UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

Bioacumulación de plata y contenido de microelementos esenciales en cultivos de células en suspensión de *Medicago sativa*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
DOLORES ITZEL LÓPEZ NICOLÁS

DIRECTORA DE TESIS
LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ
FACULTAD DE CIENCIAS

CO-DIRECTOR DE TESIS
JUAN OROZCO VILLAFUERTE
FACULTAD DE QUÍMICA

Toluca, Mx. Junio 2021

ÍNDICE

RESUMEN ***8***

1. INTRODUCCIÓN ***10***

2. ANTECEDENTES ***13***

2.1 Contaminación **13**

2.1.1 Plata 14

2.2 Translocación **15**

2.3 Toxicidad **16**

2.4 Remediación **16**

2.4.1 Tratamientos físicos 17

2.4.2 Tratamientos químicos 17

2.4.3 Tratamientos biológicos 18

2.4.3.1 Fitorremediación **18**

2.5 Nutrición de la planta **18**

2.5.1 Micronutrientes 19

a) Cobre 19

b) Manganeso 20

c) Hierro 20

d) Zinc 21

2.6 Sistemas de defensa de la planta **21**

2.7 Biotecnología vegetal **22**

2.8 Cultivo de tejidos en estudios de fitorremediación **23**

***2.9 Medicago sativa* L** **24**

3. OBJETIVOS ***26***

3.1 General **26**

3.1.1 Particulares 26

4. HIPÓTESIS ***26***

5. METODOLOGÍA ***27***

5.1* Obtención y proliferación de biomasa de *M. sativa **27**

5.2 Formulación del medio de cultivo y condiciones de incubación **27**

5.3 Bioensayo de inducción de estrés por Ag en cultivos de células en suspensión de *M. sativa* **27**

***5.4* Digestión de biomasa vegetal** **27**

***5.5* Análisis del contenido de metales por espectrofotometría de absorción atómica** **28**

***5.6* Análisis estadístico** **28**

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 29
7. CONCLUSIONES 46
8. REFERENCIAS 47
9. ANEXOS 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo conceptual de transferencia de la plata a sistemas acuáticos. Modificado de Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019. 15
Figura 2. Mecanismos de defensa de la célula vegetal ante agentes estresantes, como iones metálicos, nanotubos y NP. Modificado de Yang et al., (2017). 22
*Figura 3. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de Medicago sativa, durante 21 días; expuestas a 0 µM Ag (-□-) y 50 µM Ag (-□-). * Indica diferencias significativas.* 30
Figura 4. Muestras de biomasa digerida: A) digestión con agua regia y el método "Organic A"; B) digestión con agua regia y el método "Organic A-modificado"; C) digestión con ácido nítrico diluido y el método "Organic A"; y D) digestión cristalina sin impurezas obtenido con ácido nítrico diluido y el método "OrganicA-modificado". 33
Figura 5. Contenido de Ag en los cultivos de celulas en suspensión (-○-) y factor de bioaconcentración (FB) (-○-) en células en suspensión de M. sativa expuestas a 50 µM de Ag. Los datos representan el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas. 35
*Figura 6. Contenido de Cu en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-∆-) y cultivos control (-∆-). * Iindican diferencias significativas.* 38
*Figura 7. Contenido de Mn en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-○-) y cultivos control (-○-). *Indican diferencias significativas.* 39
*Figura 8. Contenido de Fe en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-◊-) y el tratamiento control (-◊-). *Indican diferencias significativas.* 41
*Figura 9. Contenido de Zn en células en suspensión de M. sativa expuestas a 50 µM de plata (-×-) y 0 µM de plata (-×-). *Indican diferencias significativas* 43
Figura 10. Curva de calibración para Ag (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica. 55
Figura 11. Curva de calibración para Cu (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica. 55
Figura 12. Curva de calibración de Zn (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica. 56
Figura 13. Curva de calibración de Mn (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica. 56
Figura 14. Curva de calibración de Fe (ppm), en flama. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica. 57
Figura 15. Presentación del trabajo en el congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería en el 2019. 57
Figura 16. Presentación del trabajo en el congreso de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C. en el 2020, de forma virtual. 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las células en suspensión de M. sativa control y expuestas a Ag. 31

ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AAE	Agencia Ambiental Europea
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	plata
$AgNO_3$	nitrato de plata
AgNPs	nanopartículas de plata
AIA	acido indolacético
Ag_2S	argentita
Ag_3AsS_3	proustita
Ag_3SbS_3	pirargirita
Ag_5SbS_4	estefanita
APX	ascorbato peroxidasa
As	arsénico
ATP	adenosín trifosfato
B	bario
BAP	6-bencilaminopurina
Be	berilio
C	carbono
Ca	calcio
CAT	catalasa
Cd	cadmio
CO2	dióxido de carbono
Cr	cromo
Cu	cobre
CVT	cultivo de tejidos vegetales
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia Protectora del Ambiente de los Estados Unidos
ERO	especies reactivas de oxigeno
FB	Factor de bioconcentración
Fe	hierro
FS	fotosistema
GSH	glutatión
GST	glutatión S-tranferasa
H_2O_2	peróxido de hidrogeno
Hg	mercurio
HNO_3	ácido nítrico
HO•	radicales hidroxilos
K	potasio
kt	kilotolenadas
nM	nanomolar
MDA	malondialdehido
mM	minimolar
MSm	medio MS modificado
µM	micromolar
Mg	magnesio
Mn	manganeso
Mo	molibdeno
MP	metales pesados
N	nitrógeno

Ni	níquel
NP	nanopartículas
$\bullet O_2$	superóxidos
Org-A	Organic A
Org-AM	Organic A, modificado
P	fosforo
Pb	plomo
PDX	peroxidasa
PF	peso fresco
PS	peso seco
ppm	partes por millón
ppb	partes por billón
rpm	revoluciones por minuto
S	azufre
SH	sulfhidrilo
Se	selenio
Sb	antimonio
SOD	super oxido dismutasa
t	toneladas
Tl	talio
QD	quantum dots
Zn	zinc
ZIPs	transportadoras de zinc

RESUMEN

La contaminación es un problema a nivel global, donde las actividades antropogénicas constituyen una de las principales fuentes de emisión. Para satisfacer las distintas necesidades humanas, se realiza la extracción de diversos recursos naturales, durante este proceso los ambientes son dañados estructuralmente, y a través de su aplicación en varios productos de uso cotidiano se liberan elementos tóxicos dañinos, incluso durante la vida útil del producto. Estos contaminantes se movilizan a través de descargas residuales tanto industriales como domésticas, así como en los residuos sólidos, que, al no ser tratados adecuadamente, muchos de estos elementos llegan a los ecosistemas provocando grandes afectaciones. Entre los contaminantes, encontramos a los metales pesados (MP), que al ser adicionados al ambiente persisten indefinidamente, al no ser biodegradables se acumulan y dañan a los organismos vivos, *e.g.* en peces se han observado malformaciones, en especies vegetales la disminución de biomasa, y en humanos daños en el ADN.

La plata, es un MP, el cual es empleado en una gran variedad de productos por sus diversas propiedades. Una de ellas es la actividad antimicrobiana, por lo que se ha incorporado en la elaboración de pinturas, cosméticos, purificadores de agua, textiles, y en la manufacturación de nanopartículas con fines farmacológicos. El aumento en el uso y elaboración de subproductos de la Ag, ha incrementado la adición del metal en los ecosistemas, y con ello los riesgos toxicológicos. Debido a esto, se han implementado técnicas para restaurar las áreas contaminadas, con métodos físicos y químicos, sin embargo, suelen dañar la estructura y las propiedades del suelo, así como la biota. Por ello, dentro de la aplicación de métodos no convencionales y amigables con el ambiente, se encuentra la utilización de métodos biológicos, entre los cuales encontramos a la fitorremediación, una técnica basada en el uso de plantas, para acumular, extraer o degradar el contaminante de interés. Aunque la fitorremediación es una técnica aceptada, aún se desconoce información sobre los mecanismos que las plantas utilizan para la tolerancia y acumulación de los contaminantes. Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del estrés por plata, en el contenido de micronutrientes y la capacidad de acumulación del metal, en cultivos de células en suspensión de *Medicago sativa*. Para ello, cultivos de células en suspensión de *M. sativa* fueron expuestos a 0 y 50 µM de plata, la biomasa se cosechó cada tercer día y se determinó su peso, posteriormente las muestras fueron digeridas y se midió el contenido de plata, cobre, zinc, hierro y manganeso en sus tejidos.

En términos generales, los cultivos de *M. sativa* en presencia de Ag tuvieron una disminución en la producción de biomasa, con respecto al tratamiento control (sin plata), sin embargo, el patrón de la cinética de crecimiento fue similar, para ambos tratamientos. Mientras que la acumulación de Ag se determinó desde el día 0 (73.07 mg Ag Kg^{-1}), la cual fue incrementándose con el transcurso del tiempo, registrándose la significativamente mayor acumulación en el día 14 (495.00 mg Ag kg^{-1}), y posteriormente se observó una disminución en el contenido de plata. Por otro lado, se observaron cambios en el contenido de micronutrientes cuando las células fueron expuestas a plata, el Cu fue significativamente menor al control (>20 veces) en la primera mitad de la cinética, el Fe mayor que el control (>3 veces) en la primera mitad de la cinética, Mn duplico su contenido en casi toda la

cinética con respecto al control y el Zn aumento (<4 veces) en la segunda parte de la cinética, esto demuestra que la absorción de los cuatro microelementos es afectada por la presencia de plata, sin embargo, el efecto es distinto y con diferentes niveles de afección para cada micronutriente, que puede ser explicado por su participación en el metabolismo celular y en su implicación en el defensa antioxidante. Los resultados del presente estudio muestran que *M. sativa* es una especie vegetal tolerante a plata, incluso en células sin diferenciación celular. Mientras que, en los cuatro microelementos evaluados, los cuales juegan un papel importante en el funcionamiento celular, se ve afectado su contenido, lo que sugiere que participan en la respuesta contra el estrés por plata.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de productos que deriva de un incremento acelerado de la población, hace necesaria la explotación y el uso de los recursos naturales, entre los cuales encontramos a los metales (Adriano, 2001; Johnson, 2013). La adición de elementos metálicos a productos de uso cotidiano tiene un impacto tanto positivo como negativo, influyendo en la energía, salud y afectaciones al ambiente (Hameed *et al*., 2016). Debido a la implementación de los metales en diversas industrias y productos que se emplean cotidianamente, la industria minera se encuentra más explotada cada día (Mani *et al*., 2020). Entre las industrias con mayor demanda de metales se encuentra la dedicada a la manufactura de nanopartículas metálicas (NP), las cuales se emplean en la medicina, productos biomédicos, farmacéuticos, electrónicos, purificadores de agua, pinturas, textiles, productos de cuidado personal, transporte, fertilizantes, entre otros (Fernández-Silva *et al*., 2011). Las NP incluidas en diversos productos son liberados durante la vida útil del producto, llegando a depositarse en descargas de aguas residuales domésticas e industriales (Benn & Westerhoff, 2008). De entre las consecuencias por el incremento de su uso, se encuentra el riesgo de la generación de nano-residuos (Bystrzejewska-Piotrowska *et al*., 2012). Durante la fabricación de nanomateriales como las NP, éstos se incorporan al ambiente, *e.g.* para el 2010 se estimó que se encontraban en 8-20%, 0.4-7% y 0.1-1.5%, en suelos, cuerpos de agua y atmosfera, respectivamente (Keller *et al*., 2013). De acuerdo a Buríc y colaboradores (2015), las nanopartículas de plata (Ag) son las más utilizadas, por sus propiedades, en especial su actividad antibacterial, llegando a tener una producción de 500 toneladas (t) anuales.

Por otro lado, las minas activas y abandonadas representan un alto riesgo de contaminación, por la liberación de altas concentraciones de metales al ambiente provocando diversos problemas al medioambiente y a la salud humana (Midhat *et al*., 2018). Entre ellos encontramos a los denominados metales pesados (MP), que de acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 1998) son aquellos cuya densidad es mayor a 5 g cm^{-3}, denotando a metales y metaloides que se asocian a cierto grado de toxicidad, y que en concentraciones por encima de determinados límites, pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora o fauna. En términos generales, los MP representan un problema grave de contaminación, dado que no son biodegradables persisten en el ambiente indefinidamente (Adriano, 2001). Estos elementos interactúan con los diversos organismos vivos, los cuales pueden llegar a ser tóxicos para plantas, animales, hongos, bacterias y seres humanos (Jiang *et al*., 2020; Mohamed & Sabeera, 2019). En un estudio realizado por Haferburg & Kothe, (2010), la explotación de minas, así como el proceso de extracción y manufacturación representan un riesgo de contaminación, siendo los suelos los que muestran mayor grado de contaminación (Nel *et al*., 2006). Considerando datos de la Agencia Ambiental Europea (AAE), se estima que hay alrededor de 1.4 millones de sitios contaminados en el planeta, que corresponden a zonas mineras activas y abandonadas. Por lo cual, existe la necesidad de recuperar estos sitios que representan disturbios por la contaminación.

Para tratar estos problemas se requiere de la implementación de métodos que mitiguen los elementos tóxicos, las primeras tecnologías hacen referencia a métodos fisicoquímicos, también llamados métodos convencionales, encontrando a la excavación, solidificación, lavado de suelo, entre otros. Sin embargo, estos métodos no son completamente eficientes y adicionalmente provocan daños en la estructura física del suelo, así como inhibición de la

actividad biológica y suelen tener costos elevados (Mulligan *et al*., 2001). Actualmente encontramos métodos biológicos que ayudan a atenuar los problemas de contaminación, como lo es la fitorremediación, la cual representa una alternativa biotecnológica que se basa en el empleo de especies vegetales capaces de mitigar los contaminantes de forma natural del suelo, agua y aire. La vegetación capaz de realizar procesos de fitorremediación utiliza diversas estrategias, pueden remover, acumular, atenuar, degradar, absorber o metabolizar contaminantes inorgánicos como orgánicos; y es una tecnología amigable con el ambiente y de costo accesible (Fernández-Silva *et al*., 2011; Mastronardi *et al*., 2015).

En la fitorremediación se emplean especies capaces de acumular y tolerar concentraciones importantes de metales, a las que se les denomina acumuladoras o hiperacumuladoras (Nguyen *et al*., 2017; Peuke & Rennenberg, 2005). En las plantas, los MP se incorporan en las células a través de la membrana celular, empleando canales de transporte específicos para los minerales esenciales que utilizan adenosín trifosfato (ATP), posteriormente, los MP se movilizan al citoplasma, a la vacuola o a la pared celular, con ayuda de diversos mecanismos de defensa para evitar el envenenamiento a causa de los elementos tóxicos (Achari & Kowshik, 2018; White, 2012). En el ambiente, los MP se pueden encontrar en diferentes estados de oxidación, debido a ello pueden provocar estrés iónico, lo que a su vez ocasiona la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), provocando daño a biomoléculas y finalmente la muerte celular (Adriano, 2001; Dobias & Bernier-Latmani, 2013; Raklami *et al*., 2019). Para tolerar los contaminantes, entre ellos los MP y situaciones adversas como estrés hídrico y cambios de temperatura, las plantas desarrollaron diversos sistemas de defensa, uno de estos mecanismos es la presencia de enzimas con actividad antioxidante, que desactivan moléculas de bajo peso molecular, y evitan, previenen o combaten el daño oxidativo provocado por radicales, dentro de estas enzimas encontramos a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (PDX), entre otras (Adriano, 2001; Raklami *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2016). Sin embargo, la expresión de estas biomoléculas se ve afectada por la falta o disminución en la concentración de nutrientes, debido a sus interacciones o el impedimento ocasionado por los MP. También, la tolerancia al estrés está asociada a modificaciones de membrana, la estructura dinámica puede cambiar dependiendo de la respuesta o el desarrollo relacionado a las condiciones del ambiente, modificando la permeabilidad, una restricción en el consumo de agua o metales, etc. (Raklami *et al*., 2019; White, 2012). Por otro lado, metales como hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), bario (B), molibdeno (Mo) y cobre (Cu), son minerales que se encuentran en la nutrición de las plantas de forma esencial, y son catalogados como micronutrientes, ya que su requerimiento es bajo (Adriano, 2001; Kirkby, 2012), y su función y contenido puede ser afectado por la presencia de MP.

Los micronutrientes participan en diversas funciones, *e.g.* el Fe tiene una participación en la síntesis de proteínas como la ferredoxina, ribosomas, en la biosíntesis de clorofila, y está relacionado con enzimas importantes en la detoxificación como la catalasa y la peroxidasa, por lo que la deficiencia de hierro tiene un efecto en la disminución de estas enzimas. La deficiencia de algunos microelementos puede afectar la concentración de otros, tal es el caso del Zn, su baja concentración esta correlacionada con la disminución de Fe, los bajos niveles de zinc también tienen consecuencias en el metabolismo de la planta, ya que la tolerancia al estrés ambiental disminuye, debido a que el Zn es componente de enzimas que responden ante estos tipos de estrés, como la Cu-Zn-SOD. Por otro lado, encontramos al Cu que participa en la fotosíntesis, la respiración celular, el metabolismo del carbono (C) y nitrógeno (N), a su vez también brinda protección contra estrés oxidativo, sin la presencia de este mineral comienza a disminuir la concentración de clorofila, al igual que el transporte de electrones en el fotosistema I (FS I) se ve afectado, la

plastocianina, la ascorbato peroxidasa (APX), la diamina oxidasa, y la CuZn-SOD donde funge como catalizador. Mientras que el Mn está implicado en diversos procesos redox, debido a que numerosas enzimas son activadas con el ion Mn^{2+}, a su vez, este mineral puede sustituir al magnesio (Mg), y en algunas reacciones, también es parte estructural de enzimas como la SOD y en el fotosistema II (FS II) (Broadley *et al*., 2012; Robson, 1981).

El estudio de las plantas fitorremediadoras ha sido explorado desde hace unas décadas, sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado en campo, siendo procedimientos lentos, ya que los estudios en estas condiciones pueden tardar varios años con requerimiento de una constante asistencia humana (Nirola *et al*., 2016); además se ven afectados por las condiciones climáticas y factores no controlables, como las propiedades fisicoquímicas del suelo, estrés por plagas, entre otros. Debido a esta problemática surgen alternativas para efectuar los estudios en periodos más cortos y altamente controlados, como es el caso del cultivo de tejidos vegetales (CTV), herramienta que se encuentra dentro de la biotecnología vegetal. El CTV comprende el establecimiento de un explante vegetal (segmento de una planta donadora con características viables para su uso) en condiciones asépticas y controladas, el éxito de este método ha permitido el establecimiento y fitomejoramiento de especies, es decir, la planta puede adquirir mecanismos que mejoran su sobrevivencia o alguna cualidad añadida que no tenía anteriormente (Cabrera, 2009). Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del estrés por plata, en la concentración de micronutrientes y la capacidad de acumulación del metal, en cultivos de células en suspensión de *Medicago sativa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación

Desde la Revolución Industrial y la globalización económica, la contaminación se ha visto aumentada de forma exponencial, debido a las actividades antropogénicas en conjunto con la industrialización, la cual busca cubrir la creciente demanda de productos por el crecimiento poblacional (Ali *et al*., 2013; Rai *et al*., 2020). Una fuente importante de emisión de contaminantes son los residuos municipales, considerados una de las mayores fuentes de contaminación por MP. Los materiales ricos en MP son resultado de la extracción producto de la actividad minera, el sector agrícola también contribuye contaminando con éstos elementos, cuando se aplican pesticidas o insecticidas, ya que los contiene en su formulación, provocando disturbios en los ciclos bioquímicos de los cultivos y el suelo (Gangwar *et al*., 2014). En el panorama Nacional, México tiene a la minería como una actividad con gran tradición, jugando un papel fundamental en el desarrollo económico y social del país. Tan solo la actividad minera genera el 65% del total de residuos industriales, provocando efectos negativos, pues la mayoría de los residuos producto de esta fuente de emisión se diseminan en el entorno mediante erosión y lixiviación, contaminando suelo, agua y aire (Mussali-Galante *et al*., 2012; 2019).

La incorporación de MP a diversos objetos de uso cotidiano aumenta la adición de contaminantes, que posteriormente son incorporados al ambiente por efluentes industriales y residuos orgánicos que viajan a través de la lixiviación y/o en forma gaseosa, permitiendo que se desplacen por medio de corrientes de aire (Ali *et al*., 2013; Gangwar *et al*., 2014). Sin mencionar que también los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren naturalmente, contribuyen a la degradación del suelo y adicionando MP (Gangwar *et al*., 2014), provocando efectos tóxicos en el ambiente, en plantas, animales, seres humanos y microorganismos, estos últimos al verse afectados provocan una disminución en las actividades y propiedades del suelo (Ali *et al*., 2013).

2.2 Metales pesados

Los metales pesados son elementos con una densidad alta, más de 5 g cm^{-3}, denotando a metales y metaloides que están asociados a la contaminación y la toxicidad. De los 90 elementos, 53 de ellos se consideran metales pesados y de éstos, 17 son importantes a nivel biológico, ya que son requeridos por algunos organismos y son empleados en concentraciones bajas, por lo que reciben el nombre de elementos esenciales (Adriano, 2001; Hameed *et al*., 2016; Singh *et al*., 2020); los elementos restantes no son necesarios para los organismos, por lo que son denominados no esenciales, y su condición fisiológica se basa en su solubilidad (Ali *et al*., 2013; Hameed *et al*., 2016).

