



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Síntesis de nanopartículas metálicas mediada por
organismos fúngicos. Caracterización e impacto en modelos
biológicos**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Jesica María Kobashigawa

Directora de Tesis: Dra. Cecilia Cristina Carmarán

Co-Directora de Tesis: Dra. Lucía Beatriz Scaffardi

Consejero/a de Estudios: Dra. María Victoria Novas

Lugar de trabajo: Laboratorio de Micología y Fitopatología-DBBE-FCEyN-UBA.

Fecha de presentación: Buenos Aires, 2024

Síntesis de nanopartículas metálicas mediada por organismos fúngicos.

Caracterización e impacto en modelos biológicos

RESUMEN

La nanotecnología es un campo de la tecnología que involucra la síntesis, caracterización, manipulación y aplicación de estructuras en la nanoescala. Nanopartículas (NPs) de metales nobles tales como oro y plata muestran propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, magnéticas y químicas únicas, y muy diferentes a aquéllas encontradas en los mismos materiales a escala macroscópica. Los métodos más comunes de producción de NPs metálicas, de bajo costo y volúmenes importantes, utilizan solventes tóxicos que presentan serios problemas de contaminación asociados a su impacto a nivel ambiental. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas que permitan hacer frente a las demandas cada vez más importantes de NPs para las diferentes aplicaciones en diversas disciplinas. Bajo esta premisa, la producción biológica de NPs metálicas emerge como una opción interesante.

El uso de organismos fúngicos en la producción de NPs recibe una creciente atención debido a que ofrecen importantes ventajas frente al uso de otros organismos, entre ellas, su fácil cultivo en condiciones controladas que puede ser escalado generalmente con procesos económicamente viables, y su capacidad como productores de compuestos extracelulares. En este marco se presentan como desafíos emergentes la identificación de nuevos y mejores organismos como mediadores en la obtención de NPs y la -caracterización de las condiciones de síntesis capaces de modular la forma y tamaño de las NPs obtenidas de manera ambientalmente amigable. Asimismo, el aumento en el uso de este tipo de tecnologías trae aparejado un problema ambiental, como es introducir en los ecosistemas una cantidad masiva de materiales que podrían afectar a los organismos e impactar de maneras desconocidas en la cadena trófica. Existen cada vez más estudios en esta temática, sin embargo, se halla en debate el nivel de toxicidad de estos materiales encontrándose incluso resultados contradictorios y un amplio camino por recorrer. En este contexto, los objetivos de este trabajo fueron: 1-Seleccionar organismos de interés como mediadores de la síntesis de NPs metálicas. 2- Evaluar la capacidad de diferentes cepas fúngicas como mediadoras de la síntesis de NPs de plata y oro. 3- Evaluar la capacidad de cepas fúngicas psicotolerantes como mediadoras de la síntesis de NPs de plata. 4- Estudiar y caracterizar las NPs obtenidas. 5- Analizar el impacto de la variabilidad intraespecífica en la síntesis de NPs de plata. 6- Estudiar el impacto del pH en la forma y tamaño de las NPs obtenidas. 7- Estudiar el efecto de las NPs de plata sintetizadas en el desarrollo de modelos biológicos.

Se llevaron adelante ensayos de evaluación preliminar sobre la base de los cuales se seleccionaron cuatro cepas de *Tulasnella albida*, y adicionalmente cepas de *Cerinosterus luteoalbus*, *T. assiutensis* y *Trametes trogii*. A estas cepas se las caracterizó morfológica,

molecular y fisiológicamente (curva de crecimiento, azúcares y proteínas totales, perfil enzimático). Las cepas seleccionadas se utilizaron para la síntesis de NPs de plata (AgNPs) y de oro (AuNPs). La síntesis de AgNPs se llevó adelante analizando 2 valores de pH (5 y 9) y 2 temperaturas (6 y 28°C) y AgNO₃ como precursor, mientras que la síntesis de AuNPs se llevó adelante analizando 3 valores de pH (5, 9 y 11), a 28°C y utilizando como precursor HAuCl₄. Para todos los ensayos se realizaron 5 réplicas. Las NPs sintetizadas fueron caracterizadas mediante SEM, TEM, EDS, FTIR, Raman y OES (Espectroscopía de Extinción Óptica) para la cual se utilizó la teoría de Mie para reproducir el espectro experimental, teniendo en cuenta la distribución del tamaño de las AgNPs como parámetro de ajuste.

Las cepas con mejores perfiles de producción en la síntesis de AgNPs fueron las de *T. albida* pero sin diferencia apreciable entre las cuatro cepas seleccionadas, seguidas por *T. assiutensis* y *C. luteoalbus*. Los resultados positivos fueron obtenidos a pH 9, mientras que a pH 5 no se obtuvieron resultados de síntesis. En el caso de *T. troglia* no se obtuvieron resultados con ninguno de los pH analizados. Las NPs obtenidas fueron esféricas, en el caso de *T. albida*, con un diámetro promedio de 5 nm. Se determinó mediante las técnicas Raman, TEM y EDS, que las NPs presentaban una capa de óxido alrededor conformando partículas core-shell Ag-Ag₂O. En los casos de *C. luteoalbus* y *T. assiutensis*, se obtuvieron AgNPs poliédricas de variados tamaños. La composición elemental de las NPs fue determinada mediante EDS. Se analizaron las bandas de absorción correspondientes a los espectros FTIR para cada muestra de AgNPs mostrando que las NPs están rodeadas de material orgánico, probablemente proteínas. Se utilizó la teoría de Mie teniendo en cuenta una estructura de tipo núcleo-coraza para las NPs producidas con *T. albida* en las que se considera núcleo de Ag y coraza de Ag₂O. Para el caso de las muestras de AgNPs de *C. luteoalbus* y *T. assiutensis*, se observaron mayoría de formas esféricas, aunque en algunos casos se encontraron morfologías diferentes en menor proporción. En este caso, los espectros de extinción producidos por las NPs se ven alterados respecto del que presentarían si sólo fueran NPs esféricas. Por esta razón el ajuste de los espectros con teoría de Mie (desarrollada para NPs esféricas) sólo permite reproducir la región alrededor del plasmón entre 350 y 450 nm, considerando NPs esféricas de radio modal 24,5 nm (*C. luteoalbus*) con una distribución log-normal apropiada alrededor de este radio. Se realizó un ajuste con una función exponencial creciente con asíntota *A* y un tiempo característico *t*₀ para la curva del pico máximo de plasmón en función del tiempo obteniéndose valores comparativos entre cepas. Se observó que la cepa con mayor valor de *A* y menor *t*₀ fue *T. albida*.

El estudio de la síntesis de AuNPs dio resultados heterogéneos en cuanto a su morfología y condiciones de síntesis. *T. albida* mostró síntesis positivas a pH 9 y 11, resultando en su mayoría formas esféricas y algunas NPs con formas irregulares en ambos casos. *C. luteoalbus* también mostró resultados positivos a pH 9 y 11, dando NPs de formas irregulares y particularmente, en el segundo caso, también en forma de agujas. *Talaromyces* sp. mostró resultados a pH 5, dando NPs esféricas en su mayoría, pero también triangulares, cuadradas y

en forma de agujas. *T. trogii* mostró resultados a pH 5, obteniéndose diferentes formas coexistiendo con otras cuasi esféricas. Se obtuvieron espectros de extinción UV-visible con características plasmónicas que pudieron ajustarse en el rango de longitudes de onda entre 500 y 600 nm solamente debido a la variedad morfológica existente. Se realizó un ajuste con una función exponencial creciente con asíntota A y un tiempo característico t_0 para la curva del pico máximo de plasmón en función del tiempo obteniéndose valores comparativos entre cepas. Se observó que la cepa con mayor valor de A fue *T. trogii*. Se obtuvo la composición elemental de las NPs mediante EDS. Se analizaron los picos de absorbancia correspondientes a los espectros FTIR para cada muestra de AuNPs mostrando que las AuNPs están rodeadas de material orgánico.

Las AgNPs sintetizadas fueron utilizadas para analizar el efecto que producían las mismas sobre ciertos organismos biológicos de interés agronómico/ambiental. En plantas se utilizó como modelo *Phaseolus radiatus*, evaluándose largo de raíz/largo de vástago y peso fresco/peso seco. En hongos se analizó el impacto sobre la comunidad fúngica endofítica en hojas de *P. radiatus*, evaluándose parámetros cuantitativos de la comunidad: abundancia, riqueza, diversidad; también se analizó el radio de crecimiento de la colonia en los hongos *Stemphylium* sp., *Alternaria* sp. En animales se utilizó como modelo a *Tenebrio molitor*, y se evaluó supervivencia, pasaje de larva a pupa y de pupa a adulto, concentración de Ag en adulto mediante la técnica ICP-OES y, adicionalmente, se caracterizó la composición de la microbiota intestinal mediante análisis metagenómicos de larvas tratadas y no tratadas evaluándose parámetros cuantitativos de la comunidad. En base a los ensayos realizados en esta etapa de la tesis, se observa que las AgNPs sintetizadas por los organismos fúngicos de este trabajo, tienen un efecto negativo en el desarrollo de organismos biológicos. Particularmente los ensayos realizados con *P. radiatus*, y sobre algunos modelos fúngicos dieron diferencias significativas frente al control, mientras que en el resto de los ensayos sólo se observaron tendencias.

Durante el desarrollo de este trabajo se identificaron, cepas de hongos con una buena capacidad de síntesis de AgNPs y AuNPs. Se analizó la variación de la síntesis de AgNPs dentro de la misma especie y también de AuNPs entre especies diferentes, y a distintos pH. Los resultados de esta tesis aportan adicionalmente una caracterización de calidad de las NPs sintetizadas. Los análisis llevados adelante incluyen un detallado estudio del efecto de las AgNPs sintetizadas en organismos biológicos modelo, pudiéndose inferir que las AgNPs podrían presentar efectos tóxicos en distintas partes del desarrollo de los mismos.

Synthesis of metal nanoparticles mediated by fungal organisms.

Characterization and impact on biological models

ABSTRACT

Nanotechnology is a field of technology that involves the synthesis, characterization, manipulation and application of structures at the nanoscale. Nanoparticles (NPs) of noble metals such as gold and silver show unique optical, electrical, mechanical, magnetic and chemical properties, very different from those found in the same materials on a macroscopic scale. The most common methods for producing metal NPs, at low cost and in significant volumes, use toxic solvents that present serious pollution problems associated with their environmental impact. Therefore, the development of new alternative technologies is necessary to address the increasingly important demands for NPs for different applications in various disciplines. Under this premise, the biological production of metal NPs emerges as an interesting option.

The use of fungal organisms in the production of NPs receives increasing attention because they offer important advantages over the use of other organisms, among them, their easy cultivation under controlled conditions that can generally be scaled up with economically viable processes, and their ability as producers of extracellular compounds. In this framework, the identification of new and better organisms as mediators in obtaining NPs and the characterization of the synthesis conditions capable of modulating the shape and size of the NPs obtained in an environmentally friendly manner are presented as emerging challenges. Likewise, the increase in the use of this type of technology brings with it an environmental problem such as introducing a massive amount of materials into ecosystems that could affect organisms and impact the food chain in unknown ways. There are more and more studies on this topic, however, the level of toxicity of these materials is under debate, even finding contradictory results and a long way to go. In this context, the objectives of this work were: 1-Select organisms of interest as mediators of the synthesis of metal NPs. 2-Evaluate the capacity of different fungal strains as mediators of the synthesis of silver and gold NPs. 3-Evaluate the capacity of psychrotolerant fungal strains as mediators of the synthesis of silver NPs. 4- Study and characterize the NPs obtained. 5-Analyze the impact of intraspecific variability on the synthesis of silver NPs. 6- Study the impact of pH on the shape and size of the NPs obtained. 7- Study the effect of synthesized NPs in the development of biological models.

Preliminary evaluation trials were carried out on the basis of which four strains of *Tulasnella albida* were selected, and additionally strains of *Cerinosterus luteoalbus*, *T. assiutensis* and *Trametes trogii*. These strains were characterized morphologically, molecularly and physiologically (growth curve, total sugars and proteins, enzymatic profile). The selected strains were used for the synthesis of silver NPs (AgNPs) and gold NPs (AuNPs). The

synthesis of AgNPs was carried out analyzing 2 pH values (5 and 9) and 2 temperatures (6 and 28°C) and AgNO₃ as precursor, while the synthesis of AuNPs was carried out analyzing 3 pH values (5, 9 and 11), at 28°C and using HAuCl₄ as precursor. For all tests, 5 replicates were carried out. The synthesized NPs were characterized by SEM, TEM, EDS, FTIR, Raman and OES (Optical Extinction Spectroscopy) for which Mie theory was used to reproduce the experimental spectrum, taking into account the size distribution of the AgNPs as a fitting parameter.

The strains with the best production profiles in the synthesis of AgNPs were those of *T. albida* but with no appreciable difference between the four selected strains, followed by *T. assiutensis* and *C. luteoalbus*. Positive results were obtained at pH 9, while at pH 5 no synthesis results were obtained. In the case of *T. troglia*, no results were obtained with any of the pHs analyzed. The NPs obtained were spherical, in the case of *T. albida*, with an average diameter of 5 nm. It was determined using Raman, TEM and EDS techniques that the NPs had an oxide layer around them, forming Ag-Ag₂O core-shell particles. In the cases of *C. luteoalbus* and *T. assiutensis*, polyhedral AgNPs of various sizes were obtained. The elemental composition of the NPs was determined by EDS. The absorption bands corresponding to the FTIR spectra for each AgNPs sample were analyzed showing that the NPs are surrounded by organic material, probably proteins. The Mie theory was used taking into account a core-shell type structure for the NPs produced by *T. albida* in which the Ag core and Ag₂O shell are considered. In the case of the AgNPs samples from *C. luteoalbus* and *T. assiutensis*, a wide variety of NP morphologies in addition to the spherical ones were observed. In this case, the extinction spectra produced by the NPs are altered compared to what they would present if they were only spherical NPs. For this reason, fitting the spectra with Mie theory (developed for spherical NPs) only allows reproducing the region around the plasmon between 350 and 450 nm, considering spherical NPs with a modal radius of 24.5 nm (*C. luteoalbus*) with an appropriate log-normal distribution around this radius. A fitting was performed with an increasing exponential function with an asymptote *A* and a characteristic time *t*₀ for the curve of the maximum plasmon peak as a function of time, obtaining comparative values between strains. It was observed that the strain with the highest *A* value and lowest *t*₀ was *T. albida*.

The study of the synthesis of AuNPs gave heterogeneous results in terms of their morphology and synthesis conditions. *T. albida* showed positive syntheses at pH 9 and 11, resulting in NPs with irregular shapes in both cases, as well as spherical ones. *C. luteoalbus* also showed positive results at pH 9 and 11, giving NPs of irregular shapes and particularly, in the second case, also in the shape of needles. *T. assiutensis* showed results at pH 5, giving spherical, triangular, square and needle-shaped NPs. *T. troglia* showed results at pH 5, obtaining different shapes coexisting with other quasi-spherical ones. UV-visible extinction spectra were obtained with plasmonic characteristics that could be adjusted in the wavelength range between 500 and 600 nm only due to the existing morphological variety. A fitting was performed with an increasing exponential function with an asymptote *A* and a characteristic

time t_0 for the curve of the maximum plasmon peak as a function of time, obtaining comparative values between strains. It was observed that the strain with the highest A value was *T. troglia*. The elemental composition of the NPs was obtained by EDS. The absorbance peaks corresponding to the FTIR spectra for each AuNPs sample were analyzed showing that the AuNPs are surrounded by organic material.

