupo P=O [81], principalmente en los tratamientos T300, Z150, F150 y F300 a los 30 DDS. Posteriormente, esta señal se aprecia mejor en los tratamientos control, T150, T300 y Z150 a los 60 DDS, para luego solo ser visibles en los tratamientos T300, Z150 y Z300 a los 90 DDS; en ~1153 cm⁻¹ se observa una señal que corresponde a la flexión del enlace C-O [79], y solo deja de observarse en el tratamiento Z300 a los 30 DDS, permaneciendo en todos los tratamientos en los diferentes tiempos de muestreo, así mismo se aprecia que todos los tratamientos en todos los tiempos de muestreo presentan una señal en 1007 y 1024 cm⁻¹, la cual se asocia a la tensión y flexión de enlace C-O todas estas bandas se pueden atribuir a la composición de ácidos nucleicos y carbohidratos [81].

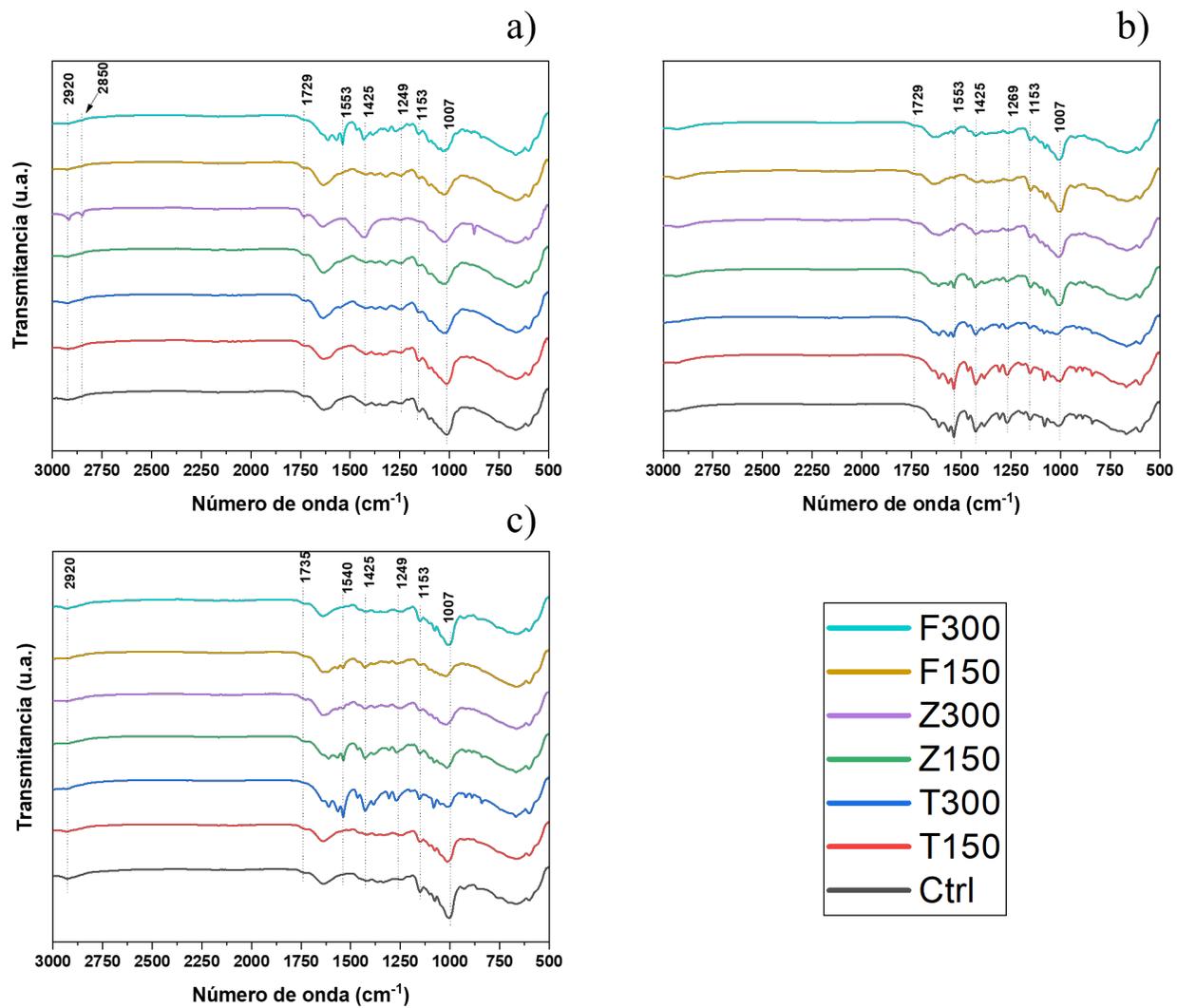


Fig. 16. Espectros infrarrojos de tallos frescos de frijol común. a) 30 días después de la siembra (DDS), b) 60 DDS y c) 90 DDS.

Tabla 13. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para tallos de *P. vulgaris* L. a los 30, 60 y 90 DDS.

DDS	Región espectral (cm ⁻¹)							Asignación de frecuencia tentativa
	Control	NPs de TiO ₂		NPs de ZnO		NPs de Fe ₂ O ₃		
		T150	T300	Z150	Z300	F150	F300	
30	-	-	-	-	2916	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	Tensión asimétrica de CH ₂
90	2921	-	2918	-	-	-	2922	
30	-	-	-	-	2852	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	Tensión asimétrica de CH ₂
90	-	-	-	-	-	-	-	
30	1634	1634	1364	1634	1634	1634	1612	
60	1611	1611	1610	1613	1612	1636	1631	Amida I: Tensión del enlace C=O
90	1636	1634	1611	1612	1635	1634	1637	
30	-	-	-	-	-	-	1536	
60	1537	1537	1540	1536	1537	-	1537	Amida II: Flexión simétrica del enlace N-H
90	-	-	1537	1536	1537	1538	-	
30	1420	1420	1420	1420	1429	1420	1430	
60	1426	1427	1426	1431	1425	-	1429	Flexión simétrica de CH ₃
90	-	-	1427	1431	1429	1429	-	
30	1244	-	1244	1244	-	1244	1270	
60	1270	1270	1268	1268	-	-	-	Tensión asimétrica del enlace P=O, presente en los ácidos nucleicos
90	-	-	1269	1269	-	-	-	
30	1148	1152	1148	1152	-	1148	1154	
60	1152	1150	1154	1150	1150	1149	1150	Tensión y flexión de enlace C-O, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos.
90	1149	1151	1154	1151	1151	1153	1150	
30	1007	1011	1017	1008	1018	1020	1024	
60	1008	1008	1015	1005	1009	1004	1009	Intensidad característica asociada con sustancias ricas en polisacáridos
90	1004	1014	1013	1014	1016	1021	1005	

7.1.5.3. Espectros FTIR-ATR de raíces frescas

Los espectros FTIR-ATR de la raíz a los 30, 60 y 90 DDS, se muestran en la Fig. 17 (a, b y c respectivamente) así como las asignaciones de frecuencias se muestran la Tabla 14. A los 30 DDS se puede observar que a los 30 DDS las señales correspondientes a las vibraciones de tensión del

CH_2 en $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$, solo aparecen en el tratamiento de T150. Sin embargo, a los 60 DDS estas señales no se logran apreciar en ningún tratamiento, pero logran aparecer débilmente en el tratamiento control a los 90 DDS. Por otro lado, la señal en $\sim 1417 \text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la flexión simétrica del grupo CH_3 , se puede apreciar con mayor intensidad en los tratamientos T150, T300 y F300, disminuyendo en el resto de los tratamientos a los 30 DDS, sin embargo, esta señal desaparece en todos los tratamientos a los 60 DDS, pero esta incrementa su intensidad en los tratamientos Z300, F150 y F300 a los 90 DDS, lo que sugiere menor producción de lípidos en la raíz a diferencia de los producidos en las hojas de planta [79] [81].

Por otro lado, las señales relacionadas a la producción de proteínas se asignan en $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ y otra en $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$; en el caso de la señal en ~ 2850 correspondiente a la tensión asimétrica del CH_2 , solo se logra apreciar en el tratamiento T150 a los 30 DDS y en el tratamiento control a los 90 DDS, por otro lado la señal en $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$ asignada a la tensión de enlace $\text{C}=\text{O}$ de amidas primarias se presenta en todos los tratamientos en cada uno de los tiempos de muestreo [79] [81]. Así mismo la señal en $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al enlace $\text{P}=\text{O}$ [81], se aprecia claramente en los tratamientos T150, Z150, F150 y F300 a los 30 DDS, sin embargo, esta señal sigue disminuyendo en intensidad a los 60 y 90 DDS. En cuanto a las señales en ~ 1150 correspondiente a la flexión de enlace $\text{C}-\text{O}$ y en $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la tensión y flexión de enlace $\text{C}-\text{O}$, se pueden apreciar en todos los tratamientos y se pueden atribuir a la producción de carbohidratos [79] [81]. En cuanto a la señal en $\sim 870 \text{ cm}^{-1}$, la cual se atribuye a la flexión $=\text{C}-\text{H}$ del xiloglucano de la pared celular, dicha señal solo puede apreciarse en algunos de los tratamientos como se puede apreciar en la Fig. 17. [85]

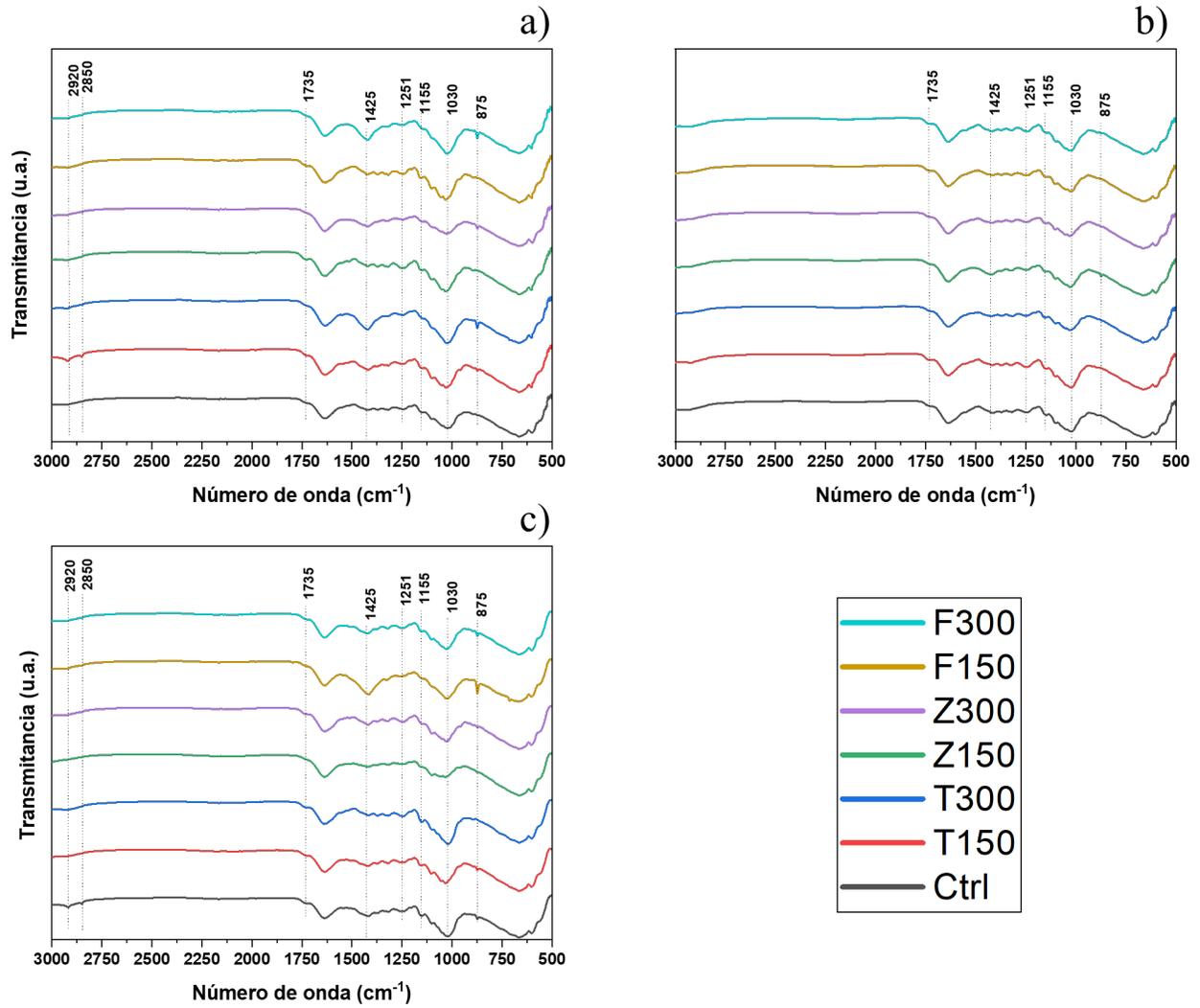


Fig. 17. Espectros infrarrojos de raíces frescas de frijol común. a) 30 días después de la siembra (DDS), b) 60 DDS and c) 90 DDS.

Tabla 14. Asignación de frecuencia tentativa de espectros FTIR para raíces de *P. vulgaris* L. a los 30, 60 y 90 DDS.

DDS	Región espectral (cm ⁻¹)							Asignación de frecuencia tentativa
	Control	NPs de TiO ₂		NPs de ZnO		NPs de Fe ₂ O ₃		
		T150	T300	Z150	Z300	F150	F300	
30	-	2917	-	-	-	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	Tensión asimétrica de CH ₂
90	2917	-	-	-	-	-	-	
30	-	2849	-	-	-	-	-	
60	-	-	-	-	-	-	-	Tensión asimétrica de CH ₂
90	2850	--	-	-	-	-	-	
30	1634	1634	1634	1632	1634	1634	1634	
60	1638	1638	1638	1638	1638	1638	1638	Amida I: Tensión del enlace C=O
90	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	
30	-	1419	1419	1420	1417	1419	1420	
60	-	-	-	-	-	-	-	Flexión simétrica del CH ₃
90	1419	1419	1419	-	1419	1416	1419	
30	-	1244	-	1243	-	1244	1244	Tensión asimétrica del enlace P=O de los ácidos nucleicos
60	1245	1241	-	-	-	1246	1245	
90	1243	1243	1243	-	1243	-	1243	
30	1148	1155	-	1155	1155	1155	1155	
60	1148	1153	1155	1141	1144	1148	1146	Tensión y flexión de enlace C-O, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos.
90	1151	1158	1151	1155	1146	1151	1153	
30	1021	1031	1023	1031	1029	1033	1025	
60	1017	1018	1020	1025	1018	1017	1023	Intensidad característica asociada con sustancias ricas en polisacáridos
90	1019	1033	1019	1034	1027	1028	1032	
30	-	872	873	-	872	-	873	Flexión del enlace =C-H del xiloglucano presente en la pared celular
60	-	-	-	872	-	-	-	
90	872	842	-	873	873	872	872	

7.1.6. Análisis de tejido por MEB

El análisis de microscopía electrónica de barrido de las muestras de hojas (Fig. 18), reveló un alto grado de rugosidad en la superficie adaxial en los tratamientos control, T150, T300, Z150, Z300 y

F150 (Fig. 18; a, b, c, d, e y f), mientras que en el tratamiento F300 (Fig. 18 g), la rugosidad fue menor, dejando apreciar con mayor claridad las estomas en la superficie de la hoja. Rajput *et al.*, (2018) [86], reportaron efectos negativos sobre la tasa de transpiración y apertura de las estomas al tratar plantas de *Hordeum sativum* con NPs de CuO. Sin embargo, en esta investigación se vio que inclusive en el tratamiento control (a) no se logran apreciar estas estructuras, por lo que se puede decir que las NPs de Fe₂O₃ a concentración de 300 mg kg⁻¹ favoreció la actividad de las estomas.

En la Fig. 19, se muestran cortes longitudinales de tallos con los diferentes tratamientos, en los cuales no se aprecia ningún daño estructural ni se logró observar ninguna estructura que se pudiera identificar como NPs; sin embargo, se logran apreciar estructuras semiesféricas que se atribuyen a la presencia de gránulos de almidón dentro de células parenquimáticas, debido a que en dichas células se pueden sintetizar y almacenar sustancias como azúcares, proteínas, pigmentos, etc., que pueden encontrarse en forma sólida, como en este caso en forma de almidón [87], esto se puede observar principalmente en los tratamientos control, Z150, Z300, F150 y F300 (Fig. 19; a, d, e, f, y g, respectivamente).

De igual manera, las imágenes correspondientes a los cortes de raíz (Fig. 20), no muestran daños en su microestructura ni se logran apreciar estructuras que se pudieran relacionar con la presencia de NPs en su interior, sin embargo, al igual que las micrografías del tallo, también se logran observar gránulos de almidón [87], lográndose apreciar en mayor cantidad en los tratamientos control, Z300, F150 y F300 (Fig. 20; a, e, f y g, respectivamente).

