

FITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO EN EL HELECHO ACUÁTICO *Azolla filiculoides* Lam.

PHYTOTOXICITY OF ZnO NANOPARTICLES ON THE AQUATIC FERN *Azolla filiculoides* Lam.

Griselda S. Zarate-Cruz¹, Hilda A. Zavaleta-Mancera^{1*}, Alejandro Alarcón², Luis F. Jiménez-García³

¹Postgrado de Botánica, Unidad de Microscopía Electrónica, ²Área de Microbiología, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (arazavaleta@yahoo.com.mx). ³Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular, Universidad Autónoma de México, Ciudad Universitaria. 04510. Ciudad de México, México.

RESUMEN

Las nanopartículas de ZnO son desechadas al ambiente y abundan en el agua residual, pero su fitotoxicidad es poco conocida. El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta fisiológica de *Azolla filiculoides* a la presencia de dos tamaños de partículas de ZnO: nanopartículas grado analítico (NPs, 26.7 ± 1 nm) y partículas submicrométricas (SMPs, 238 ± 30.7 nm) grado farmacéutico, en tres concentraciones (100 , 200 , y 400 mg L⁻¹), y un testigo. El diseño experimental fue completamente al azar, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con Tukey ($p \leq 0.05$). El análisis con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) mostró que las NPs fueron isodiamétricas, mientras que las SMPs fueron alargadas. Las plantas se incubaron en solución Yoshida con las NPs y SMPs, en invernadero por 6 d. Las partículas pequeñas (NPs) y la concentración de 400 mg NPs ZnO L⁻¹ redujeron el crecimiento y la concentración de clorofilas (Chla, Chlb, Chl total) y carotenos y xantofilas (c+x). La fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) se redujo en todas las concentraciones de partículas probadas, comparadas con el testigo, especialmente con NPs que fueron más tóxicas que las SMPs. Las NPs redujeron la actividad antioxidante total y compuestos fenólicos totales con respecto a las SMPs. La actividad nitrogenasa disminuyó en todas las concentraciones de partículas de ZnO, e independiente del tamaño. El microanálisis elemental de Zn con espectroscopía dispersiva de rayos X y Microscopía de Barrido (EDS-MEB) mostró mayor abundancia de Zn en el envés de las frondas, la cual dependió de la concentración de NPs en contraste con las SMPs. En conclusión, el tamaño de las partículas de ZnO es más

ABSTRACT

Nanoparticles of ZnO are disposed of in the environment and abound in wastewater, but their toxicity to plants is little known. The objective of this study was to evaluate the physiological response of *Azolla filiculoides* to the presence of two ZnO particle sizes: analytical grade nanoparticles (NPs, 26.7 ± 1 nm) and pharmaceutical grade submicrometric particles (SMPs, 238 ± 30.7 nm), in three concentrations (100 , 200 , and 400 mg L⁻¹), and a control. The experimental design was completely randomized, data were analyzed with an ANOVA and means were compared with Tukey ($p \leq 0.05$). Transmission Electron Microscopy (TEM) showed that the NPs were isodiametric, while the SMPs were elongated. Plants were incubated in Yoshida solution containing the NPs and SMPs in a greenhouse for 6 d. The small particles (NPs) and the concentration of 400 mg NPs ZnO L⁻¹ reduced growth and concentration of chlorophylls (Chla, Chlb, Chl total) and of carotenes and xanthophylls (c+x). Chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) was decreased in all tested concentrations compared with the control, especially with NPs, which were more toxic than SMPs. NPs reduced total antioxidant activity and total phenolic compounds, relative to SMPs. Nitrogenase activity decreased in all the ZnO particle concentrations regardless of size. The Zn element microanalysis with energy-dispersive X-ray spectroscopy on scanning microscopy (EDS-SEM) showed that Zn was more abundant on the abaxial side of the frond, in function of NPs concentration, in contrast with that of SMPs. In conclusion, ZnO particle size is more determinant in degree of toxicity than concentration. Chlorophyll fluorescence and nitrogenase activity were good indicators of toxicity in this species.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2015. Aprobado: mayo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 677-691. 2016.

Key words: Phytotoxicity, water fern, nanoparticles, ZnO NPs.

determinante en el grado de toxicidad, que la concentración. La fluorescencia de clorofila y actividad nitrogenasa fueron buenos indicadores de toxicidad en esta especie.

Palabras clave: Fitotoxicidad, helecho acuático, nanopartículas, NPs ZnO.

INTRODUCCIÓN

El tamaño de un material nanoestructurado es intermedio entre las estructuras moleculares y micrométricas y su magnitud se mide en escala nanométrica. Las nanopartículas (NPs) tienen características fisicoquímicas y ópticas únicas, debido a su alta razón superficie/volumen. En esta condición hay un gran número de átomos en la superficie que modifican las propiedades físicas, magnéticas, fotoeléctricas y térmicas (Hernando-Grande, 2007). La nanotecnología ha llevado al desarrollo de nanomateriales usados en la industria automotriz, en pinturas, electrónica, construcción, aeronáutica, cosméticos y farmacéutica. En el 2012 habían 1300 productos donde al menos uno de sus componentes fue NPs (Love *et al.*, 2012).

Las partículas de óxido metálico más comunes son las NPs de óxido de titanio (TiO_2) y de óxido de zinc (ZnO) y son las más usadas en la industria farmacéutica (Huang *et al.*, 2013). Para evaluar el impacto de la exposición a estas NPs en la salud humana es necesario detectar y monitorear nanomateriales en el aire, agua y suelo, lo cual requiere de varios tipos de sensores (Maynard *et al.*, 2006; Handy *et al.*, 2008).

El mecanismo por el cual un nanomaterial puede ser tóxico y alterar los sistemas biológicos, depende de su tamaño, composición, forma, y propiedades superficiales (Dhawan *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2015). La evaluación de la toxicidad de las NPs que contienen un metal pesado dependerá del tamaño, forma y de la toxicidad del ion metálico, el cual puede liberarse de éstas (Perreault *et al.*, 2010). La toxicidad de un metal a organismos vivos está influenciada por su solubilidad en agua, la unión específica a un sitio biológico y su morfología. Los efectos tóxicos de un metal pesado están definidos por cambios en la funcionalidad o cambios morfológicos en el cuerpo humano, a consecuencia de la ingesta, inhalación y absorción o introducción a través de un agente biológico (Panyala *et al.*, 2008; Hossain, 2015).

INTRODUCTION

The size of a nanostructured material is intermediate between molecular and micrometric structures and its magnitude is measured on a nanometric scale. Nanoparticles (NPs) have unique physical-chemical and optical characteristics because of the high surface/volume ratio. In this condition, a large number of atoms on the surface modify physical, magnetic, photoelectric and thermal properties (Hernando-Grande, 2007). Nanotechnology has led to development of nanomaterials used in the car, paint, electronics, construction, aeronautics, cosmetics and pharmaceutical industries. In 2012, there were 1300 products with at least one NP component (Love *et al.*, 2012).

The most common metal oxide particles are titanium oxide (TiO_2) and zinc oxide (ZnO) NPs, which are the most used in the pharmaceutical industry (Huang *et al.*, 2013). To evaluate the impact of exposure to these NPs on human health, it is necessary to detect and monitor nanomaterials in the air, water and soil, which requires several types of sensors (Maynard *et al.*, 2006; Handy *et al.*, 2008).

The mechanism by which a nanomaterial can become toxic and alter biological systems depends on its size, composition, shape, and surface properties (Dhawan *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2015). Evaluation of toxicity of NPs that contain a heavy metal will vary depending on the size and shape of the NPs and of the toxicity of the metal ion that they can release (Perreault *et al.*, 2010). The toxicity of a metal for live organisms is affected by its water solubility, its union to a specific biological site and its morphology. The toxic effects of a heavy metal are defined by changes in functionality and morphology in the human body when it is ingested, inhaled, absorbed or introduced through a biological agent (Panyala *et al.*, 2008; Hossain, 2015).

Heavy metals are found in nature, but they can also be anthropogenic. In Europe, concentrations of ZnO NPs of 0.01 g L^{-1} were found in surface water and 0.432 g L^{-1} in wastewater, and in the United Kingdom they were less than $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Boxall *et al.*, 2007; Gottschalk *et al.*, 2009).

Los metales pesados se encuentran en la naturaleza pero también pueden ser antropogénicos. En Europa las concentraciones de NPs de ZnO fueron 0.01 g L^{-1} en agua superficial y 0.432 g L^{-1} en las aguas residuales y en el Reino Unido hubo menos de 100 ug L^{-1} (Boxall *et al.*, 2007, Gottschalk *et al.*, 2009).