The synthesized AgNPs were used to analyze their effect on certain biological organisms of agronomic/environmental interest. In plants, *Phaseolus radiatus* was used as a model, evaluating root length/stem length and fresh weight/dry weight. In fungi, the impact on the endophytic fungal community in *P. radiatus* leaves was analyzed, evaluating quantitative parameters of the community: abundance, richness, diversity; The colony growth radius was also analyzed in the fungi *Stemphylium* sp., *Alternaria* sp. In animals, *Tenebrio molitor* was used as a model, and survival, passage from larva to pupa and from pupa to adult, Ag concentration in adults were evaluated using the ICP-OES technique and, additionally, the composition of the intestinal mycobiota was characterized using metagenomic analysis of treated and untreated larvae, evaluating quantitative parameters of the community. Based on the tests carried out in this stage of the thesis, it is observed that the AgNPs synthesized by the fungal organisms in this work have a negative effect on the development of biological organisms. Particularly the tests carried out with *P. radiatus*, and on some fungal models, gave significant differences compared to the control, while in the rest of the tests only trends were observed.

During the development of this work, fungal strains with a good capacity to synthesize silver and gold NPs were identified. The variation in the synthesis of AgNPs within the same species and also of AuNPs between different species, and at different pHs, was analyzed. The results of this thesis additionally provide a quality characterization of the synthesized NPs. The analyzes carried out include a detailed study of the effect of the synthesized AgNPs on model biological organisms, and it can be inferred that the AgNPs could present toxic effects in different parts of their development.

Agradecimientos

A Ceci y Lucy por la paciencia, enseñanzas y gran esfuerzo en conjunto.

A mi familia por apoyarme siempre y tenerme paciencia.

A mis amigos por su apoyo y por ser siempre un lugar de catarsis .

A los jurados, por dedicarle el tiempo a leer esta tesis y evaluarla.

Al labo 5, en especial Caro, Esteban, Rocío y Lucas que me acompañaron desde el principio y me ayudaron siempre que lo necesité.

A CONICET, por permitirme, mediante una beca, dedicarme al doctorado.

Al INMIBO y su gente, por su siempre buena disposición y ser un buen lugar de trabajo.

Al CIOp, por abrirme las puertas cada vez que lo necesité.

Al Dr. Daniel Schinca, por sus consejos y aportes a esta tesis.

Al Dr. Alberto Caneiro, por permitirnos la utilización del equipo y lograr las imágenes TEM.

Al Lic. Hernán Lozano, por su colaboración con la técnica ICP-OES.

Al Dr. Alberto Scarpettini, por proporcionarme las AuNPs recubiertas con citrato.

ÍNDICE

CAPÍTULO I:	2
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	3
I.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	3
I.1.1. Propiedades de las nanopartículas metálicas	3
I.1.2. Teoría de Mie	5
I.1.3. Tipos de síntesis	7
I.1.4. Formación y estabilidad de nanopartículas coloidales	9
I.2. BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	11
I.2.1. Biosíntesis utilizando hongos	12
I.2.2. Nanopartículas de plata	14
I.2.3. Nanopartículas de oro	15
I.3. EFECTOS TÓXICOS	16
I.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
I.5. BIBLIOGRAFÍA	19
CAPÍTULO II:	32
BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	32
II.1. INTRODUCCIÓN	32
II.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
II.2.1. Microorganismos: selección y caracterización	34
II.2.1.1. Ensayos preliminares	34
II.2.1.2. Caracterización morfológica	34
II.2.1.3. Caracterización molecular	34
II.2.1.4. Caracterización fisiológica	35
II.2.2. Biosíntesis de nanopartículas de plata	36
II.2.3. Biosíntesis de nanopartículas de oro	38
II.2.4. Caracterización de las Nanopartículas	38
II.2.5. Modelado	39
II.3. RESULTADOS	41
II.3.1. <i>Tulasnella albida</i>	41
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (<i>Tulasnella albida</i>)	45
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (<i>Tulasnella albida</i>)	56
II.3.2. <i>Cerinosterus luteoalbus</i>	69
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (<i>Cerinosterus luteoalbus</i>)	72
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (<i>Cerinosterus luteoalbus</i>)	80
II.3.3. <i>Talaromyces assiutensis</i>	97
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (<i>Talaromyces assiutensis</i>)	102

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (<i>Talaromyces assiutensis</i>)....	108
II.3.4. <i>Trametes trogii</i>	114
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (<i>Trametes trogii</i>).....	116
Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (<i>Trametes trogii</i>).....	117
II.4. DISCUSIÓN.....	126
Caracterización de las cepas.....	126
Síntesis de nanopartículas.....	130
Síntesis de AgNPs.....	135
Síntesis de AuNPs.....	138
Efecto del pH.....	141
FTIR.....	143
Discusión general.....	145
II.5. BIBLIOGRAFÍA.....	147
CAPÍTULO III.....	157
IMPACTO EN MODELOS BIOLÓGICOS.....	157
INTRODUCCIÓN.....	157
III.1. EFECTOS EN PLANTAS.....	159
III.1.1. <i>Phaseolus radiatus</i>	159
III.1.1.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	160
III.1.1.2. RESULTADOS.....	162
III.2. EFECTOS EN COMUNIDADES ENDOFÍTICAS FÚNGICAS Y CEPAS DE HONGOS SELECCIONADAS.....	169
III.2.1. Efectos en comunidad endofítica de <i>Phaseolus radiatus</i>	169
III.2.1.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	170
III.2.1.2. RESULTADOS.....	173
III.2.2. Efectos en cepas fúngicas endofíticas.....	180
III.2.2.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	181
III.2.2.2. RESULTADOS.....	183
III.3. EFECTOS EN INSECTOS Y SU COMUNIDAD MICOBÍOTICA ASOCIADA AL INTESTINO.....	185
III.3.1 <i>Tenebrio molitor</i>	185
III.3.2 Microbiota intestinal.....	186
III.3.3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	187
Ensayo A.....	188
Análisis de supervivencia.....	188
Análisis de la comunidad micobiótica asociada al intestino mediante metagenómica.....	189
Ensayo B.....	190
Análisis de pasaje a pupa y a adulto.....	190

Análisis de las concentraciones de Ag mediante ICP-OES.....	191
Análisis estadístico.....	191
III.3.3.2 RESULTADOS.....	193
<i>Ensayo A</i>	193
Análisis de supervivencia.....	193
Análisis de la comunidad micobiota intestinal mediante metagenómica.....	194
<i>Ensayo B</i>	198
Análisis de pasaje a pupa y a adulto.....	198
Análisis de las concentraciones de Ag mediante ICP-OES.....	199
III.4 DISCUSIÓN.....	200
Efecto en plantas.....	202
Efecto en comunidades endofíticas fúngicas y cepas de hongos seleccionadas.....	204
Efecto en insectos y su comunidad micobiótica asociada al intestino.....	206
Discusión general y conclusiones.....	208
III.5. BIBLIOGRAFÍA.....	210
RESULTADOS RELEVANTES.....	219
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	221
ANEXO.....	221

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo de la tecnología que involucra la síntesis, caracterización, manipulación y aplicación de estructuras en la nanoescala (Rafique *et al.*, 2017). En el campo de la nanofabricación, muchos desarrollos se han centrado en la obtención de materiales de aplicación nanotecnológica, donde su demanda ha pasado de una escala laboratorio a una escala de producción industrial, en particular, la producción de nanopartículas (NPs). Las NPs constituyen la unidad de construcción elemental para el desarrollo de nanoestructuras y dispositivos en nanotecnología (Madkour & Madkour, 2019).

NPs de metales nobles tales como oro y plata muestran propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, magnéticas y químicas únicas, y muy diferentes a aquéllas encontradas en los mismos materiales a escala macroscópica. Debido a estas características particulares es que pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones que van desde la medicina como la administración de drogas y medicamentos, hasta mejoras en productos manufacturados, remediación del medio ambiente, aplicaciones electrónicas, etc. (Khan *et al.*, 2019).

Los métodos más comunes de producción de NPs metálicas, de bajo costo y volúmenes importantes, utilizan solventes tóxicos que presentan serios problemas de contaminación asociados con un impacto negativo tanto a nivel ambiental, como para la salud de los seres humanos, limitando de esta forma su uso a nivel industrial (Abuzeid *et al.*, 2023; Patel *et al.*, 2023). Otros métodos de síntesis en medios líquidos están basados en ablación de blancos metálicos por medio de pulsos láser ultracortos (Santillán *et al.*, 2020), pero la tasa de producción actual de este método es limitada, con tasas típicas en el rango de miligramos por hora (Khairani *et al.*, 2023), siendo difícil implementarlos a escala industrial. Para obtener concentraciones necesarias para aplicaciones finales, se deben explotar láseres de alta energía, que son económicamente costosos (Sportelli *et al.*, 2018). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías alternativas que permitan hacer frente a las demandas cada vez más importantes de NPs para las diferentes aplicaciones en diversas áreas, reduciendo el impacto negativo del proceso. Bajo esta premisa, la producción biológica de NPs emerge como una opción interesante.

El uso de organismos fúngicos en la producción de NPs recibe una creciente atención debido a que ofrecen importantes ventajas frente al uso de otros organismos, entre ellas, su fácil cultivo en condiciones controladas que puede ser escalado a una importante producción por fermentación controlada y, generalmente, con procesos económicamente viables, y por su capacidad como productores de compuestos extracelulares. Distintos reportes señalan a especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma* y *Penicillium*, entre otros géneros, como productores de NPs metálicas (Rai *et al.*, 2021; Yassin *et al.*, 2021; Gade *et al.*, 2022; Mishra *et al.*, 2022).

La búsqueda y caracterización de organismos fúngicos capaces de una producción eficiente de NPs metálicas aparece como uno de los desafíos para una producción económicamente

viable y ambientalmente amigable de estos materiales. En este marco se presentan como desafíos emergentes la identificación de nuevos y mejores organismos como mediadores en la obtención de NPs y la identificación de las condiciones de síntesis capaces de modular la forma y tamaño de las NPs obtenidas.

Nuestro país está realizando importantes avances en el desarrollo de la nanotecnología con una importante cantidad de especialistas en los diferentes campos de aplicación (Otal *et al.*, 2009; De Rosa *et al.*, 2022; González-Seligra *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2023; entre otros). En cuanto a la biosíntesis a partir de microorganismos, se encuentran reportes como el de Spedalieri (2015) utilizando algas, o el de Pereyra *et al.* (2018) utilizando actinobacterias metalotolerantes. Utilizando organismos fúngicos se encuentran trabajos como el de Kobashigawa *et al.* (2019) utilizando al hongo *Trametes trogii* y el de Spagnoletti *et al.* (2019) utilizando al hongo *Macrospora phaseolina*.

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

I.1. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Las NPs son una amplia clase de materiales que incluyen partículas que tienen al menos una dimensión inferior a 100 nm. Debido a su tamaño extremadamente pequeño, poseen una gran relación superficie/volumen. Esto conduce a que tengan propiedades químicas y físicas diferentes en comparación con un volumen mayor de la misma composición química, siendo intermediarios entre el material a granel (“*bulk*” en inglés) y estructuras moleculares o atómicas (Eustis & El-Sayed, 2006).

Las NPs metálicas están sintetizadas a partir de precursores metálicos exclusivamente. Poseen propiedades optoelectrónicas únicas y debido a su pequeño tamaño, presentan un cambio en las propiedades de los materiales. Por ejemplo, propiedades como el punto de fusión, la fluorescencia, la conductividad eléctrica, la permeabilidad magnética y la reactividad química cambian en función del tamaño de la partícula (De Souza *et al.*, 2019). Las NPs de los metales nobles, es decir, cobre (Cu), plata (Ag) y oro (Au) tienen una amplia banda de absorción en la zona visible del espectro solar electromagnético que dependen de su morfología, hallando lugar en múltiples áreas de investigación y tecnología. Es por estas razones que la búsqueda de procesos de síntesis controlada de tamaños y formas de NPs metálicas ha tomado relevancia en los últimos años (Khan *et al.*, 2019).

I.1.1. Propiedades de las nanopartículas metálicas

Las NPs exhiben diferentes propiedades en comparación con las partículas a granel convencionales debido a su dimensionalidad. Los parámetros principales de las NPs son su forma (incluidas las relaciones de aspecto cuando corresponde), el tamaño y la subestructura morfológica. En presencia de agentes químicos (tensioactivos), las propiedades superficiales e interfaciales pueden modificarse. Indirectamente, dichos agentes pueden estabilizar las NPs

contra la agregación, conservando la carga de partículas y modificando la capa más externa de la misma (Hong, 2019).

Las NPs tienen propiedades ópticas particulares: cuando una pequeña NP metálica esférica es irradiada por la luz, el campo eléctrico oscilante hace que los electrones de conducción oscilen de manera coherente. Cuando la nube de electrones se desplaza en relación con los núcleos, surge una fuerza restauradora de la atracción de Coulomb entre los electrones y los núcleos, que resulta en la oscilación de la nube de electrones en relación con el marco nuclear. La oscilación colectiva de los electrones se llama Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) (Kelly *et al.*, 2003; Linic *et al.*, 2015). En las NPs metálicas el plasmón dipolar, está confinado a la geometría de la NP y por lo tanto las condiciones de resonancia dependen no sólo del metal y el dieléctrico circundante, sino también del tamaño y la forma exacta de la NP, así como de la polarización del campo con respecto a la NP. Cada plasmón produce una distribución de carga superficial diferente en la NP y, por lo tanto, una distribución característica del campo eléctrico alrededor de la misma (Fig. 1) (Coronado *et al.*, 2011).

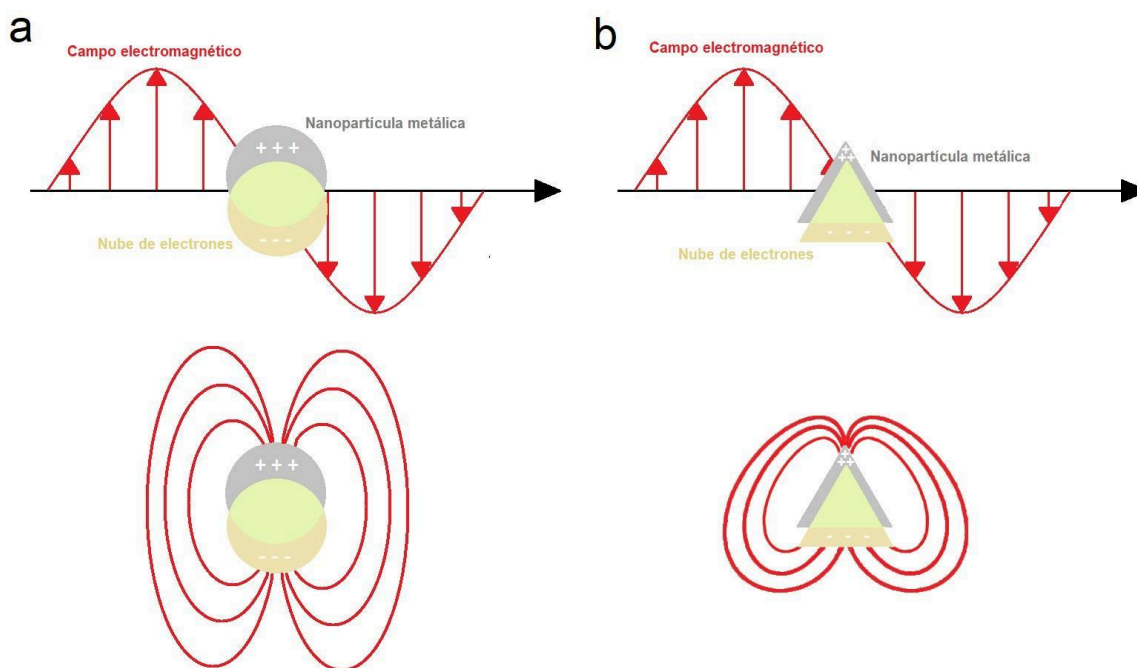


Figura 1. Representación esquemática de la resonancia de plasmón superficial de una NP (a) con morfología esférica y (b) con morfología de prisma triangular. Se observa que el campo electromagnético desplaza los electrones de conducción de sus posiciones de reposo alrededor de los núcleos positivos, generándose una fuerza restauradora. Los movimientos colectivos de los electrones son resonantes a frecuencias ópticas. La carga superficial y la distribución del campo eléctrico local dependen de la forma de la NP, siendo dipolar simétrico en el caso de la esfera, mientras que en el prisma hay una concentración de carga y campo en la punta superior. Adaptado de Coronado *et al.* (2011).