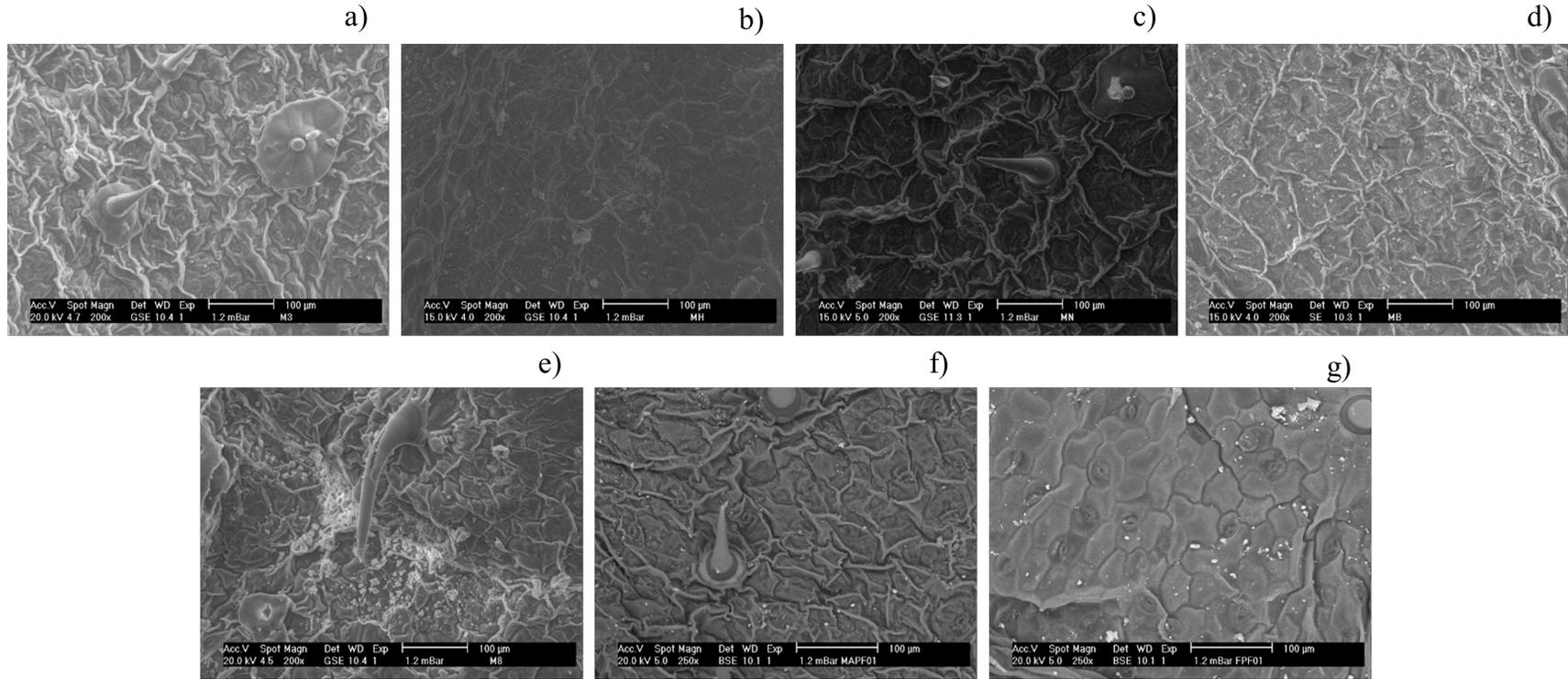


Fig. 18. Micrografías de la superficie adaxial (haz) en hojas de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 y g) F300.

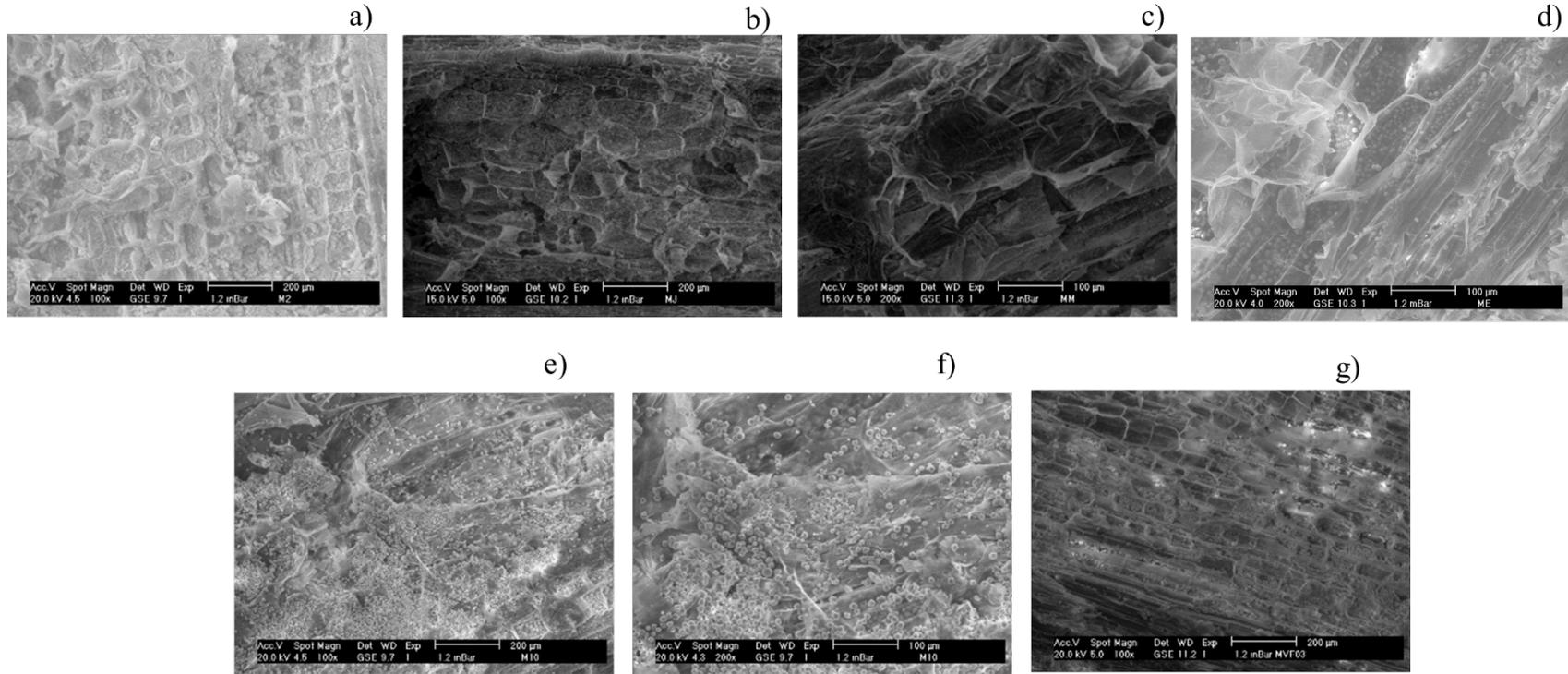


Fig. 19. Micrografías de la estructura interna de tallos de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 y g) F300.

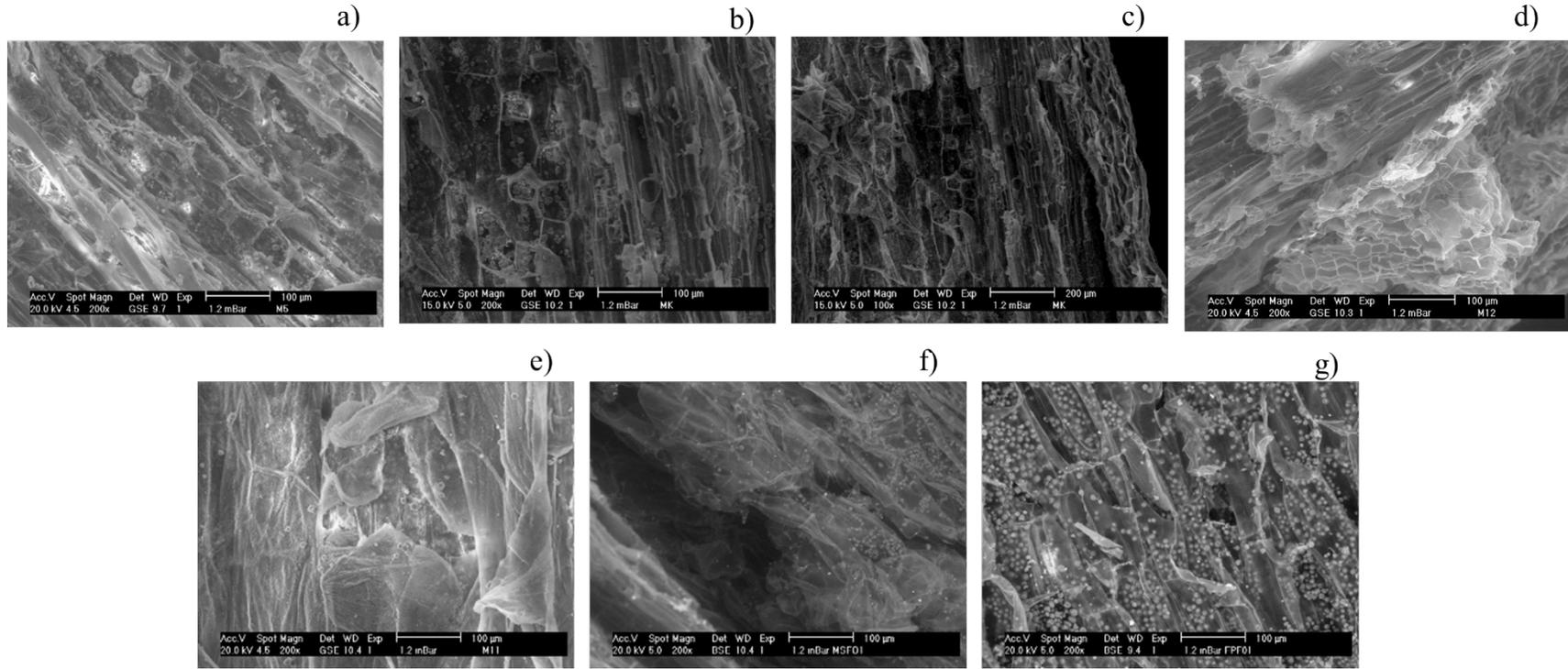


Fig. 20. Micrografías de la estructura interna de las raíces de frijol común bajo diferentes tratamientos de nanopartículas; a) Control, b) T150, c) T300, d) Z150, e) Z300, f) F150 y g) F300.

7.1.7. Concentración elemental en tejido vegetal

La concentración de P en hojas de frijol fue significativamente mayor en los tratamientos F150 a los 30 y 90 DDS (Tabla 15), siendo el tratamiento control a los 90 DDS el tratamiento que menor concentración de P absorbió. Sin embargo, se observó que a los 60 DDS la absorción de P se vio favorecida en el tratamiento T150 (Tabla 15). De igual manera, la cuantificación de este macronutriente también se realizó en tallo y raíces de la planta y se observó que el tratamiento F150 a los 30 DDS y el tratamiento T150 a los 60 y 90 DDS (Tabla 15), fueron los que presentaron mayor concentración de P en ambas secciones de la planta (tallo y raíz). Además, se observó que a los 90 DDS al igual que en las hojas, el tratamiento control fue el que menor concentración de P presentó tanto en el tallo como en la raíz.

Por su parte, estudios como el de Daghan, (2018) [88], reporta que la adición de NPs de TiO₂, afectan positivamente la absorción de P en brotes y raíces de *Zea mays* L., sin embargo, Poscic *et al.*, (2016) [89] encontraron que la adición de NPs de CeO₂ o TiO₂ no modificaron la concentración de P en plantas de *Hordeum vulgare* L., por lo que los impactos favorables en relación a la absorción de P pueden ser dependientes de la composición y tipo de NP.

La mayor concentración de K en la sección del tallo se presentó en el tratamiento T150 a los 30 y 90 DDS (Tabla 15), mientras que a los 60 DDS, el tratamiento control fue el que presentó mayor concentración, seguido del tratamiento T150.

En la sección de las raíces, se encontró mayor concentración de K en el tratamiento F150 seguido del tratamiento T150 con respecto al control (Tabla 15), sin embargo, la concentración de K en estos tratamientos disminuye a los 60 DDS y aumenta significativamente en el tratamiento control (Tabla 15). Por otro lado, a los 90 DDS, se observó que la concentración de K disminuyó en el tratamiento control y aumentó en el tratamiento Z300, siendo este último el tratamiento que presentó una concentración significativamente mayor (Tabla 15).

Por otro lado, Poscic *et al.* (2016) [89], encontraron que la concentración de K en planta de cebada se reduce significativamente al exponerse a NPs de CeO₂ o TiO₂, mientras que Daghan, (2018) [88], reporta que la adición de NPs de TiO₂ estimulan la absorción de K tanto en los brotes como en las raíces de plantas de *Z. mays* L. Por lo que, de igual forma, el efecto de las NPs sobre la capacidad de absorción de K depende de la planta en estudio y el tipo de NP.

Tabla 15. Concentración de K y P en diferentes secciones de plantas de frijol común cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃ a concentraciones de 150 o 300 mg kg⁻¹ a diferentes tiempos de muestreo. Valores medios ± DE con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos en cada tiempo de muestreo (n= 3; Tukey α= 0.05).

Tratamiento	Hoja			Tallo			Raíz		
	30 DDS	60 DDS	90 DDS	30 DDS	60 DDS	90 DDS	30 DDS	60 DDS	90 DDS
Concentración de Potasio									
Control	22680 ± 10 ^b	26000 ± 10 ^c	44379 ± 10 ^d	32990 ± 10 ^c	22300 ± 10 ^a	22997 ± 10 ^c	10040 ± 10 ^c	23200 ± 10 ^a	14458 ± 10 ^c
T150	31750 ± 10 ^a	27500 ± 10 ^c	51330 ± 10 ^a	37160 ± 10 ^a	20700 ± 10 ^b	30563 ± 10 ^a	17940 ± 10 ^b	19000 ± 10 ^f	15085 ± 10 ^b
T300	19150 ± 10 ^f	28900 ± 10 ^a	50920 ± 10 ^b	32020 ± 10 ^f	19000 ± 10 ^c	21893 ± 10 ^d	12010 ± 10 ^c	20600 ± 10 ^b	10312 ± 10 ^f
Z150	19280 ± 10 ^c	28900 ± 10 ^a	43915 ± 10 ^c	34500 ± 10 ^b	20500 ± 10 ^c	23292 ± 10 ^b	10570 ± 10 ^d	19500 ± 10 ^c	8269 ± 10 ^g
Z300	18550 ± 10 ^g	27800 ± 10 ^b	41201 ± 10 ^g	26680 ± 10 ^g	18600 ± 10 ^f	21550 ± 10 ^f	6040 ± 10 ^g	20000 ± 10 ^d	17441 ± 10 ^a
F150	20400 ± 10 ^d	26600 ± 10 ^d	43225 ± 10 ^f	32760 ± 10 ^d	19200 ± 10 ^d	19440 ± 10 ^g	20400 ± 10 ^a	20400 ± 10 ^c	12061 ± 10 ^d
F300	20940 ± 10 ^c	25800 ± 10 ^f	46195 ± 10 ^c	32150 ± 10 ^c	16100 ± 10 ^g	21645 ± 10 ^c	8750 ± 10 ^f	19000 ± 10 ^f	11783 ± 10 ^e
Concentración de Fosforo									
Control	3440 ± 10 ^b	1190 ± 10 ^c	1824 ± 10 ^g	3010 ± 10 ^f	1180 ± 10 ^b	1754 ± 10 ^f	3190 ± 10 ^d	1460 ± 10 ^b	1979 ± 10 ^f
T150	2790 ± 10 ^c	1510 ± 10 ^a	2607 ± 10 ^b	3090 ± 10 ^c	1250 ± 10 ^a	2961 ± 10 ^a	2780 ± 10 ^g	1570 ± 10 ^a	2622 ± 10 ^a
T300	2860 ± 10 ^c	940 ± 10 ^c	2474 ± 10 ^c	3080 ± 10 ^c	860 ± 10 ^f	1989 ± 10 ^c	2870 ± 10 ^f	1000 ± 10 ^d	2487 ± 10 ^c
Z150	2890 ± 10 ^d	1240 ± 10 ^b	1870 ± 10 ^f	4620 ± 10 ^b	1140 ± 10 ^c	1800 ± 10 ^e	4300 ± 10 ^b	1340 ± 10 ^c	2079 ± 10 ^c
Z300	2920 ± 10 ^c	1120 ± 10 ^d	2118 ± 10 ^c	3990 ± 10 ^c	1100 ± 10 ^d	1883 ± 10 ^d	3060 ± 10 ^c	1340 ± 10 ^c	2080 ± 10 ^c
F150	3920 ± 10 ^a	1030 ± 10 ^c	2672 ± 10 ^a	5880 ± 10 ^a	1040 ± 10 ^c	2208 ± 10 ^b	10300 ± 10 ^a	1360 ± 10 ^c	2178 ± 10 ^d
F300	2700 ± 10 ^g	890 ± 10 ^g	2293 ± 10 ^d	3230 ± 10 ^d	770 ± 10 ^g	2186 ± 10 ^b	4140 ± 10 ^c	980 ± 10 ^d	2531 ± 10 ^b

En el caso de la absorción de Ti por las plantas de frijol, la concentración no fue dependiente en el contenido de Ti en hojas, tallos y raíces. Los resultados no presentaron diferencias significativas en el contenido de Ti en hojas, tallos y raíces a los 30, 60 y 90 DDS, sin embargo, en el caso de las raíces a los 90 DDS se observó que la concentración disminuyó de manera significativa en los tratamientos acondicionados con NPs de TiO₂ en ambas concentraciones en comparación con el control (Tabla 16). Sin embargo, las raíces de la planta fueron las que acumularon mayor cantidad de Ti, lo que coincide con lo reportado por Kelemen *et al.* (1993) [90], quienes reportaron que la mayor cantidad de Ti permanece en las raíces de las plantas de *Triticum aestivum* L., mientras que solo una pequeña cantidad se acumuló en las hojas; de igual manera, Deng *et al.* (2017) [91], reportan que la acumulación de Ti en raíces de plantas de *Oriza sativa* L. se dio en mayor medida en las raíces, con diferencias de hasta dos órdenes de magnitud en comparación con la acumulación de Ti en hojas y tallos, en este sentido, y de acuerdo con lo reportado por Lyu *et al.* (2017) [92], la cantidad de Ti total acumulado en plantas puede variar entre 1 a 578 mg kg⁻¹ sin considerarlas como plantas acumuladoras, por lo que la concentración detectada en cada una de las secciones de la planta de frijol en esta investigación se puede considerar como que concentración absorbida tiene un rango normal.

La acumulación de Zn en los diferentes tejidos de la planta se puede observar en la Tabla 16. En el caso de las hojas, se puede ver que a los 30 DDS, se presentó mayor absorción de Zn en el tratamiento Z150 en comparación con el tratamiento control, lo mismo ocurrió cuando se analizaron las hojas expuestas después de 90 DDS, en donde se puede apreciar que la mayor acumulación de Zn ocurrió en el tratamiento Z150, pero esto no sucedió en el periodo de 60 DDS ya que no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Por otro lado, la absorción por parte del tallo (Tabla 16), a los 30 DDS se observa que la acumulación de Zn en el tallo en el tratamiento Z300 es significativamente mayor en comparación con el tratamiento control. En cuanto a la absorción por parte de la raíz, se observa que a los 30 DDS la mayor acumulación se dio en el tratamiento Z300 en comparación con el control; así mismo a los 90 DDS la mayor acumulación de Zn se presentó en los tratamientos Z300 y Z150 en comparación con el tratamiento control. De manera general se puede decir que la mayor acumulación se observó en la raíz de la planta en comparación con la concentración de Zn en hojas y tallos; este resultado es consistente con lo reportado por Zhang *et al.* (2015) [93]. Estos autores

observaron que los niveles de Zn eran más bajos en hojas y tallos que en raíces de plantas de palla (*Schoenoplectus tabernaemontani* C. C. Gmel.), expuestas a NPs de ZnO. Así, existen múltiples evidencias de que el aumento en la concentración de Zn en las raíces puede deberse a la interacción directa de las NPs de ZnO con las raíces aumentando la capacidad de adsorción de NPs e impidiendo que estas se trasladen hacia tallos y hojas Lin y Xing, (2008) [94].