Los MP son constituyentes naturales de nuestro planeta, se encuentran en aleaciones, sin embargo, las actividades humanas y los residuos industriales adicionan al ambiente los MP, lo que representa un grave problema debido a que no son biodegradables y generalmente no se movilizan, permitiendo que persistan indefinidamente en el ambiente (Adriano, 2001; Gangwar *et al*., 2014; Tovar-Sánchez *et al*., 2018; Weerakoon, 2019). Este tipo de elementos tóxicos causan un efecto negativo en los organismos que se encuentran en contacto con ellos, *e.g.* en plantas pueden causar estrés oxidativo, por la generación de

radicales libres, lo que induce la inhibición del crecimiento, y pueden causar también cambios genéticos (Mussali-Galante *et al*., 2012). En general, los organismos vivos que se encuentren en contacto con los MP pueden tener cambios moleculares, celulares, y modificaciones en la estructura genética, entre otros. Algunos MP pueden ser genotóxicos, mutagénicos y alterar la reparación del ADN (Tovar-Sánchez *et al*., 2018). La toxicidad de lo MP está determinada por su concentración y su reactividad, es decir, su capacidad oxidante (Singh *et al*., 2020). La incorporación de los metales al ecosistema se da por el potencial de biodisponibilidad y la movilidad del suelo, posteriormente los cationes metálicos se adhieren a partículas que tienen cargas negativas, como la arcilla y la materia orgánica, cuando los metales llegan a separarse de estas partículas se adhieren a suelo soluble y se encuentran en forma disponible para bioacumularse en diferentes organismos (Ali *et al*., 2013; Patra *et al*., 2020; Singh *et al*., 2020; Tovar-Sánchez *et al*., 2018). Es por ello, que la Agencia Protectora del Ambiente de los Estados Unidos (EPA) indica que 13 elementos metálicos son fuente prioritaria de contaminación, en los cuales se enlista a la plata (Ag), arsénico (As), berilio (Be), cadmio (Cd); cromo (Cr), cobre (Cu). Mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), antimonio (Sb), selenio (Se); talio (Tl) y zinc (Adriano, 2001).

2.2.1 Plata

La plata es un metal dúctil, el cual se utiliza principalmente en la industria de la fotografía, como conductor eléctrico, en la elaboración de pinturas, joyería, y se adiciona a diversos artículos por sus propiedades antibacterianas, en desinfectantes de comida y productos de tratamiento personal, entre otros (Ennvironmental Protection Agency, 1980; Fernandes *et al*., 2017; Gottschalk & Nowack, 2011; Wu *et al*., 2020). La plata tiene dos valencias, Ag^{+} y Ag^{++}, naturalmente se encuentra en bajas concentraciones, tanto en agua, suelo y aire, las cuales pueden variar dependiendo de la zona geográfica, mayormente se encuentran en aleaciones (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019), en forma de argentita (Ag_2S), proustita (Ag_3AsS_3), pirargirita (Ag_3SbS_3), estefanita (Ag_5SbS_4) y en su forma nativa metálica. La solubilidad de la plata depende del complejo formado, en el caso del nitrato de plata ($AgNO_3$) tiene una solubilidad de $2.45x10^9$ µg L^{-1}, mientras que las sales inorgánicas de plata son menos tóxicas que el $AgNO_3$ (EPA, 1980). A nivel mundial, en el 2004, se estimaba una producción anual de plata de 320 kilotoneladas (kt). Para el 2002, tan solo en México se producían 2852 t, y se posicionaba como el mayor productor a nivel mundial, conservando en 2018 el primer lugar en producción de Ag con 6116 t (The Silver Institute, 2019). El proceso de extracción metalúrgico depende del metal principal, ya que normalmente la plata se encuentra en aleaciones con otros elementos (*e.g.* Cu, Zn, Pb u Au) (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

Dentro de las descargas emitidas, la concentración de Ag varía dependiendo de la distancia en la que se encuentre la industria o la fuente de emisión. En años anteriores, las descargas de agua que mayormente contenían Ag provenían de la industria de la fotografía, posteriormente, la inclusión de cámaras digitales al mercado disminuyo la concentración de Ag en descargas hasta 1 µg L^{-1}. En los sedimentos o suelos, la concentración varía, dependiendo de ciertas propiedades (*e.g.* salinidad, pH, hidróxidos de Fe y Mn, y materia orgánica). En cuerpos de agua la forma iónica de la Ag es altamente toxica, aun en bajas concentraciones (Dobias & Bernier-Latmani, 2013; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019; Wang *et al*., 2017).

La biomagnificación, que se caracteriza por una bioacumulación sucesiva en los niveles tróficos (Fig 1.), es una forma indirecta de toxicidad en humanos, debido a su ciclo natural en la cadena trófica. Esto se debe a que las formas iónicas y no iónicas que se encuentran

en los diferentes ambientes son absorbidos por plantas o algas, posteriormente son consumidos por vertebrados que se alimentan de estas, para finalmente llegar al ser humano cuando son añadidos a su dieta (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019; Tovar-Sánchez *et al*., 2018). Los efectos en los humanos ocasionados por la ingesta de plata, puede llegar a producir argiria, en pacientes diagnosticados se observa una coloración de piel gris azulada, causada por la acumulación de Ag en la dermis, también se puede observar una tonalidad más oscura que varía por la incidencia de la luz (EPA, 1980). En plantas se ha observado resistencia al incremento en el contenido de Ag en suelo, algunas plantas no suelen ser afectadas, ya que no es significativa la toxicidad y la reducción del crecimiento no suele ser reportada, pero en especies sensibles al contaminante llega a reducir el proceso de germinación, crecimiento, generación de raíces, entre otras muchas más funciones biológicas (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

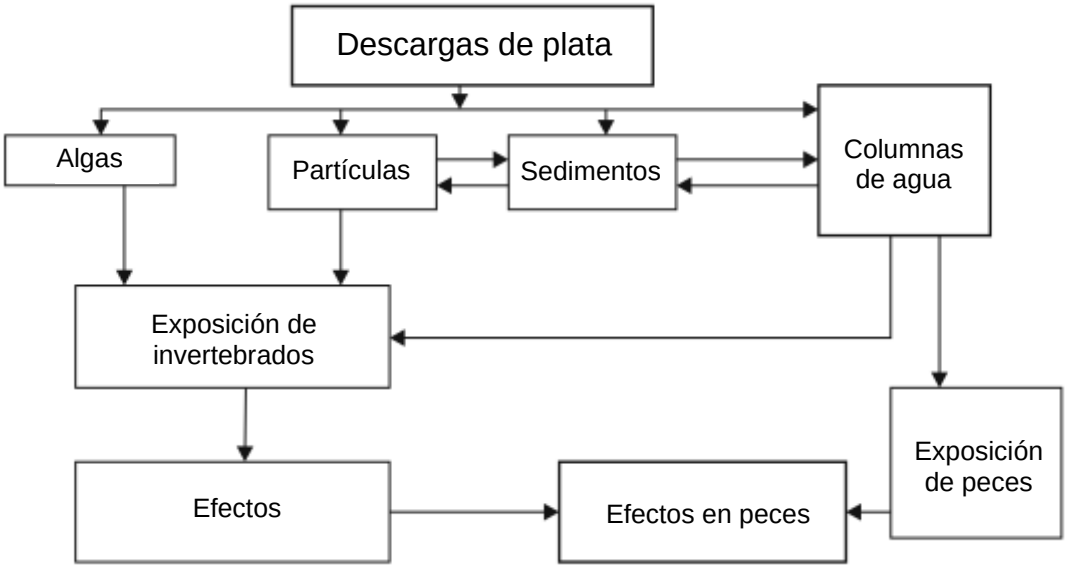


Figura 1. Modelo conceptual de transferencia de la plata a sistemas acuáticos. Modificado de Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019.

2.3 Translocación

Los suelos contienen MP por diversas fuentes, las partículas minerales son retenidas en el sustrato haciendo enlaces con el humus o la materia orgánica, y por la precipitación de los mismos; posteriormente que se encuentran añadidos y fijados en el suelo, están al alcance de las raíces de las plantas, donde parte de ellos son absorbidos por medio de las raíces, aunque muchos de estos elementos metálicos no se encuentren disponibles para las plantas llegan al interior de estas mediante rutas específicas que desarrollan estas especies (Singh *et al*., 2020). Por ejemplo, algunas plantas secretan componentes lipofílicos que incrementan la solubilidad de los MP, y en asociación con microorganismos pueden producir surfactantes (Barbasz *et al*., 2016; Siciliano & Germida, 1998). Los metales son absorbidos de la matriz del suelo a través de transportadores específicos en la membrana celular; en las células corticales de la raíz se captan de forma competitiva con otros elementos esenciales, posteriormente siguen rutas simplásticas y apoplásticas: los metales

son introducidos a las células de las raíz por las cargas negativas en los sitios de la pared celular, traslocada dentro del tejido, posteriormente algunas proteínas trasladan a los iones metálicos al xilema de la raíz, en el xilema se transportan a través de la transpiración (principalmente), por medio de la presión negativa que mueve el agua y los solutos (minerales) hacia la parte superior de la planta (Ameen *et al*., 2019; Page & Feller, 2015; Singh *et al*., 2020). Después de que los metales han sido absorbidos por la planta, se transportan a otros compartimientos celulares, incluyendo cloroplastos, mitocondrias y vacuolas, regularmente en su forma no tóxica. Esto ocurre por medio de enzimas o proteínas reguladoras, como la transportadora de zinc/hierro en los plasmodesmos (ZIPs), posteriormente se transportan por el xilema a las partes aéreas de la planta (Rai *et al*., 2020; Salt *et al*., 1995; Shahzad *et al*., 2016; Singh *et al*., 2020)

2.4 Toxicidad

Los efectos tóxicos de los MP son variados, causando daños en la biota y en la salud humana, teniendo diversas afectaciones, como daño en el ADN, efectos carcinogénicos, y en niños se ha observado daños neurológicos (Padmavathiamma & Li, 2007). Los organismos que están en contacto con los MP, tienen diversas respuestas ante el estrés, las cuales se presentan en cambios químicos, físicos o biológicos, ocasionando efectos adversos (Adriano, 2001). Derivado del estrés por el contaminante, se generan especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se forman principalmente en la mitocondria, cloroplastos, peroxisomas, apoplastos y otros sitios, encontrando al peróxido de hidrogeno (H_2O_2), superóxidos ($\bullet O_2$) y radicales hidroxilos ($HO\bullet$), estas moléculas se presentan cuando la planta u organismo tiene síntomas de toxicidad. Las ERO son moléculas altamente reactivas, que en ausencia de un sistema de defensa contra estas especies inducen diversos daños celulares, alterando las vías metabólicas, ocasionando cambios fisiológicos y morfológicos, observándose como una reducción del crecimiento, debido a las interacciones a nivel celular y molecular (Deriu *et al*., 2007; Liu & Yang, 2020; Weerakoon, 2019). El estrés oxidativo, causado por las ERO´s y algunos subproductos, pueden inducir modificaciones en los enlaces covalentes de las proteínas (proteínas oxidadas), las especies reactivas también realizan cambios en los sitios específicos de los aminoácidos, cambios en la fragmentación de péptidos, entre otras modificaciones (Sharma *et al*., 2012).

En plantas, las interacciones de elementos metálicos como las NPs tienen una influencia en el contenido y la actividad de algunas hormonas producidas por las plantas (fitohormonas), *eg.* los iones de Ag, inhiben la producción de etileno, tienen interacciones con el ácido indolacético (AIA) y el etileno (Bleecker & Kende, 2000). Además, los metales pueden causar estrés hídrico, afectando la transpiración y los estomas, provocando una disminución en el contenido de agua reduciendo el tamaño y la cantidad del tejido del xilema, también se ven afectados los cloroplastos y la elongación celular (Adrees *et al*., 2015). En resumen, la exposición de los organismos a los MP es de importancia crítica.

2.5 Remediación

En el empeño por resolver la problemática ante la contaminación, se han implementado diversas tecnologías con la finalidad de remediar los sitios contaminados (Mussali-Galante *et al*., 2019). Se define a la remediación como la limpieza, acción o intervención, que se aplica cuando existe una contaminación severa, la cual garantiza la corrección de medios contaminados, ayudando en la disminución de ambientes afectados y permitiendo así la

reducción de la toxicidad de los mismos, y reduciendo la movilidad del material xenobiótico (Adriano, 1986). Entre las tecnologías para tratar el problema de contaminación encontramos a los métodos físicos, químicos y biológicos, la adecuada selección del método a utilizar deberá ser seleccionada cuidadosamente para minimizar el impacto en el ecosistema. Un programa de remediación de suelos contaminados involucra diferentes etapas, en las que podemos encontrar: 1) la determinación del metal, la especiación, la relación y los mecanismos de transporte; 2) el desarrollo y la mejora de los métodos de recuperación de metales; y 3) el desarrollo y mejora de técnicas de inmovilización de metales (Ali *et al*., 2013). Anteriormente las tecnologías aceptadas y mayormente empleadas para tratar residuos peligrosos y remediar los suelos eran la excavación, incineración y disposición de tierras (Haferburg & Kothe, 2010; Mulligan *et al*., 2001; Nirola *et al*., 2016). Frecuentemente, la remediación de suelos contaminados con metales se realiza en el sitio contaminado (*in situ)*, entre las técnicas empleadas se encuentran la atenuación natural, extracción, y el empleo de plantas para extraer el contaminante (fitorremediación), estas plantas deben ser acumuladoras o hiperacumuladoras. En general, la remediación *in situ,* empleando la fitorremediación es más eficiente en cuanto a costos, comparado con los métodos tradicionales (Hameed *et al*., 2016; Johnson, 2013; Nirola *et al*., 2016).

2.5.1 Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos son aquellos que requieren de la aplicación *in situ*, deben estar en contacto con el contaminante y el suelo. Algunos métodos son: a) la vitrificación, en esta técnica se emplea el calentamiento o la aplicación de calor en el área contaminada, también suele aplicarse en material de descomposición de minas, se deja de aplicar calor hasta el punto de producir una masa fundida que se endurezca y se obtenga un material similar al vidrio, el proceso de calentamiento se da por la quema de gas, o la aplicación de una corriente eléctrica, incluso la aplicación de plasma que alcance una temperatura de 2000°C; b) encapsulación, es un proceso que se aplica en pequeñas áreas afectadas, consiste en cubrir el sitio con una capa de material impermeable o levemente permeable; c) lavados, esta clase de métodos se realiza de manera *ex situ*, aplicando diversas soluciones hasta retirar el contaminante (o la mayoría de éste); d) extracción, se realiza el secuestro del contaminante utilizando ácidos o soluciones quelantes; por último, e) la electrocinética, consiste en la inducción de una corriente en el área que resulta en la migración de los iones del contaminante (Ali *et al*; 2013; Gangwar *et al*., 2014). Sin embargo, la mayoría de las técnicas físicas tienen limitaciones, debido a sus elevados costos, la necesidad de gran número de personal por su labor intensiva, y cambios irreversibles en las propiedades del suelo, así como disturbios en la microflora del mismo (Ali *et al*., 2013).

2.5.2 Tratamientos químicos

Los métodos químicos, como su nombre lo indica, utilizan compuestos químicos para la eliminación de los contaminantes, estos también se realizan *in situ*. Entre los métodos químicos se encuentran: a) neutralización, tratamiento de suelos alcalinos o ácidos para llegar a un pH neutro; b) solidificación, es la adición de un agente cementante, el cual produce un material duro y no poroso que evita la lixiviación; y c) estabilización, adición de componentes que inducen la inmovilización de los contaminantes, que inducen sorción/precipitación (Gangwar *et al*., 2014). Pero estos métodos pueden crear problemas de contaminación secundarios, además de disturbios similares a los tratamientos físicos (Ali *et al*., 2013).

2.5.3 Tratamientos biológicos

Ante la necesidad de emplear métodos efectivos, de costo accesible, que sean eficientes, y amigables con el ambiente, se han desarrollado y estudiado los métodos biológicos, que hacen empleo de organismos vivos, tolerantes a los xenobióticos para remediar las áreas afectadas. Entre los métodos encontramos a la biorremediación, técnica en la cual se emplean organismos como hongos, bacterias, así como consorcios de estos, capaces de acumular, degradar o estabilizar contaminantes, por otro lado, tenemos a la fitorremediación, la cual hace uso de plantas tolerantes que cuentan con diversos mecanismos que han ido desarrollando naturalmente, las cuales pueden bioacumular (fitoextracción) e incluso volatilizar contaminantes. El incorporar vegetación a un lugar que es afectada por contaminantes y que carece de ella, se denomina revegetación y esta acción puede ayudar a estabilizar el sitio, siendo la cubierta vegetal, en muchos casos, nativa del lugar (Gangwar *et al*., 2014; Haferburg & Kothe, 2010; Narayanan *et al*., 1995)

2.5.3.1 Fitorremediación

La fitorremediación es un método que hace referencia al empleo de plantas, ya sea asociadas o no con microorganismos, que se ha implementado para tratar sitios contaminados y para recuperar el ambiente, reduciendo las concentraciones o elementos tóxicos presentes en el área afectada (Ali *et al*., 2013; Weerakoon, 2019). Las plantas tienen una sorprendente habilidad de extraer y acumular contaminantes y de esa forma detoxificar el ambiente, pudiendo acumular o híperacumular contaminantes, removiéndolos del ambiente; adicionalmente y en contraste con otros métodos, la fitorremediación es amigable con el medio ambiente y con un costo accesible (Peuke & Rennenberg, 2005; Rai *et al*., 2020). Se han estudiado plantas con la capacidad de hipeacumular metales y metaloides (Padmavathiamma & Li, 2007; Weerakoon, 2019). Entre las técnicas que las plantas emplean se encuentran: 1) la fitoestabilización, utilizando mecanismos para atenuar contaminantes, previniendo la erosión del suelo y evitando la translocación o movilización del contaminante a otros ecosistemas, empleando compuestos químicos y complejos enzimáticos; 2) fitoinmovilización, proceso en el cual se previene el movimiento, la migración y el trasporte del contaminante; 3) fitoextracción, absorbe los metales del suelo, junto con algunos constituyentes orgánicos, el proceso comienza en la absorción de estos por medio de las raíces, posteriormente son movilizados a la parte aérea; 4) fitodegradación, involucra el consumo y la degradación de contaminantes orgánicos que se lleva a cabo en el interior de la planta, esta estrategia puede realizarse cuando la planta tiene una asociación con microorganismos que le ayudan a transformar los xenobióticos, generalmente ocurre en la rizosfera; 5) fitoacumulación, algunas especies vegetales tiene la capacidad natural de acumular los elementos tóxicos en sus tejidos (Gangwar *et al*., 2014).

2.6 Nutrición de la planta

Los seres vivos requieren de diversos factores para sus necesidades biológicas, factores como la luz, dióxido de carbono (CO_2), agua y nutrientes (minerales), son requeridos para el crecimiento de las plantas, todos estos elementos son empleados para sintetizar componentes que necesitan para su desarrollo. El 90% de la planta está constituido por componentes orgánicos como la celulosa, lípidos y proteínas (Engels *et al*., 2011). Pero dentro de la nutrición de la planta encontramos a los minerales, los cuales se dividen en macronutrientes y micronutrientes, denominados así por las concentraciones en las cuales

son requeridos, estos, se encuentran de forma natural en el sustrato y son absorbidos por las plantas a través de las raíces (Bell & Dell, 2008; Kirkby, 2012). De los metales que requieren las especies vegetales encontramos al hierro, zinc, manganeso, níquel y cobre, los cuales son necesarios en el funcionamiento, ya que tienen una participación como cofactores para algunas enzimas, sin embargo estos elementos son requeridos en bajas concentraciones, perteneciendo al grupo de los micronutrientes, por lo cual su funcionamiento biológico está dado por su concentración, cuando ésta última llega a aumentar significativamente produce efectos tóxicos (Gangwar *et al*., 2014; Römheld, 2012).

2.6.1 Micronutrientes

Los micronutrientes, llamados así por la concentración en la que se encuentran en las plantas, debido a que se requieren en pequeñas cantidades, son elementos esenciales y componentes requeridos para los organismos, principalmente porque son constituyentes predominantes de las enzimas. Entre los micronutrientes se encuentran el hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno, boro, cloro, molibdeno y níquel. Sin embargo, los elementos pueden variar dependiendo de la planta analizada, ya que en algunos casos los metales pesados pueden ser requeridos por la planta a muy bajas concentraciones (Brennan *et al*., 2019; Clemens, 2019; Engels *et al*., 2011; Kirkby, 2012), la deficiencia de la disponibilidad y la concentración de estos elementos en las plantas repercuten en el crecimiento normal de la especie, disminuyendo su tamaño, el rendimiento, la biomasa, entre otros aspectos (Shahid *et al*., 2015; Van Maarschalkerweerd & Husted, 2015).

a) Cobre

El Cu es uno de los micronutrientes esenciales, siendo constituyente de varias enzimas, además de que activa varias de éstas, involucrado en la fotosíntesis, formación de la semilla y en la respiración, encontrándolo en su forma de catión Cu^{2+}. Se requiere en bajas concentraciones, entre 5 a 20 mg L^{-1} en los tejidos vegetales, mientras que en concentraciones < 4 mg L^{-1} se considera deficiencia y mayor a 20 mg L^{-1} es considerado tóxico (Adriano, 2001; Rehman *et al*., 2019). La acumulación de este elemento se concentra en los cloroplastos, componente de la plastocianina, involucrada en el transporte de electrones del FS II, además participa en la respuesta ante estrés oxidativo, así como en la señalización ante estrés abiótico (Brennan *et al*., 2019; Maksymiec, 1997).

La deficiencia de este mineral, afecta diversos procesos fisiológicos, el metabolismo del nitrógeno (fijación del N_2, síntesis y degradación de proteínas), el metabolismo de los carbohidratos (fotosíntesis, respiración y distribución de los carbohidratos), también hay alteraciones en los procesos que tienen lugar en la pared celular (especialmente en la síntesis de la lignina), la relación del agua, así como la producción de semillas (viabilidad del polen) y la resistencia a enfermedades. Cuando presentan deficiencia de Cu, se ha observado en algunas especies vegetales, la presencia de clorosis, necrosis, distorsión de las hojas y la muerte de las especies, estos síntomas aparecen en primera instancia en hojas jóvenes (Adriano, 2001; Ameen *et al*., 2019; Brennan *et al*., 2019). La deficiencia de Cu^{2+}, se relaciona con la competencia de otros elementos divalentes, principalmente con el Fe^{2+} (Schmidt *et al*., 1997).

b) Manganeso

El manganeso es un micronutriente esencial, la forma más común en la que se encuentra es el catión Mn^{2+}, debido a esto, puede ocupar fácilmente el lugar de otros cationes divalentes, como el Fe^{2+} y Mg^{2+} (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019). En su participación en varias funciones encontramos que tiene asociación cercana con el Fe, esto se aprecia en la formación de clorofila, es activador de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos orgánicos, el fosforo (P), nitrógeno, y en plantas superiores participa en la conversión de nitrato a amonio. Su función y/o participación más conocida está en el proceso de fotosíntesis, este mineral ayuda en el transporte del O_2 a los cloroplastos, también se ha observado que la enzima S contiene 4 átomos de Mn, los cuales son transferidos al fotosistema II (FS II). Su participación también radica en la activación de enzimas involucradas en el ciclo del ácido carboxílico y el metabolismo de los carbohidratos, en estos procesos puede ser reemplazado por el Mg, y en otras ocasiones el manganeso puede remplazar al Fe (Adriano, 2001; Carrasco-Gil *et al*., 2018; Shahid *et al*., 2015).