Las plantas no están libres de la exposición a NPs y su efecto se conoce poco. El mecanismo de absorción, translocación y acumulación de las NPs en plantas depende de la especie vegetal, así como del tamaño, tipo, composición química, funcionalización y estabilidad de las NPs (Rico *et al.*, 2011). Por ejemplo, la exposición de *Passiflora juliflora-velutina* a NPs de ZnO aumentó la actividad antioxidante, de la catalasa (CAT) y de la ascorbato peroxidasa (APOX), principalmente en la raíz donde se observó la mayor absorción de NPs. No obstante, las plantas no presentaron clorosis, necrosis, ni marchitez, denotando cierta tolerancia hacia estas NPs (Hernández *et al.*, 2011). En contraste, el efecto de NPs de ZnO ($17.4 \pm 4.9 \text{ nm}$) en maíz (*Zea mays* L.) y col (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L.) fue negativo. En maíz las células meristemáticas de las raíces presentaron daño estructural sin afectar la germinación, pero en col la elongación de raíz no cambió (Pokhrel *et al.*, 2013). El efecto tóxico de NPs de ZnO y Zn^+ se evaluó en *Brassica napus*, *Raphanus sativus*, *Lolium perenne*, *Lactuca sativa*, *Z. mays* y *Cucumis sativus*; una concentración de 2000 mg L^{-1} redujo la tasa de germinación y crecimiento de la planta *L. perenne* y *Z. mays* (Lin *et al.*, 2007). López-Moreno *et al.* (2010) encontraron efectos genotóxicos de NPs de ZnO (8 nm) y de CeO_2 (7 nm) en *Glycine max*; una acumulación de 4000 mg L^{-1} de NPs de ZnO en los tejidos, alteró la estabilidad del ADN y el sistema antioxidante.

La toxicidad de NPs ZnO en plantas acuáticas es poco conocida. Hay estudios de la toxicidad de NPs de ZnO, Ag, CuO, y TiO en *Lemna minor* (Perreault *et al.*, 2010), *Spirodela polyrhiza* (Jiang *et al.*, 2012), *Landoltia punctata* (Shi *et al.*, 2011) y *Salvinia natans* (Hu *et al.*, 2013), pero no se encontró información en otras plantas acuáticas. Hossain *et al.*, (2015) al revisar literatura en proteómica vegetal para entender la respuesta al estrés producida por NPs con metales, señalan el predominio de estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* y la escasez de información en otras especies.

Plants are not exempt from exposure to NPs and their effects are little known. The mechanism of absorption, translocation and accumulation of NPs in plants depends on the plant species as well as on the size, type, chemical composition, functionalization and stability of the NPs (Rico *et al.*, 2011). For example, exposure of *Passiflora juliflora-velutina* to ZnO NPs increased the antioxidant activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APOX), especially in the root where greater NPs absorption was observed. Nevertheless, the plants did not exhibit chlorosis, necrosis or wilting, indicating certain tolerance to these NPs (Hernández *et al.*, 2011). In contrast, the effect of ZnO NPs ($17.4 \pm 4.9 \text{ nm}$) on maize (*Zea mays* L.) and cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L.) was negative. In maize, meristematic cells of the roots exhibited structural damage without effect on germination, but in cabbage root elongation was not affected (Pokhrel *et al.*, 2013). The toxic effect of ZnO and Zn^+ on *Brassica napus*, *Raphanus sativus*, *Lolium perenne*, *Lactuca sativa*, *Z. mays* and *Cucumis sativus* was assessed; a concentration of 2000 mg L^{-1} affected seed germination and plant growth in *L. perenne* and *Z. mays* (Lin *et al.*, 2007). López-Moreno *et al.* (2010) found genotoxic effects of ZnO (8 nm) and of CeO_2 (7 nm) NPs on *Glycine max*; accumulation of 4000 mg L^{-1} ZnO NPs in the tissues altered DNA stability and the antioxidant system.

Toxicity of ZnO NPs for aquatic plants is little known. There are studies on toxicity of ZnO, Ag, CuO and TiO NPs in *Lemna minor* (Perreault *et al.*, 2010), *Spirodela polyrhiza* (Jiang *et al.*, 2012), *Landoltia punctata* (Shi *et al.*, 2011) and *Salvinia natans* (Hu *et al.*, 2013), but no information was found for other aquatic plants. Hossain *et al.* (2015) reviewed literature about plant proteomics to understand the response to stress caused by NPs with metals; they point out that studies carried out with *Arabidopsis thaliana* predominated and information on other species was scarce.

Azolla filiculoides is an aquatic fern used to clean surface water contaminated by organic and inorganic compounds; its tolerance to several metals (Cu and As) is outstanding; besides, this species grows rapidly and has a high rate of duplication. For these reasons, it is a good candidate for use in phytoremediation (Sánchez-Viveros *et al.*, 2010,

Azolla filiculoides es un helecho acuático usado para limpiar aguas superficiales contaminadas por compuestos orgánicos e inorgánicos; y destaca su tolerancia a varios metales (Cu y As); además crece rápido con una tasa alta de duplicación, por lo cual es un buen candidato para uso en fitorremediación (Sánchez-Viveros *et al.*, 2010, 2011). Pero, no hay reportes sobre el efecto de NPs en este helecho acuático. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad de micropartículas y nanopartículas de ZnO en el helecho flotante *A. filiculoides*, mediante la evaluación del efecto en el crecimiento, pigmentos fotosintéticos, fluorescencia de clorofila, actividad antioxidante total, y actividad nitrogenasa, así como en la acumulación de Zn en las frondas de *A. filiculoides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de las partículas de ZnO

En este estudio se usaron NPs de ZnO grado analítico suspendidas en butilglicol 40 % (Sigma-Aldrich®, USA) y partículas de grado farmacéutico (SMPs), en polvo (Farmacia Paris, México). El butilglicol se eliminó, centrifugando 1 mL de la suspensión a 18 000 g por 20 min, y lavando tres veces las NPs, con agua desionizada. Las NPs y SMPs secas, se diluyeron 1:100 (v:v) en agua desionizada y se sonicaron (Ultrasonicador, Branson 1800®, Connecticut, USA) a 70W y 70 Hz por 10 min. La morfología, índice de redondez (diámetro mayor/diámetro menor) y tamaño promedio, de ambos tipos de partículas, se examinó con un Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) (Tecnai 2 Spirit, Fei Company, USA) operado a 120 Kv, y con el procesador de imágenes TIA (Tecnai, Imaging & Analysis, New York USA) version 4.7 SP3 (1994-2014). El diámetro promedio de las MPs fue 238 ± 30.7 nm y de las NPs 26.7 ± 1 nm.

Material biológico y establecimiento del experimento

Las plantas de *A. filiculoides* se obtuvieron del solarío del área de Microbiología del Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo (19.52° N, 98.88° O a 2250 msnm). Un gramo de helecho fresco se colocó en charolas de plástico ($12 \times 6.5 \times 4$ cm) conteniendo 200 mL con solución nutritiva pH 5.5 (Yoshida *et al.*, 1971), en invernadero con temperatura promedio diaria de 26°C y nocturna de 19°C .

2011). However, there are no reports on the effect of NPs on this floating fern. Therefore the objective of this study was to evaluate the toxic effect of size and concentration of ZnO NPs on the physiological response of the floating fern *A. filiculoides*. To this end, changes in growth, photosynthetic pigments, chlorophyll fluorescence, total antioxidant activity and nitrogenase activity, as well as Zn accumulation in *A. filiculoides* fronds were measured.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of ZnO particles

In this study, analytical grade ZnO NPs suspended in 40 % butylglycol (Sigma-Aldrich™, USA) and pharmaceutical grade ZnO particles (SMPs) in powder form (Farmacia Paris, México) were used. The butylglycol was eliminated by centrifuging 1 mL of the suspension at 18 000 g for 20 min and washing the NPs three times with de-ionized water. The dry NPs and SMPs were diluted in de-ionized water 1:100 (v:v) and sonicated (Ultrasonicador, Branson 1800™, Connecticut, USA) at 70 W and 70 Hz for 10 min. Morphology, roundness index (largest diameter/smallest diameter) and average size of both types of particles were examined with a transmission electron microscope (TEM) (Tecnai 2 Spirit, Fei Company, USA), operated at 120 Kv and, with the image processor TIA (Tecnai, Imaging & Analysis, New York USA) version 4.7 SP3 (1994-2014). The average diameter of the SMPs was 238 ± 30.7 nm and that of NPs was 26.7 ± 1 nm.

Biological material and experiment setup

Azolla filiculoides plants were obtained from the solarium of the area of Microbiology of the Graduate Program in Edaphology, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo (19.52° N, 98.88° W, altitude 2250 m). One gram of fresh plants was placed in each plastic tray ($12 \times 6.5 \times 4$ cm) containing 200 mL nutritive solution, pH 5.5 (Yoshida *et al.*, 1971) and kept in a greenhouse with an average diurnal temperature of 26°C and nocturnal temperature of 19°C .