De igual manera, se determinó la absorción de Fe en los tejidos de la planta de frijol, en la Tabla 16, se puede observar que la acumulación de hierro en las hojas de frijol fue significativamente mayor en el tratamiento F300 en comparación con el tratamiento control a los 30 DDS; sin embargo, el contenido de Fe en las hojas disminuyó con el paso del tiempo hasta los 90 DDS, en donde se observó que en los tratamientos F300 y F150 acumularon significativamente más Fe en comparación al tratamiento control.

Por otro lado, la acumulación de Fe en los tallos de frijol a los 30 DDS fue significativamente menor en los tratamientos F300 y F150, en comparación con el tratamiento control; Sin embargo, al igual que en las hojas, la acumulación disminuye a los 60 y 90 DDS en todos los tratamientos. Por su parte el contenido de Fe en las raíces, como se puede ver en la Tabla 16, a los 30 DDS, la acumulación fue significativamente menor en los tratamientos F300 y F150 en comparación con el tratamiento control, siendo el tratamiento F150 el que menos Fe acumuló en las raíces. Sin embargo, a los 90 DDS, se observó que el contenido de Fe aumentó de manera significativa en los tratamientos F300 y F150 en comparación con el tratamiento control, siendo el tratamiento F300 el tratamiento con mayor contenido de Fe en las raíces en este tiempo de muestreo.

Lo anterior coincide con lo reportado por Al-Amri *et al.* (2020) [95], quienes encontraron que la mayor acumulación de Fe en plantas de *T. aestivum* L. expuestas a NPs de Fe₂O₃, se da en las raíces obteniendo menor acumulación en las hojas. Sin embargo, en un estudio previo realizado por Pariona *et al.* (2017) [96], encontraron que la mayor acumulación de Fe en plantas de *Quercus macdougalii*, expuestas a NPs de Fe₃O₄ se da en las hojas de esta planta, por lo que la acumulación de Fe en cada planta puede depender de la capacidad de absorción y transporte de metales desde las raíces hasta las partes aéreas como tallos y hojas.

Tabla 16. Concentración de Ti, Zn y Fe en diferentes secciones de plantas de frijol común cultivadas en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃ a concentraciones de 150 o 300 mg kg⁻¹ a diferentes tiempos de muestreo. Valores medios ± DE con diferente letra indican diferencia estadística entre tratamientos en cada tiempo de muestreo (n= 3; Tukey α= 0.05).

Tratamiento	Hoja			Tallo			Raíz		
	30 DDS	60 DDS	90 DDS	30 DDS	60 DDS	90 DDS	30 DDS	60 DDS	90 DDS
Concentración de Titanio									
Control	20 ± 10 ^a	25 ± 10 ^a	31 ± 10 ^a	11 ± 1 ^a	25 ± 10 ^a	2 ± 1 ^a	140 ± 10 ^{ab}	25 ± 10 ^a	478 ± 10 ^a
T150	10 ± 5 ^a	25 ± 10 ^a	23 ± 10 ^a	20 ± 10 ^a	25 ± 10 ^a	3 ± 1 ^a	150 ± 10 ^a	25 ± 10 ^a	342 ± 10 ^c
T300	10 ± 5 ^a	25 ± 10 ^a	28 ± 10 ^a	30 ± 10 ^a	25 ± 10 ^a	3 ± 1 ^a	120 ± 10 ^b	25 ± 10 ^a	432 ± 10 ^b
Concentración de Zinc									
Control	40 ± 20 ^b	25 ± 10 ^a	31 ± 10 ^c	30 ± 10 ^b	47 ± 10 ^a	77 ± 10 ^a	90 ± 10 ^c	132 ± 10 ^a	153 ± 10 ^b
Z150	160 ± 10 ^a	50 ± 10 ^a	100 ± 10 ^a	50 ± 10 ^b	49 ± 10 ^a	80 ± 10 ^a	180 ± 10 ^b	120 ± 10 ^a	211 ± 10 ^a
Z300	60 ± 10 ^b	48 ± 10 ^a	65 ± 10 ^b	80 ± 10 ^a	48 ± 10 ^a	99 ± 10 ^a	260 ± 10 ^a	117 ± 10 ^a	231 ± 10 ^a
Concentración de Hierro									
Control	150 ± 10 ^b	49.97 ± 10.05 ^a	2 ± 1 ^b	400 ± 10 ^a	50 ± 10 ^a	2 ± 1 ^a	1700 ± 10 ^a	50 ± 10 ^a	1579 ± 10 ^c
F150	140 ± 10 ^b	56.67 ± 5.77 ^a	64 ± 10 ^a	260 ± 10 ^b	50 ± 10 ^a	2 ± 1 ^a	140 ± 10 ^c	50 ± 10 ^a	2513 ± 10 ^b
F300	200 ± 10 ^a	50 ± 10 ^a	84 ± 10 ^a	150 ± 10 ^c	50 ± 10 ^a	2 ± 1 ^a	1120 ± 10 ^b	50 ± 10 ^a	2596 ± 10 ^a

7.1.8. Análisis de componentes principales (ACP)

De acuerdo con las cargas factoriales del ACP, la concentración de hierro en hoja y tallo, K en tallo, así como P en hoja, tallo y raíz se correlacionaron positivamente con el componente principal 1 (CP1) lo que indica una alta absorción de estos nutrientes, mientras que las unidades SPAD, concentración de K en hoja y raíz se correlacionaron negativamente con el CP1. Por otro lado, la concentración de Zn en hoja, tallo y raíz se correlacionaron positivamente con el componente principal 2 (CP2) y la concentración de Ti en hojas, tallo y raíz, así como la concentración de Fe en raíz se correlacionaron negativamente con este componente (Tabla 17).

Tabla 17. Matriz de cargas de los componentes extraídos.

Variable	Coefficientes de CP1	Coefficientes de CP2
Unidades SPAD	-0.36211	-0.12858
Ti hoja	-0.08851	-0.27273
Ti tallo	-0.05268	-0.2772
Ti raíz	-0.00681	-0.13472
Zn hoja	-0.06878	0.42945
Zn tallo	-0.07453	0.50529
Zn raíz	-0.02929	0.51354
Fe hoja	0.27139	-0.16801
Fe tallo	0.29319	-0.12227
Fe raíz	0.09502	-0.10092
K hoja	-0.15904	0.04292
K tallo	0.36737	-0.00764
K raíz	-0.21923	-0.21669
P hoja	0.40927	0.04322
P tallo	0.4055	0.08077
P raíz	0.37174	-0.00339

En el gráfico de ordenación (Fig. 21) se puede observar que en el cuadrante de superior-derecho se posicionan los tratamientos con mayor absorción de P en hojas, tallos y raíces; en el cuadrante superior-izquierdo se encuentran los tratamientos con mayor absorción de Zn en hojas, tallos y raíces y en el cuadrante inferior-izquierdo, aquellos tratamientos en donde las variables como unidades SPAD y la absorción de K y Ti son bajos.

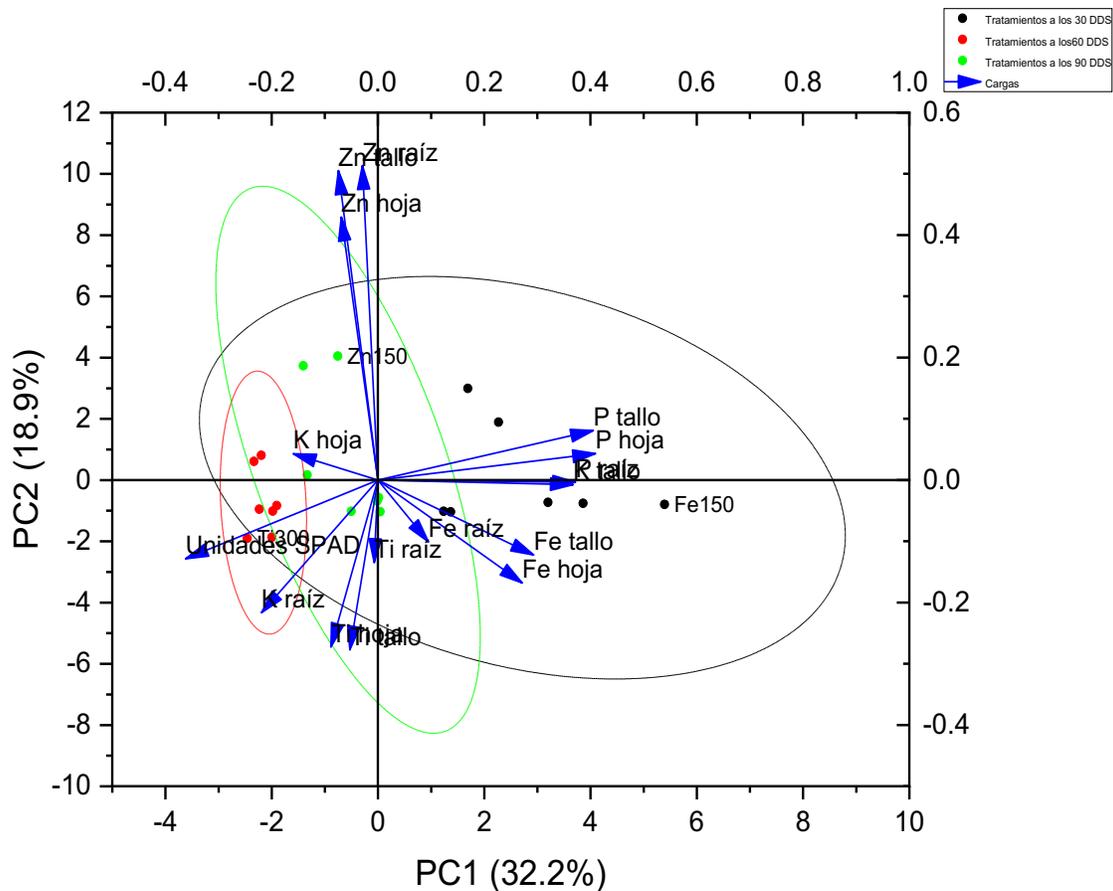


Fig. 21. ACP realizado sobre las Unidades SPAD y concentración de nutrientes en frijol común cultivado en condiciones de invernadero y en un suelo acondicionado con nanopartículas de TiO_2 , ZnO o Fe_2O_3 a concentraciones de 150 o 300 mg kg^{-1}

7.1.9. Determinación de pH y conductividad eléctrica del suelo después de cada muestreo

La Tabla 18 muestra los resultados del efecto de la aplicación de NPs sobre el pH y la conductividad eléctrica del suelo. En esta se observa que la presencia de NPs de TiO_2 y ZnO a ambas concentraciones disminuyeron significativamente el pH del suelo, comparado con el tratamiento control a los 30 DDS, así mismo, se pudo observar que solo en el tratamiento de NPs de TiO_2 y ZnO a 300 mg kg^{-1} el pH fue significativamente mayor a los 60 DDS. Por otro lado, a los 90 DDS los tratamientos con NPs de ZnO y Fe_2O_3 a 150 mg kg^{-1} , fueron los que presentaron el mayor pH en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, a pesar de estas diferencias entre los tratamientos todos se clasifican como suelos alcalinos, que de acuerdo con Dimkpa, (2018) [97], la adición de NPs en suelos alcalinos da como resultado respuestas positivas en el desarrollo de

plantas. Estos autores evaluaron el crecimiento de trigo en presencia de NPs de CuO y ZnO. Sin embargo, el comportamiento de cada tipo NPs no es estrictamente igual en todos los casos, por lo que de acuerdo con Dimkpa, (2018) [97], es necesario realizar una evaluación específica del suelo para cada NPs, ya que la reactividad de estas depende de su carga superficial, la cual está en función del pH. No obstante, Valle-Garcia et al (2021) [98] reportaron que el incremento en el pH se debe a la formación de hidróxidos con los metales de las NPs, los cuales después se disocian para dar lugar a la liberación de iones hidroxilo en el suelo.

Por otro lado, la conductividad eléctrica no presentó cambios en ninguno de los tratamientos a los 30 y 60 DDS, sin embargo, a los 90 DDS los tratamientos con NPs de TiO₂ y ZnO a ambas concentraciones presentaron valores significativamente mayores en comparación con el tratamiento control.

La evolución de esta característica con respecto al tiempo presentó diferencias significativas aumentando los valores en todos los tratamientos en comparación con los valores a los 30 DDS. Por lo anterior, Zhang *et al.* (2020) [99] sugieren que la adición de NPs al suelo podría modificar significativamente la conductividad eléctrica, debido al aumento de iones por efectos de la solubilidad de las NPs a sus formas iónicas.

Tabla 18. Características químicas de suelo acondicionado con nanopartículas de TiO₂, ZnO o Fe₂O₃ a concentraciones de 150 o 300 mg kg⁻¹ al finalizar el experimento en invernadero a los 30, 60 y 90 DDS.

Característica	DDS ^ϕ	Tratamiento ^μ						
		T150	T300	Z150	Z300	F150	F300	Control
pH ± DE	30	7.5 ± 0.08 ^{C†b‡}	7.9 ± 0.04 ^{Bb}	7.4 ± 0.11 ^{Db}	7.5 ± 0.14 ^{CDc}	8.0 ± 0.04 ^{Ab}	8.0 ± 0.03 ^{Aa}	7.9 ± 0.14 ^{Abb}
	60	8.0 ± 0.55 ^{Ba}	8.1 ± 0.12 ^{Aba}	8.1 ± 0.07 ^{ABc}	8.5 ± 0.39 ^{Aa}	8.0 ± 0.23 ^{Bb}	7.9 ± 0.07 ^{Bb}	8.0 ± 0.10 ^{Ba}
	90	8.1 ± 0.02 ^{Ba}	8.13 ± 0.04 ^{ABab}	8.2 ± 0.03 ^{Aa}	8.1 ± 0.01 ^{Bb}	8.2 ± 0.04 ^{Aa}	8.1 ± 0.04 ^{Ba}	8.1 ± 0.05 ^{Ba}
C.E ± DE (μS cm ⁻¹)	30	1095.2 ± 144.28 ^{Abc}	1084.2 ± 62.32 ^{Ac}	985.3 ± 74.92 ^{Ac}	1080.3 ± 73.24 ^{Ac}	1043.6 ± 97.49 ^{Ac}	1050.4 ± 76.94 ^{Ac}	1042.9 ± 56.97 ^{Ac}
	60	1520.7 ± 215.71 ^{Ab}	1722.6 ± 222.02 ^{Ab}	1603.9 ± 209.93 ^{Ab}	1451.9 ± 211.12 ^{Ab}	1695.6 ± 118.32 ^{Aa}	1492.4 ± 197.53 ^{Ab}	1503.3 ± 150.39 ^{Ab}
	90	2351.7 ± 64.8 ^{Aa}	2317.7 ± 71.8 ^{ABa}	2424.7 ± 45.5 ^{Aa}	2466.7 ± 53.8 ^{Aa}	1186.3 ± 45.7 ^{Db}	2184 ± 16.09 ^{Ba}	1730 ± 120.3 ^{Ca}

^ϕ Días después de la siembra.

^μ T150= TiO₂-NP-150, T300= TiO₂-NP-300, Z150= ZnO-NP-150, Z300= ZnO-NP-300, F150= Fe₂O₃-NP-150, F300= Fe₂O₃-NP-300.

[†] Valores medios con diferente letra mayúscula en cada fila, indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey α= 0.05) n=9.

[‡] Valores medios con diferente letra minúscula en cada columna, por cada característica, indican diferencia estadística a través del tiempo (Tukey α= 0.05) n=3.

7.2.Resultados del experimento en campo

7.2.1. caracterización fisicoquímica y biológica del suelo del experimento en campo

El suelo de la parcela agrícola presentó un pH de 7.07 ± 0.19 al inicio del experimento lo que lo hace un suelo neutro y una conductividad eléctrica de $340.97 \pm 19.02 \mu\text{S cm}^{-1}$ lo que indica que se trata de un suelo no salino; el contenido de materia orgánica fue de 4.16 % y la densidad aparente de 1.193 g cm^{-3} . Por otro lado, en la caracterización biológica del suelo se determinó la abundancia de esporas de HMA registrándose un promedio de 240 esporas por 100 g de suelo seco. Algunos ejemplos de esporas aisladas se pueden observar en la Fig. 22.

A partir del análisis morfológico de las esporas aisladas se lograron identificar seis géneros: *Glomus*, *Gigaspora*, *Diversispora*, *Acaulospora*, *Scutellospora* y *Sclerocystis* (Fig. 22; Tabla 20), con una distribución porcentual de 50.3 %, 41.7 %, 2.7 %, 2.8 %, 1.8 % y 0.6 %, respectivamente. La diversidad α de los géneros encontrados fue de 1.01 de acuerdo con el índice de Shannon-Wiener, lo cual indica una baja diversidad de esporas de HMA en el suelo.

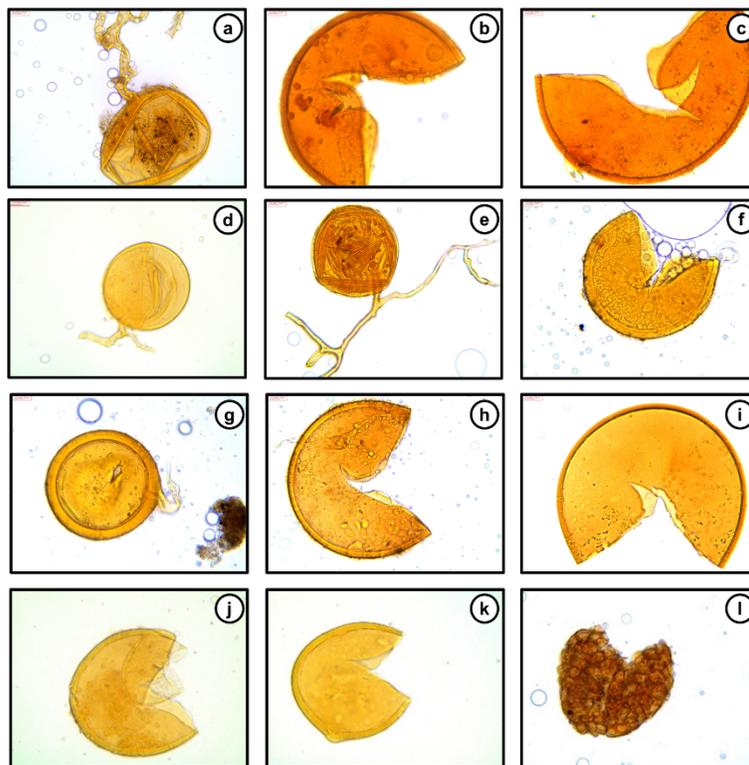


Fig. 22. Ejemplos de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas antes del montaje experimental. Con los géneros encontrados: *Glomus* (a, d, e y g), *Gigaspora* (b, c, h y i), *Acaulospora* (f), *Scutellospora* (j), *Diversispora* (k), y *Sclerocystis* (l).