La concentración de Mn en plantas difiere en las etapas de crecimiento y/o periodo vegetativo de las mismas, incrementando usualmente en las partes maduras. Cuando existe una deficiencia de manganeso de observan síntomas como la clorosis intervenal, donde las venas cambian su coloración a negro, se presenta en primer lugar en hojas jóvenes, posteriormente el follaje vira a un color amarillo por completo, en ocasiones, la deficiencia de Mn se suele confundir con la disminución de Fe, Mg o N. Por otro lado, la bioquímica del Mn está controlada por la interacción con otros elementos, en particular el Fe y Co (Adriano, 2001; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019; Millaleo *et al*., 2010).

c) Hierro

El Fe es uno de los metales más importantes, y uno de los mayores constituyentes de la litosfera. En las plantas tiene funciones metabólicas, en diversos estudios se muestra que es el metal clave para la trasformación de energía que necesitan en la síntesis y otros procesos celulares, como la formación de clorofila y la transferencia de electrones, también está implicado en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Ding *et al*., 2018; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

La mayoría de los elementos que son esenciales para las plantas están relacionados con la presencia o la concentración de otro elemento (micronutriente), tal es el caso del hierro, por ejemplo, un exceso de Mn, Ni y Co reducen la absorción y translocación del Fe, y esto se ve reflejado en la reducción del nivel de clorofila, en el caso contrario, cuando se encuentran altos niveles de Fe la concentración de los micronutrientes, como el Ni, Mn y Co, se ven afectados, disminuyendo su concentración, lo mismo ocurre con otros minerales que están relacionados o que llegan a interactuar con el Fe, por ejemplo el potasio (K), calcio (Ca) y el azufre (S), donde una disminución de K puede generar toxicidad por Fe, debido a la oxidación interrumpida de Fe^{2+} a Fe^{3+}, en el caso del Co, este llega a suprimir la disponibilidad de Fe, causando clorosis, por ultimo las interacciones Fe-S tiene el mismo efecto que el Ca, se observa una baja disponibilidad de Fe (Abadía *et al*., 2011; Carrasco-Gil *et al*., 2018; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

d) Zinc

El Zn es un elemento divalente, que tiene una densidad de 7.13 g cm^3, debido a esta característica se considera un MP, pero las concentraciones en las que se han encontrado en las plantas son muy bajas. El zinc está involucrado en un gran número de enzimas (metalo-enzimas), como lo son las deshidrogenasas, proteinasas, peptidasas y fosfohidrolasas y participa en la síntesis de proteínas, además de que es esencial para la estabilización de ribosomas citoplasmáticos y para la formación de ribosomas, también cataliza procesos de oxidación en la membrana en células de la raíz, tiene influencia en la permeabilidad de la membrana y estabiliza los componentes celulares, participa en la síntesis de la auxina AIA, y en la trasformación de carbohidratos (Adriano, 2001; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

La participación del zinc también se ve implicada en la estimulación para la resistencia de la planta en condiciones no favorables, como la sequía y enfermedades causadas por bacterias y hongos. La deficiencia de este mineral se considera cuando tiene una concentración por debajo de los 20 mg L^{-1}, por otro lado los efectos tóxicos se observan cuando supera los 300-400 mg L^{-1}, lo cual depende se los requerimientos de cada especie (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019).

2.7 Sistemas de defensa de la planta

Los procesos de detoxificación van desde enlaces en las paredes celulares, exudación de compuestos quelantes, absorción de metales, así como moléculas quelantes que secuestran y transportan a los MP dentro de las vacuolas. Las plantas que toleran estas condiciones de estrés, secuestran el metal almacenándolo en sus tejidos, lo que les permite sobrevivir, y reciben el nombre de acumuladoras o metalo-tolerantes (Peuke & Rennenberg, 2005), o la denominación de hiperacumuladoras. Ante el estrés oxidativo que provocan los MP en las plantas, estas han desarrollado diferentes sistemas antioxidantes que incluyen enzimas y biomoléculas como el α-tocoferol y ácido ascórbico, para atenuar las ERO, se ha visto la participación de glicoproteínas, que catalizan la oxidación de varios sustratos orgánicos e inorgánicos, convirtiendo el H_2O_2 a H_2O, el glutatión (GSH), fenoles, ascorbato, entre otros, y mecanismos enzimáticos, como la CAT, SOD, GST, etc. (Deriu *et al*., 2007; Singh *et al*., 2015), estas enzimas juegan un papel importante en la homeostasis de las células (Liu & Yang, 2020) (Fig. 2).

Algunas biomoléculas no enzimáticas donan un electrón o protón (según sea el caso) para estabilizar los radicales de las ERO´s, como el ascorbato y el GSH, o actúan como quelantes para inhibir la lipoperoxidación, como es el caso de los fenoles, por mencionar algunos mecanismos. Mientras que los mecanismos enzimáticos juegan un papel fundamental en la defensa contra las ERO, por ejemplo, la SOD cataliza los súper óxidos ($O°_{-2}$) a compuestos menos tóxicos como el peróxido de hidrogeno y agua, esta enzima tiene varias isoformas, como la Fe-SOD, la Mn-SOD y la Cu/Zn-SOD, por otro lado, la APX tiene una alta afinidad por el H_2O_2, convirtiéndolo a una forma menos toxica, como es el H_2O, mediado por el ascorbato (Foyer & Halliwell, 1976; Fridovich, 1989; Noctor & Foyer, 1998; Rao *et al*., 2006; Young, 1991). Los mecanismos de defensa, también se encuentran extracelularmente, en la micorriza, donde se excretan exudados a través de las raíces, incluso las plantas pueden llegar a alterar el pH de la rizosfera y desarrollar una barrera rédox, constituyendo algunas de las primeras restricciones para la entrada de MP (Singh *et al*., 2020).

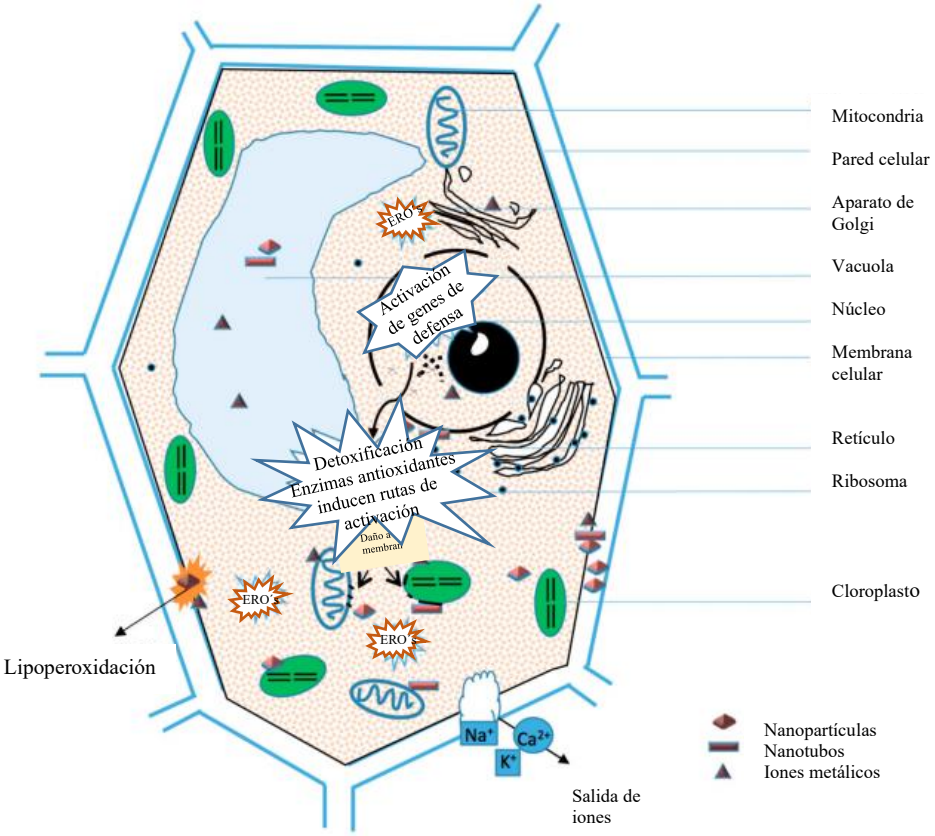


Figura 2. Mecanismos de defensa de la célula vegetal ante agentes estresantes, como iones metálicos, nanotubos y NP. Modificado de Yang et al., (2017).

2.8 Biotecnología vegetal

La biotecnología aprovecha la capacidad metabólica de los organismos empleados en diferentes sistemas para resolver problemas (Mussali-Galante *et al*., 2019). Dentro de la biotecnología encontramos a la biotecnología vegetal, la cual se basa en el empleo de plantas, abarcando técnicas agronómicas, hortícolas, y cultivo *in vitro* de tejidos o de órganos vegetales (Smith, 2013).

La biotecnología vegetal, emplea técnicas modernas, haciendo uso de plantas completas o sus partes, incluso de células, para producir, o mejorar características que se desean y que son de utilidad en la agricultura, biodiversidad, alimentación, problemas ambientales, etc. (Cabrera, 2009). Dentro de esta disciplina encontramos dos ramas fundamentales la cual es la ingeniería genética de plantas y el CTV (Arizmendi, 2019). Algunos ejemplos son la producción de plantas tolerantes a condiciones adversas, como sequías, estrés hídrico y salino, altas y bajas temperaturas, así como resistencia a herbicidas, plagas, y la mejora en el contenido de nutrientes, como el aumento de la concentración de zinc en granos, el contenido de proteínas, etc. (Cabrera 2009).

2.9 Cultivo de tejidos en estudios de fitorremediación

Estudios desarrollados en fitorremediación, normalmente se realizan bajo condiciones de campo, sin embargo, estos procesos suelen ser lentos, y no es posible controlar factores como la iluminación, atmósfera y temperatura; mientras que los estudios establecidos en invernadero y otros sistemas, como la hidroponía, se centran en la relación entre la concentración de los metales en el medio de crecimiento (sustrato) y las plantas (Adriano, 2001), sin embargo, estos sistemas permiten la interacción con microorganismos que se encuentran en el sustrato donde se desarrolla la especie vegetal, por lo que se desconoce el potencial intrínseco vegetal, es por ello que se ha optado por el empleo de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales (CVT) (Nirola *et al*., 2016). El CTV, es una técnica que permite el crecimiento de células, tejidos, órganos, en un medio que le proporciona nutrientes en ausencia de microorganismos, el cual se basa en la totipotencialidad celular, es decir, una célula es capaz de crecer y diferenciarse hasta formar un organismo completo (Cabrera, 2009; Thorpe, 2013). El crecimiento de los tejidos vegetales se realiza *in vitro*, donde se pueden minimizar variables, como los factores ambientales de temperatura, intercambio gaseoso, iluminación y nutrición (Staba, 2000). El CTV comprende el establecimiento de un explante vegetal, que consiste en una porción de tejido proporcionado por una planta madre o donadora, en condiciones asépticas y controladas; el éxito de este método ha permitido el establecimiento y fitomejoramiento de especies (Cabrera, 2009; Thorpe, 2013).

Santos *et al*., (2010), emplearon cultivos en suspensión de *Medicago sativa* L., los cuales fueron expuestos a 1, 10 y 100 nM de QD (Quantum Dots; nanocristales semiconductores inorgánicos) de CdSe/ZnS (metales pesados) recubiertos con ácido mercaptopropanoico. En la presencia de 1 nM de QD se observó una respuesta cito-oxidativa, mientras a 100 nM de QD se observó citotoxicidad y reducción del 6% en la viabilidad celular a las 24 h de exposición, a las 72 h se formaron pequeños agregados y el 50% de las células eran viables, a los 8 días de la adición de los QD se redujo la biomasa en comparación al control, cerca de la mitad de las células observadas no eran viables. Por otro lado, Zuverza-Mena *et al*., (2016), realizaron un estudio con semillas de rábano, germinadas *in vitro*, expuestas a soluciones de 0, 125, 250 y 500 mg L^{-1} de NPsAg durante 8 días. En los tratamientos se observó un aumento del 3% en la germinación y una disminución del 3 y 6% de menor a mayor concentración respectivamente, mientras que la acumulación de Ag dependía de la concentración a la que estuvo expuesta, es decir, los tratamientos con 125 y 250 mg L^{-1} acumularon 114 y 204 mg Ag L^{-1}, PS, y en el tratamiento de 500 mg Ag L^{-1} se observó una mayor acumulación (900 mg Ag L^{-1}), así como también la elongación de raíces y hojas se vio disminuida, y la concentración de macro y micronutrientes se vio afectada, en el caso del Ca y el Mg se observó una reducción del 20 y 10% para el tratamiento de 250 mg Ag L^{-1} y 33 y 19% en el tratamiento de 500 mg Ag L^{-1}, respectivamente, para cada elemento; por otro lado, los micronutrientes B, Mn y Cu disminuyeron en todos los tratamientos con respecto al control, mientras que el Zn disminuyo solo en el tratamiento con 500 mg L^{-1}.

Barbasz *et al*., (2016), estudiaron los efectos de NP y iones de plata en células de callo de dos variedades de *Triticum aestivum* L. Rarábola; tolerante al estrés oxidativo y Raweta, una especie susceptible al estrés. Las concentraciones empleadas fueron 0, 20, 40 y 60 ppm de NPAg o $AgNO_3$ (como fuente de iones). En altas concentraciones para ambas variedades de *T. aestivum* se observaron malformaciones de las células, siendo más cortas e hinchadas que las células de callo control (sin Ag), así como el aumento del contenido de malondialdehído (MDA) y prolina en los tratamientos que contenían ≤ 40 ppm de Ag, de

igual manera la concentración de enzimas antioxidantes se vio afectada por la presencia del metal, en la variedad Rarábola aumentó la concentración de la peroxidasa en los tratamientos con Ag, y para Raweta se observó un aumento en la SOD y POX. Torres Ruíz, en el 2017, expuso cultivos de callo de *Medicago sativa* en condiciones *in vitro* a 0, 25, 50, 100 y 250 ppm de Ag, durante 30 y 60 días, observando que la actividad antioxidante y la producción de metabolitos como fenoles se vieron estimulados, además, después de una semana de incubación, la coloración del callo se tornó de verde a amarrillo, mencionando que es un síntoma que presentan algunas plantas expuestas a metales pesados.

Los estudios *in vitro* pueden proveer información sobre el potencial de las plantas fitoremediadoras, así como la interacción de los efectos estresantes en el metabolismo, enzimas específicas y metabolitos involucrados en la respuesta ante los contaminantes (Mohamed & Sabeera, 2019), es por ello que el establecimiento de estos modelos de investigación resultan de suma importancia.

2.10 *Medicago sativa* **L**

La posibilidad de aplicar técnicas para tratar los problemas de contaminación, así como la necesidad de atenuar los contaminantes, como los metales pesados, ha conducido al estudio de diversas especies vegetales, siendo descritas alrededor de 157 especies, en las cuales se ha observado la tolerancia a MP, entre ellas se encuentran especies forrajeras, arbustos, arboles, plantas acuáticas, entre otras. Dentro de las especies estudiadas encontramos a las leguminosas, las cuales tienen un rol importante en la fijación de nitrógeno al suelo, esta característica les da la capacidad de sobrevivir en suelos infértiles, aportando este elemento y haciendo más fértil el sustrato en el que se encuentran, además, este grupo presenta tolerancia a sequías (Nirola *et al*., 2016). Las leguminosas son superadas solo por las gramíneas, en su importancia para los humanos. Entre las especies que conforman a la familia de las leguminosas podemos encontrar a *Medicago sativa*, conocida comúnmente como alfalfa, la cual se considera una fuente potencial para la eliminación y recuperación de iones metálicos como los metales pesados, además, se caracteriza por mostrar un buen crecimiento en suelos contaminados (Cheng *et al*., 2019).

M. sativa L., es una especie perene, de raíces profundas, valorada mundialmente como especie forrajera por su alto valor nutricional, contiene de 16 a 22% de proteína cruda total (Xiong *et al*., 2017). La alfalfa ha sido empleada como modelo de estudio para monitorear diferentes tipos de estrés, como el hídrico, salino, así como la baja disponibilidad de nutrientes, y presencia de contaminantes (Babakhani *et al*., 2011; Liu *et al*., 2019). Se ha observado que *M. sativa* ante la presencia de contaminantes, desencadena la expresión de mecanismos de defensa como la producción de enzimas (*e.g.* ascorbato peroxidasa), de igual manera se ha estudiado la expresión de genes que están relacionados con la capacidad detoxificante (Zhang *et al*., 2018). La gran capacidad de tolerar diversos tipos de estrés abióticos, ha permitido que *M. sativa* sea catalogada como planta fitorremediadora, la cual ha tenido reportes de acumulación de diversos metales como Pb, Cd, Cu, Zn y Ni, siendo una planta frecuentemente empleada (Nirola *et al*., 2016; Peralta-Videa *et al*., 2002). También, se ha estudiado su capacidad para la fitoestabilización de metales presentes en suelos mineros generalmente ácidos, debido a que *M. sativa* es capaz de sobrevivir en condiciones adversas, además de que ayuda a estabilizar el pH del suelo a través de la fijación de nitrógeno, así como su capacidad para la estabilización de metales presentes en suelos (Midhat *et al*., 2018).

Gardea-Torresdey *et al*., (2003), reportan que *M. sativa* crecida *in vitro* con diferentes concentraciones de $AgNO_3$ (0-320 mg L^{-1}), después de 9 días es capaz de sintetizar nanopartículas de plata. Mientras que, en otro estudio, se reporta que semillas de *M. sativa* fueron germinadas en sustrato adicionado con diversos metales (Cd, Cu y Zn; 500 mg L^{-1}), observándose que no se inhibió la germinación y que la edad de la planta se correlacionaba con la absorción del metal, la mayor acumulación fue para Cd con 4650 mg kg^{-1} y 1209 mg kg^{-1} (PS), en raíz y en la parte aérea, respectivamente (Peralta-Videa, *et al*., 2004). Mientras que en cultivos hidropónicos de *M. sativa* con Cd (5-20 mg L^{-1}) y Pb (50-200 mgL^{-1}), acumulando hasta 200 mg Cd kg^{-1}, y 600 mg Pb kg^{-1} (Niu *et al*., 2007). En otro estudio, Hegazy *et al*., (2014), expusieron tejido callogénico (células desdiferenciadas) de *M. sativa*, a nitrato de plata, obteniendo nanopartículas y una acumulación de 550 µg Ag kg^{-1}, a pH 7, observando que variando el pH se inducen diferencias en el tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas. En el 2015, López *et al*., estudiaron los efectos del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el AIA sobre la absorción de Pb (0.2 mM) en plantas de *M. sativa* en condiciones de hidroponía durante 10 días, observaron una mayor acumulación en raíces (70 g Pb kg^{-1}, PS), mientras que el tallo contenía 11 g Pb kg^{-1} (PS). Por su parte, Dai, *et al*., (2015), evaluaron diferentes variedades de *M. sativa* (Aohan, Golden, Empres, Sanditi y Longxi), cultivadas en invernadero, adicionadas con Zn (300-900 µM), durante 23 días, la variedad Aohan presento la mayor acumulación tanto en tejido de hojas y raíz, con 273.06 y 229.06 mg kg^{-1}, respectivamente, sin embargo, la exposición a Zn mostro cambios fisiológicos, como el aumento de MDA, peróxido de hidrogeno (H_2O_2), así como el aumento en la actividad enzimática. Por su parte, Kabir *et al*., (2016), reportaron cambios morfológicos en plantas completas de *M. sativa,* sometidas a estrés por Cd, generando la disminución en la longitud de raíz, perdida de biomasa, así como la disminución del contenido de clorofila y del contenido proteico. En un estudio con semillas germinadas en distintas soluciones de Cu (25-75 mgL^{-1}), se observó reducción en la elongación de la raíz y en la absorción de macro y microelementos (Ca, K, Mg, P, Zn y Mn) (Cota-Ruiz, *et al*., 2018). También se ha evaluado la respuesta de *M. sativa* a Ni (0-500 $mgkg^{-1}$) durante 60 días, la máxima concentración reportada fue de 21.93 y 75.2 $mgkg^{-1}$, en tallos y raíces respectivamente, a 500 mg kg^{-1}, además, la exposición a Ni, disminuyo el crecimiento (33-32%), el contenido de clorofila, y la actividad peroxidasa, pero se incrementó la expresión de genes (Helaoui, *et al*., 2020). Sin embargo, de nuestro conocimiento, no existen reportes para *M. sativa* sobre el efecto de la plata en el contenido de micronutrientes.

3 OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto del estrés por plata, en la concentración de micronutrientes y la capacidad de acumulación del metal, en cultivos de células en suspensión de *Medicago sativa.*

3.1.1 Particulares

a) Caracterizar el patrón de crecimiento en cultivos de células en suspensión de *M. sativa* expuestos a 0.0 y 50 µM de Ag, a través del tiempo.

b) Caracterizar el patrón de la acumulación de Ag en cultivos de células en suspensión de *M. sativa* expuestos a 0.0 y 50 µM de Ag, a través del tiempo.

c) Determinar el efecto del estrés por plata en el contenido de microelementos de los cultivos celulares expuestos a 0 y 50 µM de Ag, a través del tiempo.

4 HIPÓTESIS

Cultivos *in vitro* de células en suspensión de *M. sativa* tendrán la capacidad de acumular plata, sin embargo, estarán sujetas a estrés, lo que se reflejará en una alteración en la concentración de microelementos esenciales (Zn, Cu, Fe y Mn).