Los colores de las NPs varían según la sal de metal, el agente reductor y el *capping* que se utilicen. El punto de fusión también cambia, cayendo drásticamente cuando el tamaño de las partículas alcanza la nanoescala. Las NPs poseen vigor mecánico en comparación con sus

homólogos convencionales debido a que la conversión de materiales a nanoescala aumenta la perfección del cristal y la reducción de defectos, lo que daría como resultado una mejora del vigor mecánico (Ealias & Saravanakumar, 2017; Agarwal *et al.*, 2020). Estas características tan particulares permiten encontrar en las NPs múltiples aplicaciones en tecnología, medicina, óptica, etc.

I.1.2. Teoría de Mie

Cuando una NP es iluminada por un haz de luz, la distribución angular de la intensidad de luz re irradiada, así como también la cantidad de luz absorbida, depende de manera unívoca del tamaño, la forma, el material de la partícula y el medio circundante.

Dentro de este panorama, el problema con solución analítica más importante está relacionado al de una esfera de radio a e índice de refracción arbitrarios. En 1908, Gustav Mie (Mie, 1908) desarrolló su teoría en un esfuerzo por comprender los variados colores en la absorción y scattering exhibidos por pequeñas partículas de oro suspendidas en agua. Aunque la solución formal a este problema ha estado disponible desde hace muchos años, sólo el advenimiento de las grandes computadoras de alto poder de cálculo ha permitido la resolución práctica de los complejos cálculos involucrados.

Gustav Mie aplica las ecuaciones de Maxwell para analizar la interacción entre una onda electromagnética de amplitud E_0 cuando incide sobre una partícula esférica genérica de radio a , permitividad ϵ_1 , inmersa en un medio con permitividad ϵ_m (Fig.2) (Bohren & Huffman, 1998).

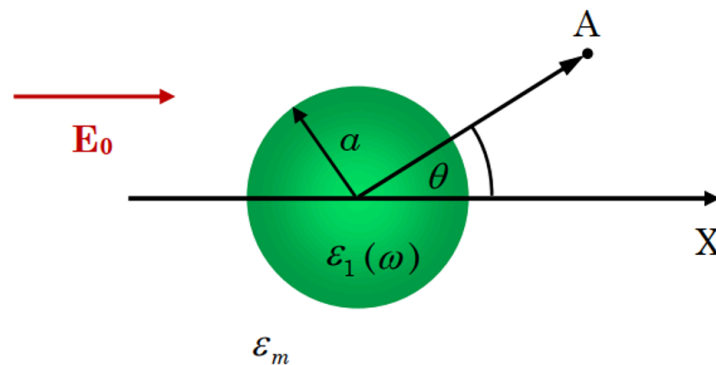


Figura 2. Esquema de una esfera homogénea situada en un campo electromagnético E_0 paralelo a la dirección de propagación en el eje X .

De los resultados obtenidos se definen las secciones eficaces de scattering y de extinción. Para el caso de NPs de radios mucho menores que la longitud de onda incidente ($a \ll \lambda_{inc}$), el campo E_0 induce un momento dipolar dentro de la esfera de magnitud proporcional a E_0 , siendo

$$\mathbf{p} = \varepsilon_0 \alpha \mathbf{E}_0 \quad (1)$$

donde α es la *polarizabilidad* definida como:

$$\alpha = 4 \pi a^3 \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_m}{\varepsilon_1 + 2 \varepsilon_m} \quad (2)$$

La *sección eficaz de scattering* de una esfera simple se puede obtener dividiendo la potencia total irradiada del dipolo en la esfera por la intensidad de la onda plana incidente, dando como resultado:

$$C_{sca} = \frac{k^4}{6 \pi} |\alpha|^2 = \frac{8}{3} \pi k^4 a^6 \left| \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_m}{\varepsilon_1 + 2 \varepsilon_m} \right|^2 \quad (3)$$

siendo k el vector de onda en el medio circundante. La potencia eliminada del haz incidente debido a la presencia de una partícula no sólo se debe al fenómeno de scattering sino también a un fenómeno conocido como absorción. Por lo tanto, si se calcula la potencia disipada dentro de la partícula, se obtiene una expresión para la *sección eficaz de absorción*, dada por:

$$C_{abs} = k \operatorname{Im} [\alpha] = 4 \pi k a^3 \operatorname{Im} \left[\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_m}{\varepsilon_1 + 2 \varepsilon_m} \right] \quad (4)$$

La suma del fenómeno de scattering y el de absorción dan como resultado un fenómeno conocido como extinción, $C_{ext} = C_{abs} + C_{sca}$. Las ecuaciones (3) y (4) demuestran que cuando una partícula pequeña con $a \ll \lambda$ interactúa con un campo electromagnético, la eficiencia de absorción que es proporcional al volumen (a^3), domina sobre la eficiencia de scattering, siendo ésta proporcional a a^6 . Además, se observa que para el caso de NPs metálicas tanto la absorción como el scattering están reforzados resonantemente cuando se cumple la condición $\operatorname{Re} [\varepsilon_1(\omega)] = -2\varepsilon_m$, siendo ésta la resonancia del plasmón que se conoce como *condición de Fröhlich*.

Los métodos tradicionales para la determinación de tamaños de NPs se basan en microscopía óptica o electrónica, dependiendo del tamaño. Estos métodos presentan la desventaja de necesitar una preparación especial de la muestra y en general, poseen una baja estadística de muestreo. Por su parte, la técnica de espectroscopía óptica se puede realizar sin tratamiento especial de la muestra, la estadística de muestreo es muy alta, la adquisición de datos puede ser muy rápida, el análisis se hace “*in situ*” y es un excelente complemento a la microscopía electrónica.

La técnica de extinción espectral se puede implementar con un espectrofotómetro comercial. Es muy simple y apropiada para determinar el tamaño de partículas en el rango de micrones y submicrones cuando se trata de partículas dieléctricas (Scaffardi *et al.*, 1996, Garcés *et al.*, 2000), y en el rango de los nanómetros para partículas metálicas (Scaffardi *et al.* 2005;

Scaffardi & Tocho, 2006; Scaffardi *et al.*, 2007; Scaffardi & Tocho, 2008; Roldán *et al.*, 2008, Torchia *et al.*, 2008, Schinca *et al.*, 2009) en suspensiones líquidas diluidas. Los resultados experimentales registrados por el espectrofotómetro pueden ser ajustados por medio de los cálculos de Mie para partículas esféricas, donde es necesario conocer el índice de refracción en función de la longitud de onda, tanto para el material particulado como para el solvente.

I.1.3. Tipos de síntesis

Los métodos de nanofabricación se dividen en dos categorías principales: métodos "*top-down*" ("de arriba hacia abajo") y "*bottom-up*" ("de abajo hacia arriba") de acuerdo con los procesos involucrados en la creación de estructuras a nanoescala. En la síntesis *top-down*, o destructivo, la producción del nanomaterial se produce por la reducción de un material a granel a partículas de escala nanométrica (Schinca *et al.*, 2009, Biswas *et al.*, 2012). Entre los métodos *top-down* más utilizados se pueden enumerar la molienda mecánica (fresado y recocido posterior de NPs durante la síntesis, donde se muelen diferentes elementos en una atmósfera inerte (Yadav *et al.*, 2012)), la nanolitografía (proceso de imprimir una forma o estructura requerida en un material sensible a la luz que elimina selectivamente una porción de material para crear la forma y estructura deseadas (Xie *et al.*, 2011)), la pulverización (deposición de NPs en una superficie al expulsar partículas de ella al chocar con iones (Torimoto *et al.*, 2006)), la descomposición térmica (descomposición química endotérmica producida por el calor que rompe los enlaces químicos en el compuesto (Salavati-Niasari & Davar, 2009)) y la ablación láser (irradiación de un metal sumergido en una solución líquida por un rayo láser que condensa una columna de plasma que produce NPs. Es un método que no requiere ningún agente estabilizador químico por lo que se lo puede considerar un proceso "verde" (Schinca & Scaffardi, 2008, Amendola & Meneghetti, 2009)).

El método de síntesis *bottom-up*, o constructivo, es la formación de NPs a partir de la acumulación de átomos o grupos de átomos (Biswas *et al.*, 2012). Entre los métodos *bottom-up* más comunes se enumeran los siguientes: Sol-gel (proceso que implica la conversión de monómeros en una solución coloidal (sol) que actúa como precursor de una red integrada (gel) de partículas discretas o polímeros reticulados (Hench & West, 1990)), *spinning* (síntesis en la cual un reactor de disco giratorio con atmósfera cuya fuerza centrífuga se utiliza para producir una película extremadamente delgada (Tai *et al.*, 2008)), deposición química de vapor (deposición de una película delgada de reactivos gaseosos sobre un sustrato (Singh *et al.*, 2003)), pirólisis (un precursor alimenta un horno a alta presión donde es quemado y los gases de combustión o subproductos se clasifican para recuperar las NPs (Teoh *et al.*, 2010)), y la biosíntesis (síntesis utilizando bacterias, extractos de plantas, hongos, etc. para producir NPs, en lugar de productos químicos convencionales, para fines de biorreducción y *capping* (Mohanpuria *et al.*, 2008)). El tema de biosíntesis de NPs metálicas será desarrollado con más profundidad en la sección I.2. En la **Figura 3** se esquematizan las aproximaciones *bottom-up* y *top-down* en el proceso de síntesis de NPs.

Las ventajas y desventajas, así como los métodos más adecuados para un tipo u otro de NPs, pueden observarse en la **Tabla 1**. La precisión con la que se puedan fabricar los

nanomateriales determinarán su eficiencia a la hora de su implementación en las diferentes aplicaciones al mismo tiempo que, del objetivo de la utilización de estos nanomateriales, dependerá el tipo de síntesis apropiado en cada caso.

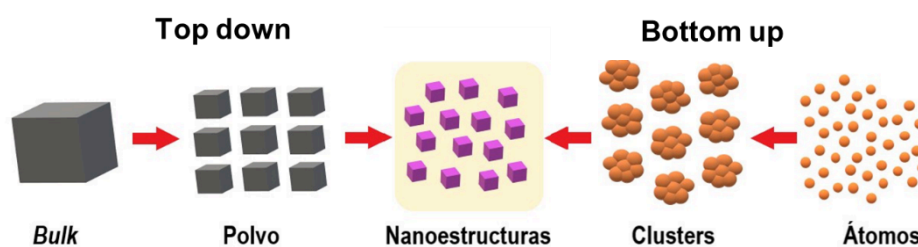


Figura 3. Dos aproximaciones del proceso de síntesis de NPs

<i>Tipo de síntesis</i>	<i>Método</i>	<i>Nanopartículas</i>
<i>Bottom up</i>	Sol-gel	Carbón, metales y óxido de metales
	Spinning	Polímeros orgánicos
	Deposición química de vapor	Carbono y metales
	Pirólisis	Carbono y óxido de metales
	Biosíntesis	Polímeros orgánicos y metales
<i>Top down</i>	Molienda mecánica	Metales, óxidos y polímeros
	Nanolitografía	Metales
	Ablación láser	Carbono y óxido de metales
	Pulverización	Metales
	Descomposición térmica	Carbono y óxido de metales

Tabla 1. Tipos de síntesis, métodos según tipo de NPs. Adaptado de Ealias & Saravanakumar (2017).

La caracterización de las NPs puede ser llevada a cabo con la utilización de variadas técnicas: espectroscopía de extinción ultravioleta (UV) - visible (OES), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión dinámica de luz (DLS), X- espectroscopía de fotoelectrones de rayos (XPS), espectroscopía Raman, análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos X en polvo (XRD), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción asistida por matriz (MALDI-TOF), interferometría de polarización dual, resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de seguimiento de NPs (NTA) para la evaluación del movimiento browniano y análisis de tamaño de partículas (Patra & Baek, 2014).

I.1.4. Formación y estabilidad de nanopartículas coloidales

El proceso de síntesis de NPs en solución puede ser dividido en una etapa de nucleación y otra de crecimiento. La nucleación es el proceso mediante el cual los núcleos (semillas) actúan como plantillas para el crecimiento de los cristales. El modelo más aceptado es el de LaMer que está dividido en tres procesos: (I) rápido aumento en la concentración de monómeros libres en solución hasta alcanzar un nivel crítico de sobresaturación en el que es posible la nucleación homogénea pero “efectivamente infinita” (C_{min}), (II) aumento de la saturación hasta que la barrera de energía (energía de activación) para la nucleación puede superarse, lo que lleva a una auto nucleación rápida ($C_{máx}$), (III) disminución del nivel de sobresaturación inmediatamente por debajo de este nivel de auto-nucleación, terminando el período de nucleación (C_s) (**Fig.4**); el crecimiento se produce por difusión de monómeros adicionales en solución hacia superficies de partículas. En ausencia de estabilizantes las partículas crecerán por coalescencia, siguiendo un mecanismo de disolución-precipitación (maduración de Ostwald)(Thanh *et al.*, 2014).

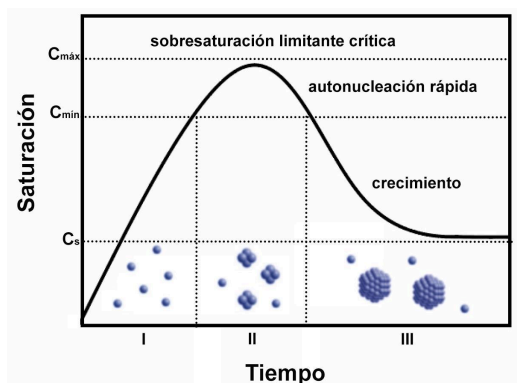


Figura 4. Mecanismo de LaMer: principio de nucleación, curva teórica cualitativa que describe la concentración de monómeros en función del tiempo. Adaptado de Polte (2015).