Tabla 19. Descripción general de los géneros de esporas de HMA identificados en el suelo de estudio.

Género de espora	Descripción general	Ref.
<i>Glomus</i>	Las esporas de este género se desarrollan en el ápice de las hifas o entre el micelio, por lo que se pueden encontrar de forma individual o formando racimos. Poseen una pared exterior de una o varias capas, además de que pueden conservar resto del micelio que les da origen, formando una hifa de sostén.	[100], [101]
<i>Gigaspora</i>	Este género produce esporas individuales las cuales se desarrollan a partir de una hifa de sostén, la cual toma una forma globosa en el ápice. Este tipo de esporas comprenden tamaños superiores a los 200 μm de forma globosa o subglobosa y estructuralmente, poseen solo una pared estructural constituida generalmente de dos o tres extractos	[100], [102]
<i>Diversispora</i>	Son del tipo glomoiide, pueden desarrollarse de forma individual o formando pequeños grupos de esporas, son esporas lisas que poseen dos capas, la primera es una capa evanescente y una segunda capa conformada de láminas delgadas y comprimidas.	[100]
<i>Acaulospora</i>	Las esporas de este género se desarrollan en una hifa que sostiene un saco esporogeno, cuando madura la espota, el saco se rompe y queda como un remanente junto a la ella. Este tipo de esporas se pueden encontrar solitarias y son de forma globosa o subglobosa, su pared estructural se conforma de dos estratos; el externo, puede presentar láminas y algunas ornamentaciones, mientras que el interno, puede presentar varias capas membranosas con numerosas láminas y excrecencias irregulares.	[100], [103]
<i>Scutellospora</i>	Son esporas de forma globosa, cuyo diámetro oscila entre los 120 a 280 micras. Se desarrollan en las terminaciones de las hifas a partir de células esporógenas. Poseen una estructura de dos paredes, en la pared externa se pueden llegar a presentar generalmente tres capas, la más externa es rígida, la segunda es una capa laminada y la tercera es delgada y muy cercana a la segunda capa. La pared interna se conforma de aproximadamente tres capas las cuales son delgadas, transparentes y de apariencia membranosa.	[100], [101]
<i>Sclerocystis</i>	Las esporas de este género se desarrollan a partir de un agregado denso de hifas, formando esporocarpos donde las esporas crecen de forma numerosa y apilándose en capas y organizándose en una sola	[100], [103]

7.2.2. Determinación de pH y conductividad eléctrica después de cada muestreo.

Los valores de pH fueron significativamente mayores en los tratamientos NPs-Zn y NPs-Fe, en comparación con los valores en el tratamiento control a los 60 DDS, por otro lado, a los 120 DDS no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en comparación con el tratamiento control (Tabla 20). Sin embargo, se puede observar que todos los tratamientos aumentaron significativamente los valores de pH a lo largo del tiempo, *i.e.* los valores de pH a los 120 DDS

fueron mayores a los registrados a los 60 DDS. Lo anterior coincide con lo descrito en el apartado 7.1.9 de esta investigación.

En cuanto a la conductividad eléctrica del suelo, los tratamientos NPs-Ti y NPs-Ag presentaron valores significativamente mayores en comparación con el tratamiento control a los 60 DDS, por otro lado, a los 120 DDS todos los tratamientos presentaron valores de conductividad eléctrica significativamente menores en relación con el tratamiento control. Sin embargo, estos valores a lo largo del tiempo fueron significativamente menores a los obtenidos a los 60 DDS.

Tabla 20. Algunas Características químicas de suelo acondicionado con nanopartículas de TiO₂, ZnO, Fe₂O₃ o Ag a concentraciones de 20 mg m⁻² al finalizar el experimento en campo a los 60 y 120 DDS.

Característica	DDS ^ϕ	Tratamiento ^μ				
		NPs-Ti	NPs-Zn	NPs-Fe	NPs-Ag	Control
pH ± DE	60	7.43±0.064 B†c‡	7.70±0.030 Ba	7.65±0.035 Ba	7.59±0.051 Bab	7.5±0.017 Bbc
	120	8.51±0.104 Aa	8.37±0.106 Aa	8.42±0.078 Aa	8.34±0.149 Aa	8.56±0.044 Aa
CE ± DE (μS cm ⁻¹)	60	767.40±2.40 Aa	434.5±34.6 Ac	523.23±9.15 Ac	748.5±51.1 Aa	637.90±11.46 Ab
	120	237±18.1 Bc	329.17±17.01 Bab	347.2±37.1 Ba	282.57±0.81 Bbc	370.4±13.88 Ba

^ϕ Días después de la siembra.

^μ NPs-Ti= TiO₂-NP, NPs-Zn= ZnO-NP, NPs-Fe= Fe₂O₃-NP y NPs-Ag= Ag-NP.

[†] Valores medios con diferente letra minúscula en cada fila, indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey α= 0.05) n=3

[‡] Valores medios con diferente letra mayúscula en cada columna, por cada característica, indican diferencia estadística a través del tiempo (Tukey α= 0.05) n=3.

7.2.3. **Conteo de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) después de cada muestreo**

Con el aislamiento y conteo de esporas de HMA a los 60 y 120 DDS (Fig. 23 y Fig. 24) se determinó la abundancia promedio de esporas (APE) de HMA en el suelo (Tabla 21). Por un lado, se observó que en los tratamientos NPs-Ti, NPs-Zn y NPs-Ag, la APE fue significativamente menor en comparación con el tratamiento control a los 60 DDS; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento NPs-Fe y el tratamiento control a los 60 DDS. Por otro lado, a los 120 DDS, todos los tratamientos fueron significativamente mayores al tratamiento control, sin embargo, se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento NPs-Fe el tratamiento con mayor APE, seguido de los tratamientos NPs-Ag y NPs-Zn y finalmente el tratamiento NPs-Ti.

En esta investigación, la APE de todos los tratamientos fue superior a lo reportado en otras investigaciones. Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) [104], caracterizaron las comunidades de HMA asociadas a agaves mezcaleros en dos poblaciones del estado de Oaxaca, reportando valores promedio de 128.3 y 144 esporas por cada 100 g de suelo para cada región. De igual manera, la abundancia promedio reportada en la presente investigación se encuentra por encima de los valores obtenidos por Bertolini *et al.* (2020) [105], quienes determinaron la abundancia de HMA en cinco plantaciones de *Coffea arabica* L. al sur del estado de Chiapas, registrando valores desde 55 a 198 esporas por cada 100 g de suelo.

Sin embargo, un estudio realizado al norte de México por Sánchez-Sánchez *et al.* (2018) [106], quienes caracterizaron esporas de HMA de la rizósfera de *Capsicum annuum* var *aviculare* L., de cuatro localidades de Coahuila y Zacatecas, llegaron a registrar valores por encima de las 3000 esporas por cada 100 g de suelo, mostrando una APE superior a la reportada en esta investigación.

Por otro lado, se pudieron observar diferencias significativas en la APE a través del tiempo en cada tratamiento, en el caso del tratamiento control, hubo un decremento en la APE a los 120 DDS en comparación con el control a los 60 DDS; sin embargo, en los demás tratamientos a los 120 DDS, se observó un incremento significativo en la APE en comparación con los tratamientos a los 60 DDS.

Lo anterior, sugiere que la estructura de las comunidades de HMA pueden estar influenciadas por los factores abióticos (NPs, P disponible, pH, etc.) que interactúan con estos sistemas como lo sugieren las investigaciones realizadas por Reyes-Jaramillo *et al.* (2019) [104] y Bertolini *et al.* (2020) [105]. Sin embargo, en el caso del efecto del pH, Rodríguez-López *et al.* (2015) [107] sugiere que la APE no siempre va a estar influenciado por este parámetro, debido a que los HMA pueden presentar diferencias en sus respuestas y adaptación a diferentes condiciones edáficas. En este sentido Restrepo-Giraldo *et al.* (2019) [108] destaca que la respuesta de los HMA al pH del suelo puede variar, considerando que los HMA pueden tolerar condiciones adversas de pH.

Tabla 21. Número promedio de esporas de hongos micorrízicos arbusculares encontradas en 100 g de suelo a los 60 y 120 DDS en la rizósfera de trigo.

Tratamiento	Número promedio de esporas \pm D.E. [‡]	
	60 DDS [‡]	120 DDS
Control	949.33 \pm 120.81 ^{aA*}	453.7 \pm 42.60 ^{dB}
NPs-Ti	400.50 \pm 94.00.75 ^{bB}	610.67 \pm 5.77 ^{cA}
NPs-Zn	459.33 \pm 105.54 ^{bB}	747.3 \pm 46.70 ^{bA}
NPs-Fe	784.66 \pm 74.33 ^{aB}	1290 \pm 34.60 ^{aA}
NPs-Ag	427.50 \pm 68.60 ^{bB}	768 \pm 75.00 ^{bA}

[‡] Días después de la siembra.

[‡] Desviación estándar

* Letra minúscula en cada columna indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$) n=3.

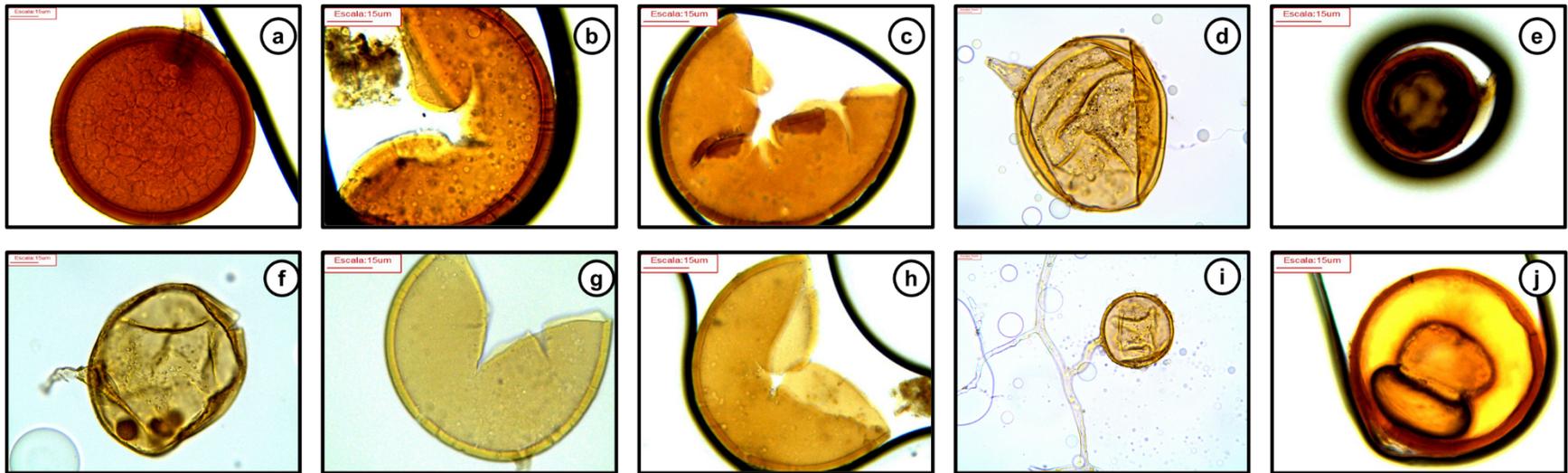


Fig. 23. Ejemplares de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas a los 60 DDS en los diferentes tratamientos. Control, a) *Diversispora* sp. y f) *Glomus* sp.; b) y g) tratamiento NPs-Ti, tratamiento NPs-Zn c) *Diversispora* sp. y h) *Glomus* sp.; tratamiento NPs-Fe, d) *Gigaspora* sp. y i) *Glomus* sp. y tratamiento NPs-Ag. e) y j) *Glomus* sp.

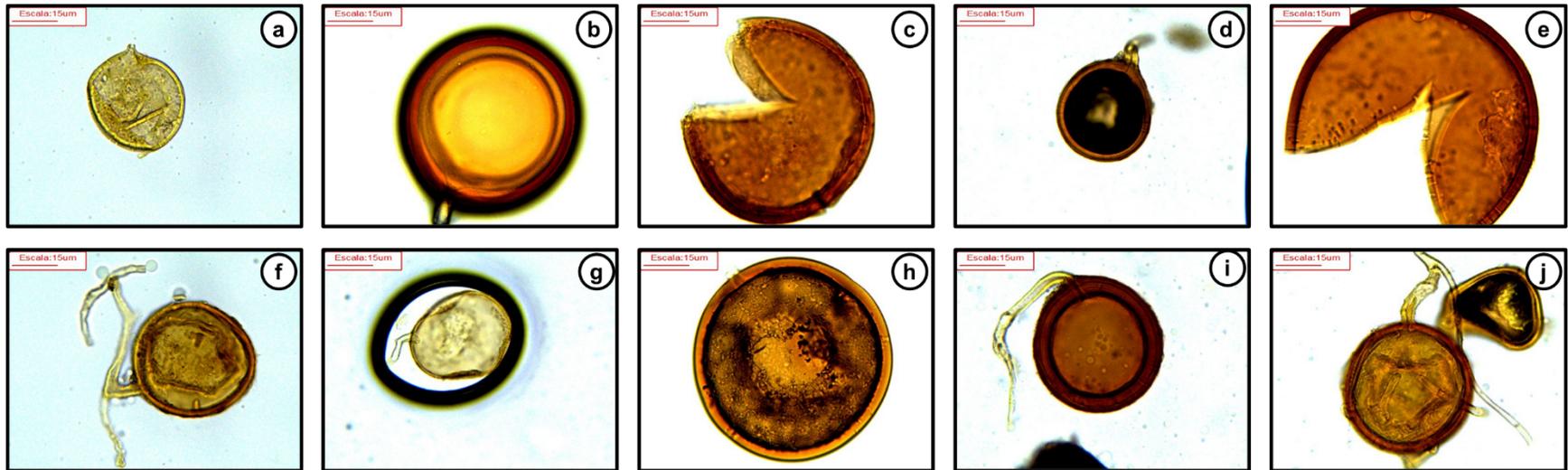


Fig. 24. Ejemplares de esporas de hongos micorrízicos arbusculares aisladas a los 120 DDS en los diferentes tratamientos; control a) *Glomus* sp. y f) *Glomus* sp.; tratamiento NPs-Ti b) *Glomus* sp. y g) *Glomus* sp., tratamiento NPs-Zn c) *Acaulospora* sp. y h) *Glomus* sp; tratamiento NPs-Fe d) *Glomus* sp. y i) y tratamiento NPs-Ag e) *Gigaspora* sp. y j) *Glomus* sp.

7.2.4. Colonización micorrízica arbuscular en raíces de trigo

La tinción de raíces permitió observar estructuras características durante la infección micorrízica arbuscular como arbuscúlos, vesículas y micelio en todos los tratamientos a los 60 y 120 DDS (Fig. 25 y Fig. 26, respectivamente). En cuanto al porcentaje de colonización calculado, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos a los 60 y 120 DDS en comparación con el tratamiento control (Tabla 22).

Tabla 22. Porcentajes de colonización de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de trigo expuestas a NPs a los 60 y 120 DDS.

Tratamiento	% de colonización \pm D.E. [‡]	
	60 DDS [‡]	120 DDS
Control	70.00 \pm 8.82 ^{aA*}	58.89 \pm 5.09 ^{aA}
NPs-Ti	63.34 \pm 4.72 ^{aA}	57.77 \pm 5.09 ^{aA}
NPs-Zn	65.55 \pm 3.85 ^{aA}	66.66 \pm 9.42 ^{aA}
NPs-Fe	70.00 \pm 4.72 ^{aA}	75.55 \pm 6.93 ^{aA}
NPs-Ag	56.66 \pm 4.72 ^{aA}	69.99 \pm 8.81 ^{aA}

[‡] Días después de la siembra.

[‡] Desviación estándar

* Letra minúscula en cada columna indican diferencia estadística entre tratamientos (Tukey $\alpha=0.05$) n=3.

* Letra mayúscula en cada fila indican diferencia estadística en el tiempo (Tukey $\alpha=0.05$) n=3.

Lo anterior sugiere que la presencia de NPs en el suelo no afecta el proceso de colonización por HMA en las raíces de plantas de trigo. Únicamente en estadios tempranos de la planta (60DDS) se observa una estimulación por parte de las NPs de Fe, lo que coincide con lo reportado por Feng *et al.* (2013) [109], quienes encontraron que a una concentración de 0.032 mg kg⁻¹ de NPs de Fe₂O₃ estimula el proceso de infección de las raíces por HMA aumentando significativamente el porcentaje de colonización por parte de HMA del género *Glomus* (*G. Caledoniun*) en raíces de *Trifolium repens* L., de 25.3 % a 35 % mientras que con NPs de Ag aumento de 25.3 % a 39.7 y 47.3 % a concentraciones de 0.1 y 1 mg kg⁻¹ de NPs de Ag respectivamente. De manera contraria, Cao *et al.* (2020) [110] encontraron que el porcentaje de colonización micorrízica en plantas de *Zea mays* L., disminuía significativamente en presencia de una concentración de 2.5 mg kg⁻¹ de NPs de Ag, asumiendo que las NPs deterioran la interacción entre HMA y las plantas, así mismo, Noori *et al.* (2017) [111] encontraron que la colonización micorrízica por parte del HMA del género

Rhizopagus (*R. intraradices*) en plantas de *Lycopersicon esculentum* P. Mill., redujo significativamente al estar expuestas a dosis de 12, 24 y 36 mg kg⁻¹ de NPS de Ag, obteniendo resultados dependientes de la dosis, es decir, había mayor reducción en la colonización micorrízica conforme la dosis de NPs de Ag aumentaba.