5 METODOLOGÍA

5.1 Obtención y proliferación de biomasa de *M. sativa*

Cultivos de células en suspensión crecidos en medio Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 1.56 mg L^{-1} de BAP (6-bencilaminopurina), 1 mg L^{-1} de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y 30 g L^{-1} de sacarosa, fueron proliferados para obtener la biomasa necesaria para el bioensayo de tolerancia y acumulación.

5.2 Formulación del medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo MS se reformuló de acuerdo a Torres Ruíz (2017), debido a que el $AgNO_3$ como fuente de iones Ag para la inducción de estrés, tiende a reaccionar con los compuestos clorados, provocando que la plata precipite y no se encuentre biodisponible. Por ello, se remplazaron los compuestos clorados por sales equivalentes que no involucran cloro en su composición. La sustitución se realizó manteniendo el mismo balance de elementos que la formulación original del medio MS. También, durante el proceso de elaboración del medio de cultivo se evitó su exposición a la luz, debido a que el nitrato de plata es fotosensible. El medio de cultivo fue inoculado con 2 g de biomasa (peso fresco; PF), los cultivos se incubaron durante 21 días a 25 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz, a 110 rpm. Al término del ciclo de cultivo, las células se transfirieron a matraces con medio fresco y fueron cultivadas en las mismas condiciones.

5.3 Bioensayo de inducción de estrés por Ag en cultivos de células en suspensión de *M. sativa*

El bioensayo de estrés a Ag, se realizó en matraces de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo MS modificado en su formulación (MSm) y elaborado con agua desionizada, suplementado con 1.56 mg L^{-1} de BAP, 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 30 g L^{-1} de sacarosa, y adicionado con 0 y 50 µM de $AgNO_3$, e inoculados con 2 g de biomasa (PF), los cuales se incubaron por 21 días, a 25 °C bajo un periodo de 16 horas luz a 110 rpm. Se cosecho la totalidad de la biomasa producida de cada matraz por filtración al vacío, cada tercer día, y las células se lavaron con agua desionizada, y con una solución de EDTA 10 mM de manera alternada con el fin de eliminar las trazas de metales adsorbidos, enseguida se registró el peso (PF) y posteriormente las células fueron secadas por 72 h en horno a 60 °C, al término del periodo se registró el peso seco (PS). Se evaluó el crecimiento celular con la determinación del PS, y los parámetros cinéticos; velocidad de crecimiento (µ) (ecuación de la recta) y tiempo de duplicación (td) (Ecuación 1). El experimento se realizó por duplicado.

Ecuación 1. $$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

5.4 Digestión de biomasa vegetal

500 mg de biomasa seca de *M. sativa,* previamente pulverizada con ayuda de un mortero, se colocó en un tubo de teflón, al cual se le adicionaron 10 mL de una mezcla de ácido nítrico-agua (5:4), las muestras fueron sometidas a digestión ácida asistida por microondas (Multiwave Go, Anton Paar, Australia). Se evaluó el método “Organic A”, cargado desde fabricación en el equipo (Org-AO), y una modificación (Org-AM),

incrementando la temperatura a 190 °C en lugar de 180 °C, con la finalidad de obtener una muestra completamente digerida, con apariencia cristalina y sin mostrar precipitados. Al término del proceso de digestión, las muestras se filtraron con membranas de 0.42 µm (Pall Corporation, EU), enseguida las muestras se llevaron a un volumen de 10 mL con H_2O desionizada, por último, las muestras digeridas fueron almacenadas en frascos de polietileno de alta densidad a 4 °C. Las digestiones se realizaron por duplicado. Todo el material empleado para la determinación se lavó con una solución de detergente no iónico seguido de su inmersión en una solución 0.1 M de HNO_3 durante 12 h.

5.5 Análisis del contenido de metales por espectrofotometría de absorción atómica

A las muestras digeridas de acuerdo a la subsección previa, se les determinó el contenido de Ag, así como de los micronutrientes Fe, Zn, Cu y Mn, en un espectrofotómetro de absorción atómica SavantAA (GBC, Australia). Dependiendo de la concentración de los elementos (ppm o ppb) se analizaron por el método de horno de grafito o por flama. Empleando curvas de soluciones estándar para cada metal a partir de soluciones stock (J.T. Baker, EU). Los elementos fueron leídos con lámparas de cátodo hueco (Photron Lamps, Australia), a sus respectivas longitudes de onda. Antes de cada determinación las muestras fueron atemperadas. Para el método de flama se utilizó el quemador aire-acetileno, con una toma de muestra de 3 mL por minuto, mientras que por el método de horno de grafito se empleó gas argón, utilizando un volumen de 20 µL por cada quema. Derivado de la exposición a la Ag, se calculó el factor de bioconcentración (FBC) (Ecuación 2) y el contenido de microelementos esenciales. Cada lectura se realizó por duplicado. Todo el material empleado para la determinación se lavó con una solución de detergente no iónico seguido de su inmersión en una solución 0.1 M de HNO_3 durante 12 h.

Ecuación 2.
$$FBC = \frac{[Ag]\ en\ células\ en\ suspensión}{[Ag]\ en\ el\ medio\ de\ cultivo}$$

5.6 Análisis estadístico

Todos los datos registrados fueron sujetos a una prueba de T o un análisis de varianza, usando el software estadístico STAT GRAPHICS Centurion XVI. Para la comparación de medias se empleó la prueba LSD ($p \leq 0.05$).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto del estrés por Ag en el crecimiento de cultivos de células en suspensión de *M. sativa*

En el presente estudio, cultivos de células en suspensión de *M. sativa* fueron expuestos a 50 µM de Ag en forma de $AgNO_3$. En términos generales, los cultivos mostraron una disminución en el crecimiento celular en comparación con el tratamiento control (en ausencia de Ag). En los primeros días de la cinética (0-14 d), la tendencia en el crecimiento de ambos tratamientos se observa similar, no mostrando diferencias significativas. A partir del día 16, se observa que en el tratamiento conteniendo Ag disminuye significativamente su crecimiento, lo cual se mantiene y se magnifica al aumentar los días de exposición al metal, mostrando la máxima disminución en el crecimiento (30%) en el día 21, en comparación con el tratamiento control (**Fig. 3**), registrando un peso de 17.299 y 12.110 g biomasa (PS) L^{-1} medio, para el tratamiento control y el tratamiento con Ag, respectivamente. La disminución del crecimiento en los cultivos expuestos a plata puede deberse a que la presencia de metales pesados, como la plata, provoca la producción de EROs, lo que conduce a un estrés oxidativo, induciendo alteraciones en las actividades enzimáticas, en particular en las que tienen actividad antioxidante (Deriu *et al*., 2007). En la literatura se encuentran reportes sobre la inhibición del crecimiento en diferentes especies de plantas que fueron expuestas a Ag, atribuyéndolo a la toxicidad del metal (Hossain *et al*., 2015; Oukarroum *et al*., 2013), dado que este metal ocasiona la alteración de diferentes mecanismos celulares, que indudablemente son dañados y conduce a la muerte celular, entre ellos se ha reportado la inhibición de la ribulosa-5-fosfato (Rubisco), una baja capacidad fotoprotectora del fotosistema II (FS II), como se observó con *Spirodela polyrhiza* (Jiang *et al*., 2017), estas afectaciones reducen la actividad fotosintética e inhibición del crecimiento (Da Costa & Sharma, 2016; Li *et al*., 2016; Sharma, 2007).

En condiciones *in vitro* se ha evaluado el efecto de la Ag, como el trabajo reportado por Torres Ruíz, (2017), quien realizó un estudio empleando tejido callogénico de *M. sativa*, utilizando $AgNO_3$ como fuente del metal, en concentraciones de 0-500 mg L^{-1} de Ag, observando que al transcurrir una semana de cultivo, el desarrollo de los callos se vio alterado, y ocurrió un cambio de coloración del callo verde a amarillo (clorosis). Esta coloración se ha reportado como una característica de especies vegetales expuestas a MP, debido a que la presencia de Ag inhibe la fotosíntesis, al provocar cambios morfológicos en los cloroplastos, así como la acumulación de Ag^+ en los tilacoides que provocan daños irreversibles y la degradación de los pigmentos (Qian *et al*., 2013). Por otro lado, el cambio en la coloración, es un indicador de la capacidad de síntesis de NPs (Jiang *et al*., 2014), existen biomoléculas de las plantas, como los compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, y coenzimas, que promueven la síntesis de NP al incorporar los iones metálicos (Kumar *et al*., 2020). Mahjouri *et al*., (2018), empleó células en suspensión de *Nicotiana tabacum* cv., expuestas CuO-NPs (0, 10, 25, 50, 75 y 100 mg L^{-1}) sintetizadas químicamente (SQ) y con extractos vegetales (SV; síntesis verde), observando una mayor afectación en la viabilidad celular en el tratamiento que contenía NP-SQ en comparación de las NP-SV, en ambos tratamientos aumento la generación de ERO, en particular el H_2O_2.

Además de las alteraciones fisiológicas de las células vegetales, la acumulación de plata provoca citotóxicidad, ocasionando la disminución de la viabilidad celular, lo cual también está relacionado con la producción de EROs (Marslin *et al*., 2017; Oukarroum *et al*., 2013, Qian *et al*., 2013). Barbasz *et al*., (2016) encontraron cambios morfológicos en callos de *Triticum aestivum* expuestos a iones de plata o AgNPs en concentraciones de 20-60 mg L^{-1}, notando células alargadas, hinchadas o incluso reducción del tamaño celular. Mientras que Zuverza-Mena *et al*., (2016), observaron alteraciones conformacionales de macromoléculas por la exposición a plata, como en los carbohidratos, lípidos y la lignina, los cuales pueden ocasionar cambios en la morfología y con ello afectar negativamente el desarrollo de plantas completas. Por otra parte, Qian *et al*., (2013) evaluaron en condiciones *in vitro* a *Arabidopsis thaliana*, germinando semillas en presencia de Ag^{+} y AgNPs, a concentraciones de 0-3.0 mg L^{-1}, la que provocó la inhibición de la germinación, reducción en el tamaño de la raíz y disminución de la biomasa (PF), debido a la inhibición de la absorción de nutrientes, así como una disminución de la biosíntesis de clorofila (α y β) y otros pigmentos, como carotenoides, por la presencia del metal en ambas formas (Ag^{+} y AgNPs).

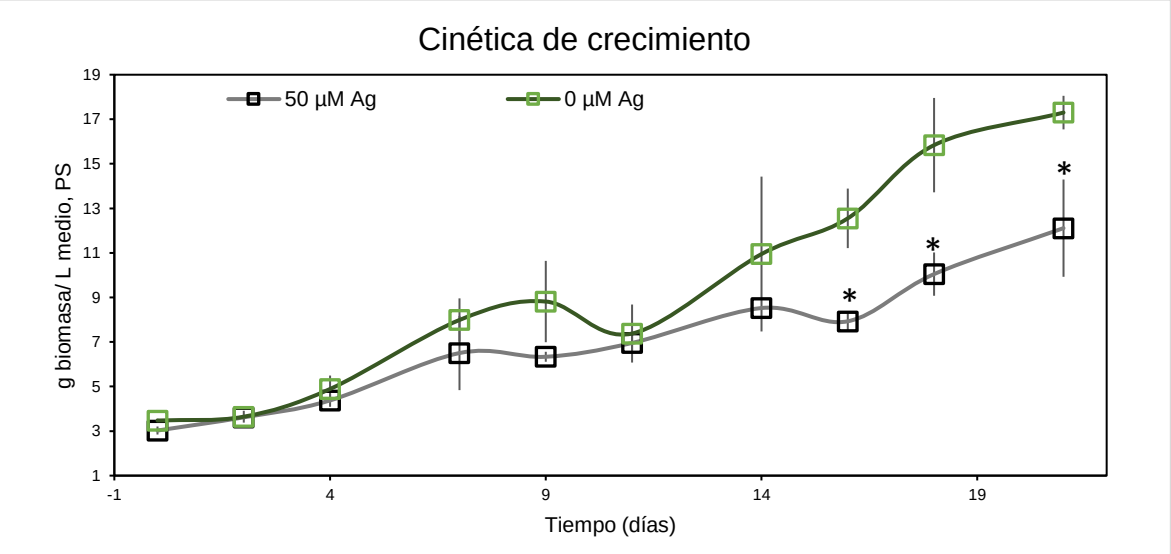


*Figura 3. Cinética de crecimiento de cultivos de células en suspensión de Medicago sativa, durante 21 días; expuestas a 0 µM Ag (-□-) y 50 µM Ag (-□-). * Indica diferencias significativas.*

En la cinética del presente trabajo, con base en la fase exponencial que transcurre en el periodo de los 4 a los 18 días, se determinó una velocidad de crecimiento celular (µ) para el tratamiento control y el tratamiento suplementado con Ag de 0.072 y 0.050, respectivamente, mientras que el tiempo de duplicación celular (td) fue de 9.638 para 0 mM Ag y 13.997 en 50 mM Ag, en ambos parámetros la presencia de plata mostró cambios con respecto al control (**Tabla. 1**). Es decir, la plata disminuyó la velocidad de crecimiento (>30%) y aumento el tiempo de duplicación (<50%), lo que representa un efecto tóxico y por lo tanto alteraciones en el crecimiento celular. La toxicidad asociada a los iones de plata libres es debida a que son disruptores de transportadores de membrana, causando desequilibrio en la osmorregulación y finalmente muerte celular (Magesky & Pelletier, 2015).

Esto es similar a lo reportado en células en suspensión de *Nicotiana tabacum* expuestas a SnO_2 y Ag NPs (0.1-0.5 mg mL^{-1}), donde se observa una reducción en la viabilidad celular de 69-18% a las 48h, esto se debió a que las NPs afectaron la función de la vacuola y la mitocondria, en esta última, la disponibilidad energética era insuficiente, interrumpiendo el funcionamiento vital y sistemático de las células, y ocasionando la muerte celular (Mahjouri *et al*., 2020). En el trabajo reportado por Lin *et al*., (2009), se emplearon células en suspensión de *Arabidopsis thaliana T87* expuestas a nanotubos de carbono (NTC) en concentraciones de 10- 600 mg L^{-1}, observándose que desde el segundo día los NTC tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de la biomasa, con respecto al control, la presencia de éstos afecto la duplicación de las células vegetales, disminuyendo la producción de biomasa y la viabilidad celular.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las células en suspensión de M. sativa control y expuestas a Ag.

Parámetro cinético	0 mM Ag	50 mM Ag
μ	0.0721 ± 0.004^a	0.0501 ± 0.007^b
td	9.6388 ± 0.596^a	13.9973 ± 2.036^b

Los datos representan el promedio de dos repeticiones ± DS. Letras diferentes indican diferencias significativas, p=0.05.

Por otra parte, los cultivos *in vitro* se han explorado por la producción de metabolitos secundarios y aumento de biomasa, llevándose a cabo estudios de elicitación con NPs. En un estudio reportado por Fazal *et al*., (2016), el tejido callogénico de *Prunella vulgaris*, fue expuesto a nanopartículas de Ag y Au (AgNPs y Ag-AuNP, respectivamente), con ácido naftalenacético (ANA; 30 μg L^{-1}), observando un crecimiento del 100% en los tratamientos que contenían ANA y Ag-AuNPs, mientras que en presencia únicamente de AgNPs se observó un incremento del 37%, con respecto al control, la inhibición en la producción de biomasa en los tratamientos que solo contenían NPs (Ag y/o Au) se atribuye al daño celular ocasionado por las NP. Por otro lado, Jamshidi *et al*., (2014) emplearon AgNPs (0-10 mg L^{-1}), ANA y ácido indolacético (AIA) para elicitar células en suspensión de *Corylus avellana*, lo que ocasionó una disminución de la viabilidad celular del 44% con Ag a 10 mg L^{-1}, debido al tamaño que tienen las NP éstas pueden unirse con mayor facilidad a diversos componentes celulares, lo que les permite atravesar fácilmente la membrana, acumularse y causar daños celulares.

Los mecanismos por los cuales la presencia de Ag provoca la reducción de biomasa aún no están bien elucidados, sin embargo, existen reportes sobre la transcripción de genes que podrían estar asociados a la tolerancia al estrés, conduciendo la maquinaria metabólica destinada al desarrollo y crecimiento de la planta hacia la creación de mecanismos de defensa contra los elementos tóxicos, lo cual repercute en la reducción de biomasa (Nair & Chung, 2014; Wang *et al*., 2017; Wang *et al*., 2011). Además, la toxicidad de los MP depende entre otros factores, del tamaño de la partícula o del estado en el que se encuentre, debido a que un menor tamaño le brinda una mayor facilidad para entrar a las células del apoplasto, atravesando la membrana vía endocitosis, y posteriormente ser traslocados a otra parte de la planta (Rico *et al*., 2011).

El cambio en el estado fisicoquímico de la Ag afecta potencialmente su toxicidad, debido a una mayor o menor biodisponibilidad del metal por los flujos difusivos. Dentro de los

metales pesados, los iones de plata son considerados unos de los más tóxicos, tanto para microorganismos como bacterias, así como para animales acuáticos, en los cuales se ha determinado la concentración letal media en promedio entre 6.5-70 µM Ag, mientras que para el nitrato de plata se ha observado una letalidad en una concentración de 11 mg kg^{-1} (Adriano, 2001; Kabata-Pendias & Mukherjee, 2019). En un estudio realizado por Allan (1958), se menciona que la toxicidad depende de la forma química en la que se encuentra la Ag, *e.g.* el $AgNO_3$ es ocho veces más toxico que el AgCl. La plata en forma de NPs tiene mecanismos tóxicos, iniciando con su adherencia a la membrana lo que ocasiona disrupción y altera la función de la bomba de protones, provoca la degradación de polisacáridos, inhibe la activación de enzimas, altera la homeostasis del fosfato, inhibe la síntesis de ADN y la desnaturalización de los ribosomas. Por otra parte, se ha observado que la plata conformando NPs también tiene efectos negativos, reduciendo el crecimiento, debido a los cambios en la expresión de genes, promueven la inhibición del flujo de agua en las membranas celulares, y reprime la síntesis de proteínas como respuesta ante el ataque de patógenos, lo que suscita la vulnerabilidad de las plantas ante agentes infecciosos, y también se ha observado una deficiencia en la absorción de minerales (Wang *et al*., 2017). En el trabajo de Song *et al*., (2013), se reporta la reducción de biomasa en plantas de *Lycopersicon esculentum*, que fueron expuestas a AgNPs. Mientras que Oukarroum *et al*., (2013) observan una correlación entre la disminución de células viables y la generación de ERO, debido a la fitotoxicidad de Ag en su forma de nanopartículas.

6.2 Acumulación de Ag en los cultivos de células en suspensión de *M. sativa*

6.2.1 Digestión

Para poder analizar el contenido de elementos metálicos que se encuentra en las células en suspensión (biomasa) a través de la espectroscopia de absorción atómica (EAA), es necesario que la biomasa sea sometida a un proceso de digestión, en el cual se descompone la materia orgánica en fracciones simples, como iones, agua y gases remanentes de las mezclas ácidas, y esto se logra aplicando temperatura con la presencia de ácidos, actualmente se cuentan con digestores que aplican microondas (González, 2009). En la **Fig. 4** se observan 4 productos de digestión ácida asistida por microondas de la biomasa de *M. sativa*, en los procedimientos se modificó la temperatura y la solución ácida para realizar la digestión, en la Fig. 4 **A** y **B** se observa la hidrólisis por el método Organic A sin modificaciones (Org-A) cargado previamente en el equipo, empleando la mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico (agua regia; 1:1), posterior al proceso de digestión prevalece un color naranja, característico del agua regia, por otro lado, en la **Fig. 4 B** el color es menos intenso, producto de la modificación de la temperatura (190°C) en la rampa del método (Org-AM), en ambos casos, es evidente la presencia de precipitados, por lo cual se descartó el agua regia en la digestión. Posteriormente, se realizó una digestión con ácido nítrico diluido (HNO_3:H_2O; 5:4), para ambas digestiones se obtuvo una solución cristalina después de la digestión (**Fig. 4 C** y **D**), en el método Org-A aún se observaron precipitados **(Fig. 4 C),** aunque en menor proporción con respecto al uso de agua regia, lo que sugiere una digestión parcial. Afortunadamente, el producto de reacción con el método Org-AM, y usando como solvente el ácido nítrico diluido mostraba una digestión cristalina y

libre de precipitados (**Fig. 4 C),** el cual fue seleccionado para digerir todas las muestras. La obtención de una digestión cristalina es esencial para la lectura en EAA, dado que el color puede modificar las lecturas de absorbancia, y en cuanto a los sólidos presentes en las muestras son un problema tanto para el método de flama como para horno de grafito, en el primero, el capilar puede quedar obstruido, e incluso la sección donde la muestra se nebuliza queda interrumpido, acumulando estos sólidos que pueden provocar un accidente, dañando el equipo y en casos extremos al usuario. Mientras que, para el método de horno de grafito, la presencia de solutos en el tubo pirolítico puede causar interferencias en la quema de la muestra y en la lectura, obteniendo datos erróneos, como se menciona en la NMX-AA-051-SCF1 (Secretaria de Economía, 2001). Adicionalmente, se realizó un filtrado de la muestra digerida con membranas de 0.42 µm.