Las partículas a nanoescala son inestables y tienden a aglomerarse porque a estas distancias las partículas son atraídas entre sí por fuerzas de van der Waals, electrostáticas o magnéticas. Sin ninguna fuerza repulsiva contrarrestante, las NPs se agregan, aglomeran o experimentan procesos coalescentes (Hong 2019). Los mecanismos generales de estabilización de los materiales coloidales se han descrito en la teoría Derjaguin – Landau – Verwey – Overbeek (DLVO) (la fuerza total entre las partículas coloidales es la suma de las fuerzas de van der Waals (atractivo) y las fuerzas eléctricas debido a la doble capa de contraiones (repulsivo): $W_{total}(D) = W_{atractivo}(D) + W_{repulsivo}(D)$; Polte, 2015). La adsorción de agentes estabilizadores a nanocristales nucleados disminuye la energía libre de la superficie y, por lo tanto, la reactividad de las partículas. La respuesta para prevenir la agregación de NPs se logra generalmente mediante mecanismos de estabilización electrostáticos y estéricos. Los estabilizadores proporcionan una barrera física que evita que las superficies metálicas entren en contacto entre sí directamente. También pueden cambiar la carga superficial de un grupo y, por lo tanto, cambiar su estabilidad hacia la agregación. La combinación de la estabilización energética de la superficie del metal por el tensioactivo, las consecuencias de las

interacciones carga-carga y la repulsión estérica entre partículas impiden que el sistema forme agregados (Nath *et al.*, 2010).

La *estabilización electrostática* está dada por al menos una doble capa eléctrica sobre la superficie de las NPs. Se basa en la repulsión entre superficies de NPs con carga similar en solución evitando que las partículas se agreguen. Es el método principal de estabilización de partículas en solución acuosa (Nath *et al.*, 2010). La *estabilización estérica* es la adsorción de moléculas grandes en la superficie de la partícula, como polímeros o tensioactivos, proporcionando una capa protectora que impide la agregación. La estabilización estérica es una consecuencia de la repulsión estérica entre las cadenas hidrófobas gigantes de agentes estabilizantes. En general, en los solventes no polares, los mecanismos estéricos juegan papeles dominantes en la estabilización de los coloides metálicos (Studart *et al.*, 2007). Muchas veces el tipo de polímero es crucial a la hora de funcionalizar NPs (Nath *et al.*, 2010). La *estabilización electrostérica* es una combinación entre la estabilización electrostática y la estérica. Los compuestos usados (agentes tensoactivos iónicos) contienen un grupo polar capaz de generar una doble capa eléctrica y una cadena lipofílica capaz de proporcionar la repulsión estérica (Fritz *et al.*, 2002).

El tipo de estabilizador que rodee a la partícula será importante a la hora de evaluar su actividad catalítica (Park *et al.*, 2009), antibacteriana (Kvítek *et al.*, 2008), su pertinencia en la aplicabilidad médica (Niska *et al.*, 2016) etc. y su relación con el ambiente natural que la rodee (Tejamaya *et al.*, 2012)

En condiciones ambientales varios factores pueden afectar la estabilidad del coloide, como por ejemplo la presencia de cationes mono o divalentes, el pH, la temperatura, el carbono orgánico disuelto (DOC) etc. (Zhang *et al.*, 2009; Akaighe *et al.*, 2012; Cornelis *et al.*, 2012; Pokhrel *et al.*, 2013) que en muchos casos promueven la agregación de las NPs con la consecuente pérdida de actividad y posibles riesgos toxicológicos. Comprender la estabilidad coloidal de las NPs desempeña un papel clave en la interpretación fenomenológica de los experimentos toxicológicos. (MacCuspie, 2011).

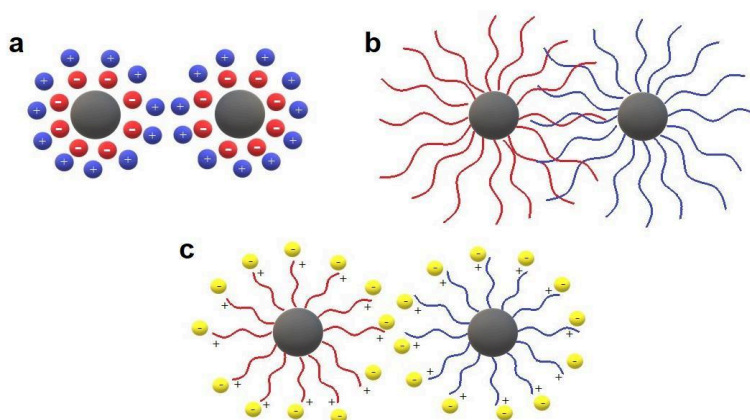


Figura 5. Tipos de estabilización en los coloides metálicos: **(a)** Estabilización electrostática. **(b)** Estabilización estérica. **(c)** Estabilización electrostérica.

I.2. BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Se define la Química Verde como el "diseño de productos y procesos químicos con el fin de reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas". Esta definición y concepto fueron formulados por primera vez a principios de la década de 1990. Anastas y Warner en 1998 desarrollaron 12 principios que describen elocuentemente la química verde la cual debe apuntar a frustrar el desperdicio, minimizar el uso de energía, emplear materiales renovables y aplicar métodos que minimicen el riesgo ecológico (Anastas & Eghbali, 2010).

Los métodos de síntesis respetuosos con el medio ambiente se han vuelto cada vez más populares no sólo debido a la necesidad de contar con métodos más ecológicos sino también para contrarrestar grandes costos y los mayores requisitos de energía de los procesos físicos y químicos. Los tres conceptos principales para la preparación de NPs en un enfoque de síntesis verde son la elección del medio disolvente (preferiblemente agua), un agente reductor ecológico y un material no tóxico para la estabilización de las NPs. Para ser eficientes energéticamente, los procesos de síntesis deben llevarse a cabo cerca de la temperatura y presión ambiente y en pH neutro. De esta manera, los sistemas biológicos aparecen como la opción más adecuada para alcanzar tales condiciones de química natural (Rauwel *et al.*, 2015).

En la actualidad, los organismos utilizados en la síntesis de NPs varían desde células bacterianas (Prakash *et al.*, 2010) hasta hongos (Siddiqi & Husen, 2016), actinomicetos (Sastry *et al.*, 2003) e incluso algas (Hassaan & Hosny, 2018) y plantas (Iravani, 2011). Se ha informado que estos sistemas biológicos producen varios tipos de NPs intracelulares o extracelulares optimizando la producción, manipulando algunos parámetros (como la temperatura, el pH, el tiempo de exposición al sustrato, la biomasa y la concentración de sustrato) que controlan las condiciones de crecimiento, las actividades celulares y los procesos enzimáticos (Korbekandi *et al.*, 2009). La biosíntesis de NPs es un tipo de enfoque ascendente donde la reacción principal que ocurre es la reducción/oxidación. Las enzimas microbianas o los fitoquímicos de las plantas con propiedades antioxidantes o reductoras son generalmente responsables de la reducción de compuestos metálicos en sus respectivas NPs (Prathna *et al.*, 2010).

Los microorganismos se han utilizado para la síntesis de NPs debido a su facilidad de manejo, creciendo en medios de bajo costo, manteniendo los niveles de seguridad, con el potencial de adsorber los iones metálicos y reducirlos a NPs por las enzimas producidas en procesos metabólicos. La síntesis de NPs por microorganismos puede ser intracelular o extracelular dependiendo de la ubicación (Menon *et al.*, 2017). Como se ha mencionado antes, los agentes de capping desempeñan un rol fundamental y versátil en la síntesis de las NPs jugando un papel importante en la estabilización y funcionalización de las mismas, controlando la morfología, el tamaño y protegiendo la superficie, evitando así la agregación. Esta función en la síntesis biológica está dada por biomoléculas, que en contraste con los tensioactivos comerciales, son menos peligrosos para el ambiente (Sharma *et al.*, 2019).

I.2.1. Biosíntesis utilizando hongos

Se cree que en la Tierra existe una diversidad de hongos que varía entre los 2,2 y 3,8 millones de especies de las cuales en la actualidad sólo han sido descritas 120.000 de éstas (Hawksworth & Lücking, 2017). Los hongos son organismos eucariotas que se clasifican dentro del reino Fungi. Secretan una amplia gama de enzimas en el medio ambiente y luego absorben estos alimentos “predigeridos” en sus células (Webster & Weber, 2007). Estos organismos varían desde talos filamentosos a unicelulares microscópicos, presentando gran diversidad en cuanto a morfología, fisiología y ecología. La percepción general de estos organismos está relacionada muchas veces con un impacto negativo como agentes de enfermedades de plantas o patógenos animales, y otras veces son considerados desde un punto de vista como productos alimenticios. Sin embargo, algunas especies incluidas en géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, son conocidas por su impacto positivo en relación a los humanos, siendo aprovechados por sus actividades metabólicas, ya sea como productores de enzimas o sintetizadores de metabolitos útiles.

Los hongos conforman una piedra angular importante de la biotecnología moderna (Bennett, 1998). Los avances tecnológicos en el diseño de fermentadores para su crecimiento, junto con el desarrollo de métodos de transformación genética han revolucionado el negocio de la biotecnología fúngica, registrándose el uso de hongos en áreas muy diversas desde la alimentación, pasando por la producción de biocombustibles o como organismos prometedores en la remediación de hábitats dañados por la actividad industrial, la minería y la agricultura (Money, 2016).

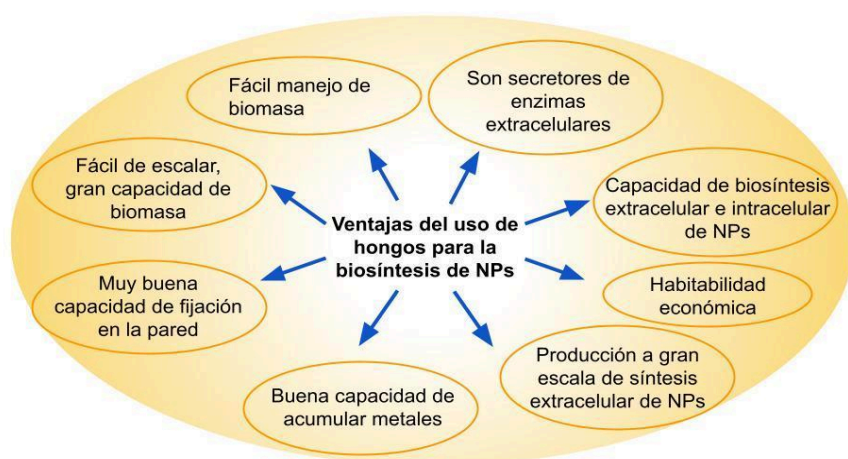


Figura 6. Ventaja del uso de hongos para la síntesis de NPs. Adaptado de Boroumand *et al.* (2015).

En este marco biotecnológico los hongos surgen como excelentes candidatos para la síntesis de NPs metálicas debido a múltiples razones (**Fig. 6**), siendo posiblemente las más importantes la tolerancia a metales, la capacidad de bioacumulación de los mismos, la capacidad de secretar una variedad muy amplia de enzimas, y su fácil manipulación (Hulkoti & Taranath, 2014). En comparación con las bacterias, los hongos son capaces de sintetizar una gran cantidad de NPs dado que secretan más cantidad de proteínas, lo que resulta en una mayor productividad (Rafique *et al.*, 2017).

La síntesis de NPs utilizando hongos puede ser intracelular o extracelular. La síntesis intracelular implica el transporte de iones a las células microbianas para formar NPs en presencia de enzimas obteniendo en general NPs más pequeñas que las sintetizadas extracelularmente. El límite de tamaño probablemente esté relacionado con las partículas que se nuclean dentro de los organismos. Por otro lado, la síntesis extracelular de NPs tiene más aplicaciones en comparación con la síntesis intracelular ya que carece de componentes celulares adyacentes innecesarios de la célula (Hasan, 2015). Algunos de los hongos que han sido utilizados en la síntesis de NPs de plata y oro se muestran en la **Tabla 2**.

<i>Tipo de organismo</i>	<i>Organismo</i>	<i>Metal</i>	<i>Morfología y tamaño</i>	<i>Referencia</i>
Hongos filamentosos	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Ag	Esféricas; 2.86 nm	AbdelRahim <i>et al.</i> , 2017
	<i>Candida glabrata</i>	Ag	Esféricas; 2–15 nm	Jalal <i>et al.</i> , 2018
	<i>Trametes trogii</i>	Ag	Esféricas y varilla ; 5–65 nm	Kobashigawa <i>et al.</i> , 2019
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ag	Esféricas; 10 nm	Elamawi <i>et al.</i> , 2018
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ag	Esféricas; 21.3–37 nm	Ahmed <i>et al.</i> , 2018
	<i>Aspergillus terreus</i>	Ag	Esféricas; 7–23 nm	Lotfy <i>et al.</i> , 2021
	<i>Ganoderma sessiliforme</i>	Ag	Esféricas; 45 nm	Mohanta <i>et al.</i> , 2018
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Ag	Esféricas; 10–20 nm	Bonilla <i>et al.</i> , 2017
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Au	60 nm	Joshi <i>et al.</i> , 2017
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Au	Esféricas; 26–34 nm	Tripathi <i>et al.</i> , 2018
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Au	Esféricas; 10–30 nm	El Domany <i>et al.</i> , 2018
	<i>Aspergillus</i> sp.	Au	Esféricas; 4–29 nm	Shen <i>et al.</i> , 2017
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Au	Esféricas y estructuras en forma de flor; 16–43 nm	Kitching <i>et al.</i> , 2016
Levaduras	<i>Rhodotorula</i> sp. ATL72	Ag	Esféricas y ovales; 8–21 nm	Soliman <i>et al.</i> , 2018
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	Esféricas; 2–20 nm	Korbekandi, <i>et al.</i> , 2016
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ag	35–400 nm	Fernández <i>et al.</i> , 2016
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Ag	15–220 nm	Fernández <i>et al.</i> , 2016
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Ag	Esféricas; 15.5 nm	Cunha <i>et al.</i> , 2018
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Au	Triángulos, triángulos truncados y hexágonos	Yang <i>et al.</i> , 2017
	<i>Magnusiomyces ingens</i> LHF1	Au	Esféricas y pseudo-esféricas; 20–28 nm	Qu <i>et al.</i> , 2018

Tabla 2. Lista representativa de algunos hongos filamentosos y levaduriformes utilizados en la síntesis de NPs de plata y oro desde 2016. Adaptado de Dikshit *et al.* (2021).

El mecanismo detrás de la síntesis biológica de NPs es aún tema de debate. Sin embargo, la reacción de reducción es el principio detrás de todo tipo de mecanismos, observándose rutas

que tienen lugar debido a péptidos y polisacáridos celulares que conducen a oxidación enzimática, reducción, sorción y quelación (Banerjee & Rai, 2018).