The treatments exposure of fern to two particle sizes (NPs and SMPs) and three concentrations of ZnO particles (100, 200, and 400 mg L^{-1}); the control contained no particles. The eight treatments were distributed in a completely randomized experimental design. The nutrient solution with NPs was sonicated for 10 min to disperse the particles before introducing the fern. The variables were measured after 6 d of exposure to the treatments.

Los tratamientos fueron la exposición del helecho a dos tamaños de partícula (NPs y SMPs), y tres concentraciones de partículas de ZnO (100, 200, y 400 mg L⁻¹) y un testigo sin partículas. La solución nutritiva con las NPs se sonicó 10 min, para dispersar las partículas, antes de colocar el helecho. Las variables se midieron a los 6 d de exposición a los tratamientos.

Tasa relativa de crecimiento y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

La tasa relativa de crecimiento (TRC; g g⁻¹ d⁻¹) se calculó con la ecuación:

$$TRC = [Ln_{pi} - Ln_{pf}] / (\Delta t)$$

donde Ln_{pi} : Logaritmo natural del peso inicial (g); Ln_{pf} : Logaritmo natural del peso final (g); t : tiempo de incubación (d).

Los pigmentos fotosintéticos se extrajeron en acetona al 80 % y el contenido de clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) y xantofilas+carotenoides (x+c) se midieron con espectroscopía UV/vis según la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983).

Actividad antioxidante total y compuestos fenólicos solubles totales

La actividad de los antioxidantes totales se determinó por la prueba de decoloración del radical 1,1-difenil-2-picryldrazyl (DPPH) (Matthäus, 2002). La extracción se obtuvo de 150-200 mg de peso fresco de *A. filiculoides* con 1 mL de metanol 80 % a 4 °C, y los extractos se centrifugaron 15 min a 17 000 g. A 30 μL del extracto se añadieron 235 μL de solución de DPPH en microplacas. Las lecturas de absorbancias iniciales y las lecturas finales (15 min después) se tomaron a una longitud de onda de 515 nm con un espectrofotómetro (Synergy 2, Biotek Instruments®, USA). La actividad antioxidante se calculó con la aplicación de alícuotas de Trolox y concentraciones conocidas de solución 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco (μM Trolox g⁻¹ PF).

El contenido de compuestos fenólicos solubles totales se evaluó por el ensayo de reactivo Folin-Ciocalteu usando ácido clorogénico como estándar. Una muestra de 150-200 mg de fronda fresca se maceró con 1 mL de metanol (80 %) a 4 °C y se centrifugó 15 min a 17 000 g. La mezcla de 30 μL de extracto+90 μL de Na₂CO₃ y 150 μ del reactivo de Folin-Ciocalteu se colocó en microplacas y 30 min después se

Relative growth rate and quantification of photosynthetic pigments

The relative growth rate (RGR; g g⁻¹ d⁻¹) was calculated with the equation:

$$RGR = [Ln_{iw} - Ln_{fw}] / (\Delta t)$$

where Ln_{iw} : natural logarithm of initial weight (*iw*); Ln_{fw} : natural logarithm of final weight (*fw*); t : incubation time (d).

The photosynthetic pigments were extracted in 80 % acetone and the content of chlorophyll *a* (Chl*a*), chlorophyll *b* (Chl*b*) and xanthophylls+carotenoids (x+c) were measured with UV/vis spectroscopy using the formula of Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Total antioxidant activity and total soluble phenolic compounds

Total antioxidant activity was determined by the bleaching test of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) (Matthäus, 2002). Extraction was obtained from 150-200 mg *A. filiculoides* fresh weight with 1 mL 80 % methanol at 4 °C; the extracts were centrifuged 15 min at 17000 g. To 30 μL extract, 235 μL DPPH solution was added. Initial absorbance readings and final readings (15 min later) were taken at a wavelength of 515 nm with a spectrophotometer (Synergy 2, Biotek Instruments™, USA). Antioxidant activity was calculated by applying aliquots of Trolox and known concentrations of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) solution. The results were expressed in equivalent micromoles of Trolox per gram of fresh tissue (μM Trolox g⁻¹ FW).

Content of total soluble phenolic compounds was measured with the Folin-Ciocalteu reactive test using chlorogenic acid as the standard. A sample of 150-200 mg of fresh frond was macerated with 1 mL methanol (80 %) at 4 °C and centrifuged 15 min at 17 000 g. The mixture of 30 mL extract+90 μL Na₂CO₃ and 150 mL of Folin-Ciocalteu reagent was placed on microplates and 30 min later, absorbance was read at 725 nm with a spectrophotometer UV/vis (Synergy 2, Biotek Instruments™, USA). The results were expressed in equivalent micrograms of chlorogenic acid per gram of fresh tissue (μg g⁻¹ FW).

Nitrogenase activity and chlorophyll fluorescence

Nitrogenase activity was assessed indirectly by determining the concentration of ethylene produced by 1 g of fresh *A.*

midió la absorbancia a 725 nm con un espectrofotómetro UV/vis (Synergy 2, Biotek Instruments®, USA). Los resultados se expresaron en microgramos equivalentes de ácido clorogénico por gramo de tejido fresco ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF).

Actividad nitrogenosa y fluorescencia de clorofila

La actividad nitrogenosa se evaluó indirectamente, mediante la determinación de la concentración de etileno producido por 1 g de *A. filiculoides* fresco, flotando en 200 mL de solución nutritiva (de los cuatro tratamientos de NPs y SMPs), en un frasco de 1 L sellado herméticamente con cinta teflón. Del frasco se extrajo 10 % del aire y se substituyó con un volumen equivalente de gas acetileno. Después de 2 h, se extrajeron 5 mL de gas y se colocaron en tubos vacutainer para análisis con cromatografía de gases (HP 5890 Series II PLUS GC con FID and TCD, Agilent Technologies) usando un estándar de etileno de 20 ppm balance N₂ (INFRA de México, S. A. de C. V.). Con base en el área bajo la curva se ajustaron las concentraciones de las muestras problema. Los resultados se expresaron en micromoles de etileno por gramo de tejido fresco ($\mu\text{mol etileno g}^{-1}$ PF).

La fluorescencia de la clorofila a se evaluó con un fluorómetro portátil (OS-30p, Chlorophyll Fluorometer, USA). Las frondas se acondicionaron en oscuridad por 5 min, antes de medir la eficiencia máxima fotoquímica potencial del fotosistema PSII (Fv/Fm) con el procedimiento de Küpper *et al.* (2002).

Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB

La espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS en inglés) acoplado a Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), permite identificar y cuantificar la composición elemental de áreas específicas en una muestra. A los 6 d de tratamiento, frondas de *A. filiculoides* sin lavar, se secaron a 60 °C hasta peso constante. Las frondas secas se montaron en porta muestras de Cu, con cinta doble adhesiva de cobre y se recubrieron con oro/paladio 80/20 con una evaporadora de metales (Fine Coat, Jeol, Japón). La superficie abaxial y adaxial de la fronda se analizaron con EDS (INCA x-ACT, Oxford Instruments, UK) acoplado a un MEB (Jeol JSM-6390) operando a 20 Kv. La concentración relativa del elemento Zn se expresó en porcentaje de peso y masa.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos fueron dos tamaños de partícula, chica (NPs 26.7 ± 1 nm) y grande (SMPs de 238 ± 30.7 nm), tres concentraciones de partículas de ZnO (100, 200, y 400 mg L⁻¹) y un testigo sin

filiculoides, floating on 200 mL nutritive solution (of the four NP and SMP treatments) in a 1-L recipient hermetically sealed with teflon tape. From the recipient, 10 % of the air was extracted and substituted with an equivalent volume of acetylene gas. After 2 h, 5 mL gas was extracted and put into vacutainer tubes for gas chromatography analysis (HP 5890 Series II PLUS GC with FID and TCD, Agilent Technologies), using an ethylene standard of 20 ppm N₂ balance (INFRA de México, S. A. de C. V.). Based on the area under the curve, concentrations of problem samples were adjusted. The results were expressed in micromoles of ethylene per gram of fresh tissue ($\mu\text{mol ethylene g}^{-1}$ FW).

Chlorophyll fluorescence was evaluated with a portable fluorometer (OS-30p, Chlorophyll Fluorometer, USA). The fronds were preconditioned in darkness for 5 min before measuring the maximum efficiency of the PSII (Fv/Fm) system photochemical potential following the procedure of Küpper *et al.* (2002).