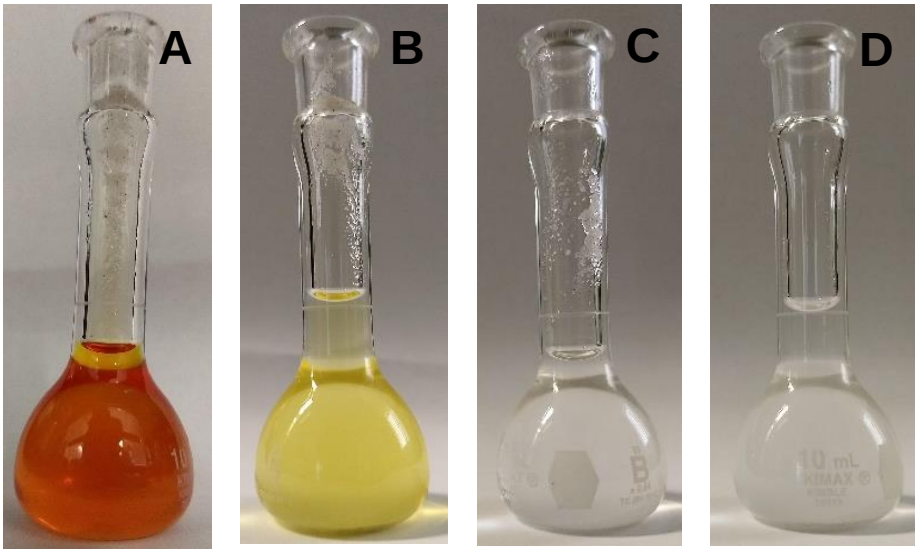


Figura 4. Muestras de biomasa digerida: A) digestión con agua regia y el método "Organic A"; B) digestión con agua regia y el método "Organic A-modificado"; C) digestión con ácido nítrico diluido y el método "Organic A"; y D) digestión cristalina sin impurezas obtenido con ácido nítrico diluido y el método "OrganicA-modificado".

6.2.2 Análisis en el contenido de plata por espectrofotometría de absorción atómica

En el presente trabajo se realizaron análisis por espectroscopia de absorción atómica tanto por el método de flama, como por horno de grafito, el análisis por espectroscopia de absorción atómica, determina la concentración de un elemento en una solución, ya sea en forma de spray para el método de flama, o en la evaporación de la muestra para el método de horno de grafito, ambos métodos cuantifican la concentración del metal mediante la absorción de luz, basada en la generación de un átomo de un elemento determinado en estado basal, que pasa a un estado de excitación, este cambio se determina por la medición de la cantidad de energía absorbida, y es directamente proporcional a la concentración del elemento de la muestra analizada (Allan, 1959; NOM-AA-051-SCF1, 2001). Para ambos métodos, la determinación de la temperatura a la cual se excitan los átomos es importante,

por ejemplo, en el método de flama si la temperatura es baja proporcionará una pequeña información del número total de átomos totales que son excitados y por lo tanto en la concentración determinada (Allan, 1959).

Se observó que la acumulación de plata en las células en suspensión expuestas a 50 µM Ag, muestran una acumulación progresiva en los primeros días de la cinética (0-7 d), y a partir del día 7, la acumulación fluctúa en un rango de 254-495 mg Ag kg^{-1} (PS), hasta el término de la cinética (21 días). Desde el día 0 las células muestran un potencial en la absorción de Ag, con un contenido de 73.07 ± 46.86 mg Ag kg^{-1} (PS), y para el día 7 con 476.79 ± 34.93 mg Ag kg^{-1} (PS), es decir, se observa un aumento gradual del contenido de plata (6 veces). Mientras que en el día 14, ocurrió la mayor acumulación del metal en las células, determinándose 495 ± 206.73 mg Ag kg^{-1} (PS). Mientras que, para el término de la cinética, se muestra un contenido bajo de plata (254.44 ± 45.04 mg kg^{-1}, PS) (**Fig. 5**). Probablemente, en las células, durante los primeros días, la cantidad de Ag acumulada no resultaba tóxica, sin embargo, las células al estar desdiferenciadas y suspendidas en el medio, tienen un contacto directo con los iones de plata disueltos en el medio de cultivo y dado que se reformuló el medio para evitar que la plata precipitara, el metal se encontraba completamente biodisponible para las células vegetales, posibilitando una mayor absorción y muy probablemente la toxicidad del metal condujo a la muerte celular, lo que se puede deducir al observar la cinética de crecimiento de las células expuestas a plata (**Fig. 3**). Por otro lado, observamos el descenso de la acumulación de Ag durante varios días, que puede atribuirse a que después de la entrada de los MP, las células pueden liberar al exterior celular a los metales para prevenir daños estructurales, fitotóxicos, y con ello preservar la funcionalidad de las células (Shah & Daverey, 2020).

La capacidad de absorción de la plata por los cultivos de células en suspensión, desde el día cero puede ser atribuida a que la fuente de plata empleada ($AgNO_3$) es la forma más biodisponible para los organismos, debido a su alta solubilidad en agua, y dado que el cultivo se encuentra en constante agitación, se favorece el contacto de la plata con las células y por lo tanto posibilita la absorción del metal por la membrana celular (Allan, 1959). Se ha reportado que la concentración de Ag en tejidos vegetales puede llegar a ser < 1 mg kg^{-1}. En plantas completas el proceso de absorción comienza en la rizosfera, cuando las raíces están en contacto directo con el elemento, y posteriormente el metal es traslocado a la parte aérea de la planta (Allan, 1959). En la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004 (Semarnat, 2007) se establecen los niveles permisibles del contenido de Ag en suelos de uso agrícola y uso industrial con 390 y 5100 mg Ag kg^{-1}, respectivamente. Los datos observados en el presente trabajo, sugieren que *M. sativa* es una planta que puede crecer en suelos contaminados con plata y que puede llegar a bioacumular en sus tejidos 495 mg Ag kg^{-1}. El Ag^+ libre generado del $AgNO_3$ en el medio, al estar en contacto con la pared celular puede formar complejos con el citrato o con el Cl^-, confiriéndole la capacidad de atravesar la pared celular (Sfriso *et al*., 2019).

Para tolerar los metales, las plantas desarrollan mecanismos, como el secuestro de estos compuestos tóxicos a las vacuolas, sin embargo, la acumulación de éstos provoca trastornos en el pH, causando cambios en la regulación metabólica y homeostasis celular (Mahjouri *et al*., 2020).

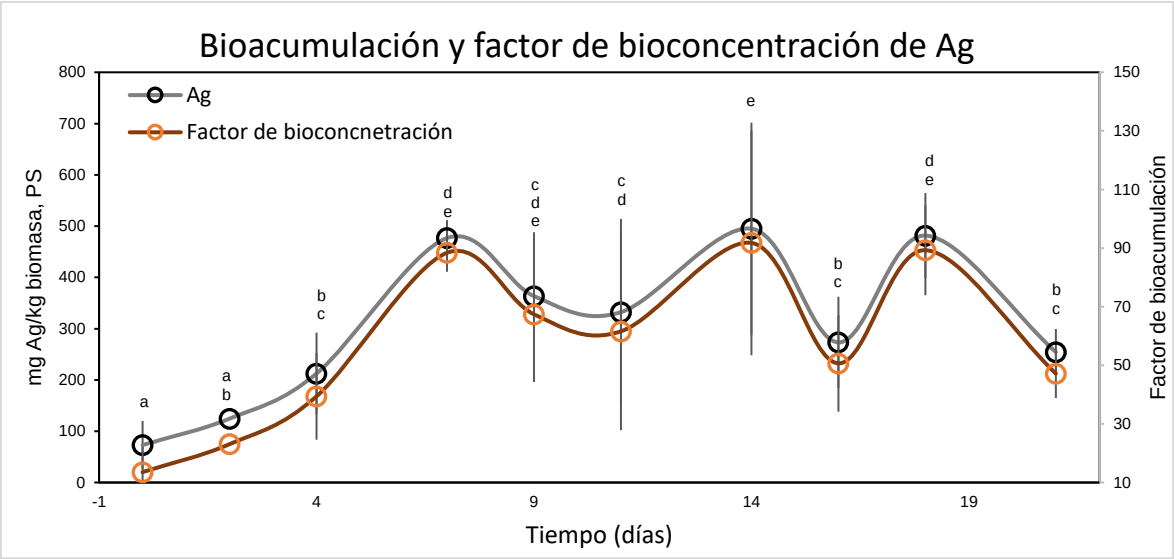


Figura 5. Contenido de Ag en los cultivos de celulas en suspensión (-○-) y factor de bioconcentración (FB) (-○-) en células en suspensión de M. sativa expuestas a 50 µM de Ag. Los datos representan el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Qian *et al*., (2013) reportan un estudio con *A. thaliana* en condiciones *in vitro,* para comparar el efecto toxico de dos formas de Ag (2 mg L^{-1} de Ag^{+} y NP) durante dos semanas, observando que las plantas germinadas en presencia de NP presentaron una mayor absorción del metal con respecto a las plantas que contenían Ag^{+}, reportando un contenido de 31.37 y 8.04 mg Ag kg^{-1}, respectivamente. La absorción de iones metálicos es más sensible por su estado fisiológico, además, la traslocación de estos metales puede llevarse mediante acuaporinas, proteínas transmembrana que regulan la homeostasis celular, las cuales favorecen la permeabilidad de la membrana plasmática y de la vacuola, facilitando la absorción de nutrientes. Por su parte, Hanks *et al*., (2015) reporta un estudio con *Pistia stratiotes* en condiciones de hidroponía, evaluando la acumulación de AgNPs y $AgNO_3$ (0.02-2 mg L^{-1}), observando una mayor absorción en el tratamiento con mayor concentración de plata, sin embargo solo se recuperó del 15% al 20% del metal.

En un trabajo reportado por Oukarroum *et al*., (2013), células de cultivos en suspensión de *Lemna gibba* fueron expuestas a soluciones suplementadas con AgNPs, en concentraciones de 0.01-10 mg L^{-1}, mostrando hasta una acumulación de 17.5 mg L^{-1} (PS), respectivamente. Mientras que Cai *et al*., (2020) expusieron plántulas de *Triticum aestivum* a Cu (0.5-2.5 mg L^{-1}) durante 4 días para inhibir la absorción de Ag, posteriormente se expusieron a 10 mg L^{-1} AgNPs, durante 2-8 h, observando que después de la aplicación de Cu la absorción de Ag decrece, la mayor acumulación de Ag fue de 607 mg kg^{-1} en el tratamiento expuesto a menor concentración de Cu, lo que fue atribuido una competencia en los transportadores de membrana, además de que la Ag inhibe grupos tiol no proteicos, lo cual reduce la entrada del metal a las células, a su vez, el daño en la membrana de las células pueden inhibir la absorción de las partículas metálicas vía endocitosis y plasmodesmocitosis.

El factor de bioconcentración (FBC) es usado para evaluar la eficiencia de especies vegetales en la extracción de metales, donde valores >1 se considera que es un modelo de estudio ideal para la fitoextracción, mientras que cuando el valor es <1, indica que la especie

no es un buen acumulador del metal (Xiong *et al*., 2018). En el presente estudio, en el día 14 se obtuvo un valor cercano a 100 (91.77) (**Fig. 5**), lo que sugiere que los cultivos de células en suspensión son un modelo adecuado para estudios de extracción de Ag. En un estudio reportado con plantas de *M. sativa* cultivadas en sustrato suplementado con Ag, Cu y Zn, muestra que tiene un factor de bioacumulación de 0.28-0.24 (Desjardins *et al*., 2016). En otro estudio, Hegazy *et al*., (2014), expusieron tejido callogénico de *M. sativa* a $AgNO_3$, obteniendo nanopartículas y una acumulación de 0.55 mg Ag kg^{-1}, a pH 7. Mientras que en plantas de *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor* expuestas a suelo adicionado con AgNPs (0-100), el FBC fue 0.14 y 0.08, respectivamente, el valor obtenido fue bajo, debido a que las NPs formaron agregados en el suelo siendo difícil la absorción (Lee *et al*., 2012).

Se ha observado que un mayor tiempo de exposición al metal, éste es capaz de ingresar a las células vegetales, sin embargo, una mayor absorción del metal causará más daño celular. Por otra parte, las características de los sustratos/medios de crecimiento en el que se desarrollan las plantas u objeto de estudio, pueden inducir modificaciones en las propiedades del metal adicionado, pudiendo inducir la generación de la síntesis de NPs, e influenciar en la biodisponibilidad y bioacumulación (Tkalec *et al*., 2019). En el presente estudio la exposición a Ag fue por 21 días, y dado que se cuidó que la fuente de metal, $AgNO_3$, estuviese disuelto para tener a la plata en forma iónica (Ag^+) con el fin de lograr su completa biodisponibilidad para las células vegetales y con ello conocer el potencial de absorción. Se ha reportado que uno de los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la absorción del metal es la expresión de genes de transportadores de membrana, los cuales juegan un papel importante en la absorción, flujo, traslocación y el secuestro de MP. Los metales pesados entran a través de los espacios intracelulares, por medio de canales de transporte iónicos o transporte simplasto, otros sistemas son los transportadores proteicos, los cuales ayudan a atravesar la membrana, además, también pueden participar diferentes quelantes, como el GSH, metalotioneínas y fitoquelatinas, llevando a los MP a la vacuola o la pared celular.

6.3 Efecto del estrés por plata en el contenido de microelementos en células en suspensión de *M. sativa*

Los micronutrientes son elementos esenciales, que se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos vegetales y que participan en diversas funciones vitales. En las leguminosas los elementos B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn se han reportado como microelementos (Brennan *et al*., 2019). De igual manera se ha encontrado que el uso, el contenido y la absorción de los elementos minerales, así como la proteína cruda, son rasgos cuantitativos que son codificados por múltiples genes, los cuales son influenciados por factores ambientales que pueden ocasionar estrés, mientras que en condiciones óptimas, éstos se ven modificados por las interacciones del genotipo (Jia *et al*., 2017).

Los MP tiene diversas implicaciones en el funcionamiento celular, como en la disminución en la concentración de los elementos esenciales para la nutrición, en el caso particular de la Ag, se une a proteínas, específicamente a los grupos sulfhídrilo (-SH), que posteriormente llevan a la inhibición de actividades o a interrupciones en la estructura celular, también, se ha reportado que puede desplazar un elemento esencial (Weerakoon, 2019). La deficiencia de micronutrientes puede causar un cambio en el metabolismo, para

la distribución y adquisición de los minerales (López-Millán *et al*., 2013). Se ha reportado que la Ag en NP puede cambiar el balance de oxidación y de los sistemas antioxidantes, afectar la homeostasis del agua, junto con la concentración de otras moléculas que se encuentran en el interior de la planta (Qian *et al*., 2013).

En el presente estudio, en los cultivos de células en suspensión expuestos a plata y en el tratamiento control, se cuantificaron cuatro microelementos (Cu, Fe, Zn y Mn), para todos ellos se ha reportado su participación en diversas funciones celulares importantes. Los microelementos metálicos como el Cu, Zn, Fe y Mn son absorbidos como iones, su afinidad es elevada y considerada más alta que la de otros cationes (Silber, 2019). En términos generales, la plata ocasionó cambios significativos en el contenido de los cuatro elementos en los cultivos de células en suspensión de *M. sativa.*

a) Cobre

En el presente trabajo, la concentración de cobre en el bioensayo de tolerancia a plata es la reportada en la formulación del medio de cultivo MS (6.36×10^{-3} mg Cu L^{-1}; Murasghige & Skoog 1962), en ambos tratamientos (0µM y 50µM de Ag), esta concentración fue usada desde el establecimiento del cultivo. Se ha reportado que el medio MS contiene la concentración adecuada de Cu para el óptimo desarrollo de los cultivos *in vitro* (Mourato *et al*., 2009). Los cultivos de células en suspensión de *M. sativa* expuestos a plata, mostraron bajos contenidos de cobre en los primeros 7 días, siendo de 8-21 veces menor la concentración con respecto al cultivo control (sin plata). Y a partir del día 9, mostraron un contenido similar al observado en el tratamiento control (**Fig. 5**). El Cu es un micronutriente, con una participación en diversas actividades, entre ellas, es esencial en la síntesis de enzimas peroxidasas, las cuales tienen un papel importante para combatir el estrés oxidativo por su función antioxidante, por lo cual, su disminución afectaría los mecanismos de defensa (Deriu *et al*., 2007; Pedrosa-Gómez *et al*., 2014).

En el comportamiento en el contenido de Cu en el tratamiento sin Ag, se observa al inicio de la cinética un contenido alto de Cu con 532.50 ± 130.12 mg kg^{-1}que se mantiene relativamente estable en los siguientes días, alcanzando la máxima concentración para el día 7 con 582.93 ± 25.44 mg Cu kg^{-1}, mientras que para el día 9 disminuye más de 5 veces su contenido, en los posteriores días no muestra cambios significativos, finalmente, al término de la cinética (día 21) muestra una concentración de 87.63 ± 10.86 mg Cu kg^{-1} (**Fig. 6**). Respecto al tratamiento conteniendo Ag, se presentan diferencias significativas con respecto al tratamiento control, en el día 0 presenta el menor contenido con 25.14 ± 5.77 mg Cu kg^{-1}, lo que representa 21 veces menos que el control. Aunque el contenido es bajo en el tratamiento con Ag, va aumentando progresivamente, teniendo el punto máximo el día 16 con un 101.44 ± 3.46 mg Cu kg^{-1}, sin embargo, a partir del día 9, el contenido no muestra diferencias con respecto al tratamiento control. En condiciones naturales, el contenido de Cu en el suelo es de 1-50 mg kg^{-1}, y una planta competente, con condiciones saludables y sin afectaciones, muestra concentraciones entre 5-20 mg Cu kg^{-1}, la toxicidad por este metal se presenta al exceder los valores antes mencionados (Mourato *et al*., 2009).

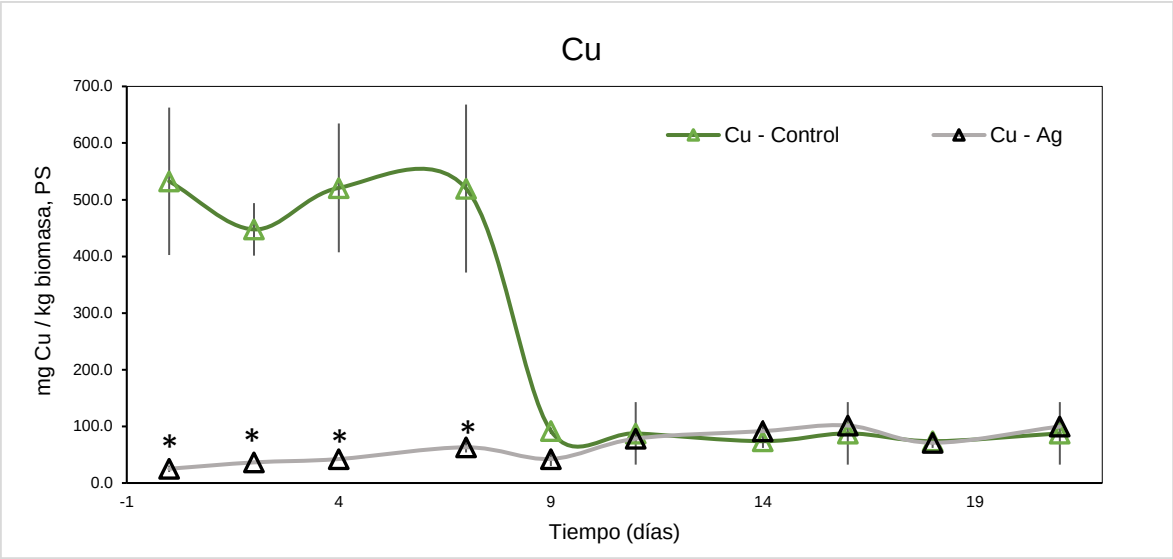


*Figura 6. Contenido de Cu en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-Δ-) y cultivos control (-Δ-). * Iindican diferencias significativas.*

Deriu *et al*., (2007) reportan que el cobre es necesario para la biosíntesis de enzimas implicadas en la detoxificación de elementos potencialmente tóxicos, como los MP, por ello se esperaba encontrar una mayor concentración de este metal en las células expuestas a Ag, sin embargo, la concentración observada es baja con respecto a los valores encontrados en el tratamiento control. El contenido menor en los cultivos expuestos a plata, puede atribuirse a que la biodisponibilidad de otros elementos, como la plata y el nitrógeno, afecta el contenido de otros microelementos (Mourato *et al*., 2009).

En un trabajo reportado con plántulas de *Triticum aestivum* L. que fueron expuestas a Cu (0.5 y 2.5 mg L^{-1}) durante 4 días para inhibir la absorción de Ag, y posteriormente se expusieron a 10 mg L^{-1} AgNPs, durante 2-8 h, observaron que después de la aplicación de Cu se inhibe la absorción de Ag, siendo la mayor acumulación de Ag de 607 mg kg^{-1} en el tratamiento expuesto a menor concentración de Cu, los autores lo atribuyen a la existencia de una competencia por los canales de absorción, sin embargo, existen otros mecanismos que son responsables en la acumulación de Ag. El bajo contenido de cobre en los cultivos expuestos a plata puede deberse a que altos contenidos de este microelemento provocan la oxidación e inhibición de la biosíntesis de grupos sulfhídrilo, provocando una disminución en ligandos para la unión de Ag, además, algunas proteínas trasportadoras de Cu median el transporte de Ag^{+} al interior de las células (Cai *et al*., 2020). De forma similar, Zuverza-Mena *et al*., (2016) estudiando el efecto de AgNP (0-500 mg L^{-1}) en *Raphanus sativus*, reportan la disminución de cobre en un 47.5-52.5% menos, en comparación al control.

b) Manganeso

El Mn, es otro microelemento, involucrado en el crecimiento de las plantas, requerido para la biosíntesis de los hidratos de carbono, lípidos y la lignina, también tiene una participación en el FS II, actúa como componente catalizando la separación del agua para obtener oxígeno y así proporcionar electrones que se emplearan en la cadena de

transporte (Ameen *et al*., 2019; Millaleo *et al*., 2010). La disminución de esta mineral afecta el crecimiento, lo que ocasiona que se reduzca la producción de biomasa (Kirkby, 2012).