I.2.2. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son utilizadas cada vez más en diversos campos industriales y médicos debido a sus propiedades físicas y químicas únicas. Las propiedades antibacterianas de la plata se conocen desde hace al menos 2000 años por lo que las AgNPs han ganado terreno como agentes antimicrobianos (Prabhu & Poulouse, 2012). Sin embargo el uso de las AgNPs va más allá y actualmente son utilizadas en múltiples aplicaciones en productos industriales, domésticos, cosméticos, sensores ópticos, la industria alimentaria, administración de medicamentos, como agentes anticancerígenos, etc (Abbasi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

Las propiedades ópticas de las nanoestructuras de plata (al igual que para el resto de los elementos metálicos) resultan de su interacción con la luz, lo que provoca la oscilación colectiva coherente de sus electrones de banda de conducción libre, o RPS (resonancia de plasmón superficial). El RPS dependerá de la forma y tamaño de la NP (**Fig. 7**) (Linic *et al.*, 2015). De los tres metales que muestran resonancias de plasmones en el espectro visible (Ag, Au, Cu), la plata exhibe la más alta eficiencia de la excitación de plasmones (Evanoff Jr & Chumanov, 2005). Algunas propiedades fisicoquímicas de las AgNPs, incluidos el tamaño (área de superficie), la forma, la carga superficial y el recubrimiento, la aglomeración y la velocidad de disolución, son particularmente importantes para determinar sus interacciones e impactos biológicos. Por ejemplo, las partículas más pequeñas tienen un área superficial más grande y, por lo tanto, tienen un mayor potencial tóxico (Wei *et al.*, 2015).

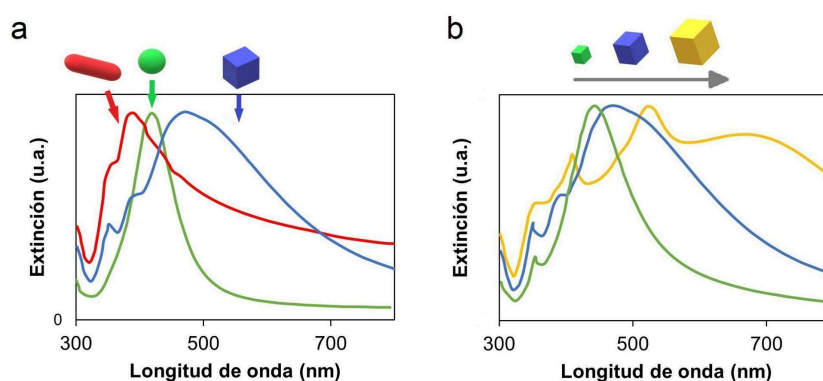


Figura 7. Espectros de extinción para AgNPs según: (a) distintas morfologías (cables, esferas o cubos); (b) distintos tamaños de nanocubos. Adaptado de Linic *et al.*, 2015.

La síntesis de AgNPs utilizando hongos en el proceso ha sido anteriormente registrada por varios autores (Ahmad *et al.*, 2003; Bhainsa & D'souza, 2006; Verma *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2016; Osorio-Echavarría *et al.*, 2021). Se ha demostrado que distintos parámetros como el pH, la temperatura, la concentración de sales o el tiempo de exposición pueden afectar la síntesis y la eficiencia así como el tamaño y forma de las NPs (Prakash & Soni, 2011; Guilger-Casagrande & de Lima 2019). El escalado de la síntesis de AgNPs mediada por

hongos aún es un tema de estudio (Syafiuddin *et al.*, 2017) por lo que la búsqueda de organismos que registren un alto rendimiento a bajo costo y puedan ser industrializados se presenta aún como un desafío.

I.2.3. Nanopartículas de oro

El oro es un material multifuncional que se ha utilizado en aplicaciones medicinales durante siglos debido a sus propiedades bacteriostáticas, anticorrosivas y antioxidantes (Park *et al.*, 2019). En los últimos años, las nanopartículas de oro AuNPs han ganado importancia en microbiología, medicina, monitoreo ambiental y electrónica (Kitching *et al.*, 2015). Dado que las AuNPs no son tóxicas y tienen propiedades de alta absorbancia, se usan ampliamente en diversas aplicaciones en el sector de la salud (Clarance *et al.*, 2020). Actualmente, un área popular en nanomedicina es la implementación de AuNPs para el diagnóstico de cáncer y la terapia fototérmica (Huang & El-Sayed, 2010).

Al igual que las AgNPs, las AuNPs presentan un plasmón superficial debido a la oscilación de sus electrones libres al interaccionar con la luz (Huang *et al.*, 2007). En 1857, Faraday obtiene por primera vez oro coloidal mediante una preparación de dos fases, reduciendo una solución acuosa de una sal de oro, como el tetracloroaurato de sodio ($\text{Na}[\text{AuCl}_4]$), con una solución de fósforo en disulfuro de carbono. Faraday reconoció que el color rojizo se debía al pequeño tamaño de las partículas de oro (Edwards & Thomas, 2007). De hecho, soluciones de AuNPs esféricas exhiben una gama de colores que van desde el marrón, el naranja y el rojo, al púrpura y el azul, dependiendo del tamaño del núcleo y la agregación de las mismas. Generalmente estas NPs muestran picos de absorción de 500 a 550 nm, con un corrimiento al rojo con aumento del tamaño de la partícula, dando una coloración rojiza a soluciones con partículas menores de 90 nm y coloraciones púrpura o azul para partículas más grandes (**Fig. 8**) (Alex & Tiwari, 2015). Las cualidades absorptivas de las AuNPs las hacen muy interesantes en la aplicación de terapias fototérmicas ya que aseguran una terapia láser efectiva a energías relativamente bajas, lo que hace que el método de terapia sea mínimamente invasivo (Huang *et al.*, 2008).

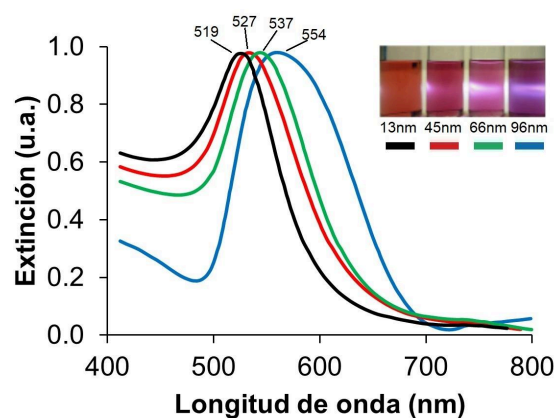


Figura 8: Espectro de extinción de coloides de AuNPs en agua con diferentes tamaños. Se observa cómo el pico de extinción se va corriendo hacia el rojo a medida que aumenta el tamaño de las NPs. Adaptado de Moirangthem *et al.* (2012).

Entre los métodos convencionales, la reducción de derivados del oro (III) (HAuCl_4), utilizando el agente reductor de citrato introducido por Turkevitch en 1951, ha sido la estrategia de síntesis de AuNPs más popular (Kimling *et al.*, 2006). Las síntesis convencionales de AuNPs utilizan, sin embargo, solventes orgánicos que los hacen inadecuados para aplicaciones de diagnóstico para detectar biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y sacáridos, y el uso de productos químicos tóxicos y solventes no polares limita su aplicación en los campos clínicos. Es por ello que se busca el desarrollo de métodos limpios, biocompatibles, no tóxicos y ecológicos (Kalimuthu *et al.*, 2020). En la literatura la síntesis de AuNPs mediada por diferentes especies de hongos ha sido registrada por varios autores (Mukherjee *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2011; Molnár *et al.*, 2018).

I.3. EFECTOS TÓXICOS

Las propiedades únicas que exhiben las NPs son la razón principal de sus numerosas aplicaciones, pero al mismo tiempo pueden representar una enorme amenaza para el medio ambiente. Es por ello que los estudios que evalúan la posible ecotoxicidad de los nanomateriales han ido aumentando en la última década. Para evaluar la potencial toxicidad se utilizan modelos biológicos en todo tipo de organismos, desde bacterias hasta especies animales complejas (Martínez *et al.*, 2020). Existen evidencias de que las NPs pueden ser bioacumuladas en plantas, algas, peces y animales (Judy *et al.*, 2011; Yeo & Nam, 2013; McTeer *et al.*, 2014), pudiendo atravesar la cadena trófica. En un entorno natural es posible que las NPs puedan retener su tamaño de partículas, propiedades y reactividad después de ingresar al medio ambiente exhibiendo efectos tóxicos en los organismos objetivo y no objetivo (Iavicoli *et al.*, 2017).

Los principales mecanismos que regulan la toxicidad de las NPs están asociados con el estrés oxidativo que provoca inflamación, genotoxicidad y disfunción importante de los orgánulos celulares (Manke *et al.*, 2013). El estrés oxidativo resulta de la formación de radicales libres, causados por la activación de vías enzimáticas oxidativas. En condiciones de estrés oxidativo prolongado, se producen daños en las proteínas, el ADN y los componentes lipídicos, las mitocondrias, disfunciones del retículo endoplásmico y, finalmente, la apoptosis. (Medici *et al.*, 2021).

La nanotecnología ofrece muchos beneficios que merecen ser explorados, pero al mismo tiempo se debe ser consciente de que su aplicación sin cuidado puede acarrear una serie de problemas a nivel ecológico. Es por ello que es importante construir sistemas de regulación para poder aplicar la nanotecnología con seguridad y evitar desastres ambientales (Paramo *et al.*, 2020). El Grupo de Trabajo sobre Nanomateriales Fabricados (*Working Party on Manufactured Nanomaterials*, WPMN) y la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (*Organization for Economic Cooperation and Development*, OCDE), y sus países miembros proponen que las pruebas y la evaluación de productos químicos

tradicionales son en general apropiados para evaluar la seguridad de los nanomateriales, pero es posible que deban adaptarse a las especificidades de los nanomateriales. Sin embargo, como los productos químicos generalmente considerados no tóxicos en rangos de macroescala pueden volverse tóxicos en el rango de nanoescala, es prudente un enfoque caso por caso. (Rasmussen *et al.*, 2017). En EE.UU., agencias reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) y el Instituto de Normas Alimentarias y Agrícolas (*Institute for Food and Agricultural Standards*, IFAS) han iniciado protocolos para hacer frente a los posibles riesgos de los nanomateriales y los nanoprodutos. Desde 2006, la FDA ha estado trabajando en la identificación de fuentes de nanomateriales, estimando el impacto ambiental y sus riesgos para las personas, los animales y las plantas, y cómo estos riesgos podrían evitarse o mitigarse (Jeevanandam *et al.*, 2018).

La síntesis biológica de NPs puede disminuir el riesgo de contaminación por reactivos tóxicos, sin embargo, los riesgos derivados por la liberación de las mismas en el medio ambiente deben ser bien estudiadas, especialmente debido a sus transformaciones en el medio ambiente que modifican sus propiedades como la toxicidad y que dependen del capping que las rodea (de Souza *et al.*, 2019). Es importante por ello, el estudio del impacto que puedan tener las NPs de síntesis biológica en modelos biológicos para tener un panorama claro del tipo de implicaciones pueden tener las nuevas tecnologías emergentes.

I.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Esta tesis tiene como objetivo general estudiar y caracterizar la capacidad de organismos fúngicos nativos como agentes mediadores en la síntesis de NPs metálicas, buscando optimizar condiciones de síntesis, dilucidando los mecanismos involucrados.

En este marco el presente trabajo de tesis tiene como objetivos particulares:

1. Seleccionar organismos de interés como mediadores de la síntesis de NPs metálicas.
2. Evaluar la capacidad de diferentes cepas fúngicas como mediadoras de la síntesis de AgNPs y AuNPs.
3. Evaluar la capacidad de cepas fúngicas psicotolerantes como mediadoras de la síntesis de AgNPs.
4. Estudiar y caracterizar las NPs obtenidas.
5. Analizar el impacto de la variabilidad intraespecífica (uso de diferentes cepas de la misma especie) en la síntesis de AgNPs.
6. Estudiar el impacto del pH en la forma y tamaño de las NPs obtenidas.
7. Estudiar el efecto de las NPs de plata sintetizadas en el desarrollo de modelos biológicos.

Nuestra hipótesis de trabajo se centra en que existen hongos nativos capaces de producir grandes cantidades de productos extracelulares que son capaces de reducir los iones a

partículas neutras. Además, se trabajará sobre la hipótesis de que los procesos de síntesis, así como las características finales de las NPs, pueden ser modulados mediante la manipulación del pH. Otra de las hipótesis sobre las que basamos este trabajo es que las NPs obtenidas mediante síntesis biológica presentan una baja toxicidad y en algunos modelos ésta es menor que la toxicidad de NPs obtenidas por medios de síntesis física de ablación láser.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., Nikasa, P., Joo, W.J., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K. & Samiei, M. (2014). Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–8.

AbdelRahim, K., Mahmoud, S. Y., Ali, A. M., Almaary, K. S., Mustafa, A. E. Z. M. & Husseiny, S. M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 208-216.

Abuzeid, H. M., Julien, C. M., Zhu, L. & Hashem, A. M. (2023). Green synthesis of nanoparticles and their energy storage, environmental, and biomedical applications. *Crystals*, 13(11), 1576.

Agarwal, M., Tomar, R. S., Singh, R. K., Meena, A. K. & Jyoti, A. (2020). Nanomaterials: Properties, Synthesis, Characterizations, and Toxicities. *Nanobiotechnology: Concepts and Applications in Health, Agriculture, and Environment*, 59.

Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R. & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.

Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R. & Sastry, M. (2005). Extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus, *Trichothecium* sp. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(1), 47-53.

Ahmed, A. A., Hamzah, H. & Maaroo, M. (2018). Analyzing formation of silver nanoparticles from the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* and their antimicrobial activity. *Turkish Journal of Biology*, 42(1), 54-62.

Akaighe, N., Depner, S. W., Banerjee, S., Sharma, V. K. & Sohn, M. (2012). The effects of monovalent and divalent cations on the stability of silver nanoparticles formed from direct reduction of silver ions by Suwannee River humic acid/natural organic matter. *Science of the Total Environment*, 441, 277-289.

Alex, S. & Tiwari, A. (2015). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(3), 1869–1894.

Amendola, V. & Meneghetti, M. (2009). Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), 3805-3821.

Anastas, P. & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, 39(1), 301–312.

- Bhainsa, K. C. & D'souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160-164.
- Banerjee, K. & Rai, V. R. (2018). A review on mycosynthesis, mechanism, and characterization of silver and gold nanoparticles. *BioNanoScience*, 8(1), 17-31.
- Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66(2-3), 101-107.
- Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E. & Faupel, F. (2012). Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170(1-2), 2-27.
- Bohren, C. F. & Huffman, D. R. (1998). Absorption and Scattering of Light by Small Particles. John Wiley & Sons.
- Bonilla, J. J. A., Guerrero, D. J. P., Sáez, R. G. T., Ishida, K., Fonseca, B. B., Rozental, S. & López, C. C. O. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using maltose and cysteine and their effect on cell wall envelope shapes and microbial growth of *Candida* spp. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(3), 1729-1739.
- Boroumand Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Md. Tahir, P., Azizi, S. & Mohamad, R. (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*, 20(9), 16540–16565.
- Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., Khusro, A., Agastian, P., Tack, J. C., Al Khulaifi, M. M., AL-Shwaiman, H. A., Elgorban, A. M., Sayed, A. & Kim, H. J. (2020). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), 706-712.
- Cornelis, G., DooletteMadeleine Thomas, C., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Beak, D. G. & Chittleborough, D. (2012). Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils. *Soil Science Society of America Journal*, 76(3), 891-902.
- Coronado, E. A., Encina, E. R. & Stefani, F. D. (2011). Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale*, 3(10), 4042-4059.
- Cunha, F. A., Cunha, M. D. C., da Frota, S. M., Mallmann, E. J., Freire, T. M., Costa, L. S., Paula, A. J., Menezes, E. A. & Fachine, P. B. (2018). Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 1-15.