Priyanka *et al.* (2017) [112] encontraron que las NPs de TiO₂ y TiO₂ dopadas con cerio al 2 y 3 %, a concentraciones de 25, 50 y 100 mg kg⁻¹ disminuyen significativamente el porcentaje de colonización por HMA en raíces de *Oryza sativa* L., obteniendo porcentajes de 41.41 % para NPs de TiO₂, 50.57 y 41.22 % para NPs de TiO₂ dopadas al 2 y 3 % con cerio respectivamente en comparación del 59 % del control. Wang *et al.* (2016) observaron un decremento significativo en la colonización de HMA en concentraciones de 800, 1600 y 3200 mg kg⁻¹ de NPs de ZnO mientras que a la concentración de 400 mg kg⁻¹ de NPs de ZnO no se observaron diferencias significativas en comparación con el control. Por lo anterior, es posible que las interacciones entre HMA y NPs puedan variar entre especies de plantas, especies de HMA y tipo de nanopartícula en el suelo.

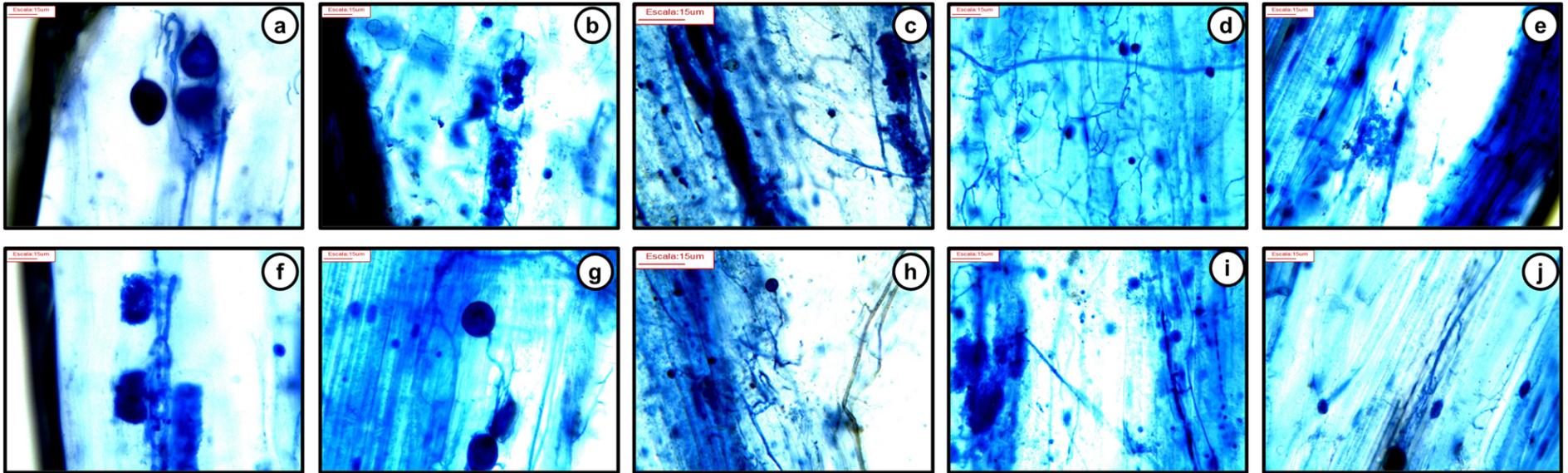


Fig. 25. Colonización de HMA en raíces de trigo. A los 60 DDS a) y f) control; b) y g) tratamiento NPs-Ti, c) y h) tratamiento NPs-Zn; d) y i) tratamiento NPs-Fe y e) y j) tratamiento NPs-Ag.

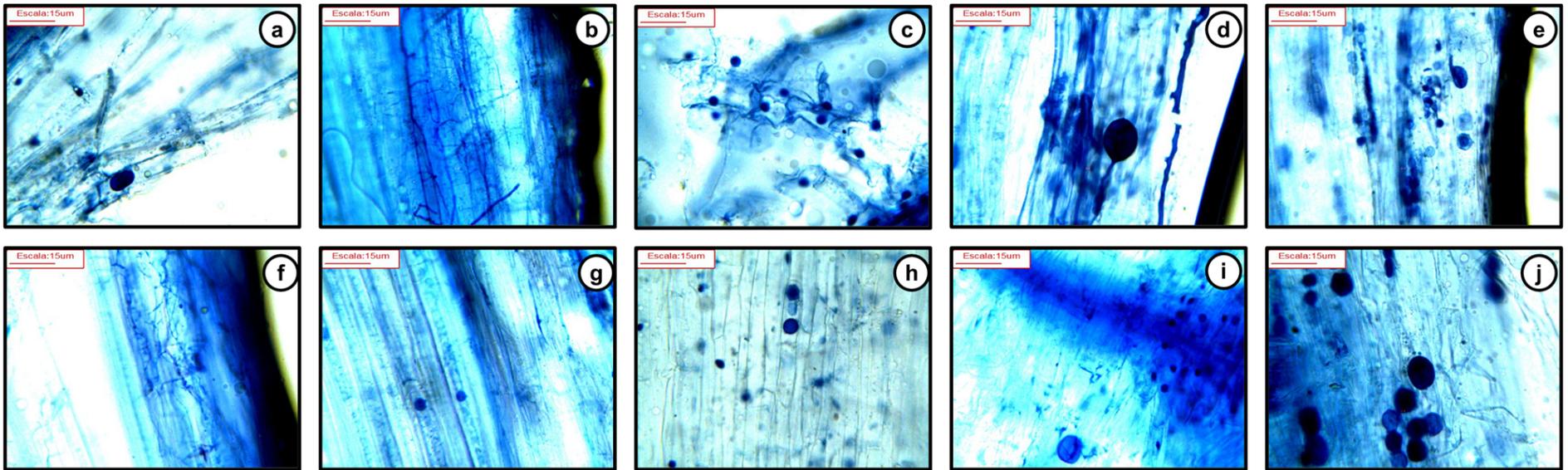


Fig. 26. Colonización de HMA en raíces de trigo a los 120 DDS; a) y f) control; b) y g) tratamiento NPs-Ti, c) y h) tratamiento NPs-Zn; d) y i) tratamiento NPs-Fe y e) y j) tratamiento NPs-Ag.

VIII. CONCLUSIÓN

La presencia de NPs (e.g. TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3) afecta negativamente el crecimiento de la planta de *P. vulgaris* L., en términos de la longitud de la raíz y la altura del tallo. Así mismo, se observó un efecto negativo de las NPs sobre la interacción simbiótica rizobia-leguminosa, debido a que las NPs retardaron la infección de las raíces, por lo que disminuyó el número de nódulos formados.

En contraparte, la absorción de macronutrientes como el P y K se favoreció en los tratamientos con la dosis de NPs de 150 mg kg^{-1} de TiO_2 o Fe_2O_3 , en los cuales se registraron mayores concentraciones de estos nutrientes en el tejido de las plantas, sin embargo, estas respuestas se dieron a diferentes tiempos de exposición por lo que se puede decir que los efectos observados son dependientes del tiempo de exposición, tipo de nanopartícula, concentración y el tipo de planta que se esté evaluando.

Por otro lado, mediante el análisis por FTIR-ATR se detectaron de manera temprana cambios químicos a lo largo del desarrollo de las plantas, por lo que esta técnica resulta adecuada para emplearse como una estrategia rápida y no destructiva que permita la detección temprana de cambios químicos en las plantas, y así poder determinar qué tipos de NPs son las que tienen mayor impacto, principalmente en las plantas de interés comercial.

La presencia de NPs incrementó el pH del suelo tanto en el invernadero como en campo, dichos cambios se atribuyen a la reactividad de las NPs en el suelo, dando lugar a la formación de compuestos hidroxilados que favorecen la liberación de iones hidroxilo.

Cuando las NPs (TiO_2 , ZnO y Ag) son aplicadas en condiciones de campo, afectan negativamente la densidad promedio de esporas de HMA a los 60 y 120 DDS. Por el contrario, en el caso de las NPs de Fe_2O_3 estimularon la esporulación de HMA en los estadíos tempranos de la planta (60 DDS). La infección de raíces por HMA, tuvo un alto porcentaje de colonización y no se observó que la presencia de NPs afectara dicha interacción. Para todos los casos, se logró observar la formación de estructuras micorrízicas intrarradicales similares, lo que sugiere que las NPs evaluadas no interfieren en la interacción simbiótica mutualista ente la micorríza arbuscular-trigo duro.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. E. Morales-Santos, C. B. Peña-Valdivia, A. García-Esteva, G. Aguilar-Benítez, J. Kohashi-Shibata, Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*. 51 (2017) 43-62.
- [2] CEDRSSA. Evolución de los precios del maíz, frijol y sorgo [En línea]. Disponible: <http://www.cedrssa.gob.mx/?doc=2643>. [Último acceso: 28 junio 2018].
- [3] A. Soltani, S. MafiMoghaddam, A. Oladzad-Abbasabadi, K. Walter, P. J. Kearns, J. Vásquez-Guzmán, S. Mamidi, R. Lee, A. L. Shade, J. L. Jacobs, M. I. Chilivers, D. B. Lowry, P. McClean, J. M. Osorno. Genetic analysis of flooding tolerance in an andean diversity panel of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 767.
- [4] C. R. Sarabia-Castillo. Efecto de nanopartículas de TiO₂, ZnO y Fe₂O₃ en la simbiosis rhizobia-leguminosa durante las primeras etapas fenológicas de soya, frijol y chícharo. (Tesis de maestría). Cinvestav-Saltillo, Coahuila, 2016.
- [5] I. E. Chavarin-Espinoza, R. Lépiz-Ildefonso, J. J. López-Alcocer, en: S. Carvajal, E. Pimienta-Barrios (Eds.), *Avances en la investigación científica en el CUCBA, Orgánica Diseño Editorial*, Guadalajara, 2008, pp. 25-30.
- [6] F. Fernández, P. Gepts y M. López, *Stages of development of the common bean plant*, Cali: CIAT, 1986.
- [7] IICA. Guía técnica para el cultivo de frijol en los municipios de Santa Lucia, Teustepe y San Lorenzo del departamento de Boaco, Nicaragua [En línea]. Disponible: <http://repiica.iica.int/DOCS/B2170E/B2170E.PDF>. [Último acceso: 29 junio 2018].
- [8] C. Ribeiro, G. Alloing, K. Mandon, P. Frenedo. Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850 (2015) 1469-1478.
- [9] B. Gourion, F. Berraba, P. Ratet, G. Stacey. Rhizobium-legume symbiosis: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20 (2014) 186-194.
- [10] M. Neveed, I. Mehboob, M. Baquir Hussain, Z. Ahmad Zahir, en: N. Kumar-Arora (Ed.), *Plant microbes symbiosis: applies facets*, Springer, New Dehi, 2014, pp. 209-239.

- [11] D. Biate, A. Kumari, K. Annapurna, L. Vithal Kumar, D. Ramados, K. Reddy, S. Naik, en: N. Kumar-Arora (Ed.), *Plant microbes symbiosis: applies facets*, Springer, New Delhi, 2014, pp. 259-271.
- [12] S. Calvo-García. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *CT. 3* (2011) 173-186.
- [13] M. Zaïm, K. El Hassouni, F. Gamba, A. Filali-Maltouf, B. Belkadi, A. Sourour, A. Amri, M. Nachit, M. Taghouti, F. M. Bassi. Wide crosses of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) reveal good disease resistance, yield stability, and industrial quality across Mediterranean sites. *Field Crop. Res.* 214 (2017) 219-227.
- [14] N. Hernández-Espinosa, B. Laddomada, T. Payne, J. Huerta-Espino, V. Govindan, K. Ammar, M. I. Ibba, A. Paqualone, C. Guzmán. Nutritional quality characterization of a set of durum wheat landraces from Iran and Mexico. *LWT-Food Sci. Technol.* 124 (2020) 109198.
- [15] A. Tidiane Sall, T. Chiari, W. Legesse, K. Seid-Ahmed, R. Ortiz, M. van Ginkel, F. M. Bassi. Durum wheat (*Triticum durum* Desf.): origin, cultivation, and potential expansion in Sub-Saharan Africa. *Agronomy.* 9 (2019) 263.
- [16] B. Dreyer, M. Honrubia, A. Morte, en: A. Morte y A. Varma (Eds.), *Root engineering. Soil Biology*, Springer, Berlin, 2014, pp. 145-169.
- [17] R. D. Finlay. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 1115-1126.
- [18] M. C. Brundrett, L. Tedersoo. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol.* 220 (2018) 1108-1115.
- [19] C. Urcelay, P. A. Tecco, F. Chiarini. Micorrizas arbusculares del tipo 'Arum' y 'Paris' y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 40 (2005) 151-155.
- [20] AZoNano. What is nanotechnology and what can it do? [En línea]. Disponible: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1134>. [Último acceso: 22 junio 2018].

- [21] E. Serrano, G. Rus, J. García-Martínez. Nanotechnology for sustainable energy. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13 (2009) 2373-2384.
- [22] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella- Jr., D. Rejeskik, M. S. Hull. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6 (2015) 1769-1780.
- [23] F. Palacio-Parada, Nanomateriales. [En línea]. Disponible: http://www.phantomsnet.net/Resources/files/Nanomateriales_alta.pdf. [Último acceso: 21 junio 2018].
- [24] C. E. Gutiérrez-Wing. Las nanopartículas: Pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear.* 39 (2005) 24-29.
- [25] S. Chavalmane-Subbenail, en: C. Kole, D. Kumar y M. Khodakovskaya (Eds.), *Plant nanotechnology*, Springer, Switzerland, 2016, pp. 15-28.
- [26] C. Buzea, I. Pacheco, en: M. Ghorbanpour, M. Khanuja y A. Varma (Eds.), *Nanoscience and plant-soil systems*, Springer, Switzerland, 2017, pp. 71-112.
- [27] P. Kumar, S. Mondal, en: C. Kole, D. Kumar y M. Khodakovskaya (Eds.), *Plant nanotechnology*, Springer, Switzerland, 2016, pp. 263-303.
- [28] M. Lahiani, M. Khodakovskaya, en: C. Kole, D. Kumar y M. Khodakovskaya (Eds.), *Plant nanotechnology*, Springer, Switzerland, 2016, pp. 349-365.
- [29] R. Purohit, A. Mittal, S. Dalela, V. Warudkar, K. Purohit, S. Purohit. Social, environmental, and ethical impacts of nanotechnology. *Mater. Today.* 4 (2017) 5461-5467.
- [30] S. Arora, J. Rajwade, K. Paknikar. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258 (2012) 151-165.
- [31] C. Rico, J. Hong, M. Morales, L. Zhao, A. Barrios, J. Zhang, J. Peralta-Videa, J. Gardea-Torresdey. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: A study involving the antioxidant defense system an in vivo fluorescence imaging. *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 5635-5642.

- [32] C. Fajardo, M. Sacca, G. Costa, M. Nande, M. Martin. Impact of Ag and Al₂O₃ nanoparticles on soil organisms: In vitro and soil experiments. *Sci. Total Environ.* 473-474 (2014) 254-261.
- [33] J. Ji, Z. Long, D. Lin. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 525-530.
- [34] D. Li, B. Li, Q. Wang, N. Hou, C. Li, X. Cheng. Toxicity of TiO₂ nanoparticle to denitrifying strain CFY1 and the impact on microbial community structures in activated sludge. *Chemosphere.* 144 (2016) 1334-1341.
- [35] I. Sadiq, B. Chowdhury, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. *Nanomed.-Nanotechnol.* 5 (2009) 282-286.
- [36] X. Zhu, J. Zhou, Z. Cai. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Mar. Pollut. Bull.* 63 (2011) 334-338.
- [37] J. Choi, S. Kim, J. Ahn, P. Youn, J. Kang, K. Park, J. Yi, D. Ryu. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 100 (2018) 151-159.
- [38] Y. Chae, C. Pham, J. Lee, E. Bae, J. Yi, M. Gu. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 94 (2009) 320-327.
- [39] A. Movafeghi, A. Khataee, M. Abedi, R. Tarrahi, M. Dadpour, F. Vafaei. Effects of TiO₂ nanoparticles on the aquatic plant *Spirodela ptyrrhiza*: evaluation of growth parameters, pigment contents and antioxidant enzyme activities. *J. Environ. Sci.* 64 (2018) 130-138.
- [40] B. Jasim, R. Thomas, J. Mathew, E. Radhakrishnan. Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 443-447.
- [41] P. Gopalakrishnan-Nair, S. Kim, I. Chung. Copper oxide nanoparticle toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: physiological and molecular level responses of in vitro grown plants. *Acta Physiol. Plant.* 36 (2014) 2947-2958.

- [42] C. R. Sarabia-Castillo, F. Fernandez-Luqueño. Efecto de nanopartículas sobre la simbiosis Rhizobia-leguminosa y morfología de *Phaseolus vulgaris* L. Rev. Mex. Agroecosistemas. 3 (2016) 122-132.
- [43] G. Zarate-Cruz, H. Zavaleta-Mancera, A. Alarcón, L. Jiménez-García. Fitotoxicidad de nanopartículas de ZnO en el helecho acuático *Azolla filiculoides* Lam. Agrobiencia. 50 (2016) 6.
- [44] N. Zuverza-Mena, D. Martínez-Fernández, W. Du, J. Hernández-Viezcas, N. Bonilla-Bird, M. López-Moreno, M. Komarek, J. Peralta-Videa, J. Gardea-Torresdey. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. Plant Physiol. Biochem. 110 (2017) 236-264.
- [45] L. Balážová, P. Babula, M. Baláž, M. Bačkorová, Z. Bujňáková, J. Briančin, A. Kurmanbayeva, M. Sagi. Zinc oxide nanoparticles phytotoxicity on halophyte from genus *Salicornia*. Plant Physiol. Biochem. 130 (2018) 30-42.
- [46] T. Frazier, C. Burklew, B. Zhang, Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Funct. Integr. Genomics. 14 (2014) 75-83.
- [47] I. Boykov, E. Shuford, B. Zhang. Nanoparticle titanium dioxide affects the growth and microRNA expression of switchgrass (*Panicum virgatum*). Genomics. 111 (2019) 450-456.
- [48] W. Tan, W. Du, A. Barrios, R. Armendariz Jr., N. Zuverza-Mena, Z. Ji, C. Chang, J. Zink, J. Hernández-Viezcas, J. Peralta-Videa, J. Gardea-Torresdey. Surface coating changes the physiological and biochemical impacts of nano-TiO₂ in basil (*Ocimum basilicum*) plants. Environ. Pollut. 222 (2017) 64-72.
- [49] C. García-Gómez, A. Obrador, D. González, M. Babin, M. Fernández. Comparative study of the phytotoxicity of ZnO nanoparticles and Zn accumulation in nine crops grown un calcareus soil and an acidic soil. Sci. Total Environ. 644 (2018) 770-780.
- [50] C. García-Gómez, A. Obrador, D. González, M. Babin, M. Fernández. Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse condition. Sci. Total Environ. 589 (2017) 11-24.

