

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SOBRE LA NODULACIÓN DE *Phaseolus vulgaris* var. L. CULTIVADO EN SUELO AGRÍCOLA

Ibarra Cervantes, Nayeli Fabiola (1), De Alba Muñoz, María Fernanda (1), Vázquez Núñez, Edgar (2)

1 [Ingeniería química sustentable, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ibarracn2014@licifug.ugto.mx]

2 [Departamento de Ingeniería Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ed.vazquez@gmail.com]

## Resumen

La nanotecnología ha cobrado una mayor importancia en los últimos años debido a sus aplicaciones dentro de la industria; sin embargo, aún no se conocen los posibles efectos negativos que pueda traer la liberación de nanomateriales y nanopartículas sobre el ambiente y a la salud. El estudio de la toxicidad de nanopartículas en plantas es de suma importancia, ya que interactúan con el entorno y son la base de la cadena trófica. En este trabajo se realizó un análisis sobre el efecto de la presencia de nanopartículas de hierro y titanio a concentraciones de 50 y 500 ppm sobre la germinación y crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. L). Semillas de frijol fueron incubadas en cajas Petri con las soluciones correspondientes durante una semana y se determinó el coeficiente de Kotowski después de 7 días de germinación, posterior a esto, éstas se plantaron en suelo agrícola, se dejaron crecer durante 21 días, muestreando aleatoriamente en los tiempos 3, 5, 7, 14 y 21 días para medir la longitud de raíz y tallo, se extrajo además la clorofila. El suelo se caracterizó fisicoquímicamente.

## Abstract

Nanotechnology has become more important in recent years due to its applications within the industry. However, the possible negative effects that the release of nanomaterials and nanoparticles can cause on the environment and health cannot be known. The study of the toxicity of nanoparticles in plants is of great importance, since they interact with the environment and are the basis of the trophic chain. In this work, an analysis was carried out on the effect of the presence of iron and titanium nanoparticles at concentrations of 50 and 500 ppm on the germination and growth of bean plants (*Phaseolus vulgaris* var. L). Bean seeds were incubated in Petri dishes with the corresponding solutions for a week and the Kotowski coefficient was determined after 7 days of germination. After this, these were planted in agricultural soil, where they grew for 21 days, randomly sampling on days 3, 5, 7, 14 and 21 to measure the length of root and stem, chlorophyll was also extracted. The soil was physicochemically characterized.

## Palabras Clave

Nanotecnología; NPs-Fe; NPs-Ti; Fitotoxicidad; Contaminación de suelo.

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una de las áreas que ha captado un mayor interés en los últimos 20 años. Comprende la investigación de las propiedades de nanomateriales, así como los métodos de preparación y aplicaciones en otros sectores, tales como medicina, electrónica, energías alternas, fotocatalisis química y tratamiento de aguas residuales.

Las nanopartículas (NPs) pueden provenir de fuentes naturales (por procesos naturales como las erupciones volcánicas, la erosión eólica y los aerosoles formados por las olas de mar) o artificiales (creadas intencionalmente en las industrias para la elaboración de diferentes productos). Sin embargo, algunas NPs que se producen accidentalmente luego de un proceso causado por acción de los humanos, como en el escape de automóviles, humos de la soldadura y efluentes industriales [1].

Las plantas interactúan fuertemente con el entorno que las rodea, lo cual incluye sustancias peligrosas que las vuelven vulnerables a sus efectos potenciales. Esto es de suma importancia ya que las plantas podrían mover NPs entre varias especies en la red alimenticia dado que son consumidas por los organismos de niveles tróficos bajos, así como por animales y seres humanos [2].

Las NPs pueden ingresar a los tejidos de las plantas a través de la raíz o de los órganos y tejidos situados sobre el suelo (por ejemplo, cutículas, tricomas, estomas, estigmas e hidátodos), incluso a través de las heridas y las uniones de las raíces. Para la acumulación y traslocación, deben atravesar una serie de barreras químicas y fisiológicas, las cuales controlan los límites de exclusión de tamaño (SEL, *size exclusion limits*). Por ejemplo, las paredes celulares de muchas plantas poseen poros de 5 nm o menos, por lo que la probabilidad de ingreso y traslocación de NPs es baja, a menos que éstas sean muy pequeñas o que las células estén dañadas previo a la exposición. De la pared celular, las NPs pueden acceder al citoplasma de la raíz por medio de endocitosis [3].