Zn microanalysis with EDS-ESM

Energy dispersive X ray spectroscopy (EDS) coupled with scanning electron microscopy (SEM), allow to identify and quantify element composition in specific areas of a sample. After 6 d of treatment, unwashed *A. filiculoides* fronds were dried at 60 °C until constant weight. The dried fronds were mounted on Cu sample holder, with double-sided adhesive copper tape and coated with gold/palladium (80/20) with a metal evaporator (Fine Coat, Jeol, Japan). The abaxial and adaxial surfaces of the frond were analyzed with EDS (INCA x-ACT, Oxford Instruments, UK) attached to a SEM (Jeol JSM-6390, Japan) operating at 20 Kv. The relative concentration of Zn element was expressed in percentages of weight and mass.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized, the treatments were two sizes of particles, small (NPs 26.7 ± 1 nm) and large (SMPs 238 ± 30.7 nm), three ZnO particle concentrations (100, 200 and 400 mg L⁻¹) and one control without particles; each treatment was replicated three times, and the experiment was repeated three times (n=9). The data were analyzed with an ANOVA and treatment means were compared with the Tukey test (p ≤ 0.05), using SAS (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary NC, USA, 2002). Values of each variable were expressed as averages ± standard error of the mean (SE).

partículas, con tres repeticiones cada uno y el experimento se repitió tres veces ($n=9$). Los datos se analizaron con un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando SAS (Statistic Analysis System, Institute Inc., Cary, NC, USA 2002). Los valores de cada variable se expresaron como promedios \pm error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las partículas de ZnO

Las NPs grado analítico observadas con MET, presentaron tamaño promedio de 26.7 ± 1.0 nm, índice de redondez de 1.09 ± 0.058 , forma isodiamétrica, y textura lisa; el diámetro de las NPs más abundante fue 21 a 30 nm (Figura 1A y C). Las SMPs de grado farmacéutico tuvieron un diámetro promedio de 238 ± 30.7 nm e índice de redondez de 3.2 ± 0.54 ; el tamaño submicrométrico más abundante fue 201-300 nm (Figura 1B y D). Las SMPs fueron nueve veces más grandes y tres veces más alargadas que las NPs.

Efecto de NPs y SMPs ZnO en el crecimiento

La tasa relativa de crecimiento de *A. filiculoides*, no se afectó por la presencia de las partículas independiente del tamaño y concentración (Figura 2). Esto contrasta con lo observado en *Arabidopsis thaliana*, cuyo crecimiento se redujo con 100 mg L^{-1} NPs de ZnO (Landa *et al.*, 2012).

Pigmentos fotosintéticos

Las NPs redujeron significativamente los niveles de la Chl a , Chl b y Chl total en 33.3 %, 71.8 % y 49.1 %, con respecto a las SMPs (Cuadro 1); la aplicación de 400 mg de NPs redujo estos tres pigmentos en 47.3 %, 10.4 % y 20.8 % respecto al testigo (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los observados en *Salvinia natans* en presencia de 1, 10, 20, 50 mg L^{-1} NPs de ZnO de 25 nm (Hu *et al.*, 2013). Las NPs pueden producir peroxidación de la membrana del cloroplastos, alterando la acumulación de pigmentos y la fotosíntesis (Ma *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013). Las NPs de ZnO redujeron en 29.1 % la concentración total de carotenoides y xantofilas (c+x) en las frondas del helecho; la aplicación de 400 mg de NPs redujo en 24.3 % el

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of ZnO particles

Analytical grade NPs and observed with TEM, had an average size of 26.7 ± 1.0 nm, roundness index of 1.09 ± 0.058 , isodiametric shape and smooth texture. The most abundant NP diameter was 21 to 30 nm (Figure 1A and C). Pharmaceutical grade SMPs had an average diameter of 238 ± 30.7 nm and a roundness index of 3.2 ± 0.54 ; the most abundant submicrometric size was between 201-300 nm (Figures 1 B and D). The SMPs were nine times larger and three times longer than the NPs.

Effect of ZnO NPs and SMPs on growth

The relative growth rate of *A. filiculoides* was not affected by the presence of the particles, regardless of the size or concentration (Figure 2). This contrasts with *Arabidopsis thaliana*, whose growth decreased with 100 mg L^{-1} ZnO NPs (Landa *et al.*, 2012).

Photosynthetic pigments

The NPs significantly reduced levels of Chl a , Chl b and total Chl by 33.3 %, 71.8 % and 49.1 %, relative to the SMPs (Table 1), whereas application of 400 mg NPs decreased the pigments by 47.3 %, 10.4 % and 20.8 %, relative to the control (Table 1). These results are similar to those observed in *Salvinia natans* exposed to 1, 10, 20, 50 mg L^{-1} 25 nm ZnO NPs (Hu *et al.*, 2013). NPs can produce peroxidation of the chloroplast membrane, altering accumulation of pigments and of photosynthesis (Ma *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2013). The ZnO NPs reduced total concentration of carotenoids and xanthophylls (c+x) by 29.1 % in the fern fronds; application of 400 mg of NPs reduced the content of c+x by 24.3 %, relative to the control (Table 1). The c+x are important molecules that participate in detoxification of several forms of activated oxygen produced in photosynthetic complexes. Thus β -carotene quenches the state of excitation of the chlorophyll triplet, which reduces the formation of singlet oxygen (Foyer and Shigeok, 2011). In this sense, the small particles (ZnO

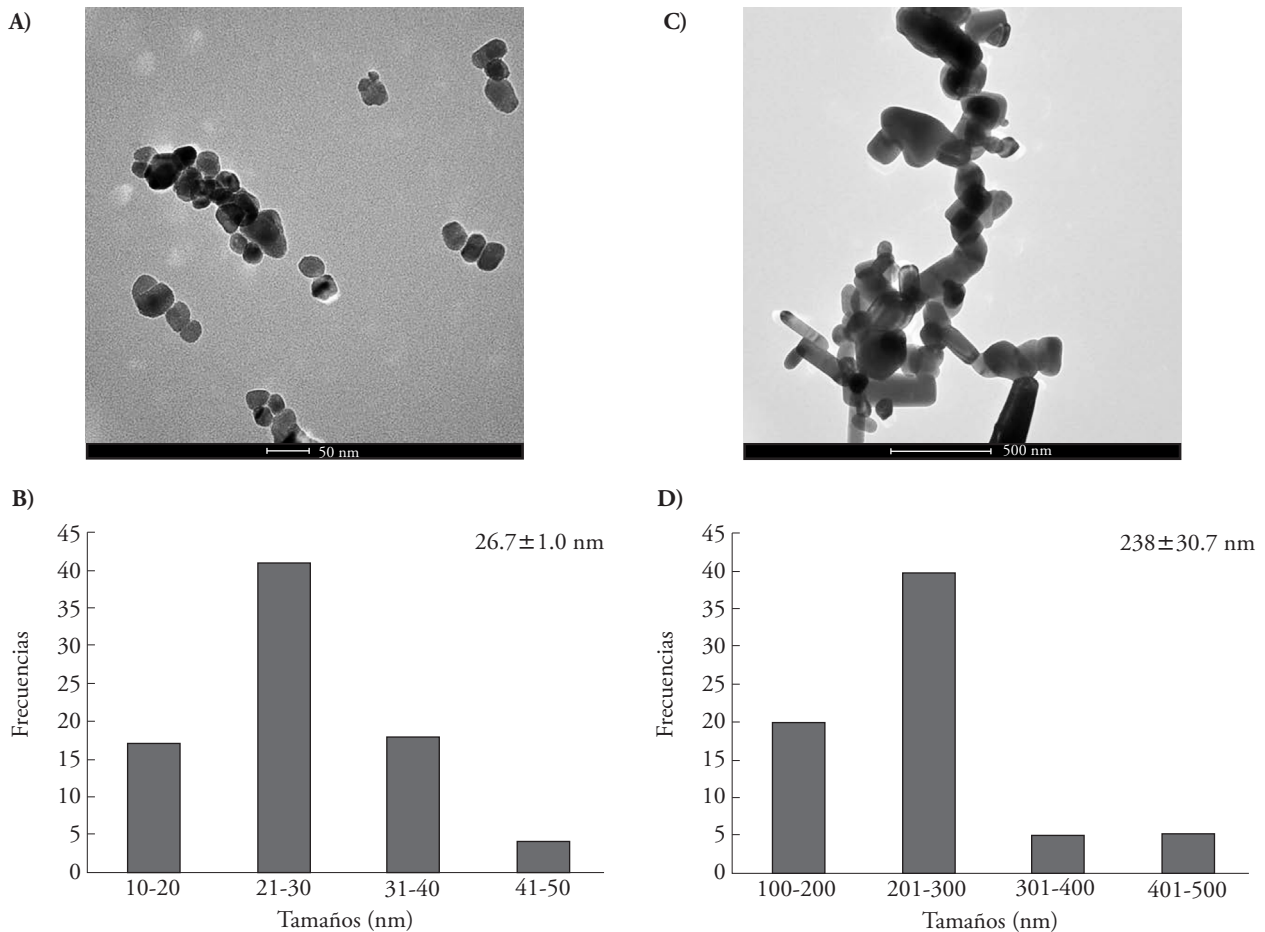


Figura 1. Análisis morfométrico de partículas de ZnO mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). A-B, Morfología y tamaños de NPs; C-D, Morfología y tamaños de partículas submicrométricas SMPs, (n=80).