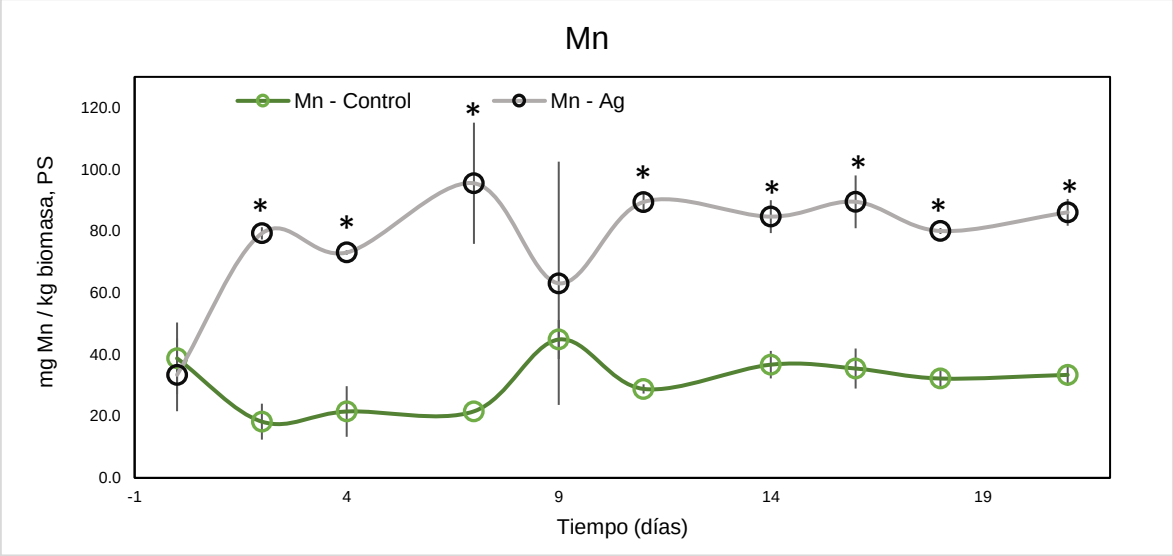


*Figura 7. Contenido de Mn en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-○-) y cultivos control (-○-). *Indican diferencias significativas.*

En la **Fig. 7**, se observa el contenido de Mn determinado en ambos tratamientos (0 y 50 µM de Ag), en el tiempo cero muestran una concentración similar, siendo de 38.75 ± 11.61 y 33.41 ± 11.79 mg Mn kg^{-1} (PS), para el tratamiento control y para el tratamiento con plata, respectivamente. Posteriormente, para el día 2, en el tratamiento control la concentración de Mn disminuye 2.1 veces, siendo el día con la menor concentración durante toda la cinética, mientras que para el tratamiento con 50 µM Ag aumenta más de 4 veces el contenido de Mn. A partir del día 4, en el tratamiento control se observa una concentración estable en el resto de la cinética, con excepción en el día 9, donde se observa un aumento en el contenido de la plata. Mientras que en el tratamiento conteniendo plata, el contenido de Mn es >2 veces que el tratamiento control en casi toda la cinética, con excepción del día 0 y 9, donde no se observan diferencia con el control; y para el día 7 se reporta la máxima concentración en este tratamiento (95.51 ± 19.64 mg Mn kg^{-1}, PS). Las concentraciones observadas en el tratamiento con estrés por Ag se mantienen entre los 80-90 mg Mn kg^{-1}, PS, para finalizar la cinética en el día 21 con una concentración de 86.08 ± 4.3 mg Mn kg^{-1}, PS. Mientras que para el tratamiento control, después del día 9, la concentración se mantiene entre los 32-36 mg Mn kg^{-1}, PS, aproximadamente. En contraste, en un estudio con *Sesuvium portulacastru* expuesta a 0-50 µM de Ni, se observó una disminución en la concentración de Mn, las plantas del tratamiento control contenían 2.64 mg kg^{-1} y en el tratamiento con 25 µM de Ni el Mn disminuyó a 1.53 mg kg^{-1} (Fourati *et al*., 2019). El contenido mayor de Mn en las células expuestas y sujetas a estrés por plata en comparación al control, puede estar explicado porque las células deben absorber mayores contenidos de Mn del medio con la finalidad

de que el Mn participe en la activación de la SOD, involucrada en los procesos de detoxificación. En condiciones de estrés, las plantas activan diversos sistemas de defensa, entre ellos están los no enzimáticos y enzimáticos, en estos últimos encontramos a la enzima SOD, y algunas de sus isoformas se activan con la presencia de iones Mn^{+}, la deficiencia de este elemento se observa en la presencia de tejido necrosado, ya que disminuye la enzima Mn-SOD, aumentando así la presencia de radicales libres (Allen *et al*., 2007). En contraste, se ha reportado que la presencia de metales pesados, como el níquel, tienen un efecto en la disminución de la absorción de diversos minerales (en su forma iónica), entre ellos el Mn^{+} (Ameen *et al*., 2019). Por otro lado, el pH en el medio de cultivo de las células en suspensión fue de 5.8, por lo que favoreció la biodisponibilidad y la absorción de Mn. Se ha reportado que un factor importante para la biodisponibilidad de los elementos es el pH, este factor puede influenciar el contenido en los tejidos, aumentándolo o disminuyendo, para el Mn, el pH debe encontrarse en un valor de 5.0 a 7.0 (Bell & Dell, 2008).

c) Hierro

El Fe, es un microelemento importante en el proceso de la fotosíntesis, se encuentra en los complejos de transferencia de electrones, incluido el citocromo b_6f y en las ferredoxinas, además, muchas de las proteínas tienen como cofactor al hierro y estas participan en la síntesis de la clorofila (Balk & Schaedler, 2014; Briat *et al*., 2015). La deficiencia de este elemento tiene varias afectaciones, en plantas completas se ha visto la aparición de clorosis en hojas (Abadía *et al*., 2011; Cheng *et al*., 2019), además por su participación en la síntesis de clorofila, su disminución afecta el contenido de la misma; también se ven afectados los tilacoides, particularmente la membrana de estos organelos, y la transferencia de electrones indudablemente cambia (Cheng *et al*., 2019; Sharma, 2007).

Para el análisis de este metal se empleó el método de flama, debido a que las concentraciones contenidas en la biomasa eran elevadas, reportando un máximo de 10,058 ± 3,323.40 mg Fe kg^{-1} y 7,483 ± 1,370.37 mg Fe kg^{-1}, PS, para el tratamiento con Ag y para el tratamiento control, respectivamente. En términos generales, se observa un mayor contenido de Fe en los cultivos expuestos a Ag con respecto al tratamiento control. En el tratamiento con 0 µM de Ag, se observa un comportamiento de forma creciente, partiendo en el día cero con una concentración de 570 ± 263 mg Fe kg^{-1} (PS), que posteriormente aumenta progresivamente, llegando a una máxima concentración de 7,483 ± 1,370 mg Fe kg^{-1} para el día 18. Por el contrario, el contenido observado para el tratamiento con exposición a Ag, mostró un comportamiento irregular, con aumentos y descensos en la concentración de Fe, con respecto a lo observado para el tratamiento control, pero mostrando mayores contenidos que el control, con excepción del día 9, donde no se observan diferencias significativas entre los tratamientos, así como en los días 18 y 21, que muestra significativamente menores contenidos que los determinados para el tratamiento control (**Fig. 8**). El contenido inicial de Fe, en los cultivos expuestos a plata, fue de 2,597 ± 563.56 mg Fe kg^{-1}, PS, posteriormente aumenta poco más de tres veces su contenido en el día 2, enseguida muestra un descenso del 34% en el día 4,

teniendo un oscilamiento similar en el resto de la cinética, observando el contenido máximo en el día 7, con 10,050 ± 3,323.40 mg Fe kg^{-1}.

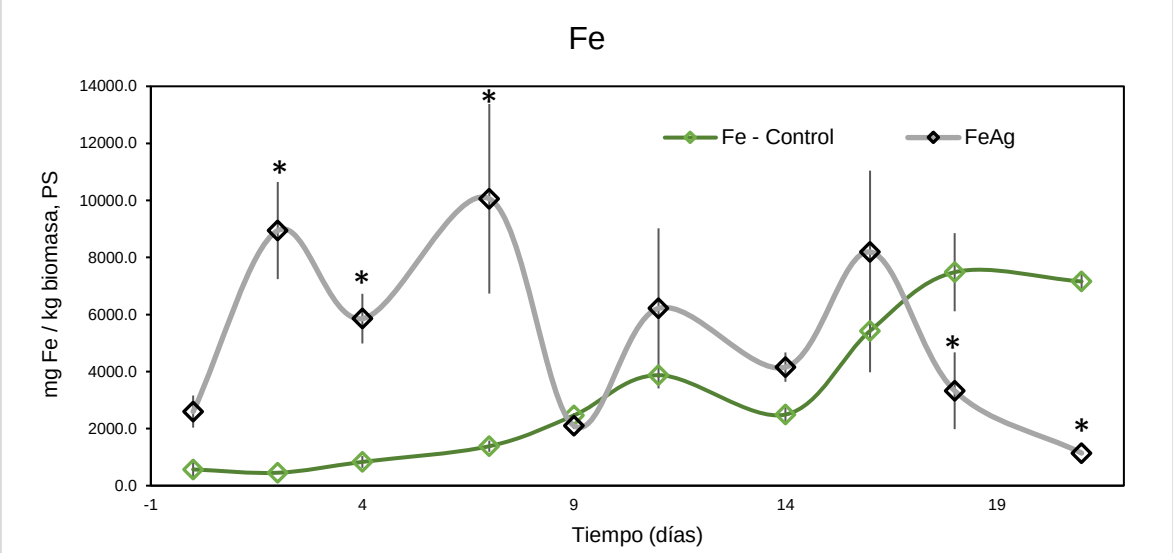


*Figura 8. Contenido de Fe en cultivos de células en suspensión de M. sativa, expuestos a 50 µM de plata (-◊-) y el tratamiento control (-◊-). *Indican diferencias significativas.*

Probablemente el significativamente mayor contenido de Fe en los cultivos de células expuestos a plata, puede deberse a una forma de protección por estrés oxidativo. Pues se ha reportado, que cuando las plantas se someten a estrés por metales pesados, éstas pueden formar complejos, *e.g.* el Fe se une a la ferritina, también forma enlaces con proteínas, y estos complejos son aprovechados para la protección de las células ante el daño oxidativo (Balla *et al*., 1992; Deák *et al*., 1999), Además, también se reporta que la demanda de cofactores de Fe en la célula fluctúa, debido a los niveles de expresión de proteínas de Fe, las cuales difieren en las etapas de crecimiento, los organismos se adaptan el uso de Fe, una vez que la absorción del metal no satisface las demandas del mismo (Balk & Schaedler, 2014). Por otra parte, la producción de ERO, en particular el radical hidroxilo (H_2O_2•) depende de la presencia de hierro libre (Fe^{+}), para llevar a cabo la reacción de Fenton. Los oxidantes de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + OH$) están mediados por este metal, los productos de la reacción causan daños a varias biomoléculas, especialmente a los ácidos nucleicos (Deák *et al*., 1999). El hierro al interior de las células puede catalizar esta reacción o disminuirla, debido a la administración de este microelemento, ya que un menor contenido de Fe o su regulación por las células vegetales puede controlar la producción de radicales hidroxilo (Kampfenkel *et al*., 1995).

Butkutė *et al*., (2017), reportan que el contenido de Fe, en el grupo de las leguminosas varía considerablemente, encontrando un bajo contenido en *Medicago lupulina* de 139 mg kg^{-1} en semillas germinadas y 148 mg kg^{-1} en plántulas (microgreens), mientras que en *Astragaus glycyphyllos* las concentraciones de hierro fueron elevadas, 734 mg kg^{-1} en semillas germinadas y 345 mg kg^{-1} en microgreens, y en *M. sativa* fue de 105 y 148 mg kg^{-1}, respectivamente para cada muestra. En el presente estudio, las células en

suspensión mostraron 5 y casi 7 veces más, para el tratamiento control y para el tratamiento expuesto a plata en el día 7, respectivamente.

En contraste, en un estudio realizado por Fourati *et al*., (2019) evaluando plantas de *S. portulacastru* expuestas a 0-50 µM de Ni, se reporta una disminución en la concentración de Fe. De igual forma, en un estudio realizado por Jalali *et al*., (2017) en plantas de *Z. mayz* con 100 mg kg^{-1} de Fe_3O_4NPs, observaron también una disminución de Fe, lo cual fue atribuido a la disminución de clorofila y ferritina. Por su parte, Cvjetko *et al*., (2018) observaron que en respuesta a la presencia de AgNPs y $AgNO_3$ en plantas de *N. tabacum*, hubo una acumulación de ambas fuentes de Ag en las vacuolas de las células de raíz, así como en los cloroplastos, lo que ocasionó la ruptura de éstos, inhibiendo su funcionamiento, adicionalmente, el metal provocó daño en el núcleo de las células.

d) Zinc

El Zn, forma parte de numerosas sales solubles, siendo el segundo metal de transición más abundante, en el suelo se encuentra en un rango de 0.7-0.8 mg Zn kg^{-1}, mientras que en rocas sedimentarias se ha reportado en el intervalo de 0.1-1.2 mg Zn kg^{-1}, en suelos agrícolas de 0.1 a 3.0 mg Zn kg^{-1},mientras que en suelos mineralógicos y orgánicos se han reportado entre 0.5 y 0.66 mg de Zn kg^{-1}, respectivamente (Broadley *et al*., 2007). Biológicamente, el zinc está presente en 6 clases de enzimas, como las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, las cuales tienen una participación estructural, así como unidad catalítica y de regulación de actividades a través de la estabilización conformacional de varias proteínas, así como la estabilización e integridad de la membrana (Gupta *et al*., 2016). También, podemos encontrar al Zn en varios radioisótopos, mientras que en solución puede estar en estado de oxidación (+2), similar al Fe^{2+} y el Cu^{2+}, aunque la participación de este microelemento es alta, no se sabe con claridad el porcentaje que se encuentra libre en el citosol (Zn^{2+}) o realizando enlaces moleculares (Broadley *et al*., 2007).

En el análisis de la concentración de Zn en la cinética de los cultivos de células en suspensión de *M. sativa*, se observan diferencias entre ambos tratamientos. Para el tratamiento control, al inicio de la cinética se observa un contenido de 1770.92 ± 82.64 mg Zn kg^{-1} (PS), posteriormente el contenido desciende gradualmente, llegando al día 9 con un contenido de 732.22 ± 3.47 mg Zn kg^{-1} (PS) que se mantiene relativamente estable durante el resto de los puntos de la cinética. Mientras que para el tratamiento con inducción de estrés por Ag hubo un contenido significativamente menor (394.61 ± 204.24 mg Zn kg^{-1} PS) en el punto cero, siendo 4.5 menos a lo mostrado por el control, sin embargo, muestran contenidos similares al tratamiento control hasta el día 9, y desde el día 11 en adelante hay un incremento de casi 4 veces en la concentración con respecto al control, tendencia que se observa en el resto de la cinética (**Fig. 9**). Probablemente los cambios en la concentración de Zn en los primeros días de cultivo se puedan atribuir a la adaptación de las células al medio de cultivo, incluido el proceso de estrés por plata, y se observa que posterior al noveno día, donde los cultivos ya se encuentran en crecimiento exponencial, la concentración del microelemento se estabiliza en ambos tratamientos. De forma similar, se ha reportado una variación en la concentración de Zn en plántulas, lo cual se atribuye a la etapa de crecimiento (Gupta, *et al*., 2016; Robson, 1981).

Broadley *et al*., (2012) y Broadley *et al*., (2007), han reportado que bajo concentraciones de 300-100 mg Zn kg^{-1}, las especies vegetales muestran síntomas de toxicidad. En plantas completas la deficiencia de Zn produce un necrosamiento de raíces, al igual que la presencia de clorosis, así como una pigmentación color rojizo o cobre, y el rango de auxinas es deficiente. La baja concentración disminuye la actividad y acumulación de la Cu/Zn-SOD, lo que causa un daño oxidativo a la membrana celular (Broadley *et al*., 2007).

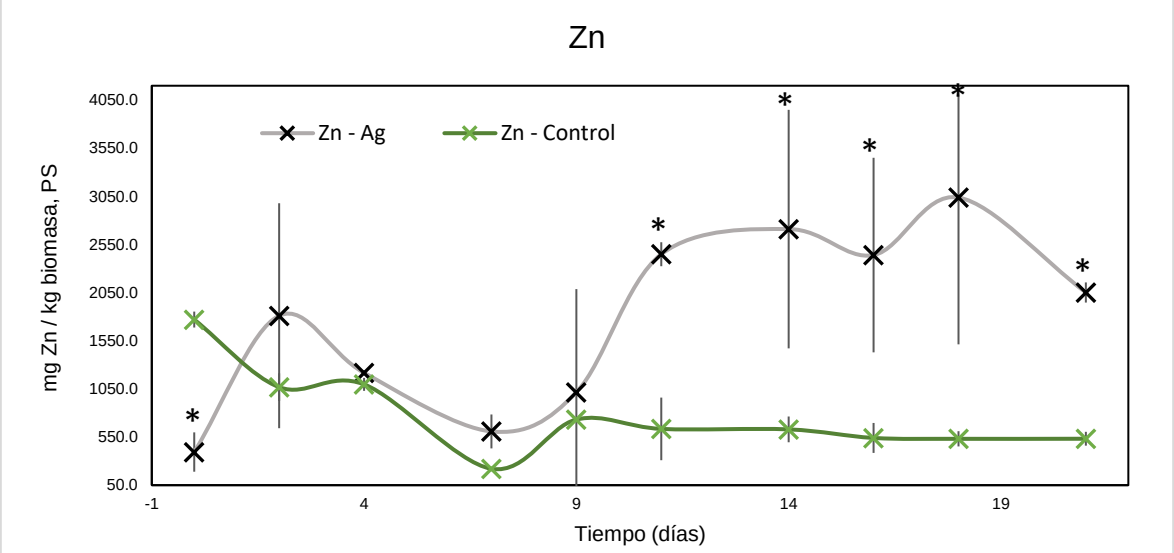


*Figura 9. Contenido de Zn en células en suspensión de M. sativa expuestas a 50 µM de plata (-×-) y 0 µM de plata (-×-). *Indican diferencias significativas*

En el 2017, Butkutė *et al*., examinaron germoplasma de 7 especies de leguminosas empleando plantas jóvenes en etapa de ramificación, demostrando que las plantas jóvenes son ricas en minerales, para *M. sativa* reportaron una concentración de Zn de 23 mg kg^{-1}, PS. También, en un estudio de Butkute *et al*., (2018) evaluaron el contenido de minerales de diversas leguminosas, encontrando para *M. sativa* una concentración de Zn de 57.1. 118 y 273 mg kg^{-1} PS, en semillas crudas, semillas germinadas y microgreens, respectivamente. Mientras que la concentración que se han reportado en células vegetales es de 743.05, 115.77 y 32.05 mg Zn kg^{-1} PS, en paredes celulares, citoplasma y orgánulos celulares excluyendo la vacuola, respectivamente (Broadley *et al*., 2007).

En contraste, en *S. portulacastru* expuesta a Ni (0-50 µM), se vio afectada la absorción de diversos elementos, sin embargo, para el Zn no mostró diferencias con respecto al tratamiento control. Mientras que plantas de *A. thaliana*, expuesta a iones de plata y nanopartículas de plata (2 mg L^{-1}), se vio afectada la concentración de Zn, en el tratamiento con AgNPs disminuye casi el 50% (12.75 mg L^{-1}) y el tratamiento con Ag^{+} no se ve afectada la concentración (22.14 mg L^{-1}), con respecto al control (Qian *et al*., 2013).

Debido a que la alfalfa es considerada un súper alimento, ha sido sujeto de diversos análisis en el contenido de minerales, proteína cruda, cenizas, entre otros, en diferentes

tejidos, como semillas, semillas germinadas, plántulas, o plantas completas. Soto-Zarazúa *et al*., (2017) analizaron plántulas completas de alfalfa y de frijol obtenidas del estado de Guanajuato, México reportando para Zn 16.5 y 33.2 g kg^{-1}, y Fe 68.5 y 209.9 g kg^{-1}, respectivamente. Mientras que alfalfas cultivadas en Lituania presentaban 23.3 mg kg^{-1} de Zn y 307 mg kg^{-1} para Fe (Butkutė *et al*., 2017).

La diferencia en el contenido de microelementos depende del tipo de tejido, del elemento en particular, así como la distribución y biodisponibilidad de los minerales, éste contenido cambia dependiendo del estado fisiológico de la especie vegetal, condiciones climáticas, y el genotipo de la planta, edad de la planta, técnicas analíticas y parte analizada, debido a esto los datos que se obtienen suelen ser diferentes (Butkute *et al*., 2018; Butkutė *et al*., 2017). De igual forma, en un estudio realizado por Loneragan (1968), reporta que existe una relación entre el crecimiento de la planta y el contenido de nutrientes, sin embargo, es compleja y depende de factores como el suministro, el radio de absorción, distribución de los sitios funcionales y el grado de movilidad del nutriente en el organismo.

Brennan *et al*., (2019) y O'Hara, (2001), mencionan que en las leguminosas se encuentran las mayores concentraciones de microelementos como Fe, Zn, Cu y Co. Por otro lado, a medida que las plantas se acercan a la adultez, la demanda de nutrientes para el crecimiento disminuye y las concentraciones del umbral critico a nivel general va disminuyendo para la mayoría de los nutrientes, a su vez, la concentración de los minerales en los tejidos suele ser bajo (Van Maarschalkerweerd & Husted, 2015). Por su parte, en el estudio por Clemens (2019), se menciona que los micronutrientes son controlados estrictamente, los cuales deben formar complejos en su forma más estable, esta restricción tiene implicaciones en que tenga una baja disponibilidad del metal, y la concentración del citosol debe ser cercana a cero, esto evita la asociación a otras moléculas menos estables, como el Fe, Mn y Cu, particularmente en el plegamiento de proteínas, en donde el metal exógeno puede anclarse a los polipéptidos nacientes. La concentración del Cu debe estar cercana a cero, y el cobre restante, que se encuentra disponible o libre se une a las metalochaperonas (Clemens, 2019; Waldron & Robinson, 2009).

En el presente trabajo, se observan cambios en la absorción de los microelementos por la presencia de la plata (**Fig. 6-9**), donde se observa un comportamiento diferente en la cuantificación de los 4 microelementos con respecto al tratamiento control, atribuible a su participación en diferentes mecanismos de defensa. Por otro lado, un estudio donde se evaluó el efectos de NPs de ZnO, se observó el incremento del contenido de proteína y una disminución en la concentración de Cu y Mo en *Cucumis sativus* (Rico *et al*., 2014). Los MP provocan afectaciones en la membrana celular, ingresando e inhibiendo la absorción de otros elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la célula, además, emplean los canales de transporte de otros elementos. Se sabe que la plata inhibe algunas enzimas, particularmente las que contienen sulfuros, provocando la alteración en la membrana celular, por lo cual, no es especifica en el consumo de elementos, permitiendo así el ingreso de Ag (Hanks *et al*., 2015). Asimismo, la presencia de plata tiene afectaciones en la concentración de los nutrientes, se ha visto que AgNPs boquean físicamente las rutas de difusión y los canales de absorción activa de los microelementos (Zuverza-Mena *et al*., 2016). Magesky & Pelletier, (2015) declaran que la plata es un disruptor de membrana, que modifica la homeostasis celular, esta disrupción afecta el consumo de elementos esenciales, al igual que interrumpe genes que codifican para trasportadores de minerales.