- [51] M. Pittol, D. Tomacheski, D. Naue-Simões, V. Ferreira-Ribeiro, R. Campomanes-Santana, Macroscopic effects of silver nanoparticles and titanium dioxide on edible plant growth. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manage.* 8 (2017) 127-133.
- [52] J. Li, J. Hu, C. Ma, Y. Wang, C. Wu, J. Huang, B. Xing. Uptake, translocation, and physiological effects of magnetic iron oxide (γ -Fe₂O₃) nanoparticles in corn (*Zea mays* L.). *Chemosphere.* 159 (2016) 326-334.
- [53] B. Wu, L. Zhu, X. Chris-Le. Metabolomics analysis of TiO₂ nanoparticles induced toxicological effects on rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Pollut.* 230 (2017) 302-310.
- [54] Z. Hossain, G. Mustafa, K. Sakata, S. Komatsu. Insights into the proteomic response of soybean towards Al₂O₃, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *J. Hazard. Mater.* 304 (2016) 291-305.
- [55] M. Faisal, Q. Saquib, A. Alatar, A. Al-Khedhairi, A. Hegazy, J. Musarrat. Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: A study on mechanism of cell death. *J. Hazard. Mater.* 250-251 (2016) 318-332.
- [56] X. Wang, P. Wu, C. Zhou, L. Li, Y. Bin-Zhao, Y. Chen. Effect of ZnO nanoparticles on *Medicago sativa* at the germination stage. *Appl. Mech. Mater.* 665 (2014) 583-586.
- [57] A. Shaw, S. Ghosh, H. Kalaji, K. Bosa, M. Brestic, M. Zivcak, Z. Hossain. Nano-CuO stress induced modulation of antioxidative defence and photosynthetic performance of Syrian barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environ. Exp. Bot.* 102 (2014) 37-47.
- [58] R. Abdelhameed, N. Abu-Elsaad, A. Latef, R. Metwally. Tracking of zinc ferrite nanoparticle effects on pea (*Pisum sativum* L.) plant growth, pigments, mineral content, and arbuscular mycorrhizal colonization. *Plants-Basel.* 10 (2021) 3.
- [59] H. Tian, M. Kahl, K. Kariman. Are nanoparticles a threat to mycorrhizal and rhizobial symbioses? A critical review. *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1660.
- [60] K. Priyanka, V. Harikumar, K. Balakrishna, T. Varghese. Inhibitory effect of TiO₂ NPs on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots. *IET Nanobiotechnol.* 11 (2017) 66-70.
- [61] M. Mohaddam, A. Sabzevar Z. Mortazaei. Impact of ZnO and silver nanoparticles on legume-*sinorhizobium* symbiosis. *Adv. Stud. Biol.* 9 (2017) 83-90.

- [62] J. Cao, Y. Feng, X. Lin, J. Wang, X. Xie. Iron oxide magnetic nanoparticles deteriorate the mutual interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and plant. *J. Soils Sediments*. 17 (2017) 841-851.
- [63] A. De Sousa-Torres, E. Govea-Alcaide, E. Gómez-Padilla, S. Masunaga, F. Effenberger, L. Rossi, R. López-Sánchez, R. Jardim. Fe₃O₄ nanoparticles and *Rhizobium* inoculation enhance nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean plants grown in soil. *Rhizosphere*. 17 (2021) 100275.
- [64] Z. Yuan, Z. Zhang, X. Wang, L. Li, K. Cai, Y. Han. Novel impacts of functionalized multi-walled carbon nanotubes in plants: promotion of nodulation and nitrogenase activity in the *rhizobium*-legume system. *Nanoscale*. 9 (2017) 9921-9937.
- [65] D. J. Muñoz-Iniestra, A. Mendoza-Cantú, F. López-Galindo, A. Soler-Aburto, M. M. Hernández-Moreno. *Edafología: Manual de métodos de análisis de suelo, Estado de México: UNAM, FES Iztacala, 2000.*
- [66] G. W. Gee, D. Or, en: D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke y R. Loeppert (Eds.), *Methods of soil analysis part 4-chemical methods, SSSA, Madison, 1996, pp. 255-293.*
- [67] D.W. Nelson, L.E. Sommers, en: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke y R. Loeppert (Eds.), *Methods of soil analysis part 5-chemical methods, SSSA, Madison, 1996, pp. 961-1010.*
- [68] G.W. Thomas, en: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke y R. Loeppert (Eds.), *Methods of soil analysis part 3-chemical methods, SSSA, Madison, 1996, pp. 475-490.*
- [69] J.D. Rhoades, en: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke y R. Loeppert (Eds.), *Methods of soil analysis part 5-chemical methods, SSSA, Madison, 1996, pp. 417-435.*
- [70] T. C. G. Kibbey, K. A. Strevett. The effect of nanoparticles on soil and rhizosphere bacteria and plant growth in lettuce seedlings. *Chemosphere*. 221 (2019) 703-707
- [71] A. Pequerul, C. Pérez, P. Madero, J. Val, E. Monge, en: M. A. C. Fragoso, M. L. Van Beusichem y A. Houwers (Eds.), *Developments in plant and soil sciences vol. 53, Springer, Dordrecht, 1993, pp 3-6.*

- [72] M. Sánchez-de Prager, R. Posada-Almanza, D. Velásquez-Pomar, M. Narváez-Castillo. Metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular, Palmira: Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, 2010.
- [73] J. Phillips, D. Hayman. Improved procedures for clearing roots and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of the infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55 (1970) 158-161.
- [74] G. Medina-Pérez, F. Fernández-Luqueño, L. I. Trejo-Téllez, F. López-Valdez, L. Pampillón-González. Growth and development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) var. pinto Saltillo exposed to iron, titanium, and zinc oxide nanoparticles in an agricultural soil. *Appl. Ecol. Env. Res.* 16 (2018) 1883-1897.
- [75] A. Boutchuen, D. Zimmerman, N. Aich, A. M. Masud, A. Arabshahi, S. Palchoudhury, Increases plant growth with hematite nanoparticle fertilizer drop and determining nanoparticle uptake in plant using multimodal approach. *J. Nanomater.* 2019 (2019) 11.
- [76] R. W. Lewis, P. M. Bertsch, D. H. McNear. Nanotoxicity of engineered nanomaterials (ENMs) to environmentally relevant beneficial soil bacteria-a critical review. *Nanotoxicology.* 13 (2019) 392-428.
- [77] M. H. Abd-Alla, N. A. Nafady, D. M. Khalaf. Assessment of silver nanoparticles contamination on *faba bean-Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae-Glomus aggregatum* symbiosis: Implications for induction of autophagy process in root nodule. *Agr. Ecosyst. Environ.* 218 (2016) 163-177.
- [78] J. Moll, A. Gogos, T. D. Bucheli, F. Widmer, M. G. A. van der Heijden. Effect of nanoparticles on red clover and its symbiotic microorganisms. *J. Nanobiothechnol.* 14 (2016) 36.
- [79] S. Suresh, S. Karthikeyan, K. Jayamoorthy. FTIR and multivariate analysis to study the effect of bulk and nano copper oxide on peanut plant leaves. *J. Sci.-Adv. Mater. Dev.* 1(2016) 343-350.
- [80] F. J. Warren, B. B. Perston, S. P. Galindez-Najera, C. H. Edwards, P. O. Powel, G. Mandalari, G. M. Campbell, P. J. Butterworth, P. R. Ellis. Infrared microspectroscopic imaging of plant tissues: spectral visualization of *Triticum aestivum* kernel and *Arabidopsis* leaf microstructure. *Plant J.* 84 (2015) 634-646.

- [81] G. Barraza-Garza, L. A. de la Rosa, A. Martínez-Martínez, H. Castillo-Michel, M. Cotte, E. Álvarez-Parrilla. La microespectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Rev. Latinoamer. Quím.* 41 (2013) 124-148.
- [82] L. Peña, V. Rentería, C. Velásquez, M. L. Ojeda, E. Barrera. Absorbancia y reflectancia de hojas de *Ficus* contaminadas con nanopartículas de plata. *Rev. Mex. Fis.* 65 (2019) 95-105.
- [83] J. Kerr, D. Baldwin, M. Tobin, L. Puskar, P. Kappen, G. Rees, E. Silvester. High spatial resolution infrared micro-spectroscopy reveals the mechanism of leaf lignin decomposition by aquatic fungi. *Plos One.* 8 (2013) e60857.
- [84] B. Ribeiro-da Luz. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. *New Phytol.* 172 (2006) 305-318.
- [85] G. Nikalje, J. Kumar, T. Nikam, P. Suprasanna. FT-IR profiling reveals differential response of roots and leaves to salt stress in a halophyte *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Biotechnol. Rep.* 23 (2019) e00352.
- [86] V. Rajput, T. Minkina, A. Fedorenko, S. Sushkova, S. Mandzhivea, V. Lysenko, N. Duplii, G. Fedorenko, K. Dvadnenko, K. Ghazaryan. Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (*Hordeum sativum distichum*). *Sci. Total Environ.* 645 (2018) 1103-1113.
- [87] S. Loza-Cornejo, X. Aparicio-Fernández, R. Patakfalvi, G. Rosas-Saito. Anatomic and phytochemical characters of the stem and root of *Mammillaria unicata* (*Cactaceae*). *Acta Bot. Mex.* 120 (2017) 21-38.
- [88] H. Daghan. Effects of TiO₂ nanoparticles on maize (*Zea mays* L.) growth, chlorophyll content and nutrient uptake. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 16 (2018) 6873-6883.
- [89] F. Poscic, A. Mattiello, G. Fellet, F. Miceli, L. Marchiol. Effects of cerium and titanium oxide nanoparticles in soil on the nutrient composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) kernels. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13 (2016) 577.
- [90] G. Kelemen, A. Keresztes, E. Bacsy, M. Feher, P. Fodor, I. Pais. Distribution and intracellular localization of titanium in plants after titanium treatment. *Food Struct.* 12 (1993) 8.

- [91] Y. Deng, E. Petersen, K. Challis, S. Rabb, R. Holbrook, J. Ranville, B. Nelson, B. Xing. Multiple method analysis of TiO₂ nanoparticle uptake in rice (*Oriza sativa* L.) plants. *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 10615-10623.
- [92] S. Lyu, X. Wei, J. Chen, C. Wang, X. Wang, D. Pan. Titanium as a beneficial element for crop production. *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 597.
- [93] D. Zhang, T. Hua, F. Xiao, C. Chen, R. Gersberg, Y. Liu, D. Stuckey, W. Ng, S. Tan. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere.* 120 (2015) 211-219.
- [94] D. Lin, B. Xing. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5580-5585.
- [95] N. Al-Amri, H. Tombuloglu, Y. Slimani, S. Akhtar, M. Barghouthi, M. Almessiere, T. Alshammari, A. Baykal, H. Sabit, I. Ercan, S. Ozcelik. Size effect of iron (III) oxide nanomaterials on the growth, and their uptake and translocation in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotox. Environ. Safe.* 194 (2020) 110377.
- [96] N. Pariona, A. Martínez, H. Hernández-Flores, R. Clark-Tapia. Effect of magnetite nanoparticles on the germination and early growth of *Quercus macdougallii*. *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 869-875.
- [97] C. O. Dimkpa. Soil properties influence the response of terrestrial plants to metallic nanoparticles exposure. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* 6 (2018) 1-8.
- [98] J. Valle-García, C. Sarabia-Castillo, H. Pérez-Hernández, A. Torres-Gómez, A. Pérez-Moreno, F. Fernández-Luqueño, en: A. Amrane, D. Mohan, T. Nguyen, A. Assadi y G. Yasin (Eds.), *Nanomaterials for Soil Remediation*, Elsevier, 2021, pp. 151-182.
- [99] W. Zhang, J. Long, J. Li, M. Zhang, X. Ye, W. Chang, H. Zeng. Effect of metal oxide nanoparticles on the chemical speciation of heavy metals and micronutrient bioavailability in Paddy soil. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 17 (2020) 2482.
- [100] T. Souza. *Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi*, Cham: Springer, 2015.

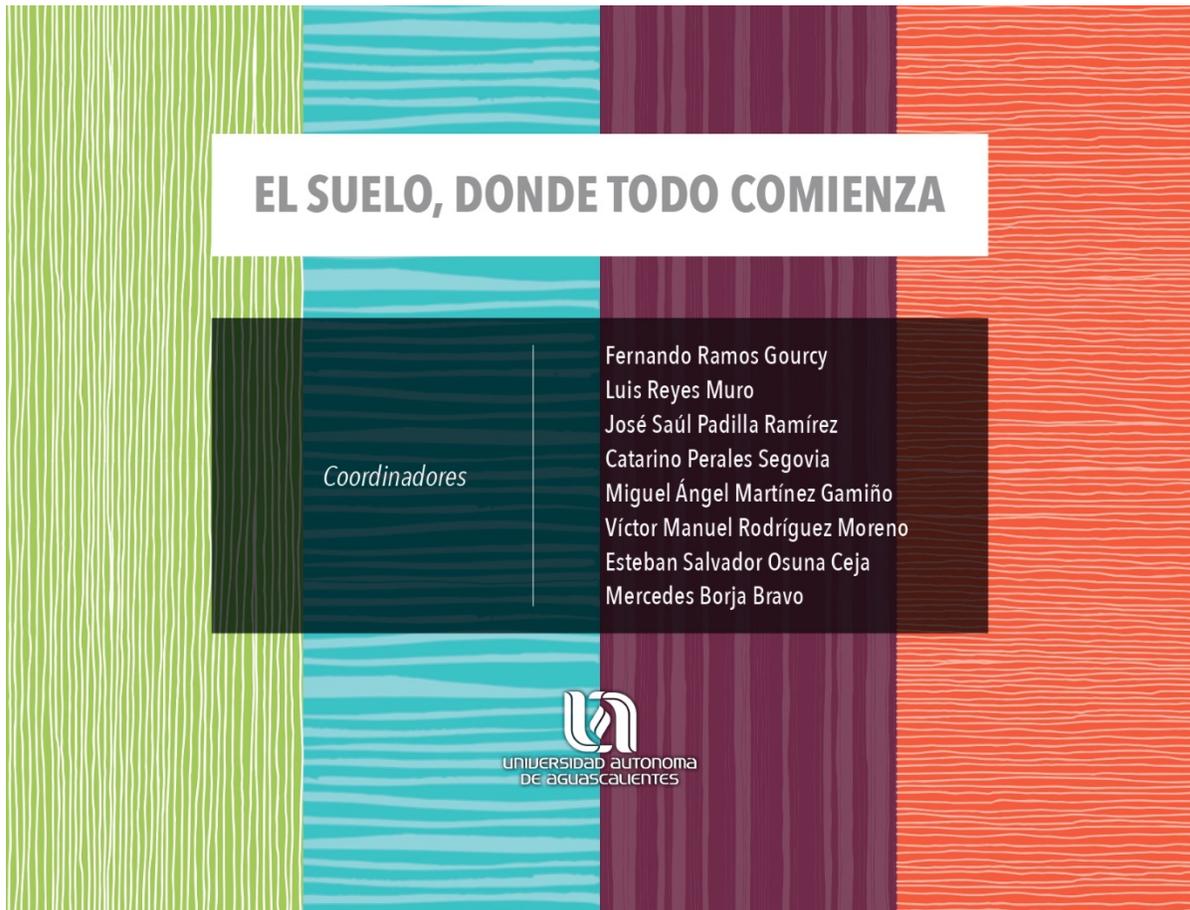
- [101] J. Rodríguez-Morales. Determinación de diversidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en rizósfera de orégano silvestre (*Lippia graveolens* H. B. K.) del ejido del Barreal de Guadalupe, Torreón, Coahuila. (Tesis de licenciatura), UAAAN, Torreón, 2012.
- [102] L. Ramón-Vicente. Comparación de la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rizósfera de nogal pecanero (*Carya illinoensis* (Wangenh)K. Koch), atacado con el hongo con pudrición texana (*Phymatotrichium omnivorum*) y arboles sanos. (Tesis de licenciatura), UAAAN, Torreón, 2015.
- [103] G. López-Zepeda. Hongos micorrízicos vesículo arbusculares (VA) en fragmentos de matorral sensu lato de los municipios de Linares y Hualahuises Nuevo León. (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, 1998.
- [104] I. Reyes-Jaramillo, E. Chimal-Sánchez, J. Salmerón-Castro, N. Vázquez-Pérez, L. Varela-Fregoso. Comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares (Glomeromycota) asociada con agaves mezcaleros de Oaxaca y su relación con algunas propiedades edáficas. Rev. Mex. Biodivers. 90 (2019) e902777.
- [105] V. Bertolini, N. Montaña, B. Salazar-Ortuño, E. Chimal-Sánchez, L. Varela. Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en plantaciones de café (*Coffea arabica*) del volcán Tacaná, Chiapas, México. Acta Bot. Mex. 127 (2020) e1602.
- [106] A. Sánchez-Sánchez, S. Salcedo-Martínez, R. Mendoza-Villarreal, J. Pinero-Espinoza, S. Moreno-Limón. Aislamiento e identificación de micorrizas arbusculares (MA) asociadas a la rizósfera del chile piquín (*Capsicum annuum* var. *aviculare* L.). Investigación y Desarrollo en Ciencias y Tecnología de Alimentos. 3, (2018) 86-91.
- [107] C. Rodríguez-López, A. Navarro-de León, J. Arboleda-Valencia, A. Valencia-Jimenez, R. Valle-Molinares. Hongos micorrizógenos arbusculares asociados a plantas de *Zea mays* L. en un agroecosistema del Atlántico, Colombia. Rev. Agron. 23 (2015) 20-34.
- [108] K. Restrepo-Giraldo, M. Montoya-Correa, P. Henao-Jaramillo, L. Gutiérrez, L. Molina-Guzmán. Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia, Colombia. IDESIA. 37 (2019) 35-44.