Diversos estudios que han demostrado resultados contradictorios en cuanto a los efectos de las NPs en las plantas. Una causa de estas discrepancias son los parámetros utilizados para determinar si la exposición a NPs trae efectos tóxicos para las plantas, que van desde la germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas, hasta citotoxicidad (por ejemplo, actividades enzimáticas, sistema fotosintético, etc.) y genotoxicidad (integridad y expresión del ácido nucleico). Además, debe tomarse en cuenta que las especies de plantas difieren en su forma de respuesta. Por ejemplo, se ha mostrado que las NPs de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) reportan una mejor capacidad de fotosíntesis [4] y metabolismo de nitrógeno, pero causan estrés antioxidativo [5].

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la presencia de NPs de hierro y titanio durante la germinación y el crecimiento de plantas de frijol. Para ello, se establecieron 4 tratamientos con ambos compuestos a concentraciones de 50 y 500 ppm (además del control) y se midieron parámetros como el coeficiente de Kotowski para la germinación, clorofila y longitud de raíz y tallo para las plántulas y pH y materia orgánica para las muestras de suelo extraídas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización fisicoquímica del suelo

La obtención de los parámetros fisicoquímicos del suelo fue realizada a partir de los métodos propuestos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Para la medición del pH, se pesaron 10 g de suelo y se agregaron 20 ml de agua destilada; se agitó vigorosamente la mezcla por 30 minutos y luego de reposar por 15

minutos más, se registró el valor mostrado en el potenciómetro (previamente calibrado con soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10).

La determinación de materia orgánica se llevó a cabo por el método de Walkley y Black (1934). El porcentaje de carbono orgánico y materia orgánica se obtiene mediante las siguientes expresiones:

$$\% C \text{ orgánico} = \left(\frac{B-T}{g}\right) (N)(0.39)(mcf) \quad (1)$$

Donde:

$B$ = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml)

$T$ = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

$N$ = normalidad exacta del sulfato ferroso

$g$ = peso de la muestra empleada (g)

$mcf$ = factor de corrección de humedad

$$\% \text{ Materia orgánica} = (\% C \text{ orgánico})(1.724) \quad (2)$$

### Adecuación de semillas

Se utilizaron semillas de frijol variedad pinto Saltillo, las cuales fueron lavadas con agua destilada y solución de NaClO al 15% y enjuagadas dos veces con agua destilada; posteriormente, fueron almacenadas a temperatura ambiente.

### Germinación de semillas

Las nanopartículas utilizadas fueron óxido de hierro (NPs-Fe) y dióxido de zinc (NPs-Ti) adquiridas a la compañía Nano ID ®. Se seleccionaron 50 semillas para cada tratamiento: (1) control, donde sólo se utilizó agua destilada; (2) solución de NPs-Fe a 50 ppm, (3) solución de NPs -Fe a 500 ppm, (4) solución de NPs-Ti a 50 ppm y (5) solución de NPs-Ti a 500 ppm. Cada grupo de semillas se puso en vasos de precipitado con las soluciones correspondientes a su tratamiento durante 24 horas. Posterior a este tiempo, se colocaron en cajas Petri con papel filtro empapado con las soluciones ya mencionadas.

### Determinación de Coeficiente de Kotowski

Las semillas de frijol se dejaron en las cajas Petri por 7 días y se calculó el coeficiente de Kotowski (CK). Se trata de una medida de la distribución de la germinación en el tiempo en relación con el número de semillas germinadas [6] y se obtiene a partir de la expresión:

$$CV = \frac{\sum n_i}{\sum (n_i t_i)} (100) \quad (3)$$

Donde

$CV$ = coeficiente de velocidad

$n_i$ = número de semillas germinadas el día  $i$

$t_i$ = número de días desde la siembra

### Determinación de valores morfométricos en plantas

Al pasar los 7 días de germinación, se sembraron las semillas en suelo agrícola. A excepción de tratamiento 1, se agregaron nanopartículas a la concentración especificada (50 ó 500 mg por cada kg de suelo). Se realizaron muestreos los días 3, 5, 7, 14 y 21 posteriores a la siembra, en los cuales se extrajeron aleatoriamente dos plantas de cada tratamiento para la medición de tallo y raíz.

Para la extracción de clorofila se utilizó 0.1 g de muestra fresca y se colocó en un microtubo con 0.4 ml de acetona al 80% v/v. Con ayuda de un pistilo, se trituró la muestra y se transfirió el sobrenadante a otro tubo (este paso se repitió dos veces más). Después de 10 minutos en la oscuridad, se centrifugó la muestra por 10 minutos a 5000 RCF y se transfirió a una celda de espectrofotómetro, utilizando la solución de acetona al 80 % como blanco.

### Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó a partir del software Origin Pro8. Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) por medio del software XLSTAT.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del suelo agrícola

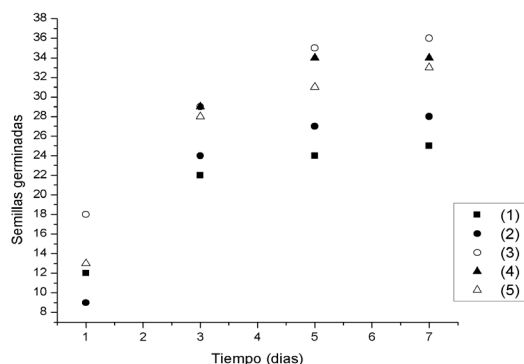
Antes de la siembra de semillas, se caracterizó el suelo, obteniendo un valor de pH de  $7.56 \pm 0.12$ , lo que indica un suelo medianamente alcalino según la norma NOM-021-RECNAT-2000. El contenido de carbono orgánico (en porcentaje) presente es de  $10.73 \pm 0.70$ , por lo que el porcentaje de materia orgánica (según la ecuación 2), es de 18.50.

### Coefficiente de Kotowski (CK) para la germinación

A continuación, se muestran los resultados para el CK para las semillas, observando un efecto mayor en el tiempo de germinación en el tratamiento 3, correspondiente a semillas germinadas con NPs de Fe a 500 mg/L.

Tabla 1: Coeficientes de Kotowski para la germinación de las semillas de frijol

Tratamiento	Tiempo de medición (días)				Coeficiente de Kotowski
	1	3	5	7	
1	12	22	24	25	22.25
2	9	24	27	28	21.35
3	18	29	35	36	22.18
4	13	29	34	34	21.65
5	13	28	31	33	21.73



El valor más bajo fue para la concentración a 50 ppm de hierro. Graficando el número de semillas germinadas durante los 7 días, se tiene que, por lo general, los tratamientos expuestos a NPs mejoran este proceso.

### Extracción de clorofila

Utilizando UV/Vis para el análisis espectrofotométrico, la clorofila absorbe longitudes de onda cercanas al azul (428-453 nm) y al rojo (661-642 nm). Para la solución de acetona al 80%, las concentraciones de la clorofila a (Chl-a), clorofila b (Chl-b) y clorofila total (Chl-t) en  $\mu\text{g/ml}$  se calcularon mediante las siguientes ecuaciones [7]:

$$\text{Chl} - a = 12.72A_{663} - 2.59A_{645}$$

IMAGEN1. Número de semillas germinadas durante los 7 días para cada uno de los tratamientos.

$$Chl - b = 22.9A_{645} - 4.67A_{663}$$

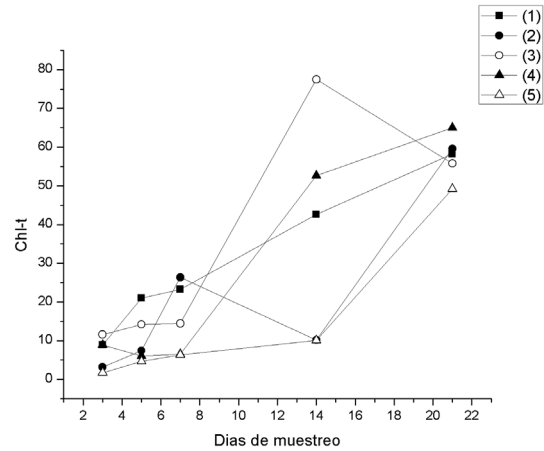
$$Chl - t = 20.31A_{645} + 8.05A_{663}$$

En la imagen 2 puede observarse la variación de clorofila total durante los días en que se realizó la prueba.