Figure 1. Morphometric analysis of ZnO particles using Transmission Electron Microscopy (TEM). A-B, NPs morphology and sizes; C-D, SMPs submicrometric particles morphology and sizes, (n=80).

contenido de $c+x$ con respecto al testigo (Cuadro 1). Los $c+x$ son importantes moléculas que participan en la detoxificación de varias formas de oxígeno activado producidos en los complejos fotosintéticos; así el β -caroteno amortigua el estado de excitación de la clorofila triplete, lo cual reduce la formación de oxígeno singlete (Foyer y Shigeok, 2011). En este sentido, las partículas pequeñas (NPs ZnO) al reducir los niveles de $x+c$ en *A. filiculoides*, son más tóxicas que las SMPs. Esta respuesta es similar a la observada al exponer *Oryza sativa* L. a NPs de Ag de 25 nm, las cuales redujeron los niveles de pigmentos fotosintéticos y causaron mayor toxicidad que partículas más grandes (Prakash *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2013). La toxicidad de NPs pequeñas se observó en cultivos *in vitro* de bacterias, levaduras, algas, crustáceos y células de mamíferos (Ivask *et*

NPs) are more toxic than SMPs because they reduce the levels of $x+c$ in *A. filiculoides*. This response is similar to that observed when *Oryza sativa* L. was exposed to 25 nm Ag NPs, which reduced the levels of photosynthetic pigments and caused greater toxicity than larger particles (Prakash *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2013). Toxicity of small NPs was observed in *in vitro* cultures of bacteria, yeasts, algae, crustaceans and mammal cells (Ivask *et al.*, 2014). NP toxicity is associated with their high surface/volume ratio ability to enter the cells and chloroplasts, destabilizing plant photosynthesis and antioxidant system. The effect of concentration, of both particle sizes, was significant at 400 mg L⁻¹, which reduced the level of all the photosynthetic pigments studied (Table 1).

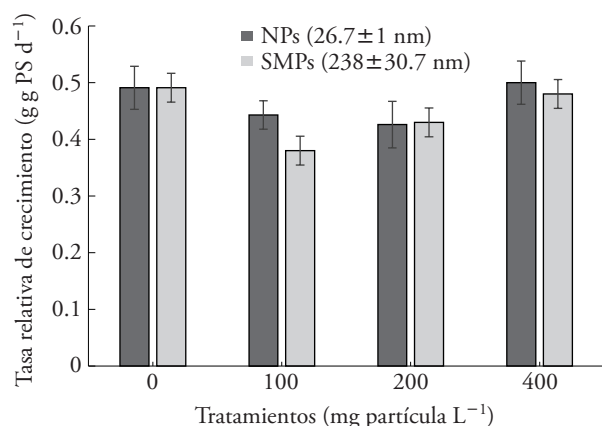


Figura 2. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de *Azolla filiculoides* expuesta a nanopartículas (NPs) y partículas submicrométricas (SMPs) de ZnO durante 6 d. No hubo diferencias significativas entre tratamientos (n=9), (Tukey, $p > 0.05$); PS: peso seco.

Figure 2. Relative growth rate (RGR) of *Azolla filiculoides* exposed to nanoparticles (NPs) and submicrometric particles (SMPs) of ZnO for 6 d. There were no significant differences between treatments (n=9), (Tukey, $p > 0.05$); PS: dry weight.

al., 2014). La toxicidad de NPs está asociada con una alta razón superficie/volumen, facilidad de entrar a las células y al cloroplasto, desestabilizando la fotosíntesis y el sistema antioxidante. El efecto de la concentración, en ambos tamaños de partículas, fue significativo en 400 mg L⁻¹, la cual redujo el nivel de todos los pigmentos fotosintéticos estudiados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la concentración y del tamaño de partículas de ZnO en pigmentos fotosintéticos de *Azolla filiculoides* a los 6 d de exposición.

Table 1. Effect of the concentration and size of ZnO particles on photosynthetic pigments of *Azolla filiculoides* after 6 d of exposure.

Concentración (mg partículas ⁻¹)	Chl _a (mg g ⁻¹ PF)	Chl _b (mg g ⁻¹ PF)	c+x (mg g ⁻¹ PF)	Chl total (mg g ⁻¹ PF)
0	0.2056 ± 0.0062 a	0.0774 ± 0.0074 ab	0.0745 ± 0.0024 a	0.2831 ± 0.0092 a
100	0.1958 ± 0.0133 a	0.0788 ± 0.0118 ab	0.0709 ± .0044 a	0.2756 ± 0.0252 a
200	0.1953 ± 0.019 a	0.0851 ± 0.0134 a	0.069 ± 0.0056 a	0.279 ± 0.0319 a
400	0.1086 ± 0.0017 b	0.0688 ± 0.0103 b	0.0564 ± 0.0038 b	0.2243 ± 0.0236 b
Tamaño de partícula (nm)				
NPs (26.7 ± 1)	0.1451 ± 0.0078 b	0.0341 ± 0.0020 b	0.0561 ± 0.0026 b	0.1792 ± 0.0095 b
SMPs (238 ± 30.7)	0.2067 ± 0.0108 a	0.1209 ± 0.0027 a	0.0793 ± 0.0023 a	0.3518 ± 0.0087 a

Los datos son la media ± error estándar; n=9. Letras distintas en una columna indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.001$) ❖ Data are the mean ± standard error; n=9. Different letters in a column indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.001$).

Total antioxidant activity, total phenolic compounds, nitrogenase activity and chlorophyll fluorescence

Total antioxidant activity and total soluble phenolic compound contents in *A. filiculoides* significantly decreased in the presence of NPs, but increased in the presence of SMPs (Figure 3). Greater toxicity of the small particles (NPs) may be explained by its small size that favors rapid absorption, particle solubility and liberation of Zn⁺ ions (Reed *et al.*, 2012). Stress caused by heavy metals raises the number of reactive oxygen species (ROS) and, in response, the plant produces more antioxidant compounds to inhibit oxidative degradation of biological molecules (Foyer and Noctor, 2005b; Sheng *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2012). An increase in the antioxidant catalase (CAT) and glutathione (GSH) was observed in *Fagopyrum esculentum* in presence of ZnO NPs (Lee *et al.*, 2013). Our study is the first of its kind to address the effect of two ZnO particle sizes on physiological variables in aquatic plants, particularly *A. filiculoides*, and its relationship to tolerance and attenuation of oxidative stress. Some phenolic compounds can sequester free radicals (Gulcin *et al.*, 2003) and act as electron donors as a detoxification mechanism (Sánchez *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2012). The decrease in antioxidant activity and total phenolic compound content in the presence of NPs (Figure 3) was similar to the effect produced by

Actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales, actividad nitrogenasa y fluorescencia de clorofila

La actividad antioxidante total y contenido de compuestos fenólicos solubles totales en *A. filiculoides* disminuyó significativamente ante NPs, pero aumentó en presencia de SMPs (Figura 3). La mayor toxicidad de las partículas pequeñas (NPs ZnO) puede explicarse porque su tamaño favorece su rápida absorción, solubilidad y liberación del ion Zn^{+} (Reed *et al.*, 2012). El estrés por metales pesados eleva la cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROS), y como respuesta, la planta produce más compuestos antioxidantes para inhibir la degradación oxidativa de moléculas biológicas (Foyer and Noctor, 2005b; Sheng *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2012). El aumento de los antioxidante catalasa (CAT) y glutatión (GSH) se observó en *Fagopyrum esculentum* ante NPs de ZnO (Lee *et al.*, 2013). Nuestro estudio es el primero en su tipo referente al efecto de dos tamaños de partículas de ZnO en variables fisiológicas de plantas acuáticas, en particular *A. filiculoides*, y su relación con la tolerancia y atenuación del estrés oxidativo. Algunos compuestos fenólicos pueden secuestrar radicales libres (Gulcin *et al.*, 2003) y actuar como donadores de electrones como mecanismo de destoxificación (Sánchez *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2012). La disminución de la actividad antioxidante y

cadmium and uranium in *Azolla* and *Lemna minor* (Sela *et al.*, 1988; Forni *et al.*, 2012). The effect of exposure to 100 mg L^{-1} ZnO NPs on *A. thaliana* gene expression was studied with micro-arrays; after 7 d, the induced genes were associated with oxidative stress, the response to lesions and electron transport (Landa *et al.*, 2012). *Azolla filiculoides* forms symbiosis with *Anabaena azollae* cyanobacteria, which fixes atmospheric nitrogen by means of the activity of the enzyme nitrogenase, which facilitates N assimilation and fern growth (Reddy, 1987; Vessey, 1994).