Por su parte Morina & Küpper, (2020), evaluaron el efecto de Cd (15 y 75 µM) y Zn (10 µM, como control) en plantas de *Arabidopsis halleri*, el cadmio afecto la absorción de macro (Ca y K) y micronutrientes (Fe, Cu, Mn y Zn), en hojas disminuyo el contenido de Fe, Zn y Mn, mientras que el cobre aumento 2 veces. Por otro lado, en plantas de *Cucurbita pepo* cultivadas en suelo se observaron los efectos de nanomateriales de cobre (nCuO, bCuO y CuNP) en concentraciones de 50 y 200 mg kg^{-1}, los tratamientos con exposición a los nanomateriales, la concentración de Zn (en raíz) disminuyo y el Fe aumentó, con respecto al control (Tamez *et al*., 2019).

En *Salvia sclarea* cultivada en invernadero sometida a estrés por Cd (100 µM) durante 8 días, se observó el aumento en la concentración de microelementos en raíces, como el Fe y Zn, 2 y 13 veces mayor contenido con respecto al control, respectivamente; mientras que en hojas el contenido de Fe y Zn disminuyo, en un 63% y 25%, respectivamente, por otro lado, en las raíces, el contenido de Mn no mostro diferencias significativas y el contenido de Cu aumento en raíces en comparación al tratamiento control, debido a que los iones de Cd emplean transportadores de membranas propios de cationes como el Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} y Zn^{2+} (Dobrikova *et al*., 2021).

Mientras que en un estudio realizado en plantas de *Orizaba sativa* sometidas a estrés por Ag, se adiciono bio-carbono (BC) para inmovilizar y reducir la absorción y traslocación de AgNPs (0-1000 mg L^{-1}), se reporta que la capacidad de acumulación de macro y microelementos fueron afectados; Cu, Mn y Zn incrementaron su contenido en hojas en un 43, 93 y 18% en comparación al control, respectivamente, mientras que la concentración de Fe se redujo de un 9-44%; lo que fue asociado a la disrupción de la membrana, generando disturbios en la homeostasis celular (Abbas *et al*., 2019). Por otro lado, Zuverza-Mena *et al*., (2016), realizaron un estudio con semillas de *Raphanus sativus*, germinadas en cajas petri, expuestas a soluciones de 0-500 mg L^{-1} de AgNPs durante 8 días. En los tratamientos se observó que la acumulación de Ag dependía de la concentración a la que estuvo expuesta, observándose la mayor acumulación (900 mg Ag L^{-1}) en el tratamiento a 500 mg Ag L^{-1}, además, la concentración de micronutrientes se vio afectada, en el caso de los macronutrientes como el Ca y el Mg se observó una reducción >10%, por otro lado, los micronutrientes donde hubo una disminución en su contenido fueron B, Mn y Cu en todos los tratamientos, mientras que el Zn solo disminuyo en el tratamiento a 500 mg L^{-1}.

7 CONCLUSIONES

La plata tiene un efecto de toxicidad en los cultivos en suspensión de *Medicago sativa,* al promover una reducción hasta del 30% en el crecimiento celular como respuesta al estrés generado por la presencia del metal. Incluso, los parámetros cinéticos del crecimiento celular de *M. sativa* se ven afectados por la presencia de la plata, la velocidad de crecimiento disminuyó 1.4 veces conduciendo a un aumento en el tiempo de duplicación.

Los cultivos de células de *M. sativa* mostraron una gran capacidad de absorber/acumular Ag desde el día cero, incrementando el contenido en los días posteriores y observando un límite de acumulación con un máximo de absorción de 495 mg Ag kg^{-1}. Obteniendo un factor de bioacumulación alto >>1, lo que la califica como una especie acumuladora y un modelo adecuado de estudio.

El contenido de microelementos en los cultivos de células en suspensión es un dato importante, debido a que son un componente fundamental en la nutrición de las células, participando en diversas actividades biológicas, incluidos los procesos detoxificantes. En el presente estudio, la presencia de plata en los cultivos promovió una mayor absorción de Mn, Fe y Zn, con respecto al tratamiento control, siendo la excepción el Cu, donde se observaron bajas concentraciones.

Dentro de las técnicas que emplean plantas completas se encuentra la fitoextracción y fitoacumulación

8 REFERENCIAS

Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez-Fernández, A., & López-Millán, A. F. (2011). Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(5), 471–482. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.026

Abbas, Q., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M. U., Ullah, H., & Ahmed, R. (2019). Effects of biochar on uptake, acquisition and translocation of silver nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to growth, photosynthetic traits and nutrients displacement. *Environmental Pollution*, *250*, 728–736. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.083

Achari, G. A., & Kowshik, M. (2018). Recent developments on nanotechnology in agriculture: plant mineral nutrition, health, and interactions with soil microflora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*, 8647–8661. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00691

Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Qayyum, M. F., & Irshad, M. K. (2015). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *119*, 186–197. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.011

Adriano, D. C. (2001). Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability, and risk of metals. 2nd ed. Springer Verlag New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5

Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals; Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869–881. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

Allan, J. E. (1959). The determination of iron and manganese by atomic absorption. *Spectrochimica Acta*. 15, 800-806. https://doi.org/10.1016/s0371-1951(59)80376-3

Allen, M. D., Kropat, J., Tottey, S., Del Campo, J. A., & Merchant, S. S. (2007). Manganese deficiency in chlamydomonas results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiology*, *143*(1), 263–277. https://doi.org/10.1104/pp.106.088609

Ameen, N., Amjad, M., Murtaza, B., Abbas, G., Shahid, M., Imran, M., Naeem, M. A., & Niazi, N. K. (2019). Biogeochemical behavior of nickel under different abiotic stresses: toxicity and detoxification mechanisms in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(11), 10496–10514. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04540-4

Arizmendi Montufar, I. (2019). Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Crataegus monogyna*, potencialmente prductores de compuestos ansiolítivos. Tesis.

Babakhani, B., Khavari-Nejad, R. A., Hassan Sajedi, R., Fahimi, H., & Saadatmand, S. (2011). Biochemical responses of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars subjected to NaCl salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, *10*(55), 11433–11441. https://doi.org/10.5897/AJB11.594

Balk, J., & Schaedler, T. A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *65*, 125–153. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759

Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J. W., & Vercellotti, G. M. (1992). Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(25), 18148–18153. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37165-0

Barbasz, A., Kreczmer, B., & Oćwieja, M. (2016). Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt ($AgNO_3$). *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(3), 1–11. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2092-z

Bell, R. W., & Dell, B. (2008). *Micronutrient for Sustainable Food, Feed, Fibre and Bioenergy Production*. International Fertilizer Industry.

Benn, T. M., & Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, *42*(18), 7025–7026. https://doi.org/10.1021/es801501j

Bleecker, A. B. ., & Kende, H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plant. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*, 1–18. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1

Brennan, R. F., Penrose, B., & Bell, R. W. (2019). Micronutrients limiting pasture production in Australia. *Crop and Pasture Science*, *70*(12), 1053–1064. https://doi.org/10.1071/CP19087

Briat, J. F., Dubos, C., & Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, *20*(1), 33–40. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.005

Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of Nutrients: Micronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants:* 3rd Ed. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants: Tansley review. *New Phytologist*, *173*(4), 677–702. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x

Butkutė, B., Padarauskas, A., Cesevičienė, J., Pavilonis, A., Taujenis, L., & Lemežienė, N. (2017). Perennial legumes as a source of ingredients for healthy food: proximate, mineral and phytoestrogen composition and antibacterial activity. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(9), 2661–2669. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2703-8

Butkute, B., Taujenis, L., & Norkevičiene, E. (2018). Small-seeded legumes as a novel food source. Variation of nutritional, mineral and phytochemical profiles in the chain: Raw seeds-sprouted seeds-microgreens. *Molecules*, *24*(1). https://doi.org/10.3390/molecules24010133

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Asztemborska, M., Steborowski, R., Polkowska-Motrenko, H., Danko, B., & Ryniewicz, J. (2012). Application of neutrin activation for investigation of Fe_3O_4 nanoparticles accumulation by plants. *Nukleonika*, *57*, 42. https://doi.org/10.1017/s1431927620022886

Cai, W., Wang, Y., Dang, F., & Zhou, D. (2020). Copper pre-exposure reduces AgNP bioavailability to wheat. *Science of the Total Environment*, *707*, 136084. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136084

Carrasco-Gil, S., Rodríguez-Menéndez, S., Fernández, B., Pereiro, R., de la Fuente, V., & Hernandez-Apaolaza, L. (2018). Silicon induced Fe deficiency affects Fe, Mn, Cu and Zn distribution in rice (*Oryza sativa* L.) growth in calcareous conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 125, 153–163. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.01.033

Cabrera Hilerio S. L. (2009). Establecimiento del condiciones *in vitro* para la induccion de morfogenesis en *Dioon merolae* de Luca Sabato y Vázquez Torres (Zamiaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de grado.

Cheng, L., Zhang, S., Yang, L., Wang, Y., Yu, B., & Zhang, F. (2019). Comparative proteomics illustrates the complexity of Fe, Mn and Zn deficiency-responsive mechanisms of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants *in vitro*. *Planta*, *250*(1), 199–217. https://doi.org/10.1007/s00425-019-03163-w

Clemens, S. (2019). Metal ligands in micronutrient acquisition and homeostasis. *Plant Cell and Environment*, *42*(10), 2902–2912. https://doi.org/10.1111/pce.13627

Cota-Ruis, K., Hernández-Viezcas. J. A., Varela-Ramírez, A., Valdés, C., Núñez-Gastélum, J. A., Martínez-Martínez, A., Delgado-Rios, M., Peralta-Videa J. R. & Gardea-Torresdey J. L. (2018). Toxicity of copper hydroxide nanoparticles, bulk copper hydroxide, and ionic copper to alfalfa plants: A spectroscopic and gene expression study. *Environmental Pollution*. 243, 703-712. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.028

Cvjetko, P., Zovko, M., Štefanić, P. P., Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A. M., Vrček, I. V., Letofsky-Papst, I., Šikić, S., & Balen, B. (2018). Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(6), 5590–5602. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0928-8

Da Costa, M. V. J., & Sharma, P. K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, *54*(1), 110–119. https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5

Dai, H., Shan, C., Zhao, H., Li, J., Jia, G., Jiang, H., Wu, S. & Wang, Q. (2015). The difference in antioxidant capacity of four alfalfa cultivars in response to Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114, 312-317. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.044

Deák, M., Horváth, G. V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z., & Dudits, D. (1999). Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology*, *17*(2), 192–196. https://doi.org/10.1038/6198

Deriu, D., Calace, N., Petronio, B. M., & Pietroletti, M. (2007). Morphological and physiological responses of barley plants grown on soils characterised by metal toxicity and metal deficiency. *Società Chimica Italiana*, *97*, 153–162. https://doi.org/10.16382/j.cnki.1000-5560.2015.01.003

Desjardins, D., Pitre, F. E., Nissim, W. G., & Labrecque, M. (2016). Differential uptake of silver, copper and zinc suggests complementary species-specific phytoextraction potential. *International Journal of Phytoremediation*, *18*(6), 598–604. https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1086296

Ding, Y., Wang, Z., Ren, M., Zhang, P., Li, Z., Chen, S., Ge, C., & Wang, Y. (2018). Iron and callose homeostatic regulation in rice roots under low phosphorus. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1486-z

Dobias, J., & Bernier-Latmani, R. (2013). Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environmental Science and Technology*, *47*(9), 4140–4146. https://doi.org/10.1021/es304023p

Dobrikova, A. G., Apostolova, E. L., Hanć, A., Yotsova, E., Borisova, P., Sperdouli, I., Adamakis, I. D. S., & Moustakas, M. (2021). Cadmium toxicity in *Salvia sclarea* L.: An integrative response of element uptake, oxidative stress markers, leaf structure and photosynthesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *209*. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111851

Economía, S. de. (2001). Análisis De Agua - Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales , potables , residuales y residuales tratadas - método de prueba (Cancela a La Nmx-AA-051-1981) Water Analisis - Determination of Metals By Atomic Absorption in Natural. 1–47.

Engels, C., Kirkby, E., & White, P. (2011). Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier. 3rd ed. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00005-4

Ennvironmental Protection Agency, U. S. (1980). *Ambient water quality criteria for silver. EPA-440/5-80-071* (Issue October).

Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., & Ali, M. (2016). Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. *Applied Biochemistry*

and Biotechnology, *180*(6), 1076–1092. https://doi.org/10.1007/s12010-016-2153-1
Fernandes, J. P., Mucha, A. P., Francisco, T., Gomes, C. R., & Almeida, C. M. R. (2017). Silver nanoparticles uptake by salt marsh plants – Implications for phytoremediation processes and effects in microbial community dynamics. *Marine Pollution Bulletin*, *119*(1), 176–183. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.052
Fernández-Silva, I., Sanmartín, P., Silva, B., Moldes, A., & Prieto, B. (2011). Quantification of phototrophic biomass on rocks: Optimization of chlorophyll-a extraction by response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(1), 179–188. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0843-1
Fourati, E., Vogel-Mikuš, K., Bettaieb, T., Kavčič, A., Kelemen, M., Vavpetič, P., Pelicon, P., Abdelly, C., & Ghnaya, T. (2019). Physiological response and mineral elements accumulation pattern in *Sesuvium portulacastrum* L. subjected *in vitro* to nickel. *Chemosphere*, *219*, 463–471. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.081
Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, *133*(1), 21–25. https://doi.org/10.1007/BF00386001
Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(14), 7761–7764.
Gangwar, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., & Maurya, J. N. (2014). Plant responses to metal stress: the emerging role of plant growth hormones in toxicity alleviation. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. 2dn Ed. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00010-7
Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, *19*(4), 1357–1361. https://doi.org/10.1021/la020835i
Gottschalk, F., & Nowack, B. (2011). The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*, *13*(5), 1145–1155. https://doi.org/10.1039/c0em00547a
Gupta, N., Ram, H., & Kumar, B. (2016). Mechanism of zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *15*(1), 89–109. https://doi.org/10.1007/s11157-016-9390-1
Haferburg, G., & Kothe, E. (2010). Metallomics: Lessons for metalliferous soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(4), 1271–1280. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2695-z
Hameed, A., Rasool, S., Azooz, M. M., Hossain, M. A., Ahanger, M. A., & Ahmad, P. (2016). Heavy metal stress: plant responses and signaling. *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*, Elsevier Inc.. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00024-2
Hanks, N. A., Caruso, J. A., & Zhang, P. (2015). Assessing *Pistia stratiotes* for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag(I) contaminated waters. *Journal of Environmental Management*, *164*, 41–45. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.026
Hegazy, H. S., Rabie, G. H., Shaaban, L. D., & Raie, D. S. (2014). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by callus of *Medicago sativa*. *Life Science Journal*, *11*(10), 1211–1214.
Helaou, S., Boughattas, I., Hattab, S., Mkhinini, M., Alphonse, V., Livet, A., Bousserrhine, N. & Banni. (2020). Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa*to nickel exposure. *Chemosphere*. 126121. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126121
Hossain, Z., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 26644–26653. https://doi.org/10.3390/ijms161125980
Jalali, M., Ghanati, F., Modarres-Sanavi, A. M., & Khoshgoftarmanesh, A. H. (2017). Physiological effects of repeated foliar application of magnetite nanoparticles on maize plants. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *203*(6), 593–602. https://doi.org/10.1111/jac.12208
Jamshidi, M., Ghanati, F., Rezaei, A., & Bemani, E. (2014). Change of antioxidant enzymes activity of hazel (*Corylus avellana* L.) cells by AgNPs. *Cytotechnology*, *68*(3), 525–530. https://doi.org/10.1007/s10616-014-9808-y
Jia, C., Wu, X., Chen, M., Wang, Y., Liu, X., Gong, P., Xu, Q., Wang, X., Gao, H., & Wang, Z. (2017). Identification of genetic loci associated with crude protein and mineral concentrations in alfalfa (*Medicago sativa*) using association mapping. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1047-x
Jiang, H. S., Qiu, X. N., Li, G. B., Li, W., & Yin, L. Y. (2014). Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *33*(6), 1398–1405. https://doi.org/10.1002/etc.2577
Jiang, H. S., Yin, L. Y., Ren, N. N., Zhao, S. T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., & Gontero, B. (2017). Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, *11*(2), 157–167. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802
Jiang, R., Huang, S., Wang, W., Liu, Y., Pan, Z., Sun, X., & Lin, C. (2020). Heavy metal pollution and ecological risk assessment in the Maowei sea mangrove , China. *Marine Pollution Bulletin*, *161*, 111816. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111816
Johnson, D. B. (2013). Development and application of biotechnologies in the metal mining industry.

Environmental Science and Pollution Research, *20*(11), 7768–7776. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1482-7

Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. (2019). Trace elements form soil to human.1st Ed. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32714-1

Kabir, A. H., Hossain, M. M., Khatun, M. A., Mandal, A., & Haider, S. A. (2016). Role of silicon counteracting cadmium toxicity in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01117

Kamal Kumar, V., Muthukrishnan, S., & Rajalakshmi, R. (2020). Phytostimulatory effect of phytochemical fabricated nanosilver (AgNPs) on *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. seed germination: An insight from antioxidative enzyme activities and genetic similarity studies. *Current Plant Biology*, *23*. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100158

Kampfenkel, K., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1995). Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants: Implications to oxidative stress. *Plant Physiology*, *107*(3), 725–735. https://doi.org/10.1104/pp.107.3.725

Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, *15*(6). https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4

Kirkby, E. (2012). Introduction, definition and classification of nutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: 3rd ed*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00001-7

Lee, W. M., Kwak, J. Il, & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, *86*(5), 491–499. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.013

Li, M., Ahammed, G. J., Li, C., Bao, X., Yu, J., Huang, C., Yin, H., & Zhou, J. (2016). Brassinosteroid ameliorates zinc oxide nanoparticles-induced oxidative stress by improving antioxidant potential and redox homeostasis in tomato seedling. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00615

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., & Watari, F. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis T87* suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*, *170*, 578–583. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.025

Liu, S., & Yang, R. (2020). Regulations of reactive oxygen species in plants abiotic stress: an integrated overview. *Plant Life Under Changing Environment*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818204-8.00017-5

Liu, Y. S., Geng, J. C., Sha, X. Y., Zhao, Y. X., Hu, T. M., & Yang, P. Z. (2019). Effect of rhizobium symbiosis on low-temperature tolerance and antioxidant response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, *10*(April), 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00538

Loneragan, J. F. (1968). Nutrient requirements of plants. *nature*, *220*(3), 1307–1308. https://doi.org/10.1071/AR9690465

López, M., Peralta-Videa, J., Benitez, T. & Gardea-Torresdey J. (2005). Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere*. 61, 595-598. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.028

López-Millán, A. F., Grusak, M. A., Abadía, A., & Abadía, J. (2013). Iron deficiency in plants: An insight from proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 1–8. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00254

Magesky, A., & Pelletier, É. (2015). Toxicity mechanisms of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. *Aquatic Toxicology*, *167*, 106–123. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.011

Mahjouri, S., Kosari-Nasab, M., Mohajel Kazemi, E., Divband, B., & Movafeghi, A. (2020). Effect of Ag-doping on cytotoxicity of SnO_2 nanoparticles in tobacco cell cultures. *Journal of Hazardous Materials*, *381*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121012

Mahjouri, S., Movafeghi, A., Divband, B., & Kosari-Nasab, M. (2018). Toxicity impacts of chemically and biologically synthesized CuO nanoparticles on cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *135*(2), 223–234. https://doi.org/10.1007/s11240-018-1458-x

Maksymiec, W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica.* (34)3, 321–342. https://doi.org/10.1023/A:1006818815528

Mani, M., Chang, J. H., Dhanesh Gandhi, A., Kayal Vizhi, D., Pavithra, S., Mohanraj, K., Mohanbabu, B., Babu, B., Balachandran, S., & Kumaresan, S. (2020). Environmental and biomedical applications of AgNPs synthesized using the aqueous extract of *Solanum surattense* leaf. *Inorganic Chemistry Communications*, *121*, 108228. https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108228

Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832

Mastronardi, E., Tsae, P., Zhang, X., Monreal, C., & DeRosa, M. C. (2015). Strategic role of nanotechnology in fertilizers: potential and limitations. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024-7

Midhat, L., Ouazzani, N., Hejjaj, A., Bayo, J., & Mandi, L. (2018). Phytostabilization of polymetallic contaminated soil using *Medicago sativa* L. in combination with powdered marble: Sustainable rehabilitation.

International Journal of Phytoremediation, *20*(8), 764–772. https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1425665

Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., & Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *10*(4), 476–494. https://doi.org/10.4067/s0718-95162010000200008

Mohamed Iqbal, M. C., & Sabeera Iqbal, S. (2019). Remediation of potentially toxic elements through transgenic plants: *in vitro* studies and the way forward. *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00006-7

Morina, F., & Küpper, H. (2020). Direct inhibition of photosynthesis by Cd dominates over inhibition caused by micronutrient deficiency in the Cd/Zn hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *155*, 252–261. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.018

Mourato, M. P., Martins, L. L., & Campos-Andrada, M. P. (2009). Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. *Biologia Plantarum*, *53*(1), 105–111. https://doi.org/10.1007/s10535-009-0014-2

Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater; an evaluation. *Engineering Geology*, *60*, 193–207. https://doi.org/10.1061/9780784408940

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assay with *Tabacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 474–497.

Mussali-Galante, P., Castrejón-Godínez, M. L., Ramírez-Zamoa, J., & Tovar-Sánchez, E. (2019). El viaje de los metales pesados. *Biotecnología En Movimiento*, *17*.

Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Valencia-Cuevas, L., & Rojas, E. (2012). Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanophrys* chronically exposed to mine tailings in Morelos, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(11), 7666–7679. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1263-8

Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, *112*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.056

Narayanan, M., Davis, L. C., Tracy, J. C., Erickson, L. E., & Green, R. M. (1995). Experimental and modeling studies of the fate of organic contaminants in the presence of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials*, *41*, 229–249. https://doi.org/10.1016/0304-3894(94)00113-U

Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, *331*, 622–627.

Nguyen, T., Amyot, M., & Labrecque, M. (2017). Differential effects of plant root systems on nickel, copper and silver bioavailability in contaminated soil. *Chemosphere*, *168*, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.047

Nirola, R., Megharaj, M., Beecham, S., Aryal, R., Thavamani, P., Vankateswarlu, K., & Saint, C. (2016). Remediation of metalliferous mines, revegetation challenges and emerging prospects in semi-arid and arid conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(20), 20131–20150. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7372-z

Niu, Z., Sun, L., Sun, T., Li, Y. & Wang, H. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences.* 19(8). 961-967. https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60158-2

Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *49*, 249–279. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249

O'Hara, G. W. (2001). Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *41*(3), 417–433. https://doi.org/10.1071/EA00087

Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L., & Dewez, D. (2013). Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(4), 902–907. https://doi.org/10.1002/etc.2131

Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, *184*, 105–126. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5

Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: Transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, *5*(3), 447–463. https://doi.org/10.3390/agronomy5030447

Patra, D. K., Pradhan, C., & Patra, H. K. (2020). Environmental technology & innovation toxic metal decontamination by phytoremediation approach : Concept, challenges, opportunities and future perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, *18*, 100672. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100672

Pedrosa Gomes, M., Mércia Lima Carvalho Carneiro, M., & Souza Garcia, Q. (2014). Trace elements tolerance modulated by antioxidant system in plants. *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling.* 523–540. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00017-4

Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Tiemann, K. J., Parsons, J. G., De la Rosa, G., & Carrillo, G. (2002). Potential of alfalfa plant to phytoremediate individually contaminated montmorillonite-

soils with cadmium(II), chromium(VI), copper(II), nickel(II), and zinc(II). *Environmental Contamination and Toxicology*, *69*(1), 74–81. https://doi.org/10.1007/s00128-002-0012-y

Peralta-Videa, J. R., De la Rosa, G., González, J. H. & Gardea-Torresdey J. L. (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research*. 8, 679-685. https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00040-6

Peuke, A. D., & Rennenberg, H. (2005). Phytoremediation. *EMBO reports*, *6*(6), 497–501. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400445

Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., & Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *25*(9), 1947–1956. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5

Rai, P. K., Kim, K. H., Lee, S. S., & Lee, J. H. (2020). Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. *Science of the Total Environment*, *705*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135858

Raklami, A., Oufdou, K., Tahiri, A. I., Mateos-Naranjo, E., Navarro-Torre, S., Rodríguez-Llorente, I. D., Meddich, A., Redondo-Gómez, S., & Pajuelo, E. (2019). Safe cultivation of *Medicago sativa* in metal-polluted soils from semi-arid regions assisted by heat-and metallo-resistant PGPR. *Microorganisms*, *7*(7). https://doi.org/10.3390/microorganisms7070212

Rao, K. V. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (2006). Physiology and molecular biology of stress toleerance in plants. *Springer*.

Rehman, M., Liu, L., Wang, Q., Saleem, M. H., Bashir, S., Ullah, S., & Peng, D. (2019). Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(18), 18003–18016. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05073-6

Rico, C. M., Lee, S. C., Rubenecia, R., Mukherjee, A., Hong, J., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Cerium oxide nanoparticles impact yield and modify nutritional parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(40), 9669–9675. https://doi.org/10.1021/jf503526r

Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., & Garde-Torresdey, J. L. (2011). Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3485–3498. https://doi.org/10.1021/jf104517j.Interaction

Robson, A. D. (1981). Zinc in soils and plants. *Developments in plant and soil sciences*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2

Römheld, V. (2012). Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: 3rd Ed*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00011-X

Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J., & Raskin, I. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian mustard*. *Plant Physiology*, *109*(4), 1427–1433. https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1427

Santos, A. R., Miguel, A. S., Tomaz, L., Malhó, R., Maycock, C., Patto, M. C. V., Fevereiro, P., & Oliva, A. (2010). The impact of CdSe / ZnS Quantum Dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture. *Journal of Nanobiotechnology*. *8*(24), 1–14. https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-24

Schmidt, W., Bartels, M., Tittel, J., & Fühner, C. (1997). Physiological effects of copper on iron acquisition processes in Plantago. *New Phytologist*, *135*(4), 659–666. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00691.x

SEMARNAT. (2007). NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. *Diario Oficial de La Federación*, 69. http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/147ssa16.html

SEMARNAT. (1998). NOM-001-SEMARNAT-1996 Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Norma Oficial Mexicana*, 33. https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf

Sfriso, A. A., Mistri, M., Munari, C., Moro, I., Wahsha, M., Sfriso, A., & Juhmani, A. S. (2019). Hazardous effects of silver nanoparticles for primary producers in transitional water systems: The case of the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Environment International*, *131*, 104942. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104942

Shah, V., & Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation*, *18*, 100774. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774

Shahid, M., Shukla, A. K., Bhattacharyya, P., Tripathi, R., Mohanty, S., Kumar, A., Lal, B., Gautam, P., Raja, R., Panda, B. B., Das, B., & Nayak, A. K. (2015). Micronutrients (Fe, Mn, Zn and Cu) balance under long-term application of fertilizer and manure in a tropical rice-rice system. *Journal of Soils and Sediments*, *16*(3), 737–747. https://doi.org/10.1007/s11368-015-1272-6

Shahzad, B., Tanveer, M., Hassan, W., Shah, A. N., Anjum, S. A., Cheema, S. A., & Ali, I. (2016). Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities – A review. *Plant Physiology and Biochemistry* (107), 104–115. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.034

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and

antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1–26. https://doi.org/10.1155/2012/217037
Sharma, S. (2007). Adaptation of photosynthesis under iron deficiency in maize. *Journal of Plant Physiology*, *164*(10), 1261–1267. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.004
Siciliano, S. D., & Germida, J. J. (1998). Mechanisms of phytoremediation: Biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews*, *6*(1), 65–79. https://doi.org/10.1139/a98-005
Silber, A. (2019). Chemical characteristics of soilless media. In *Soilless Culture: Theory and Practice Theory and Practice.* 2nd Ed. Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63696-6.00004-9
Singh, S., Yadav, V., Arif, N., Singh, V. P., Dubey, N. K., Ramawat, N., Prasad, R., Sahi, S., Tripathi, D. K., & Chauhan, D. K. (2020). Heavy metal stress and plant life: uptake mechanisms, toxicity, and alleviation. *Plant Life Under Changing Environment*. Elsiever Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818204-8.00001-1
Singh, V. P., Singh, S., Kumar, J., & Prasad, S. M. (2015). Investigating the roles of ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in arsenate tolerance in ridged *Luffa* seedlings. *Protoplasma*, *252*(5), 1217–1229. https://doi.org/10.1007/s00709-014-0753-6
Smith, R. H. (2013). Plant tissue culture. *Modern aplications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/C2011-0-04367-3
Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., & Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO_2 and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *93*, 60–67. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033
Soto-Zarazúa, M. G., Bah, M., Costa, A. S. G., Rodrigues, F., Pimentel, F. B., Rojas-Molina, I., Rojas, A., & Oliveira, M. B. P. P. (2017). Nutraceutical potential of new alfalfa (*Medicago sativa*) ingredients for beverage preparations. *Journal of Medicinal Food*, *20*(10), 1039–1046. https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0046
Staba E. J. (1982). Plant tissue culture as a source of biochemicals. 2nd Printing.
Tamez, C., Hernandez-Molina, M., Hernandez-Viezcas, J. A., & Gardea-Torresdey, J. L. (2019). Uptake, transport, and effects of nano-copper exposure in zucchini (*Cucurbita pepo*). *Science of the Total Environment*, *665*, 100–106. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.029
The Silver Institute. (2019). *World Silver Survey 2019*.
Thorpe, T. A. (2013). History of plant cell culture. *Plant Tissue Culture.* 3rd Ed., 878. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415920-4.00001-3
Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., & Balen, B. (2019). Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. *Comprehensive Analytical Chemistry*, *84*, Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010
Torres Ruíz, J. J. (2017). Fitomejoramiento por cultivo de tejidos vegetales para incrementar la tolerancia a estrés por Ag en *Medicago sativa*. Tesis.
Tovar-Sánchez, E., Hernández-Plata, I., Martínez, M. S., Valencia-Cuevas, L., & Galante, P. M. (2018). Heavy metal pollution as a biodiversity threat. *Heavy Metals*. https://doi.org/10.5772/intechopen.74052
Van Maarschalkerweerd, M., & Husted, S. (2015). Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 1–15. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00169
Waldron, K. J., & Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(1), 25–35. https://doi.org/10.1038/nrmicro2057
Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K. G., Malysheva, A., McKenna, B. A., Menzies, N. W., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2017). Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science: Nano*, *4*(2), 448–460. https://doi.org/10.1039/c6en00489j
Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R., & Jin, L. (2011). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, *159*(12), 3627–3633. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.001
Weerakoon, S. R. (2019). Genetic engineering for metal and metalloid detoxification. *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00002-X
White, P. J. (2012). Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: 3rd Ed.* 1948. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00002-9
Wu, J., Wang, G., Vijver, M. G., Bosker, T., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2020). Foliar versus root exposure of AgNPs to lettuce: Phytotoxicity, antioxidant responses and internal translocation. *Environmental Pollution*, *261*, 114117. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114117
Xiong, J., Sun, Y., Yang, Q., Tian, H., Zhang, H., Liu, Y., & Chen, M. (2017). Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Science*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12953-017-0127-z
Xiong, P. peng, He, C. quan, OH, K., Chen, X., Liang, X., Liu, X., Cheng, X., Wu, C. lu, & Shi, Z. (2018). *Medicago*

sativa L. enhances the phytoextraction of cadmium and zinc by *Ricinus communis* L. on contaminated land in situ. *Ecological Engineering*, *116*, 61–66. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.02.004

Young, A. J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, *83*(4), 702–708. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02490.x

Zhang, C., Hu, Z., Li, P., & Gajaraj, S. (2016). Governing factors affecting the impacts of silver nanoparticles on wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, *572*, 852–873. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.145

Zhang, M., Wang, J., Bai, S. H., Teng, Y., & Xu, Z. (2018). Evaluating the effects of phytoremediation with biochar additions on soil nitrogen mineralization enzymes and fungi. *Environmental Science and Pollution Research.* 25, 23106-23116*.* https://doi.org/10.1007/s11356-018-2425-0

Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: Root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00090

9 ANEXOS

a) Curvas de calibración

1. Curva de calibración para Ag, R^2>0.9

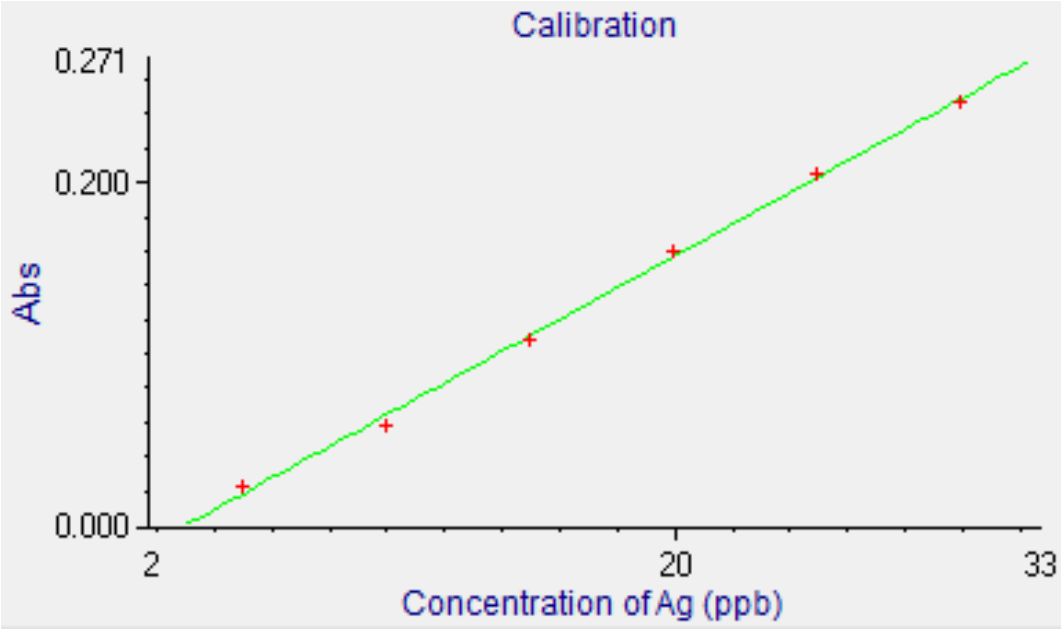


Figura 10. Curva de calibración para Ag (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica.

2. Curva para Cu, R^2>0.9

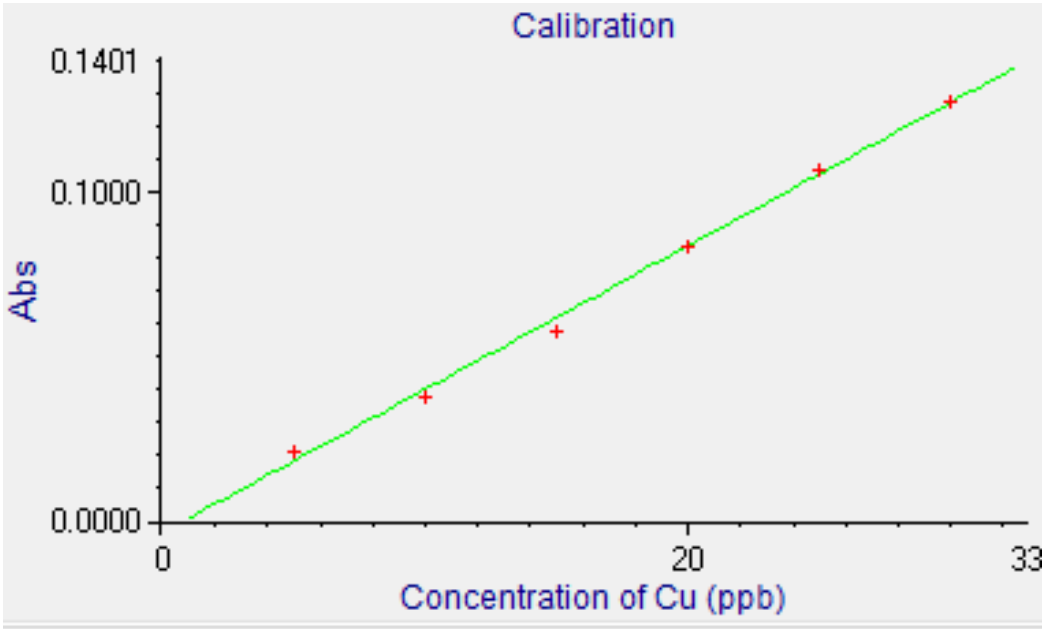


Figura 11. Curva de calibración para Cu (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica.

3. Curva para Zn, R^2>0.9

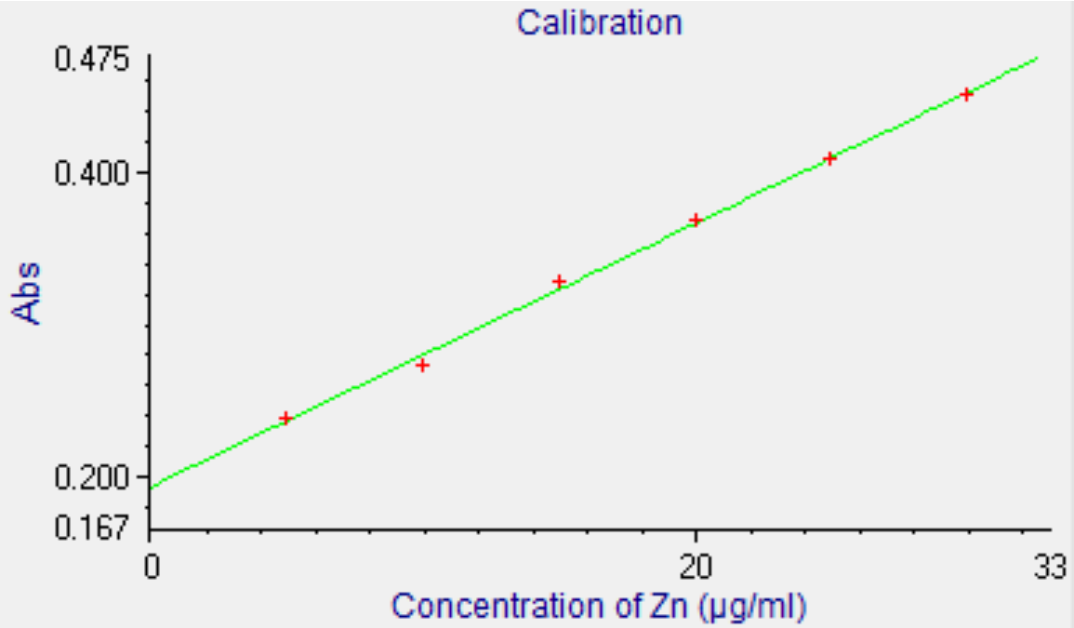


Figura 12. Curva de calibración de Zn (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica.

4. Curva para Mn, R^2>0.9

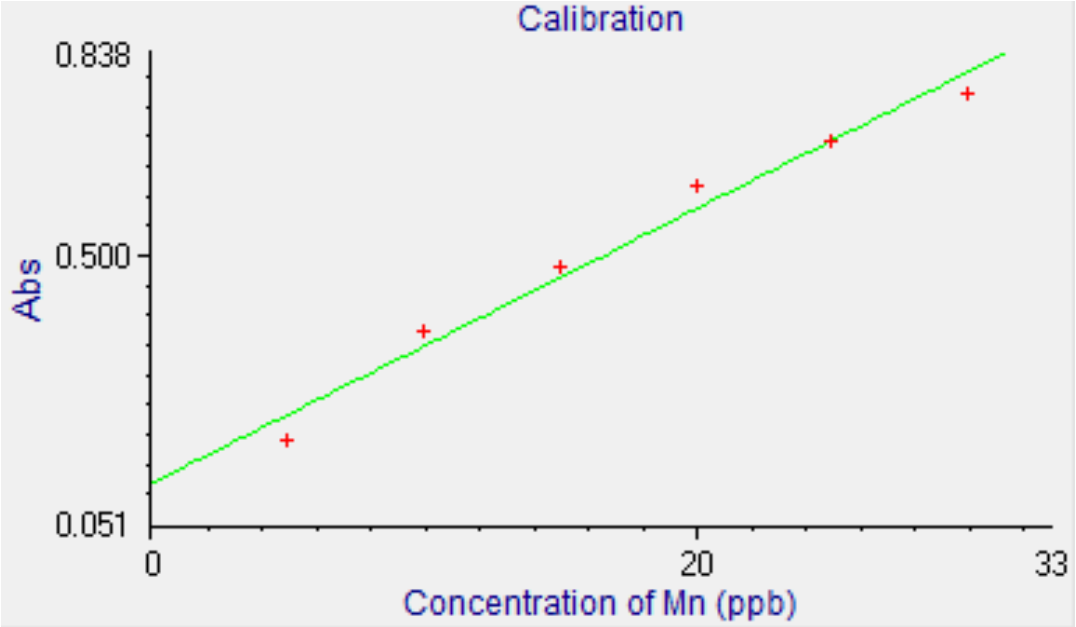


Figura 13. Curva de calibración de Mn (ppb), en horno de grafito. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica.

5. Curva para Fe, R^2>0.9

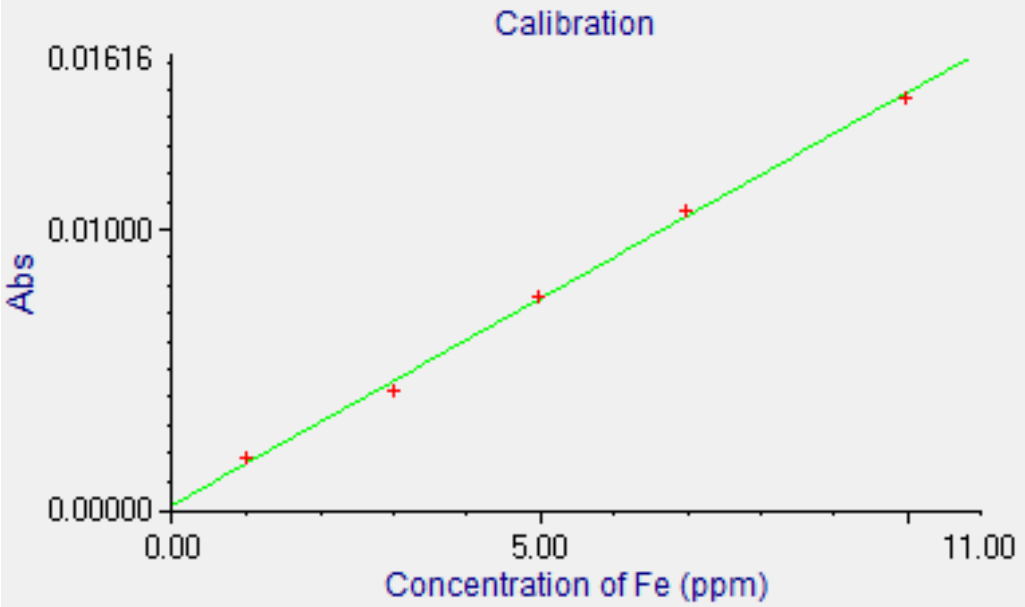


Figura 14. Curva de calibración de Fe (ppm), en flama. Tomada del espectrofotómetro de absorción atómica.

b) Presentación del trabajo



Figura 15. Presentación del trabajo en el congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería en el 2019.



Figura 16. Presentación del trabajo en el congreso de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A. C. en el 2020, de forma virtual.