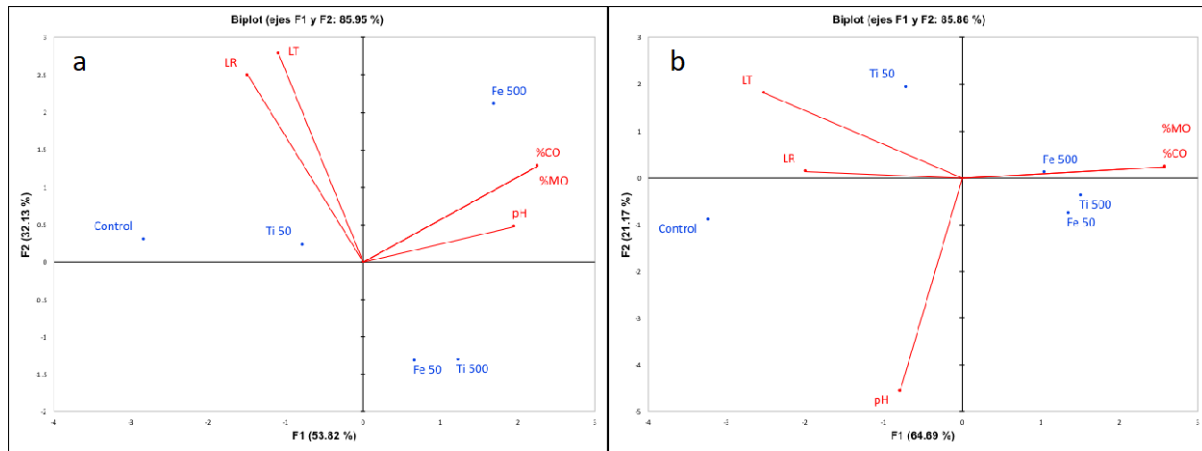
### Análisis de Componentes Principales (ACP)

Se efectuó un análisis de componentes principales para las variables pH, materia orgánica, carbono orgánico, longitud de raíz y longitud de tallo, a los días de incubación 3 y 21. Los resultados se muestran en la imagen 3.

Posterior al análisis, se obtuvo que las respuestas de las variables referidas a la s longitudes de raíz y tallo, se asocian explican cuando se asocian a las condiciones del tratamiento Ti 50 y Control, tanto para los días 3 y 21. Los tratamientos restantes no tienen una asociación aparente con las respuestas de las variables analizadas.



**IMAGEN 2:** Evolución de la concentración de clorofila total (Chl-t) para los tratamientos durante el periodo de crecimiento



**IMAGEN 3:** Análisis de componentes principales para las variables morfométricas analizadas en el a) día 3 y b) día 21 de crecimiento de *P. vulgaris* var. L. en suelo y bajo condiciones controladas.

### CONCLUSIONES

Fue posible observar efecto de crecimiento y concentración de clorofila en las plantas crecidas bajo diferentes condiciones de nanopartículas (i.e., Hierro y Titanio), a diferentes concentraciones tales como 50 y 500 mg/L. La tasa de germinación fue afectada de igual manera.

Es necesario establecer experimentos a largo plazo, llevados hasta la floración y obtención de granos y evaluar la movilidad de las nanopartículas en el tejido vegetal. Estos estudios permitirán evaluar el grado de posible transferencia de NPs en la cadena trófica y establecer criterios para el manejo de plantas comestibles expuestas a nanopartículas o nanomateriales.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de Veranos de la Investigación Científica UG en su 24° edición por el apoyo económico y a la División de Ciencias e Ingenierías Campus León por las facilidades proporcionadas para la realización de este proyecto.

## REFERENCIAS

- [1] Cox, H. & Ramos, A. (2016) Nanopartículas. Fecha de consulta: 18 de julio del 2018. Recuperado de [https://superfund.arizona.edu/sites/superfund.arizona.edu/files/nano\\_spanish\\_rocio.pdf](https://superfund.arizona.edu/sites/superfund.arizona.edu/files/nano_spanish_rocio.pdf)
- [2] Maurer-Jones, A., Gunsolus, I., Murphy C. & Baynes, C. (2013) Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Annals of Chemistry*, 85(6), 3036-3049. DOI: 10.1021/ac303636s
- [3] Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. & Kopittke, P. (2016) Nanotechnology: A New Opportunity in Plan Sciences. *Trends in Plant Sciences*, 21 (8), 699-712. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.04.005
- [4] Lei, Z., Mingyu, S., Chao, L., Liang, C., Hao, H., Xiao, W., Xiaoqing, L., Fan, Y., Fengqing, G. & Fashui, H. (2007) Effects of Nanoanatase TiO<sub>2</sub> on Photosynthesis of Spinach Chloroplasts Under Different Light Illumination. *Biological Trace Element Research*, 119 (1), 68-76. DOI: 10.1007/s12011-007-0047-3
- [5] Lei, Z., Mingyu S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L. & Fashui, H. (2007) Antioxidant Stress is Promoted by Nanoanatase in Spinach Chloroplasts Under UV-B Radiation. *Biological Trace Element Research*, 121 (1), 69-79. DOI: 10.1007/s12011-007-8028-0DO
- [6] González, L. & Orozco, A. (1996) Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 58, 15-30. DOI: 10.17129/botsoci.1484
- [7] Zhang, J., Han, C. & Liu, Z. (2009) Absorption spectrum estimating rice chlorophyll concentration: preliminary investigations. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1 (5), 223-229.