Our results are the first to reveal the effect of ZnO NPs on nitrogenase activity in the symbio-system *Azolla-Anabaena* and show the response of the symbiont to the particles. Nitrogenase activity in the *A. filiculoides-Anabaena* symbio-system decreased significantly (82 %) as of the lowest concentration (100 mg L^{-1}) (Figure 4). NPs reduced this enzymatic activity by 23.5 %, relative to SMPs (Table 2). The reduction was 79 % and 83 % in concentrations of $100\text{--}400 \text{ mg L}^{-1}$, relative to the control (Figure 4). These results indicate a clear alteration in N metabolism of cyanobacteria and, consequently, a reduction in assimilable N for the plant. Sood *et al.* (2012) compared the phytoremediating potential of aquatic macrophytes (*Elodea*, *Eichhornia*, *Lemna*, *Pistia*, *Salvinia*, *Ceratophyllum* and *Azolla*) and underlined the phytoremediating capacity of

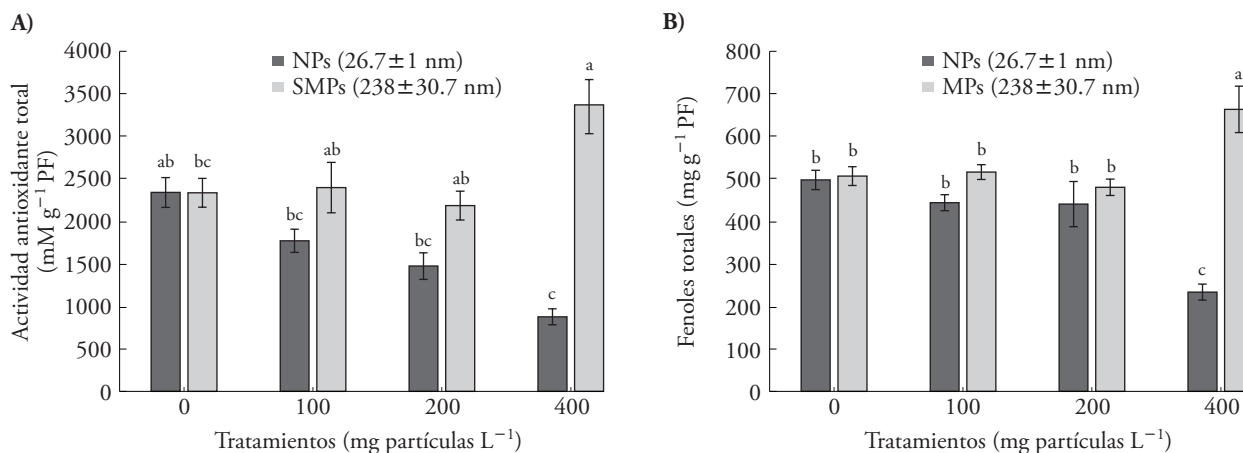


Figura 3. Actividad antioxidante total y fenoles totales en *Azolla filiculoides* expuesta a NPs ($26.6 \pm 1 \text{ nm}$) y SMPs ($268 \pm 30 \text{ nm}$) a tres concentraciones ($100, 200$ y $400 \text{ mg partículas L}^{-1}$) durante 6 d. Media \pm error estándar; $n=9$. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$); PF: peso fresco.

Figure 3. Total antioxidant activity and total phenols in *Azolla filiculoides* exposed to NPs ($26.6 \pm 1 \text{ nm}$) and SMPs ($268 \pm 30 \text{ nm}$) at three concentrations ($100, 200$ and $400 \text{ mg particles L}^{-1}$) for 6 d. Mean \pm standard error; $n=9$. Different letters indicate significant differences between treatments (Tukey, $p \leq 0.05$); PF: fresh weight.

el contenido de compuestos fenólicos totales en presencia de NPs (Figura 3), fue similar al efecto que produjo la presencia de cadmio y uranio en *Azolla* y *Lemna minor* (Sela *et al.*, 1988; Forni *et al.*, 2012). El efecto de la exposición de 100 mg L⁻¹ de NPs de ZnO en la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* se estudió con micro arreglos; después de 7 d los genes inducidos fueron los asociados al estrés oxidativo, respuesta a heridas y transporte de electrones (Landa *et al.*, 2012). *Azolla filiculoides* forma simbiosis con la cianobacteria *Anabaena azollae* la cual fija nitrógeno atmosférico a través de la actividad de la enzima nitrogenasa, lo que facilita la asimilación de N y el crecimiento del helecho (Reddy, 1987; Vessey, 1994).

Nuestros resultados son el primer reporte del efecto de NPs de ZnO en la actividad nitrogenasa del simbio-sistema *Azolla-Anabaena* y estos muestran la respuesta del simbiote a las partículas. La actividad nitrogenasa en el simbio-sistema *A. filiculoides-Anabaena* disminuyó significativamente (82 %) desde la concentración más baja (100 mg L⁻¹) (Figura 4). Las NPs redujeron en 23.5 % esta actividad enzimática con respecto a las SMPs (Cuadro 2); la reducción fue 79 % y 83 % en concentraciones de 100-400 mg L⁻¹ con respecto al testigo (Figura 4). Estos resultados indican una clara alteración en el metabolismo de N de la cianobacteria y, en consecuencia, reducción en el N asimilable para la planta. Sood *et al.* (2012) comparan el potencial fitoremediador de las macrofitas acuáticas (*Elodea*, *Eichhornia*, *Lemna*, *Pistia*, *Salvinia*, *Ceratophyllum* y *Azolla*) y enfatizan la capacidad fitoremediadora de *Azolla* por crecer rápidamente, fijar nitrógeno, e hiperacumular metales.

Las partículas no afectaron el crecimiento del helecho durante 6 d, lo que podría sugerir un potencial remediador, pero la toxicidad observada para el simbiote, cuestiona el crecimiento a mediano plazo.

La fluorescencia de clorofila, se redujo ante la exposición a los dos tamaños de partículas de ZnO y en todas las concentraciones probadas (Figura 5). Esta reducción fue 15.3 % en promedio, con respecto al control (Cuadro 2). La fluorescencia de la clorofila se usó para evaluar la toxicidad de NPs de CuO en *Lemna gibba* (Perrault *et al.*, 2010). Además, los metales pesados tienen un efecto tóxico en la mayoría de las plantas (Viehweger, 2014). Así, la exposición de *A. filiculoides* y *A. caroliniana* al ion cobre (2 mM Cu²⁺) deprime significativamente los

Azolla because it grows rapidly, fixes nitrogen and hyper-accumulates metals.

The particles did not affect fern growth for 6 d, possibly suggesting remediation potential, but the toxicity observed for the symbiont compromises growth in the medium term.

Chlorophyll fluorescence decreased when exposed to both particle sizes of ZnO and in all of the concentrations tested (Figure 5). This reduction was 15.3 % on average, relative to the control (Table 2). Chlorophyll fluorescence was used to assess toxicity of CuO NPs in *Lemna gibba* (Perrault *et al.*, 2010). Moreover, heavy metals have a toxic effect for most plants (Viehweger, 2014). Thus, exposure of *A. filiculoides* and *A. caroliniana* to copper ions (2 mM Cu²⁺) significantly depress Fv/Fm levels after 35 h of exposure (Sánchez *et al.*, 2010). In our study, exposure of *A. filiculoides* to 100 mg NPs L⁻¹ reduced Fv/Fm by 22 %, compared with the SMPs (238±30.7 nm), which reduced fluorescence by only 15 % (Figure 5). Yield of PSII (Fv/Fm) measures photochemical potential and electron transport efficiency of PSII to PSI.

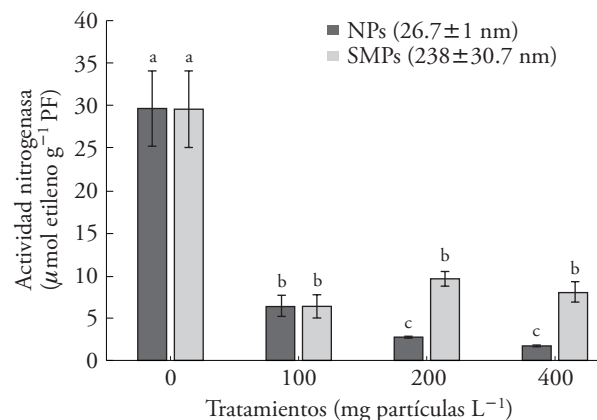


Figura 4. Actividad nitrogenasa en *Azolla filiculoides* expuesta a nanopartículas (NPs) y partículas submicrométricas (SMPs) de ZnO durante 6 d. Media ± error estándar; (n=6). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo tamaño de partícula (Tukey, p≤0.05); PF: peso fresco.

Figure 4. Nitrogenase activity in *Azolla filiculoides* exposed to nanoparticles (NPs) and submicrometric particles (SMPs) of ZnO for 6 d. Mean ± standard error; (n=6). Different letters indicate significant differences between treatments of the same particle size (Tukey, p≤0.05); PF: fresh weight.

Cuadro 2. Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB, en *Azolla filiculoides*, expuesta a tres concentraciones de nanopartículas (NPs) y partículas submicrométricas (SMPs) de ZnO durante 6 d.