De Rosa, V. D., Rebaza, A. G., Montes, M. L., Taylor, M. A. & Alonso, R. E. (2022). Sorption of Sr on montmorillonite clays: Theoretical and experimental study.I, 592, 153146.

de Souza, T. A. J., Souza, L. R. R. & Franchi, L. P. (2019). Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 171, 691-700.

De Souza, C. D., Nogueira, B. R. & Rostelato, M. E. C. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 714-740.

Dikshit, P. K., Kumar, J., Das, A. K., Sadhu, S., Sharma, S., Singh, S., Gupta, P. K. & Kim, B. S. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11(8), 902.

Du, L., Xian, L. & Feng, J. X. (2011). Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(3), 921-930.

Ealias, A. M. & Saravanakumar, M. P. (2017, November). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *In IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng* (Vol. 263, p. 032019).

Edwards, P. P. & Thomas, J. M. (2007). Gold in a metallic divided state—from faraday to present-day nanoscience. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(29), 5480-5486.

Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E. & Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1-11.

El Domany, E. B., Essam, T. M., Ahmed, A. E. & Farghali, A. A. (2018). Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using *Pleurotus ostreatus* fungus. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(5), 119-128.

Eustis, S. & El-Sayed, M. A. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, 35(3), 209-217.

Evanoff Jr, D. D. & Chumanov, G. (2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem*, 6(7), 1221-1231.

Fernández, J. G., Fernández-Baldo, M. A., Berni, E., Camí, G., Durán, N., Raba, J. & Sanz, M. I. (2016). Production of silver nanoparticles using yeasts and evaluation of their antifungal activity against phytopathogenic fungi. *Process Biochemistry*, 51(9), 1306-1313.

Fritz, G., Schädler, V., Willenbacher, N. & Wagner, N. J. (2002). Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. *Langmuir*, 18(16), 6381-6390.

Gade, A., Shende, S. & Rai, M. (2022). Potential role of *Phoma* spp. for mycogenic synthesis of silver nanoparticles. *Phoma: Diversity, Taxonomy, Bioactivities, and Nanotechnology*, 313-325.

Garcés, I., Sotolongo, O., Hernández, M. P., Scaffardi, L., García-Ramos, J. V. & Rivas, L. (2000). Determination of Particle Size Distribution on Aerosols and Suspensions by Ultraviolet-Visible-Near Infrared Absorbance Measurements. A New Procedure for Absorbing Particles. *Physica Status Solidi (b)*, 220(1), 583-586.

González-Seligra, P., Goyanes, S. & Fama, L. (2022). Effect of the Incorporation of Rich-Amylopectin Starch Nano/Micro Particles on the Physicochemical Properties of Starch-Based Nanocomposites Developed by Flat-Die Extrusion. *Starch-Stärke*, 74(1-2), 2100080.

Guilger-Casagrande, M. & de Lima, R. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.

Hasan, S. (2015). A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Research Journal of Recent Sciences* ISSN, 2277, 2502.

Hassaan, M. A. & Hosny, S. (2018). Green synthesis of Ag and Au nanoparticles from micro and macro algae-review. *International Journal of Atmospheric and Oceanic Sciences*, 2(1), 10-22.

Hawksworth, D. L. & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *The Fungal Kingdom*, 79-95.

Hench, L. L. & West, J. K. (1990). The sol-gel process. *Chemical Reviews*, 90(1), 33-72.

Hong, N. H. (2019). Introduction to Nanomaterials: Basic Properties, Synthesis, and Characterization. In *Nano-Sized Multifunctional Materials* (pp. 1-19). Elsevier.

Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. (2007). Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 2(5), 681-693.

Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 23(3), 217.

Huang, X. & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13-28.

- Hulkoti, N. I. & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483.
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H. & Shvedova, A. A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 96–111.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., Almatroudi, A. & Raees, K. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles from oropharyngeal *Candida glabrata* isolates and their antimicrobial activity against clinical strains of bacteria and fungi. *Nanomaterials*, 8(8), 586.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.
- Joshi, C. G., Danagoudar, A., Poyya, J., Kudva, A. K. & Dhananjaya, B. L. (2017). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides* isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*, 63, 137-144.
- Judy, J. D., Unrine, J. M. & Bertsch, P. M. (2011). Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science & Technology*, 45(2), 776-781.
- Kalimuthu, K., Cha, B. S., Kim, S. & Park, K. S. (2020). Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Microchemical Journal*, 152, 104296.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668-677.
- Khairani, I. Y., Mínguez-Vega, G., Doñate-Buendía, C. & Gökce, B. (2023). Green nanoparticle synthesis at scale: a perspective on overcoming the limits of pulsed laser ablation in liquids for high-throughput production. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(29), 19380-19408.
- Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.

- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(32), 15700-15707.
- Kitching, M., Ramani, M. & Marsili, E. (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 904-917.
- Kitching, M., Choudhary, P., Inguva, S., Guo, Y., Ramani, M., Das, S. K. & Marsili, E. (2016). Fungal surface protein mediated one-pot synthesis of stable and hemocompatible gold nanoparticles. *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 76-84.
- Kobashigawa, J. M., Robles, C. A., Ricci, M. L. M. & Carmarán, C. C. (2019). Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1331-1337.
- Korbekandi, H., Iravani, S. & Abbasi, S. (2009). Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(4), 279-306.
- Korbekandi, H., Mohseni, S., Mardani Jouneghani, R., Pourhossein, M. & Iravani, S. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 235-239.
- Kvítek, L., Panáček, A., Soukupova, J., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Holecová, M. & Zbořil, R. (2008). Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(15), 5825-5834.
- Linic, S., Aslam, U., Boerigter, C. & Morabito, M. (2015). Photochemical transformations on plasmonic metal nanoparticles. *Nature Materials*, 14(6), 567-576.
- Lotfy, W. A., Alkersh, B. M., Sabry, S. A. & Ghozlan, H. A. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus terreus*: characterization, optimization, and biological activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 633468.
- MacCuspie, R. I. (2011). Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(7), 2893-2908.
- Madkour, L. H. & Madkour, L. H. (2019). Introduction to nanotechnology (NT) and nanomaterials (NMs). *Nanoelectronic Materials: Fundamentals and Applications*, 1-47.
- Manke, A., Wang, L. & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013.
- Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E. M., Ortiz, T., Villamor, E., Begines, B. & Alcudia, A. (2020). Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Materials*, 14(1), 166.

- McTeer, J., Dean, A. P., White, K. N. & Pittman, J. K. (2014). Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology*, 8(3), 305-316.
- Medici, S., Peana, M., Pelucelli, A. & Zoroddu, M. A. (2021, November). An updated overview on metal nanoparticles toxicity. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 76, pp. 17-26). Academic Press.
- Menon, S., Rajeshkumar, S. & Kumar, V. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 516-527.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3), 377-445.
- Mishra, R. C., Kalra, R., Dilawari, R., Goel, M. & Barrow, C. J. (2022). Bio-synthesis of *Aspergillus terreus* mediated gold nanoparticle: Antimicrobial, antioxidant, antifungal and in vitro cytotoxicity studies. *Materials*, 15(11), 3877.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K. & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3), 507-517.
- Mohanta, Y. K., Nayak, D., Biswas, K., Singdevsachan, S. K., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Yadav, D. & Mohanta, T. K. (2018). Silver nanoparticles synthesized using wild mushroom show potential antimicrobial activities against food borne pathogens. *Molecules*, 23(3), 655.
- Moirangthem, R. S., Yaseen, M. T., Wei, P.-K., Cheng, J.-Y. & Chang, Y.-C. (2012). Enhanced localized plasmonic detections using partially-embedded gold nanoparticles and ellipsometric measurements. *Biomedical Optics Express*, 3(5), 899.
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Konya, Z., Tóth-Szeles, E., Szűcs, R. & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.
- Money, N. P. (2016). Fungi and biotechnology. In *The fungi* (pp. 401-424). Academic Press.
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R. & Sastry, M. (2002). Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem*, 3(5), 461-463.
- Nath, S., Jana, S., Pradhan, M. & Pal, T. (2010). Ligand-stabilized metal nanoparticles in organic solvent. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(2), 333-352.
- Niska, K., Knap, N., Kędzia, A., Jaskiewicz, M., Kamysz, W. & Inkielewicz-Stepniak, I. (2016). Capping agent-dependent toxicity and antimicrobial activity of silver nanoparticles:

an in vitro study. Concerns about potential application in dental practice. *International Journal of Medical Sciences*, 13(10), 772.

Osorio-Echavarría, J., Osorio-Echavarría, J., Ossa-Orozco, C. P. & Gómez-Vanegas, N. A. (2021). Synthesis of silver nanoparticles using white-rot fungus *Anamorphous Bjerkandera* sp. R1: Influence of silver nitrate concentration and fungus growth time. *Scientific Reports*, 11(1), 3842.

Otal, E. H., Granada, M., Troiani, H. E., Cánepa, H. & Walsöe de Reca, N. E. (2009). Nanostructured colloidal crystals from forced hydrolysis methods. *Langmuir*, 25(16), 9051-9056.

Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S. & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654.

Park, J. Y., Aliaga, C., Renzas, J. R., Lee, H. & Somorjai, G. A. (2009). The role of organic capping layers of platinum nanoparticles in catalytic activity of CO oxidation. *Catalysis Letters*, 129(1-2), 1-6.

Park, H., Lim, D. J., Vines, J. B., Yoon, J. H. & Ryu, N. E. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Frontiers in Chemistry*, 7, 167.

Patel, R. R., Singh, S. K. & Singh, M. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles: methods, biological applications, delivery and toxicity. *Materials Advances*, 4(8), 1831-1849.

Patra, J. K. & Baek, K. H. (2014). Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. *Journal of Nanomaterials*, 2014.

Pereyra, J. I., Paterlini, P., Noblega, L., Álvarez, A. & Romero, C. M. (2018). Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata por actinobacterias metalo-resistentes. *XXVI JJII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM*. Universidad Nacional de Cuyo.

Pokhrel, L. R., Dubey, B. & Scheuerman, P. R. (2013). Impacts of select organic ligands on the colloidal stability, dissolution dynamics, and toxicity of silver nanoparticles. *Environmental science & technology*, 47(22), 12877-12885.

Polte, J. (2015). Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles—a new perspective. *CrystEngComm*, 17(36), 6809-6830.

Prabhu, S. & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 32.

Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A. & Sinha, P. (2010). Bacteria mediated extracellular synthesis of metallic nanoparticles. *Int Res J Biotechnol*, 1(5), 071-079.

- Prakash, N. S. & Soni, N. (2011). Factors affecting the geometry of silver nanoparticles synthesis in *Chrysosporium tropicum* and *Fusarium oxysporum*. *American Journal of Nanotechnology*, 2(1), 112-121.
- Prathna, T. C., Mathew, L., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M. & Mukherjee, A. (2010). Biomimetic synthesis of nanoparticles: science, technology & applicability. In *Biomimetics Learning From Nature*. Intechopen.
- Qu, Y., You, S., Zhang, X., Pei, X., Shen, W., Li, Z., Li, S. & Zhang, Z. (2018). Biosynthesis of gold nanoparticles using cell-free extracts of *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for nitrophenols reduction. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 359-367.
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S. & Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272-1291.
- Rai, M., Bonde, S., Golinska, P., Trzcińska-Wencel, J., Gade, A., Abd-Elsalam, K. A., Shende, S., Gaikwad, S. & Ingle, A. P. (2021). *Fusarium* as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles: mechanism and applications. *Journal of Fungi*, 7(2), 139.
- Rasmussen, K., Sokull-Klüttgen, B., Yu, I. J., Kanno, J., Hirose, A. & Gwinn, M. R. (2017). Regulation and Legislation. In *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials* (pp. 159-188). Academic Press.
- Rauwel, P., Küünal, S., Ferdov, S. & Rauwel, E. (2015). A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015.
- Rodríguez, K. S., Quintero, J. M., Torres, C. R. & Errico, L. (2023). Structural, electronic, magnetic and hyperfine properties of Fe₂AlO₄ and FeAl₂O₄. A DFT study. *Journal of Alloys and Compounds*, 958, 170385.
- Roldán, M. V., Scaffardi, L. B., de Sanctis, O. & Pellegrini, N. (2008). Optical properties and extinction spectroscopy to characterize the synthesis of amine capped silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 112(3), 984-990.
- Salavati-Niasari, M. & Davar, F. (2009). Synthesis of copper and copper (I) oxide nanoparticles by thermal decomposition of a new precursor. *Materials Letters*, 63(3-4), 441-443.
- Santillán, J. M., Muñetón Arboleda, D., Muraca, D., Schinca, D. C. & Scaffardi, L. B. (2020). Highly fluorescent few atoms silver nanoclusters with strong photocatalytic activity synthesized by ultrashort light pulses. *Scientific reports*, 10(1), 8217.
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I. & Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*, 85(2), 162-170.

Scaffardi, L. B., Tocho, J. O., Yebrin, L. L. & Cantera, C. S. (1996). Sizing particles used in the leather industry by light scattering. *Optical Engineering*, 35(1), 52-56.

Scaffardi, L. B., Pellegrini, N., De Sanctis, O. & Tocho, J. O. (2005). Sizing gold nanoparticles by optical extinction spectroscopy. *Nanotechnology, I.O.P.*, Londres, Vol 16, pp 158 – 163.

Scaffardi, L. B. & Tocho, J. O. (2006). Size dependence of refractive index of gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 17(5), 1309.

Scaffardi, L. B., Lester, M., Skigin, D. & Tocho, J. O. (2007). Optical extinction spectroscopy used to characterize metallic nanowires. *Nanotechnology*, 18(31), 315402.

Scaffardi, L. B. & Tocho, J. O. (2008). Absorption spectra of tiny gold and silver objects. *Journal of Luminescence*, 128(5-6), 828-830.

Schinca, D. C. & Scaffardi, L. B. (2008). Core and shell sizing of small silver-coated nanospheres by optical extinction spectroscopy. *Nanotechnology*, 19(49), 495712.

Schinca, D. C., Scaffardi, L. B., Videla, F. A., Torchia, G. A., Moreno, P. & Roso, L. (2009). Silver–silver oxide core–shell nanoparticles by femtosecond laser ablation: core and shell sizing by extinction spectroscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(21), 215102.

Sharma, D., Kanchi, S. & Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3576-3600.

Shen, W., Qu, Y., Pei, X., Li, S., You, S., Wang, J., Zhang, Z. & Zhou, J. (2017). Catalytic reduction of 4-nitrophenol using gold nanoparticles biosynthesized by cell-free extracts of *Aspergillus* sp. WL-Au. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 299-306.

Siddiqi, K. S. & Husen, A. (2016). Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 98.

Singh, C., Shaffer, M. S. & Windle, A. H. (2003). Production of controlled architectures of aligned carbon nanotubes by an injection chemical vapour deposition method. *Carbon*, 41(2), 359-368.

Soliman, H., Elsayed, A. & Dyaa, A. (2018). Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesised by *Rhodotorula* sp. strain ATL72. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 228-233.

Spagnoletti, F. N., Spedalieri, C., Kronberg, F. & Giacometti, R. (2019). Extracellular biosynthesis of bactericidal Ag/AgCl nanoparticles for crop protection using the fungus *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Environmental Management*, 231, 457-466.

Spedalieri, A.C. (2015). Formación de nanopartículas metálicas mediada por microalgas en suspensión y encapsuladas en hidrogeles. *Tesis doctoral*. Universidad de Buenos Aires.