- [109] Y. Feng, X. Cui, S. He, G. Dong, M. Chen, J. Wang, X. Lin. Addition to the role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 9496-9504.
- [110] J. Cao, Y. Feng, X. Lin, J. Wang. A beneficial role of arbuscular mycorrhizal fungi in influencing the effects of silver nanoparticles on plant-microbe systems in a soil matrix. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 11782-11796.
- [111] A. Noori, J. White, L. Newman. Mycorrhizal fungi influence on silver uptake and membrane protein gene expression following silver nanoparticle exposure. *J. Nanopart. Res.* 19, (2017) 66.
- [112] K. Priyanka, V. Harikumar, K. Balakrishna, T. Varghese. Inhibitory effect of TiO₂ NPs on symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots. *IET Nanobiotechnol.* 11 (2017) 66-70.
- [113] M. P. Barbosa Filho, T. Cobucci, N. Kumar Fageria, P. Neves Mendez. Timing of nitrogen application on irrigated common bean measured by portable sensor. *Cienc Agrotec.* 33 (2009) 425-431.
- [114] D. Redecker, A. Schüßler, en: A. D. McLaughlin y J. Spatafora (Eds.), *Systematics and Evolution. The mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)* vol. 7, Springer, Berlin, 2014, pp. 251-269.

ANEXOS

Productos académicos

Participaciones en congreso (resumen en extenso como autor principal y como co-autor)



I
Diagnóstico, metodología
y evaluación del recurso suelo

II
Relación suelo-clima-biota

III
Aprovechamiento
del recurso suelo

IV
Educación
y asistencia técnica

ÍNDICE GENERAL

RESPUESTA DEL FRIJOL CULTIVADO EN UN SUELO ACONDICIONADO CON NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 , ZnO O Fe_2O_3

César Roberto Sarabia-Castillo¹
Andrea Yakelin Pérez-Moreno¹
Fabián Fernández-Luqueño¹

RESUMEN

En la actualidad, el uso de nanomateriales (NMs) para la elaboración de productos de uso común ha ido en ascenso, por lo que cientos de productos que contienen NMs están disponibles en el mercado. Por lo anterior, se ha planteado la preocupación acerca de los posibles impactos de estos NMs en el ambiente, una vez que estos productos son desechados o terminan su vida útil. Dicha preocupación, recae principalmente sobre la interacción de los NMs con plantas de alto valor económico, nutricional y ambiental, como el frijol común. En el presente estudio, se evaluó la respuesta morfológica del frijol cultivado en presencia de nanopartículas de TiO_2 , ZnO o Fe_2O_3 a concentración de 150 y 300 mg kg^{-1} de suelo seco, utilizando un arreglo completamente al azar. Se realizaron muestreos a los 30 y 60 días después de la siembra, en los cuales se midieron la longitud de raíz, altura de tallo, número de nódulos y peso seco de raíz y parte aérea. Las NPs de TiO_2 disminuyeron significativamente la longitud de raíz y altura de tallo. Por otro lado, la formación de nódulos se favoreció en el tratamiento con NPs de Fe_2O_3 , como se evidenció por la mayor cantidad de nódulos. La presencia de NPs indujo alteraciones morfológicas en la planta de frijol pero, sus efectos son dependientes de la concentración.

Palabras clave: contaminación, nanotoxicología, simbiosis

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Saltillo. Programa de Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. cesar.sarabia@cinvestav.edu.mx

I
Diagnóstico, metodología
y evaluación del recurso suelo

II
Relación suelo-clima-biota

III
Aprovechamiento
del recurso suelo

IV
Educación
y asistencia técnica

ÍNDICE GENERAL

PRIMERA EVIDENCIA DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Fe_2O_3 SOBRE MACROINVERTEBRADOS EN UN SUELO FORESTAL

Hermes Pérez Hernández¹
Fabián Fernández Luqueño²
Cesar Roberto Sarabia Castillo²
Andrea Yakelin Pérez Moreno²

RESUMEN

La nanotecnología y sus aplicaciones son demandadas en todo el mundo, por lo que las nanopartículas (NPs) utilizadas son liberadas al aire, agua y suelo. Los macroinvertebrados del suelo son considerados como buenos indicadores de las alteraciones provocadas por los humanos en los ecosistemas y se han evaluado los efectos de las NPs sobre lombrices epigeas e isópodos terrestres. Sin embargo, la mayoría de los experimentos son conducidos en laboratorio. Por lo tanto, por primera vez, con el presente experimento se evaluó el efecto de las NPs manufacturadas de óxidos de hierro (Fe_2O_3) a través del tiempo, sobre la presencia de Fe en los macroinvertebrados y en el suelo bajo condiciones de naturales. Los resultados revelaron que las lombrices endogeicas evitan el consumo de NPs de Fe_2O_3 a concentraciones de 1000 mg kg^{-1} de suelo seco, con evitación constante a través del tiempo. Además, se determinó que las lombrices no pueden detectar las NPs a bajas concentraciones (1 o 10 mg kg^{-1}), por lo que no limitan el consumo del suelo, lo cual se traduce en elevadas cantidades de Fe en sus cuerpos. Por otro lado, a concentraciones de 1000 mg kg^{-1} de suelo seco, el suelo mantiene elevadas cantidades de Fe a través del tiempo. Las lombrices

- 1 El Colegio de la Frontera Sur, Agroecología, Unidad Campeche, Av Polígono s/n, Ciudad Industrial, Lerma, Campeche, México. Correo electrónico: hermes.perez@estudianteposgrado.ecosur.mx, hermes.perez@cinvestav.mx.
- 2 Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Saltillo.

I
Diagnóstico, metodología
y evaluación del recurso suelo

II
Relación suelo-clima-biota

III
Aprovechamiento
del recurso suelo

IV
Educación
y asistencia técnica

ÍNDICE GENERAL

EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE LA INFECCIÓN MICORRÍZICA EN PLANTAS DE *Zea mays* L.

Andrea Yakelin Pérez-Moreno¹
Fabián Fernández-Luqueño¹
César Roberto Sarabia-Castillo¹
Gabriela Medina-Pérez¹
Hermes Pérez-Hernández²
Langen Corlay-Chee³

RESUMEN

La nanotecnología se ha empleado recientemente en procesos de remediación ambiental, por lo que debe cumplir con un diseño seguro y sustentable que permita eliminar los riesgos ambientales. Las nanopartículas de ZnO (ZnO-NP), tienen características prometedoras de óxido-reducción; sin embargo, su uso podría implicar un impacto ambiental negativo. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de las ZnO-NP sobre la infección micorrízica arbuscular en plantas de maíz (*Zea mays* L.) con o sin el hongo micorrízico arbuscular (HMA), en presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). En condiciones de invernadero se establecieron doce tratamientos, con un diseño factorial. Las plantas se cultivaron en un suelo grícico tratado con ZnO-NP a 0, 150 o 300 mg kg⁻¹ de suelo seco. Se determinó la altura de planta y longitud de raíz, el porcentaje de infección micorrízica, los porcentajes de indicadores de interacción (arbuscúlos y esporas) y el contenido de fenoles. Los PAHs disminuyeron significativamente la altura de planta, mientras que las ZnO-NP incrementaron significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de infección micorrízica, respecto al control; los porcentajes de indicadores de interacción incrementaron significativa-

- 1 Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, (CINVESTAV) Unidad Saltillo. andrea.perez@cinvestav.edu.mx.
- 2 El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Campeche.
- 3 Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Edo. Méx.



Si el suelo respira, tú respiras

Compiladoras
Dra. Mariana Saucedo García
Dra. Judith Prieto Méndez



Influencia de nanopartículas de Fe_2O_3 sobre la colonización de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de trigo

César Roberto Sarabia-Castillo¹

Andrés Patricio Torres-Gómez¹

Dulce Yaahid Flores-Rentería²

Fabián Fernández-Luqueño¹

Resumen

En la actualidad, el uso de nanopartículas (NPs) para la elaboración de productos de uso común ha ido en ascenso, lo que las hace más disponibles en el mercado, por lo que se ha planteado la preocupación acerca de los posibles impactos hacia el ambiente una vez que estos productos son desechados o terminan su vida útil. Dicha preocupación, recae principalmente en las interacciones biológicas de gran importancia como la simbiosis micorrízica arbuscular (SMA), por lo que se planteó en el presente estudio el análisis de la interacción simbiótica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) con plantas de trigo y su interacción con NPs de Fe_2O_3 (NPs-Fe) a una concentración de 180 mg por

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. Email: cesar.sarabia@cinvestav.edu.mx.

² CONACYT- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía.

Nanotecnología en el sector agrícola y ambiental: de la producción de cultivos a la remediación ambiental

Fabián Fernández-Luqueño¹
César Roberto Sarabia-Castillo¹
Andrés Patricio Torres-Gómez¹
Hermes Pérez-Hernández¹
Andrea Yakelin Pérez-Moreno ¹
Dulce Yaahid Flores-Rentería²
Gabriela Medina-Pérez³
Rafael Campos-Montiel³
Sergio Rubén Pérez-Ríos³
Fernando López-Valdez⁴

Resumen

En esta investigación se describen y discuten algunos experimentos en laboratorio, invernadero o campo que evidencian el potencial de los nanomateriales (NMs) en la agricultura y la remediación de suelo o agua. Se emplearon nanopartículas metálicas de Fe, Zn, Ag o Ti, arcillas de suelo (montmorillonitas), resi-

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. Email: fabian.fernandez@cinvestav.edu.mx.

² CONACYT- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía.

³ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP-UAEH).

⁴ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN).

ACONDICIONAMIENTO DE UN SUELO AGRÍCOLA CON NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 : EFECTOS SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA EN PLANTAS DE TRIGO

738

César Roberto Sarabia-Castillo¹; Andrés Patricio Torres-Gómez¹; Dulce Yaahid Flores-Rentería²; Gabriela Guillen-Cruz¹, Fabián Fernández-Luqueño¹

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía.

² CONACYT- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía.
E-mail: cesar.sarabia@cinvestav.mx.

RESUMEN

La preocupación por la liberación de nanopartículas (NPs) al ambiente se ha incrementado, debido a que se han evidenciado efectos perjudiciales en plantas y microorganismos benéficos del suelo, como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Esta investigación estudió la interacción simbiótica del HMA con plantas de trigo duro (*Triticum durum* Desf. Var. Samayoa C2004) cultivadas en campo y expuestas a una concentración de 20 mg m^{-2} de NPs de TiO_2 durante 60 días. Pasado este lapso se tomaron muestras de suelo y raíces, y se cuantificó el porcentaje de infección de raíces por HMA y se obtuvo la abundancia promedio de esporas de HMA en suelo tratado con NPs y sin tratar. La presencia de NPs de TiO_2 (T2) no influyó en la interacción simbiótica, al no presentar diferencias significativas en el porcentaje de colonización ($68.89\% \pm 10.18$), con respecto al tratamiento sin NPs (T1; $70.00\% \pm 8.82$); sin embargo, se observó que la abundancia promedio de esporas fue significativamente menor en el tratamiento T2, con respecto al tratamiento T1, por lo que es necesario seguir investigando los efectos de las NPs sobre la abundancia e interacción de los HMA con plantas superiores.

PALABRAS CLAVE: Contaminación; hongos micorrízicos arbusculares; nanobiotecnología; nanomateriales

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) forman asociaciones simbióticas beneficiosas con alrededor del 76% de las plantas vasculares, ofreciéndoles una mayor disponibilidad y capacidad de absorción de nutrientes, mayor absorción de agua y aumento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico, lo que contribuye en la productividad de los cultivos (Sarkodee-Addo, et al., 2020).

Sin embargo, la liberación de nanopartículas (NPs) al ambiente es más directa debido al incremento en su producción, convirtiéndose en un importante motivo de preocupación, debido a que se han evidenciado efectos negativos en plantas y en comunidades



Innovación y Suelos Sanos para el Desarrollo Sustentable





USO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 , ZnO , Fe_xO_x o Ag PARA INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DE TRIGO (*Triticum durum* Desf.)

311

Andrés Patricio Torres Gómez¹; Cesar Roberto Sarabia Castillo¹; Gabriela Guillen Cruz¹; Fabián Fernández-Luqueño¹

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Saltillo. Parque industrial Saltillo-Ramos Arizpe, Av. Industria metalúrgica 1062, C.P. 25900 Ramos Arizpe, Coah. andres.torres@cinvestav.edu.mx

RESUMEN

Debido a la alta demanda de alimentos a nivel mundial, la agricultura debe proveer más alimentos a través de nuevas tecnologías, algunas de las cuales están relacionadas con el uso de nanopartículas (NPs). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diversas NPs metálicas en el pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y biomasa microbiana del suelo, así como en la longitud de espiga y rendimiento de plantas de trigo (*Triticum durum* Desf. cv. Samayoa), cultivadas en condiciones de campo durante 130 días después de la siembra (DDS). El suelo de 25 unidades experimentales de 9 m² cada una, fue tratado con 0 o 200 g ha⁻¹ de NPs de TiO_2 , ZnO , Fe_xO_x o Ag , en un diseño experimental completamente aleatorizado, durante un ciclo agrícola. Conclusión: la aplicación de 200 g ha⁻¹ de NPs de ZnO incrementó significativamente el rendimiento del trigo en un 72.41% comparado con el control. La biomasa microbiana se incrementó significativamente en el suelo tratado con NPs de ZnO respecto a los demás tratamientos.

PALABRAS CLAVE: Calidad del suelo; fertilidad de suelo; microorganismos del suelo; nanotecnología agrícola; nutrición de cultivos.

INTRODUCCIÓN

La agricultura como pilar de la sociedad humana y actividad principal por la que se producen alimentos para los más de 7.7 mil millones de habitantes, ha provocado el desgaste de los suelos y contribuido al cambio climático, debido al uso desmedido de fertilizantes químicos. Sin embargo, el uso de insumos químicos aún es necesario para producir y proveer alimento a la población (Eslava-Eljaiek, 2018). La nanotecnología (NT) se ha empleado en la agricultura desde la última década, con el fin de proteger e incrementar la producción de cultivos. No obstante, aún no se tienen estudios concluyentes sobre el impacto de los nanomateriales (NMs) o nanopartículas (NPs) en las propiedades fisicoquímicas o biológicas del suelos, ni sobre las interacciones NPs-microorganismos del suelo (Gardea-Torresdey *et al.*, 2014; Roco, 2003).

El pH del suelo define la forma y mecanismo en que las NPs de Zn incrementen o disminuya el Zn del suelo disponible para los cultivos, en el caso de suelos calcáreos en



Innovación y Suelos Sanos para el Desarrollo Sustentable





GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE GIRASOL EN UNA MEZCLA DE JALES MINEROS Y SUELO AGRÍCOLA

633

Ana Lucia Flores-Hernández¹; César Roberto Sarabia-Castillo¹; Fabián Fernández-Luqueño¹.

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Cinvestav Saltillo. Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. E-mail: lucia.flores@cinvestav.mx

RESÚMEN

La contaminación por metales pesados es un problema derivado principalmente por actividades antropogénicas entre las cuales destacan los procesos de extracción minera. Las técnicas de remediación ayudan a reducir los contaminantes presentes en suelo y agua. El uso de plantas hiperacumuladoras de metales pesados y microorganismos del suelo ayudan a remediar suelos contaminados. En esta investigación se realizó una caracterización fisicoquímica de los jales y el suelo, con el objetivo de establecer una mezcla adecuada de jales mineros y suelo agrícola para el desarrollo de girasol. Además, se realizó el aislamiento de microorganismos presentes en suelo y jales con el objetivo de utilizarlos como estrategia de remediación de suelos.

PALABRAS CLAVES: *Contaminación; microorganismos; remediación de suelos; residuos mineros.*

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por metales pesados está directamente relacionada con diversas actividades antropogénicas. En México la minería es una de las principales causas de contaminación por metales pesados, derivado de la extracción y procesamiento de minerales. Reportes indican que a lo largo del país existen suelos afectados por el mal manejo de los residuos mineros (jales y material estéril). Sin embargo, aún no se conoce a fondo las condiciones en las que se encuentran ni los posibles impactos ambientales (Covarrubias y Peña Cabriales, 2017).

Una actividad prioritaria para la identificación de estos residuos es la caracterización de suelo de minas activas y abandonadas, con el objetivo de buscar una solución viable para el tratamiento de los residuos (Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006).