Table 2. Microanalysis of Zn using EDS-SEM in *Azolla filiculoides* exposed to three concentrations of ZnO nanoparticles (NPs) and ZnO submicrometric particles (SMPs) for 6 d.

Tamaño de las partículas (nm)	Tratamiento (mg partícula L ⁻¹)	Elemento Zn (% peso)
	testigo	0
NPs (26.7 ± 1)	100	19.9 ± 1.8 d
	200	41.3 ± 4.1 bc
	400	72.3 ± 6.6 a
SMPs (238 ± 30.7)	100	65.3 ± 6 ab
	200	48.3 ± 3.3 bc
	400	20.3 ± 4.6 d

Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones (Tukey, $p \leq 0.05$), (n=3) ♦ Different letters indicate significant differences between concentrations (Tukey, $p \leq 0.05$), (n=3).

niveles de Fv/Fm a las 35 h de exposición (Sánchez *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la exposición de *A. filiculoides* a 100 mg NPs L⁻¹ redujo en 22% el Fv/Fm, en comparación con las SMPs (238 ± 30.7 nm), las cuales disminuyeron la fluorescencia solo en 15 % (Figura 5). El rendimiento del PSII (Fv/Fm) mide el potencial fotoquímico y la eficiencia del transporte de electrones del PSII al PSI. Esta variable se usa como indicador de estrés en plantas, y permite caracterizar los efectos y mecanismos de acción de diferentes tipos de estrés ambiental por metales pesados, herbicidas y detergentes en los sistemas acuáticos (Ralph *et al.*, 2007).

Los valores máximos de Fv/Fm medidos en plantas sanas, son usualmente mayores a 0.7 (Butler y Kitajima, 1975; Sánchez-Viveros *et al.*, 2010). Sin embargo, no hay reportes del efecto de NPs de ZnO en la eficiencia fotoquímica del PSII, pero la inhibición de esta variable en diversas plantas y en especies de *Azolla* se asocia con la presencia de metales pesados, por ejemplo la aplicación de 2 mM Cu²⁺ (Michalak, 2006; Sánchez-Viveros *et al.*, 2010; Viehweger, 2014). En nuestro estudio, las NPs a 100 mg L⁻¹, redujeron en 22 % el Fv/Fm respecto al testigo, en comparación con las SMPs (15 %) (Figura 5).

La reducción de la fluorescencia de clorofila indica menor rendimiento de los centros de reacción de la plastocianina, para catalizar la transferencia eficiente de los electrones entre el PS II (citocromo b₆f)

This variable is used as an indicator of stress in plants and allows characterization of the effects and mechanisms of different types of environmental stress by heavy metals, herbicides and detergents in aquatic systems (Ralph *et al.*, 2007).

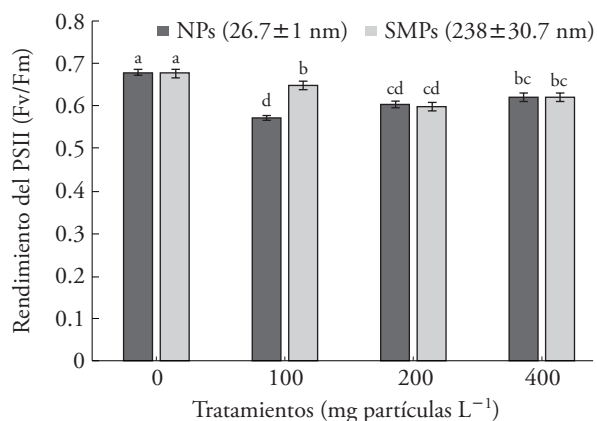


Figura 5. Fluorescencia de clorofila, rendimiento del PSII de *Azolla filiculoides* expuesta a nanopartículas (NPs) y partículas submicrométricas (SMPs) de ZnO durante 6 d. Media ± error estándar; n=9. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo tamaño de partícula (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 5. Chlorophyll fluorescence, PSII yield of *Azolla filiculoides* exposed to nanoparticles (NPs) and submicrometric particles (SMPs) of ZnO for 6 d. Mean ± standard error; n=9. Different letters indicate significant differences between treatments of the same particle size (Tukey, $p \leq 0.05$).

y el PS I (Küpper *et al.*, 2002; Letelier *et al.*, 2010). La reducción de Fv/Fm causada por las NPs ZnO se puede explicar en parte por el efecto tóxico del ion Zn^{2+} en la reacción fotoquímica del PSII, bloqueando así el transporte de electrones (Padua *et al.*, 2010). En *A. thaliana* la exposición a 100 mg L^{-1} de NPs de ZnO deprimió la expresión de genes asociados al transporte de electrones (Landa *et al.*, 2012). Según Ivask *et al.* (2014) hay un efecto del tamaño de las NPs de Ag en la toxicidad de bacterias, algas, crustáceos y células de mamíferos. Nuestro estudio aporta información nueva sobre la respuesta de los centros de reacción fotosintética a dos tamaños de partícula de ZnO, nanométrica y submicrométrica, en *A. filiculoides*.

Microanálisis de Zn mediante EDS-MEB

La señal de rayos X del elemento Zn se produjo de aglomerados y cristales adheridos a la epidermis abaxial de la fronda. En los tratamientos con NPs la acumulación de Zn aumentó proporcionalmente a la concentración. Estas observaciones fueron similares a las de un estudio en *Fagopyrum sculentum*, donde las NPs ZnO se acumularon principalmente en la superficie de la raíz, y la acumulación de Zn aumentó en función de la concentración de NPs (Lee *et al.*, 2013). En contraste, en los tratamientos con SMPs, a mayor concentración de SMPs en la solución, menor acumulación de Zn sobre la fronda. La aparición de precipitados en la solución nutritiva a 200 y 400 mg L^{-1} , sugiere que debido al tamaño, estas partículas precipitaron y el Zn no se acumuló en la hoja. Para entender mejor la toxicidad de Zn se requieren más estudios acerca de la movilidad de este elemento en la planta.

CONCLUSIONES

Las NPs de ZnO, no afectaron el crecimiento del helecho *A. filiculoides* durante 6 d pero la reducción en pigmentos fotosintéticos, antioxidantes, actividad nitrogenasa y fluorescencia de clorofila indican toxicidad para el simbio-sistema *Azolla-Anabaena*. Las SMPs de ZnO no afectaron el crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos, pero sí redujeron la fluorescencia de clorofila, y actividad nitrogenasa lo que indica estrés en la planta. *Azolla filiculoides* pudo liderar mejor con las SMPs, las cuales promovieron el

Maximum Fv/Fm values measured in healthy plants are above 0.7 (Butler and Kitajima, 1975; Sánchez-Viveros *et al.*, 2010). Although there are no reports on the effect of ZnO NPs on PSII photochemical efficiency, inhibition of this variable in diverse plants and species of *Azolla* is associated with the presence of heavy metals, for example, application of 2 mM Cu^{2+} (Michalak, 2006; Sánchez-Viveros *et al.*, 2010; Viehweger, 2014). In our study, at 100 mg L^{-1} , NPs reduced Fv/Fm by 22 %, relative to the control, and 15 %, compared with the SMPs (Figure 5).

Reduction in chlorophyll fluorescence indicates lower yield of the reaction centers of plastocyanin to catalyze electron transfer efficiently between PS II (cytochrome b_6/f) and PS I (Küpper *et al.*, 2002; Letelier *et al.*, 2010). A reduction in Fv/Fm caused by ZnO NPs may be partially explained by the toxic effect of the Zn^{2+} ion on the PSII photochemical reaction, which blocks electron transport (Padua *et al.*, 2010). Expression of genes associated to electron transport was suppressed in *A. thaliana* exposed to 100 mg L^{-1} ZnO NPs (Landa *et al.*, 2012). According to Ivask *et al.* (2014), there is an effect of Ag NP size on toxicity for bacteria, algae, crustaceans and mammal cells. Our study contributes new information on the response of the photosynthetic reaction centers to two particle sizes of ZnO, nanometric and submicrometric, in *A. filiculoides*.

Microanalysis of Zn with EDS-ESM

The X ray signal of Zn element was produced from agglomerates and crystals adhered to the abaxial epidermis of the frond. In the treatments with NPs, Zn accumulation increased proportionally with concentration. These observations were similar to those from a study on *Fagopyrum sculentum*, in which ZnO NPs accumulated mostly on the root surface and accumulation increased in function of NP concentration (Lee *et al.*, 2013). In contrast, in treatments with SMPs, the higher the concentration of SMPs in the solution, the lower the accumulation of Zn on the frond. The appearance of precipitates in the nutritive solution at 200 and 400 mg L^{-1} suggests that, because of their size, these particles precipitated and the Zn did not accumulate on the leaf. In order to better understand Zn toxicity, further studies are

aumento de los antioxidantes y fenoles solubles totales para compensar los radicales libres producidos por estrés.