- Sportelli, M. C., Izzì, M., Volpe, A., Clemente, M., Picca, R. A., Ancona, A., Lugarà, P. M., Palazzo, G. & Cioffi, N. (2018). The pros and cons of the use of laser ablation synthesis for the production of silver nano-antimicrobials. *Antibiotics*, 7(3), 67.
- Studart, A. R., Amstad, E. & Gauckler, L. J. (2007). Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir*, 23(3), 1081-1090.
- Syafiuddin, A., Salim, M. R., Beng Hong Kueh, A., Hadibarata, T. & Nur, H. (2017). A review of silver nanoparticles: Research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 64(7), 732-756.
- Tai, C. Y., Wang, Y. H. & Liu, H. S. (2008). A green process for preparing silver nanoparticles using spinning disk reactor. *AIChE Journal*, 54(2), 445-452.
- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C. & Lead, J. R. (2012). Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 7011-7017.
- Teoh, W. Y., Amal, R. & Mädler, L. (2010). Flame spray pyrolysis: An enabling technology for nanoparticles design and fabrication. *Nanoscale*, 2(8), 1324-1347.
- Thanh, N. T., Maclean, N. & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610-7630.
- Torchia, G. A., Scaffardi, L. B., Méndez, C., Moreno, P., Tocho, J. O. & Roso, L. (2008). Optical extinction for determining the size distribution of gold nanoparticles fabricated by ultra-short pulsed laser ablation. *Applied Physics A*, 93, 967-971.
- Torimoto, T., Okazaki, K. I., Kiyama, T., Hirahara, K., Tanaka, N. & Kuwabata, S. (2006). Sputter deposition onto ionic liquids: Simple and clean synthesis of highly dispersed ultrafine metal nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 89(24), 243117.
- Tripathi, R. M., Shrivastav, B. R. & Shrivastav, A. (2018). Antibacterial and catalytic activity of biogenic gold nanoparticles synthesised by *Trichoderma harzianum*. *IET Nanobiotechnology*, 12(4), 509-513.
- Verma, V. C., Kharwar, R. N. & Gange, A. C. (2010). Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Nanomedicine*, 5(1), 33-40.
- Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S. & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), 595-601.
- Xie, Z., Yu, W., Wang, T., Zhang, H., Fu, Y., Liu, H., Li, F., Lu, Z. & Sun, Q. (2011). Plasmonic nanolithography: a review. *Plasmonics*, 6(3), 565.

- Xue, B., He, D., Gao, S., Wang, D., Yokoyama, K. & Wang, L. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Nanomedicine*, 1899-1906.
- Yadav, T. P., Yadav, R. M. & Singh, D. P. (2012). Mechanical milling: a top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), 22-48.
- Yang, Z., Li, Z., Lu, X., He, F., Zhu, X., Ma, Y., He, R., Gao, F., Ni, W. & Yi, Y. (2017). Controllable biosynthesis and properties of gold nanoplates using yeast extract. *Nano-micro letters*, 9, 1-13.
- Yassin, M. A., Elgorban, A. M., El-Samawaty, A. E. R. M. & Almunqedhi, B. M. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Penicillium verrucosum* and analysis of their antifungal activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2123-2127.
- Yeo, M. K. & Nam, D. H. (2013). Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: a comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environmental Pollution*, 178, 166-172.
- Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P. & Crittenden, J. (2009). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Research*, 43(17), 4249-4257.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W. & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.

CAPÍTULO II

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

METÁLICAS

CAPÍTULO II:

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

II.1. INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de NPs metálicas utilizando diferentes cultivos fúngicos y sustancias obtenidas a partir de ellos es un método prometedor, sencillo y respetuoso con el medio ambiente que ha comenzado a ser investigado en las últimas décadas (Dikshit *et al.*, 2021). Variando las condiciones de síntesis, se puede utilizar una misma cepa (es decir, el mismo organismo) para producir NPs con diferentes tamaños, formas, estabilidad en coloides y, por tanto, diferente actividad biológica. (Loshchinina *et al.*, 2022). Generalmente, su cultivo es sencillo debido a que los hongos poseen requerimientos nutricionales simples y son fáciles de manipular. También pueden soportar una gama más amplia de condiciones de crecimiento en comparación con otros microorganismos y plantas (Šebesta *et al.*, 2022). tales como la resistencia a la agitación, la presión del flujo y otras condiciones en cámaras y biorreactores (Jadoun *et al.*, 2022).

Todos los métodos biológicos de nanosíntesis se pueden dividir en dos tipos principales. En el primero, los cultivos vivos se utilizan directamente como “nanofábricas”, formando NPs in vivo y acumulándolas en sus células, en su superficie celular y/o en el medio. La desventaja de este método es la necesidad de separar las NPs obtenidas de las células del bio objeto; además, el proceso de biosíntesis por cultivos en crecimiento puede llevar mucho tiempo. El nivel del precursor también puede ser un factor limitante, porque las altas concentraciones de metales y otros compuestos utilizados para biosintetizar NPs inhiben los procesos de crecimiento. La otra opción para la síntesis biológica de NPs es el uso de diversas sustancias derivadas de bio objetos, como líquidos de cultivo, extractos intracelulares, fracciones de proteínas o metabolitos fúngicos individuales. El uso de tales técnicas facilita enormemente el proceso de nanosíntesis, ya que no es necesario destruir las células del organismo productor y separar las NPs de ellas (Loshchinina *et al.*, 2022) (**Fig. 9**).

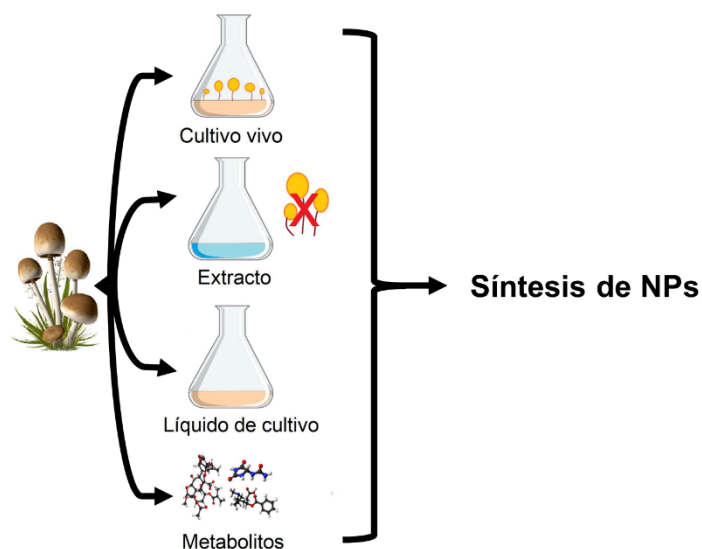


Figura 9. Distintos tipos de procedimientos en la síntesis biológica utilizando hongos.

Aunque los estudios publicados hasta la fecha muestran que muchas especies diferentes de hongos pueden producir biomoléculas necesarias para la formación de NPs metálicas, sería necesaria una optimización de estos procesos para lograr un escalamiento de producción comercial. (Šebesta *et al.*, 2022). Por lo tanto, la selección de especies, cepas y sus perfiles de síntesis puede ser de gran importancia para promover su uso en diferentes condiciones de producción, así como para el desarrollo de aplicaciones específicas. En esta sección de la tesis se propone estudiar y seleccionar organismos fúngicos como mediadores de la síntesis de AgNPs y AuNPs, estudiar y caracterizar las NPs obtenidas, y analizar el impacto del pH en la forma y tamaño de las mismas.

Durante este capítulo se llevarán a cabo las actividades relacionadas con los objetivos 1 a 6:

- 1- Seleccionar organismos de interés como mediadores de la síntesis de NPs metálicas.
- 2- Evaluar la capacidad de diferentes cepas fúngicas como mediadoras de la síntesis de AgNPs y AuNPs.
- 3- Evaluar la capacidad de cepas fúngicas psicrotolerantes como mediadoras de la síntesis de AgNPs.
- 4- Estudiar y caracterizar las NPs sintetizadas.
- 5- Analizar el impacto de la variabilidad intraespecífica (uso de diferentes cepas de la misma especie) en la síntesis de AgNPs.
- 6- Estudiar el impacto del pH en la forma y tamaño de las NPs obtenidas.

Los análisis llevados adelante serán presentados en 3 secciones correspondientes a una introducción y desarrollo experimental generales, y resultados, que se presentan en subsecciones correspondientes a las cuatro cepas seleccionadas para los ensayos. Finalmente, los resultados obtenidos se discutirán de forma integrada.

II.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

II.2.1. Microorganismos: selección y caracterización

II.2.1.1. Ensayos preliminares

A fin de seleccionar aquellos hongos que presentaban el mejor perfil para los ensayos de síntesis, basándonos en el rendimiento de producción de NPs para una metodología predeterminada (detallada luego en los ensayos de síntesis de AgNPs, ver sección II.2.2.), facilidad de manejo (filtrado simple, sin taponamiento de filtro, sin pigmentación del medio) y buen crecimiento (mayor biomasa), se realizaron ensayos preliminares sobre un grupo de 30 microorganismos.

Se analizaron hongos psicotolerantes, hongos solubilizadores de fósforo para agregar variedad al perfil de organismos estudiados, y adicionalmente se incluyó al hongo *Trametes trogii* (BAFCcult 463) de conocido perfil enzimático con gran producción de enzimas ligninolíticas (Levin & Forchiassin, 2001).

Las cepas seleccionadas para realizar los ensayos finales subsiguientes fueron:

- ❖ *Tulasnella albida* (BAFCcult 4710; 4711; 4712; 4713);
- ❖ *Cerinosterus luteoalbus* (BAFCcult 4705)
- ❖ *Talaromyces assiutensis*.
- ❖ *Trametes trogii* (BAFCcult 463)

II.2.1.2. Caracterización morfológica

Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en placas con agar malta (MEA) 2% con cloranfenicol (MEAc) e incubadas a 24°C en oscuridad. Se observaron características macromorfológicas de las colonias, coloración y textura del micelio, reverso de la caja, estructuras reproductivas, etc.; y estructuras micromorfológicas bajo lupa y microscopio óptico Olympus BX41, U-TV1-2, T7 (Tokio, Japón) con cámara Infinity1 anexa, registrándose fotográficamente estructuras sexuales y asexuales, esporas y toda estructura pertinente.

II.2.1.3. Caracterización molecular

Las cepas fueron incubadas en MEA 2% a 24 °C en cámara de cultivo por 2 semanas o hasta cubrir la caja. Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción Inbio HighWay Biología Molecular ADN PuriPrep-T (Tandil, Argentina) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se amplificó la región ITS (White *et al.*, 1990) por PCR. Las condiciones utilizadas para la PCR realizada para los basidiomicetes fueron las siguientes:

Master mix (Vf = 50 µl)	
Taq polimerasa (5 U/µL)	0,5 µl
ITS1 (primer forward) (10 µM)	1 µl
ITS4 (primer reverse) (10 µM)	1 µl
DNTPs (1 mM)	1 µl
Buffer (10 X)	5 µl
MgCl₂ (25 mM)	1,8 µl
H₂O miliq	34,7 µl
ADN	5 µl

Tabla 3. Proporciones utilizadas para generar la *master mix* utilizada en la PCR

Ciclos de amplificación por PCR (45 ciclos, tiempo total 2:30 hs)		
	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3 min
Desnaturalización	94	45 s
Annealing	55	45 s
Elongación	72	1 min
Extensión final	72	7 min
Preservación de muestras	4	∞

Tabla 4. Ciclos de amplificación por PCR realizados.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron enviados para su secuenciación a Macrogen (Corea). Como primer paso, las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a través del BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) para la búsqueda de secuencias altamente similares para posteriores estudios filogenéticos. Se detallan en Tablas ubicadas en el Anexo las secuencias del GenBank, que fueron comparadas con las secuencias obtenidas en este trabajo (**Tabla 1'** y **Tabla 2', Anexo**). Los nombres de las especies a las que pertenecen las secuencias de referencia se mantuvieron tal como aparecen en el GenBank.

Las secuencias de ADN fueron editadas y manipuladas a través del programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), utilizando Clustal para alinear (bootstrap=1000; gap penalties: pairwise alignments y multiple alignment con valores de gap opening=10 y gap extension=2). Las hipótesis filogenéticas fueron construidas bajo el método de máxima parsimonia y de máxima verosimilitud por medio del programa MEGA 10.2.6 (Kumar *et al.*, 2016). Tanto para máxima parsimonia como para máxima verosimilitud se utilizó un valor de bootstrap de 1000.

II.2.1.4. Caracterización fisiológica

Para cada cepa seleccionada se realizó la curva de crecimiento, se evaluó el contenido de proteínas y azúcares reductores del sobrenadante fúngico utilizado para la síntesis de NPs y se analizó cualitativamente el perfil enzimático.

Curva de crecimiento

La realización de las curvas de crecimiento se llevó a cabo utilizando erlenmeyers de 100 mL conteniendo 50 mL de un medio de crecimiento esterilizado compuesto por: 10 g.L⁻¹ de glucosa, 5 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extracto de malta y 3 g.L⁻¹ de extracto de levadura (MGYP). Cada erlenmeyer fue inoculado con dos inóculos (pequeños cubos de agar con micelio en activo crecimiento) de 5 mm de la cepa correspondiente e incubado a 28°C y 200 rpm, en la oscuridad, durante 10 días. Cada dos días, el micelio fue cosechado, filtrado a través de un embudo Büchner y luego secado entre 30 a 60 °C, hasta alcanzar un peso constante. Por cada cepa se realizaron tres réplicas.

El medio de cultivo mencionado, así como las condiciones de incubación han sido utilizados para el crecimiento de los hongos en el resto de los experimentos que se desarrollan en la tesis.

Análisis de proteínas totales y azúcares reductores

Se analizó el filtrado fúngico para detectar proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976) con albúmina de suero bovino como patrón, y azúcares reductores por el procedimiento de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944) con glucosa como patrón.

Perfil enzimático

Sobre la base de los grupos a los que pertenecían las cepas seleccionadas se analizaron los perfiles enzimáticos. Se utilizó un método cualitativo analizando reacciones en medios de agar enriquecidos, registrándose un cambio de coloración en los mismos. La intensidad relativa de la reacción se registró una semana después de incubación en oscuridad a 24 °C (+/-; nivel de decoloración/sin decoloración). Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Se analizaron los siguientes medios enriquecidos:

- *Agar con ácido gálico*: detección de oxidasas (Stalpers, 1978)
- *Agar con ácido tánico*: detección de oxidasas (Stalpers, 1978)
- *Medio con tirosina*: detección de tirosinasas (Stalpers, 1978)
- *Extracto de agar malta suplementado con Azure B (50μM)*: detección de lignina peroxidasa (LiP) (Levin *et al.*, 2005)
- *Extracto de agar malta suplementado con Verde de malaquita (50μM)*: detección de lacasas y manganeso peroxidasa (Levin *et al.*, 2005)
- *NBRIP*: detección de solubilización de fósforo (Nautiyal, 1999)

II.2.2. Biosíntesis de nanopartículas de plata

Para llevar adelante la biosíntesis, la biomasa fúngica se obtuvo en las mismas condiciones que para la curva de crecimiento (ver II.2.1.2.). En este caso la incubación se realizó durante 7 días. El micelio obtenido fue filtrado, lavado con agua estéril y vuelto a incubar a 28 °C y 200 rpm en 50 ml de agua destilada estéril durante 3 días. Luego, el micelio fue filtrado

nuevamente, desechando la biomasa, reservando el líquido filtrado (filtrado fúngico) para su uso en los ensayos posteriores.