Los metales pesados no son biodegradables, por lo tanto, se pueden acumular y llegar a concentraciones que representen un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Para tratar de lidiar con la contaminación se han desarrollado diversos métodos de remediación fisicoquímica y biológica. La fitorremediación representa una técnica que ayuda a degradar los contaminantes presentes en el suelo utilizando plantas, por lo tanto, es una estrategia respetuosa con el medio ambiente, además, se ha demostrado que es una técnica eficiente (Ali *et al.*, 2013)



Innovación y Suelos Sanos para el Desarrollo Sustentable





NANOTECNOLOGÍA APLICADA A LOS SECTORES AGRÍCOLA Y AMBIENTAL

730

Fabián Fernández-Luqueño^{1,2,3}, César R. Sarabia-Castillo¹; Andrés P. Torres-Gómez¹; Nayelli A. Sigala-Aguilar¹; Selvia García-Mayagoitia¹; Ana L. Flores-Hernández¹; Jessica D. Valle-García²; Amir Ali³

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), Unidad Saltillo, Posgrado en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía. ²Cinvestav, Programa de Doctorado en Ciencias en Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad. ³Cinvestav, Programa de Doctorado en Ciencias en Nanociencias y Nanotecnología.
E-mail: fabian.fernandez@cinvestav.edu.mx

RESUMEN

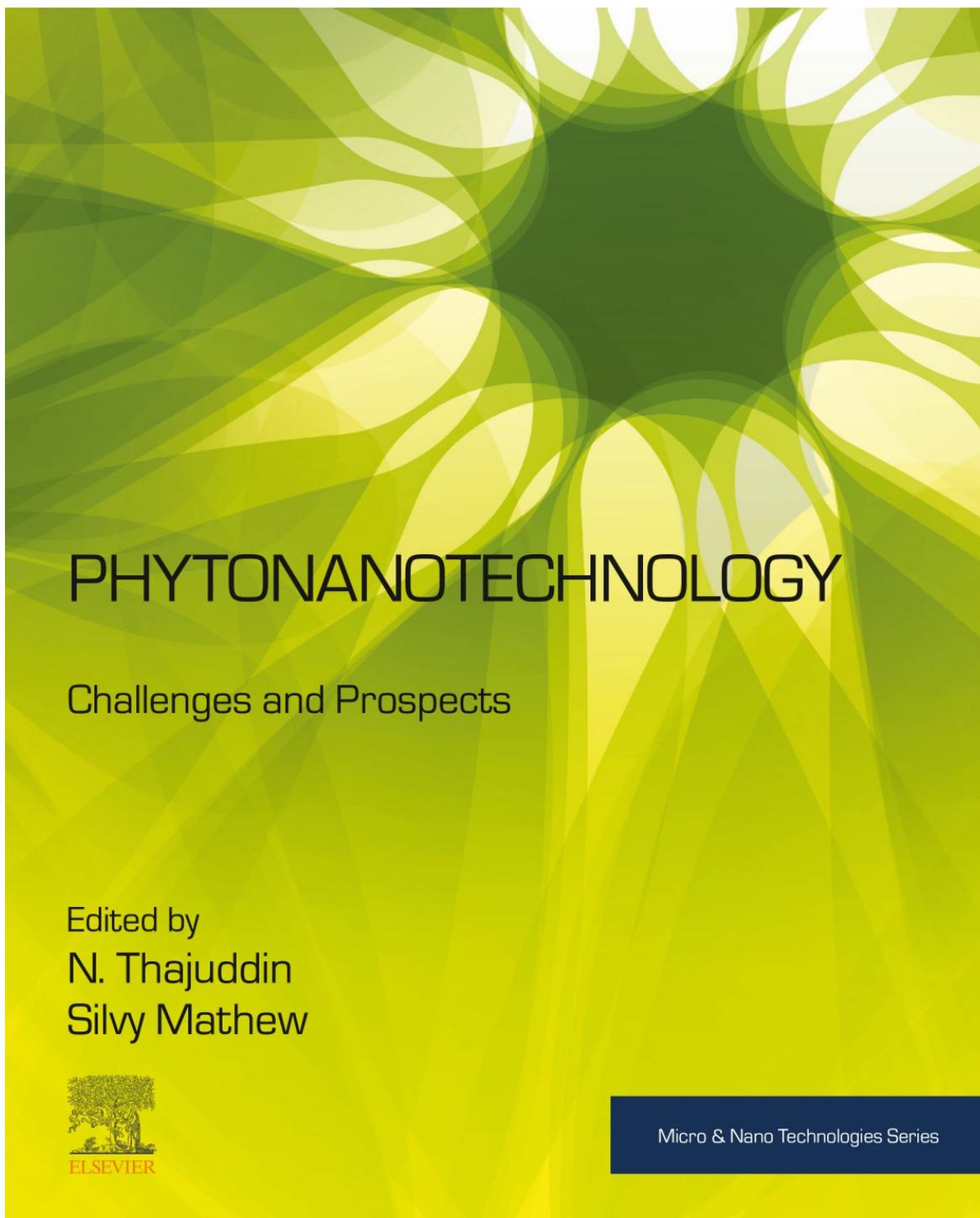
Los objetos o partículas de dimensiones nanométricas se han estudiado desde diferentes enfoques, lo cual ha dado lugar a materiales con propiedades y características únicas y particulares, en comparación con materiales similares de dimensiones mayores. Así, las nanociencias (NSC) y las nanotecnologías (NTECH) se han dado paso durante los últimos lustros, para ofrecer soluciones innovadoras a problemas que aquejan a diversos sectores y a la sociedad. El objetivo de esta contribución es destacar el trabajo conjunto que se ha desarrollado en el laboratorio de Interacciones Ambiente-Planta del Cinvestav Saltillo, en el cual estudiantes de cuatro Programas de Posgrado buscan soluciones nanotecnológicas a problemas relacionados con la contaminación del medioambiente y generan opciones innovadoras para atender demandas tecnológicas del sector rural. Las investigaciones desarrolladas y en proceso consideran un enfoque sustentable, por lo que generalmente, cuando se evalúan las aplicaciones y beneficios de diversos nanomateriales manufacturados (ENM), también se investiga el daño colateral potencial al ecosistema, a través de estudios con lombrices, isópodos o microorganismos del suelo. Entre los ENM empleados en nuestro laboratorio, destacan las nanopartículas (NP) de Ag, TiO₂, ZnO, CeO₂, Fe₃O₄ (magnetita), Fe₂O₃ (hematita) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT), así como la síntesis de composites (NCMP) de arcillas de suelo, biomasa fúngica, residuos de café y diversos ENM. Si bien, varios de estos ENM favorecen la germinación y emergencia de las semillas, así como el desarrollo de los cultivos, su efecto está en función del tipo y tamaño de ENM, concentración, modo y momento de aplicación, tipo de cultivo y variable evaluada. Los NCMP sintetizados han remediado suelo y agua, mientras que se ha evidenciado el daño temporal de algunos ENM sobre la diversidad y abundancia de poblaciones microbianas del suelo y sobre poblaciones de lombrices e isópodos. Nuestras evidencias sugieren que los ENM tienen aplicaciones reales y seguras, pero su uso aún no se debe extender ni generalizar. No obstante, la formación de recursos humanos especializados en estas áreas del conocimiento y el financiamiento a proyectos debe continuar, para entender los procesos



Innovación y Suelos Sanos para el Desarrollo Sustentable



Capítulos de libro (como autor principal y como co-autor)



CHAPTER 9

Phytonanotechnology and environmental remediation

Sarabia-Castillo Cesar Roberto^a, Pérez-Moreno Andrea^a, Galindo-Ortiz Andrés^a, Fraga-Pecina Norma^a, Pérez-Hernández Hermes^b, Medina-Pérez Gabriela^c, Fernández-Luqueño Fabián^a

^aSustainability of Natural Resources and Energy Program, Cinvestav-Saltillo, Ramos Arizpe, Coahuila, Mexico

^bEl Colegio de la Frontera Sur, Agroecología, Unidad Campeche, Campeche, Mexico

^cTransdisciplinary Doctoral Program in Scientific and Technological Development for the Society, Cinvestav-Zacatenco, Mexico City, Mexico

9.1 Introduction

Phytoremediation is a technique that employs plants to degrade, stabilize, or remove pollutants. It can be an alternative green technology method for the remediation of soil, water, and air. Phytoremediation, as a green technology option, is defined as the use of plants to remove pollutants from the environment or to render them harmless. This technique includes seven main strategies [1]: (i) phytoextraction, also referred to as phytosequestration, phytoaccumulation, or phytoabsorption, where plants remove pollutants from soil and concentrates them in the harvestable parts of plants; (ii) phytodegradation, also referred to as phytotransformation, in which plants break down pollutants into simpler compounds that are integrated with plant tissue, which in turn, foster plant growth; (iii) phytofiltration, also referred to as rhizofiltration, where plants or roots absorb, adsorb, concentrate, or precipitate pollutants; (iv) phytohydraulic, which is used to limit the movement of contaminants with water, that is, plants are used to increase evapotranspiration, thereby controlling soil water and contaminant movement; (v) phytostabilization, also referred to as phytoimmobilization, where plants reduce the mobility and bioavailability of pollutants in the environment, either by immobilization or prevention of migration; (vi) phytostimulation, also referred to as rhizodegradation, where the roots release compounds to enhance microbial activity in the rhizosphere through the rhizospheric associations among plants and symbiotic soil microorganisms; and (vii) phytovolatilization, where plants increase the volatilization of pollutants into the atmosphere via themselves through their ability to take up, translocate, and subsequently transpire volatile contaminants.

However, other phytoremediation techniques have been described such as phyllorremediation, that is, plant-leaf-based remediation technologies [2]; phytobial remediation, that is, phytoremediation assisted by microorganisms [3]; or magnetofection,

NANOMATERIALS FOR SOIL REMEDIATION

Edited by
Abdeltif Amrane
Dinesh Mohan
Tuan Anh Nguyen
Aymen Amine Assadi
Ghulam Yasin



Micro & Nano Technologies Series

Current perspectives of soil nanoremediation

Sarabia-Castillo Cesar Roberto¹, Pérez-Hernández Hermes², Torres-Gómez Andrés Patricio¹, Amir-Ali Khalil Gul³ and Fernández-Luqueño Fabián¹

¹*Sustainability of Natural Resources and Energy Programs, Cinvestav-Saltillo, Ramos Arizpe, Mexico*

²*The Southern Frontier College (ECOSUR), Agroecología, Unidad Campeche, Campeche, Mexico*

³*Nanoscience and Nanotechnology Program—Cinvestav, Cinvestav-Zacatenango, Mexico City, Mexico*

24.1 Introduction

Organic, inorganic, xenobiotic, recalcitrant, or ubiquitous pollutants are delivered to the soil, water, or air during practically any industrial process or human activity. The concentrations of these pollutants exceed the capacity of natural degradation, overcome the resilience capacity, and the natural attenuation does not work; therefore a contamination problem arises.

Currently, soil pollution is one of the main threats affecting global soils and the ecosystem services provided by them. Besides, soil pollution can severely degrade the major ecosystem services provided by soil (Rodríguez-Eugenio et al., 2018). According to Montanarella et al. (2016), contamination is the third soil global threat, after soil erosion, and soil salinization and sodification, respectively. The primary anthropogenic sources of soil pollution are the chemicals used in or produced as by-products of industrial activities, domestic, livestock, and municipal wastes, agrochemicals, and petroleum-derived products (Rodríguez-Eugenio et al., 2018). However, new concerns have been raised regarding emerging contaminants such as pharmaceuticals, endocrine disruptors, hormones, toxins, and biological pollutants, among others, such as products or subproducts of nanotechnology. These pollutants are mainly released to the environment accidentally or intentionally, but they are also delivered as a result of atmospheric deposition.

Different physical, chemical, and biological technologies or their combinations have been developed to degrade, dissipate, immobilize, or trap pollutants to reduce their concentration below national or international guideline values. However, sometimes the degradation rates are not as high as desired, and this, along with the synthesis of new nanosized materials with

Influence of nanoparticles on the physical, chemical, and biological properties of soils

Valle-García Jessica Denisse¹, Sarabia-Castillo Cesar Roberto²,
Pérez-Hernández Hermes³, Torres-Gómez Andrés Patricio²,
Pérez-Moreno Andrea² and Fernández-Luqueño Fabián²

¹*Transdisciplinary Doctoral Program in Scientific and Technological Development for the Society, Cinvestav-Zacatenco, Mexico City, Mexico*

²*Sustainability of Natural Resources and Energy Programs, Cinvestav-Saltillo, Ramos Arizpe, Mexico*

³*Agroecología, Unidad Campeche, El Colegio de la Frontera Sur, Campeche, Mexico*

8.1 Introduction

Soils have a determining role in ecosystem functioning through their physicochemical and biological properties and the interactions with biotic or abiotic systems around them. However, the decline of soil ecosystem services has triggered the transdisciplinary collaboration aiming at developing more sustainable soil management practices (Adhikari and Hartemink, 2016; Faucon et al., 2017). The soil is a nonrenewable resource that is harnessed in various ways such as cultural services, water purification, recycling of nutrients, and degradation of wastes or pollutants, among others. All of them contribute to human well-being, shape the sustainable development, and guarantee the environmental health.

However, the soil quality is threatened continuously by unsustainable management practices or by pollutants, which are delivered at rates of thousands of tons yearly worldwide. Common pollutants include polycyclic aromatic hydrocarbons, volatile organic compounds, polychlorinated biphenyl compounds, emerging organic contaminants, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene, among others. Besides, emerging nanosized materials have been synthesized at industrial scale and delivered to the environment when their life cycle ends, or before. These nanoscale materials are well-known as engineered nanomaterials (ENMs), and they are distinguished by their specific properties never seen before. Besides, they are also characterized by their collateral effects on human or environmental health. Therefore pollution by ENMs has arisen, and technologists or scientists are concerned regarding the collateral effects and unknown drawbacks of these nanosized materials.

Nanotechnology Interventions in Food Packaging and Shelf Life



EDITED BY

Aamir Hussain Dar
Gulzar Ahmad Nayik



CRC Press
Taylor & Francis Group

2 Nanotubes as Packaging Tool

*Sarabia-Castillo Cesar R.¹, Amir Ali²,
Pérez-Hernández Hermes³, Pérez-Moreno Andrea¹,
Torres-Gómez Andrés P.¹, Ayaz Mukarram Shaikh⁴,
Yash D. Jagdale⁵, and Fernández-Luqueño Fabián¹*
¹Sustainability of Natural Resources and Energy Programs,
Cinvestav-Salttillo, Coahuila, C.P., Mexico
²Nanoscience and Nanotechnology Program, Cinvestav,
Mexico City, Mexico
³El Colegio de la Frontera Sur (CONACYT), Agroecología,
Unidad Campeche, Campeche, Mexico
⁴Institute of Food Science, University of Debrecen,
Böszörményi, Hungary
⁵MIT School of Food Technology, MIT ADT University,
Pune, Maharashtra, India

CONTENTS

2.1	Introduction	17
2.2	Single-, Double-, or Multi-Walled Carbon Nanotubes to Preserve Food.....	19
2.3	Films, Fibers, or Biocomposites Based on Nanotubes Extend the Food Shelf Life	21
	2.3.1 Titanium Dioxide Nanotubes (TNT).....	23
	2.3.2 Halloysite Nanotubes (HNTs).....	24
	2.3.3 Carbon Nanotubes and Multi-Walled Carbon Nanotubes	25
	2.3.4 Graphene Nanomaterials	26
2.4	Biodegradable and Eco-Friendly Carbon Nanotubes for Packaging Food	27
2.5	Drawbacks of Nanotubes as Packaging Systems.....	32
2.6	Conclusions.....	33
	Acknowledgment	34
	References.....	34

2.1 INTRODUCTION

Carbon nanotubes (CNTs) are cylinder-shaped molecules of single-layer carbon atoms folded up into a tube (graphene). These nanotubes can be single walled (SWCNT) with a diameter of less than one nanometer (nm) or multi walled (MWCNT) with a diameter ranging from less than one nanometer to more than 100 nm. They can be a few micrometers long to several millimeters long, or even longer.

DOI: [10.1201/9781003207641-3](https://doi.org/10.1201/9781003207641-3)

17

Artículos Científicos (como autor principal y como co-autor)



Mexican Journal of Biotechnology 2019, 4(4):29-49

Journal homepage: www.mexjbiotechnol.com
ISSN:2448-6590

ORIGINAL RESEARCH



Nanomaterials modify the growth of crops and some characteristics of organisms from agricultural or forest soils: An experimental study at laboratory, greenhouse and land level

Los nanomateriales modifican el crecimiento de los cultivos y algunas características de organismos de suelos agrícolas o forestales: Un estudio experimental a nivel laboratorio, invernadero y campo

Andrea Pérez-Moreno¹, Cesar Roberto Sarabia-Castillo¹, Gabriela Medina-Pérez², Hermes Pérez-Hernández³, Jorge Roque De La Puente⁴, Sirenia González-Pozos⁴, Langen Corlay-Chee⁵, Angelina Chamizo-Checa⁶, Rafael G. Campos-Montiel⁷, Fabián Fernández-Luqueño^{1*}

¹ Sustainability of Natural Resources and Energy Program, Cinvestav-Salttillo, Coahuila, C.P. 25900, Mexico.

² Transdisciplinary Doctoral Program in Scientific and Technological Development for the Society, Cinvestav-Zacatenco, Mexico City, Mexico.

³ El Colegio de la Frontera Sur, Agroecología, Unidad Campeche, Campeche, Mexico.

⁴ Unidad de Microscopia Electrónica y Laboratorio Avanzado de Nanoscopia Electrónica (LANE) de Cinvestav Zacatenco, Ciudad de Mexico, Mexico.

⁵ Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de Mexico, Mexico.

⁶ Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico.

⁷ Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: cinves.cp.cha.luqueno@gmail.com (F. Fernández-Luqueño)

Article history:

Received: 19 September 2019 / Received in revised form: 24 October 2019 / Accepted: 25 October 2019 / Published online: 30 October 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.4.29>

ABSTRACT

Currently, some concerns regarding the potential toxicity of nanoparticles (NP) on the environment have emerged. The effect of ZnO, TiO₂, and Fe₂O₃ NP on corn (*Zea mays* L.), common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), nanobioremediation of polycyclic aromatic



Ecological Drawbacks of Nanomaterials Produced on an Industrial Scale: Collateral Effect on Human and Environmental Health

H. Pérez-Hernández · A. Pérez-Moreno · C. R. Sarabia-Castillo ·
S. García-Mayagoitia · G. Medina-Pérez · F. López-Valdez ·
R. G. Campos-Montiel · P. Jayanta-Kumar · F. Fernández-Luqueño

Received: 5 April 2021 / Accepted: 28 September 2021 / Published online: 12 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract Currently, hundreds of different nanomaterials with a broad application in products that make daily lives a little bit easier, in every aspect, are being produced on an industrial scale at thousands of tons per year. However, several scientists, researchers, politics, and ordinary citizens have stated their concern regarding the life cycle, collateral effects, and final disposal of these cutting-edge materials. This review summarizes, describes, and discusses all manuscripts published in the Journal Citation

Reports during the last 10 years, which studied the toxicity or the effects of nanomaterials on human and environmental health. It was observed that 23.62% of the manuscripts analyzed found no ecological or human risks; 54.39% showed that several nanomaterials have toxicological effects on the ecosystems, human, or environmental health. In comparison, only 21.97% stated the nanomaterials had a beneficial impact on those. Although only 54.39% of the manuscripts reported unfavorable effects of nanomaterials on ecosystems, human, or environmental health, it is relevant because the potential damage is invaluable. Therefore, it is imperative to make toxicological studies of nanomaterials with holistic

H. Pérez-Hernández
El Colegio de la Frontera Sur, Agroecología, Unidad Campeche, 24500 Campeche, Mexico
e-mail: hermes.perez@estudianteposgrado.ecosur.mx

A. Pérez-Moreno · C. R. Sarabia-Castillo ·
S. García-Mayagoitia · F. Fernández-Luqueño (✉)
Sustainability of Natural Resources and Energy Programs,
Cinvestav-Salttillo, 25900 Coahuila, Mexico
e-mail: cinves.cp.cha.luqueno@gmail.com

C. R. Sarabia-Castillo
e-mail: cesar.sarabia@cinvestav.edu.mx

S. García-Mayagoitia
e-mail: selvia.garcia@cinvestav.edu.mx

G. Medina-Pérez · R. G. Campos-Montiel
Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo,

Hidalgo, C. P. 43000, México
e-mail: gamepe@yahoo.com

R. G. Campos-Montiel
e-mail: rcampos@uah.edu.mx

F. López-Valdez
Agricultural Biotechnology Group, Research Center for Applied Biotechnology (CIBA), Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tlaxcala, Mexico
e-mail: flopez2072@yahoo.com

P. Jayanta-Kumar
Research Institute of Biotechnology & Medical Converged Science, Dongguk University-Seoul, Goyang 10326, Republic of Korea
e-mail: jkpatra.cet@gmail.com