En resumen, las partículas pequeñas (NPs) fueron más tóxicas que las partículas grandes (SMPs), lo cual indica que el tamaño de la partícula de ZnO es más determinante que la concentración en la toxicidad del helecho *A. filiculoides*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada a la primera autora. A la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) del Colegio de Postgraduados por las facilidades otorgadas. Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por los valiosos comentarios durante la experimentación. Esta investigación formó parte de los proyectos realizados en la Línea Prioritaria de Investigación LPI-16 "Innovación Tecnológica" del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Boxall, A. B. A., Q. Chaudhry, C. Sinclair, A. D. Jones, R. Aitken, B. Jefferson, and C. Watts. 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Report by the Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK. 89 p.
- Butler, W. L., and M. Kitajima. 1975. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 376: 116-125.
- Dhawan, A., V. Sharma, and D. Parman. 2009. Nano materials a challenge for toxicologists. *Nanotoxicology* 3: 1-9.
- Forni, C., R. Braglia, F. J. Harren M., and S. M. Cristescu. 2012. Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aquat. Toxicol.* 110-111: 107-113.
- Foyer, C. H., and S. Shigeoka. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 155: 93-100.
- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005a. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28: 1056-1071.
- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005b. Redox Homeostasis and Antioxidant Signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Gottschalk, F., T. Sonderer, R. W. Scholz, and B. Nowack. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9216-9222.
- Handy, R. D., R. Owen, and E. Valsami-Jones. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17: 315-325.

required to understand mobility of this element in plants.

CONCLUSIONS

ZnO NPs did not affect growth of the fern *Azolla filiculoides* during the 6 d. However, the reduction in photosynthetic pigments, antioxidants, nitrogenase activity and chlorophyll fluorescence indicate their toxicity for the symbiosystem *Azolla-Anabaena*. The ZnO SMPs did not affect growth or photosynthetic pigment content, but they did reduce chlorophyll fluorescence and nitrogenase activity, which indicates stress in the plant. *Azolla filiculoides* was better able to deal with SMPs, which promoted an increase in antioxidants and total soluble phenols in order to compensate the free radicals produced by stress.

Summarizing, small particles (NPs) were more toxic than large particles (SMPs), indicating that size of ZnO particles is more important than concentration in determining toxicity for the fern *A. filiculoides*.

—End of the English version—



- Hernández, V., J. A., M. H. Castillo, A. D. Servin, J. R. Peralta V., and J. L. Gardea T. 2011. Spectroscopic verification of zinc absorption and distribution in the desert plant *Prosopis juliflora-velutina* (velvet mesquite) treated with ZnO nanoparticles. *Chem. Eng. J.* 170: 346-352.
- Hernández-Ortega, H. A., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, H. A. Zavaleta-Mancera., H. A. López-Delgado, and M. R. Mendoza-López. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *J. Environ. Manage.* 95: 5319-5324.
- Hernando-Grande, A. 2007. Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la Física actual en lucha contra la enfermedad. *Rev. Royal Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 101: 321-327.
- Hu, C., X. Liu, X. Li, and Y. Zhao 2013. Evaluation of growth and biochemical indicant of *Salvinia natans* exposed to zinc oxide nanoparticles and zinc accumulation in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* Doi 10.1007/s11356-013-1970.9
- Huang, Y., S. C. Lenaghan, L. Xia, J. N. Burris, C. N. Stewart, and M. Zhang. 2013. Characterization of physicochemical properties of nanoparticles for cosmetic application. *J. Nanobiotech.* 1; 11:3. doi: 10.1186/1477-3155-11-3.
- Hossain, Z., M. Ghazala, and S. Komatsu. 2015. Plant responses to nanoparticles stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 26644-26653.
- Ivask, A., I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, A. Kärinen, T. Titma, M. Heinlaan, M.

- Visnapuu, D. Koller, V. Kisand, and A. Kahru. 2014. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *in vitro*. PLoS One. 9(7): e102108. doi: 10.1371/journal.pone.0102108
- Jiang, H-S., M. Li, F. Y. Chang, W. Li, and L. Y. Yin. 2012. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrrhiza*. Environ. Toxicol. Chem. 31: 1880-1886.
- Küpper, H., I. Šetlík, M. Spiller, F. C. Küpper and O. Prášil 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of *in vivo* heavy metal chlorophyll formation. J. Phycol. 38: 429-441.
- Landa, P., R. Vankova., J. Andrlava, J. Hodek, P. Marsik, H. Storchova, J. C. White, and T. Vanek. 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂ and fullerene soot. J. Hazard. Mater. 241-242: 52-62.
- Lee, S., S. Kim, S. Kim, and I. Lee. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. Environ. Sci. Pollut. Res. 20: 848-854.
- Letelier, M. E, S. Sánchez-Jofré, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso, and P. Aracena-Parks. 2010. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. Chem. Biol. Interact. 188: 220-227.
- Lichtenthaler, H. K., and A. R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Bioch. Soc. Tran. 11: 591-592.
- Lin, D., and B. Xing. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut. 20: 1-8.
- López-Moreno M.L., G. de la Rosa, J. A Hernández-Viezcas, H. Castillo-Michel, C. E. Botez, J. R. Peralta-Videa, and J. L. Gardea-Torresdey. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. Environ. Sci. Technol. 44: 7315-7320.
- Love, S. A., M. A. Maurer-Jones, J. W. Thompson, Y. S. Lin, and C. L. Haynes. 2012. Assessing nanoparticle toxicity. Ann. Rev. Analyt. Chem. 5: 181-205.
- Ma, H., P. L. Williams, and S. A. Diamond 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles: A review. Environ. Pollut. 172: 76-85.
- Matthäus, M. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agri. Food Chem. 50: 3444-3452.
- Maynard, A. D., R. J. Aitken, T. Butz, V. Colvin, K. Donaldson, G. Oberdörster, M. A. Philbert, J. Ryan, A. Seaton, V. Stone, S. S. Tinkle, L. Tran, N. J. Walke, and D. B. Warheit. 2006. Safe handling of nanotechnology. Nature 444: 267-269.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish J. Environ. Stud. 15: 523-530.
- Padua, M., A.M. Cavaco, S. Aubert, R. Bligny, and A. Casimiro. 2010. Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese. Physiol. Plant 138: 301-11.
- Panyala, N. R., E. M. Peña M., and J. Iavel. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environmental and human health? J. Appl. Biomed. 6: 117-129.
- Perrault, F., A. Ouarrour, L. Pirastru, L. Sirois, W. Gerson M., and R. Popovic. 2010. Evaluation of cooper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. J. Bot. doi: 10.1155/2010/763142.
- Pokhrel, L. R., and B. Dubey. 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver on zinc oxide nanoparticles. Sci. Total Environ. 1:321-332. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.059.
- Ralph, P. J., R. A. Smith, C. M. O. Macinnis-Ng, and C. R. Seery. 2007. Use of fluorescence-base ecotoxicological bioassay in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. Toxicol. Environ. Chem. 89: 589-607.
- Reddy, K. R. 1987. Nitrogen fixation by *Azolla* cultured in nutrient enriched waters. J. Aquat. Plant Manage. 25: 43-48.
- Reed, R. B., D. A. Ladner, C. P. Higgins, P. Westerhoff, and J. F. Ranville. 2012. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. Environ. Toxicol. Chem. 31: 93-99.
- Rico, C. M., S. Majumdar, M. Duarte-Gardea, J. R. Peralta-Videa, and J. L. Gardea-Torresdey 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. J. Agric. Food Chem. 59: 3485-3498.
- Sánchez-Viveros, G., D. González-Mendoza, A. Alarcón, and R. Ferrera-Cerrato, C. R. 2010. Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. Int. J. Agric. Biol. 12: 365-368.
- Sánchez-Viveros, G., R. Ferrera-Cerrato, and A. Alarcón. 2011. Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents, and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. Water Air Soil Pollut. 217: 455-462.
- Sela M., E. Tel-Or, E. Fritz, and A. Huttermann. 1988. Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. Plant Physiol. 88: 30-36.
- Sheng, M., M. Tang, H. Chen, B. Yang, F. Zhang, and Y. Huang. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salts stress. Mycorrhiza 18: 287-296.
- Sood, A., L. U. Perm, R. Prasana, and A. S. Ahluwalia. 2012. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte *Azolla*. AMBIO 41: 122-137.
- Jiyan S., A. B Abid, I. M. Kennedy, K. R. Hristova, and W. K. Silk. 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. Environ Pollut. 159: 1277-1282.
- Vessey J. K., 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume roots nodules: in defense of the acetylene reduction assay. Plant and Soil 158: 151-162.
- Viehweger K. 2014. How plants cope with heavy metals. Bot. Studies 55:35. doi:10.1186/1999-3110-55-35.
- Yoshida S., D. Forno, J. Cock, and K. Gomez. 1981. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, 3rd ed. Manila Philippines: International Rice Research Institute. 269 p.