Para la biosíntesis de AgNPs, se utilizó el filtrado fúngico. Se llevaron a cabo ensayos a pH 5 y pH 9. Se usó NaOH 1 M y HCl 1N para ajustar el pH. Se añadió AgNO₃ 100 mM al filtrado para obtener una concentración final de 0,5 mM. El filtrado fúngico con el precursor se incubó durante 7 días a 28°C y 200 rpm. Se estableció como tratamiento control el filtrado fúngico sin el agregado del precursor. Para todos los tratamientos se realizaron cinco réplicas. La **Figura 10** esquematiza de manera general el procedimiento para la síntesis de AgNPs.

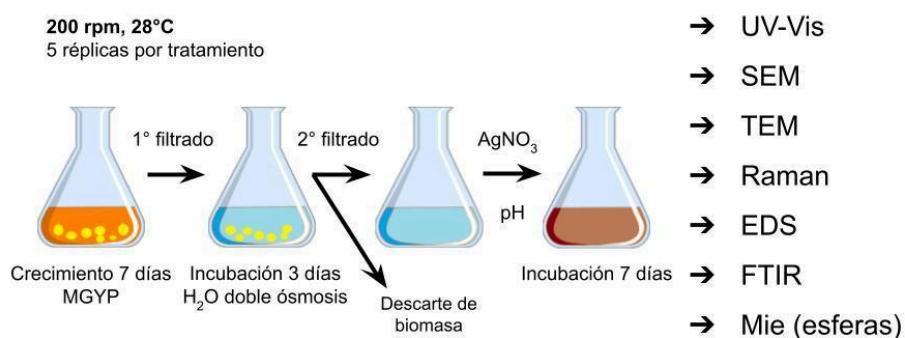


Figura 10. Esquema general de la síntesis de AgNPs, técnicas y modelo utilizados para la caracterización.

Para evaluar la biosíntesis de AgNPs, se extrajo una alícuota de 1 ml de cada frasco y se obtuvieron sus espectros UV-visibles utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU UV 1800 (Tokio, Japón), escaneando los espectros de extinción en un rango de longitud de onda de 200 - 800 nm a los días 1, 2, 3 y 7. Para la *T. albida* (BAFCcult 4711) se analizó adicionalmente la síntesis durante las 12 primeras horas, tomándose mediciones cada 3 horas.

La síntesis de AgNPs fue detectada por la presencia de la resonancia de plasmón superficial (RPS). El pico RPS de AgNPs esféricas se observa convencionalmente a 400 nm, cambiando de posición a longitudes de onda más altas a medida que aumenta el radio de las partículas (Pyatenko *et al.*, 2007).

Con el fin de separar las NPs de mayor tamaño de las de menor radio, las NPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 20 minutos, luego de lo cual se analizó el espectro de extinción del sobrenadante (que contiene NPs de menor tamaño). Posteriormente se volvió a centrifugar el sobrenadante y se registró un nuevo espectro de extinción. Esta cepa fue seleccionada debido a que mostró un mejor rendimiento (mayor altura del plasmón) comparada con el resto de las cepas estudiadas.

Adicionalmente se analizó la síntesis bajo las mismas condiciones, pero con una concentración mayor de AgNO₃ (5 mM) utilizando la cepa *T. albida* (BAFCcult 4711), y se estudió la síntesis de AgNPs con una temperatura de 6 °C (0,5 mM). Se realizaron mediciones de espectros de extinción en el espectrofotómetro los días 1, 2, 3 y 7.

II.2.3. Biosíntesis de nanopartículas de oro

Para llevar adelante la biosíntesis, la biomasa fúngica se obtuvo en las mismas condiciones que para la curva de crecimiento (ver II.2.1.4.), pero la incubación se realizó durante 7 días. Luego, el micelio obtenido fue filtrado, lavado con agua estéril y vuelto a incubar a 28 °C y 200 rpm en 50 ml de agua destilada estéril durante 3 días. Luego, el micelio se filtró nuevamente, desechando la biomasa, reservando el líquido filtrado (filtrado fúngico). Se utilizaron las mismas cepas fúngicas que para la síntesis de AgNPs pero en el caso de *T. albida* sólo se utilizó la cepa BAFCCult 4711.

Para la biosíntesis de AuNPs, se utilizó el filtrado fúngico a pH 5, pH 9 y pH 11. Se usó NaOH 1 M y HCl 1N para ajustar el pH. Se añadió HAuCl₄ 100 mM al filtrado de hongos para obtener una concentración final de 0,5 mM. El filtrado fúngico con el precursor se incubó durante 7 días a 28°C y 200 rpm. Se estableció como control el filtrado fúngico sin el agregado del precursor. Para todos los tratamientos se realizaron cinco réplicas. La **Figura 11** esquematiza de manera general el procedimiento para la síntesis de AuNPs.

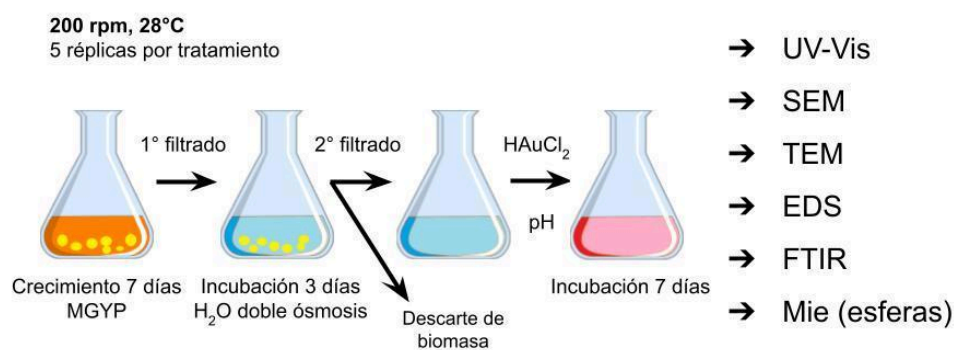


Figura 11. Esquema general de la síntesis de AuNPs, técnicas y modelo utilizados para la caracterización.

Para detectar la biosíntesis de AuNPs, se extrajo una alícuota de 1 ml de cada frasco y se obtuvieron sus espectros UV-visibles utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800 (Tokio, Japón) escaneando los espectros de extinción en un rango de longitud de onda de 200 - 800 nm a los días 1, 2, 3 y 7. La síntesis de AuNPs fue detectada por la presencia de la Resonancia de Plasmón Superficial (RPS). El pico RPS de AuNPs esféricas se observa típicamente alrededor de 520 nm, observándose un ensanchamiento y desplazamiento hacia el rojo del RPS asociado con el aumento del tamaño de las AuNPs (Amendola *et al.*, 2017). La misma medición se realizó luego de dos años para analizar la evolución de la síntesis.

II.2.4. Caracterización de las Nanopartículas

Para caracterizar las NPs sintetizadas con las diferentes cepas, se utilizaron técnicas adecuadas y complementarias para analizar morfología (SEM y TEM), composición elemental (TEM, EDS), distribución de tamaño de NPs con característica plasmónica y estructura simple o núcleo-coraza (Espectroscopía de extinción) y grupos funcionales intervinientes (Raman, ATR-FTIR).

Los equipos utilizados para estas diferentes técnicas son los siguientes:

- ❖ ***Espectroscopía de extinción (OES)***: espectrofotómetro Shimadzu UV 1800 (Tokio, Japón); Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Begum *et al.* (2018).
- ❖ ***Microscopía electrónica de barrido (SEM)***: modelo Zeiss SUPRA TM 40 (Oberkochen, Alemania) en el modo de electrones secundarios; Centro de Microscopías Avanzadas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Vladár & Hodoroaba (2020)
- ❖ ***Microscopía electrónica de transmisión (TEM)***: FEI-Talos F200X Microscopio electrónico de transmisión de exploración G2 FEG en modo STEM combinado con un detector de campo oscuro anular de ángulo alto (HAADF); YPF TECNOLOGÍA (Y-TEC). Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Inkson (2016)
- ❖ ***Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS)***: FEI-Talos F200X; YPF TECNOLOGÍA (Y-TEC), Berisso. Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Hodoroaba (2020)
- ❖ ***Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier - Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)***: Thermo Scientific Nicolet iS50, en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} , sobre las NPs liofilizadas; Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica (UMYMFOR), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Khan *et al.* (2018)
- ❖ ***Micro Raman***: Microscopio confocal HORIBA ExPlora Plus Raman, trabajando con una longitud de onda de excitación de 785 nm ; Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp), La Plata. Las muestras fueron preparadas según la descripción del artículo de Nguyen *et al.* (2012)

Exceptuando la caracterización mediante el espectro de extinción, el resto de las caracterizaciones se realizaron sobre las NPs sintetizadas a 28 °C. En el caso de las AgNPs de *T. albida* sólo se caracterizaron las AgNPs producidas con la cepa BAFCcult 4711, concentración 0,5 mM. La técnica de Micro Raman sólo fue utilizada para caracterizar las AgNPs sintetizadas con *T. albida* BAFCcult 4711.

II.2.5. Modelado

Los espectros de extinción óptica de las muestras coloidales obtenidas que mostraron RPS se modelaron utilizando la teoría de Mie para NPs esféricas pequeñas (Schinca & Scaffardi, 2008). La forma y el máximo del RPS fueron simuladas para ajustar los espectros experimentales utilizando el software MiePlot v. 4.6 (disponible en www.philiplaven.com), determinando el radio modal y la distribución de tamaños. Como medio circundante se seleccionó agua (IAPWS 20°C). Se utilizó una distribución log-normal, variando el radio modal (el dominante o más frecuente) para NPs de plata o de oro según el caso, y el

porcentaje de desviación estándar. Se determinó teóricamente la distribución y el tamaño modal de las partículas de la solución al representar gráficamente el espectro de extinción en función de la longitud de onda. El rango de longitud de onda se seleccionó de 200 nm a 800 nm. El gráfico correspondiente obtenido con estos parámetros se comparó con la curva obtenida con los datos experimentales hasta lograr el mejor ajuste de curva posible.

En el caso de AgNPs esféricas, los átomos de oxígeno presentes en el medio acuoso circundante tienen la probabilidad de unirse a los átomos de Ag^0 en la superficie de las NPs para formar una delgada capa de Ag_2O , produciendo una estructura final del tipo núcleo-coraza (en inglés “*core-shell*”) $\text{Ag-Ag}_2\text{O}$, cuyo efecto más notable es producir el corrimiento del pico del plasmón. Existe también una capa biológica que rodea esta nanoestructura, pero, desde un punto de vista óptico, tiene un valor de índice de refracción muy similar al del agua y no contribuye a los corrimientos del pico de plasmón con respecto al agua pura. Teniendo en cuenta estos hechos, se utilizó la aproximación de Rayleigh para NPs pequeñas para determinar la polarizabilidad de una partícula de $\text{Ag-Ag}_2\text{O}$ de núcleo-coraza con radio interior r_1 , función dieléctrica del núcleo ϵ_1 , radio exterior r_2 , función dieléctrica de la coraza ϵ_2 y función dieléctrica del medio circundante ϵ_m :

$$\alpha = 4\pi r_2^3 \frac{(\epsilon_2 - \epsilon_m)(\epsilon_1 + 2\epsilon_2) + f(\epsilon_1 - \epsilon_2)(\epsilon_m + 2\epsilon_2)}{(\epsilon_2 + 2\epsilon_m)(\epsilon_1 + 2\epsilon_2) + f(2\epsilon_2 - 2\epsilon_m)(\epsilon_1 - \epsilon_2)}$$

donde $f = \left(\frac{r_1}{r_2}\right)^3$. La función dieléctrica metálica se obtuvo de Johnson & Christy (1972) mientras que la función dieléctrica de la coraza se tomó de Qiu *et al.* (2005).

II.3. RESULTADOS

II.3.1. *Tulasnella albida*

Caracterización morfológica

Tulasnella albida, Bourdot & Galzin. Hyménomycètes de France: 59 (1928)

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Subclase: *Incertae sedis*

Orden: Cantharellales

Familia: Tulasnellaceae

Aspecto de la colonia: micelio hialino con aspecto algodonoso color blanco, adherido al agar hacia los bordes. El reverso es blanco.

Caracteres microscópicos: micelio septado, fibulado, con presencia de gúttulas. La observación se realizó hasta el día 30 y en todo este tiempo no produjo estructuras reproductivas en el cultivo (MEAc).

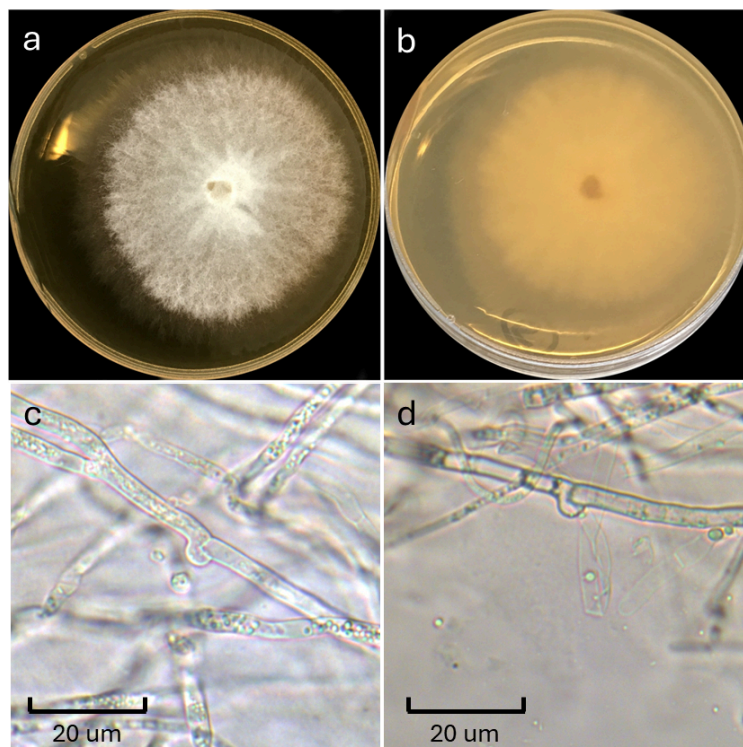


Figura 12. *Tulasnella albida*. **(a)** Aspecto superficial de la colonia luego de dos semanas de crecimiento. **(b)** Reverso de la colonia. **(c)** y **(d)** Micelio tabicado con fibulas.

Caracterización molecular

Con el objetivo de caracterizar y corroborar la identificación taxonómica, la cepa BAFCCult 4711 se secuenció y se comparó con un total de 29 secuencias (**Tabla 1'**, **Anexo**). Se realizaron análisis de máxima verosimilitud y máxima parsimonia (MP). El árbol de máxima verosimilitud fue construido bajo el modelo de Kimura 2 parámetros (K2) + Distribución Gamma (G). El análisis de MP dio como resultado 3 árboles filogenéticos de máxima parsimonia. Los resultados obtenidos del análisis filogenético indican que la cepa correspondería al género *Tulasnella*, estando fuertemente asociada a las secuencias asignadas a la especie *Tulasnella albida*. Las **Figuras 13 y 14** muestran el árbol de máxima verosimilitud y el árbol consenso Bootstrap de máxima parsimonia respectivamente.

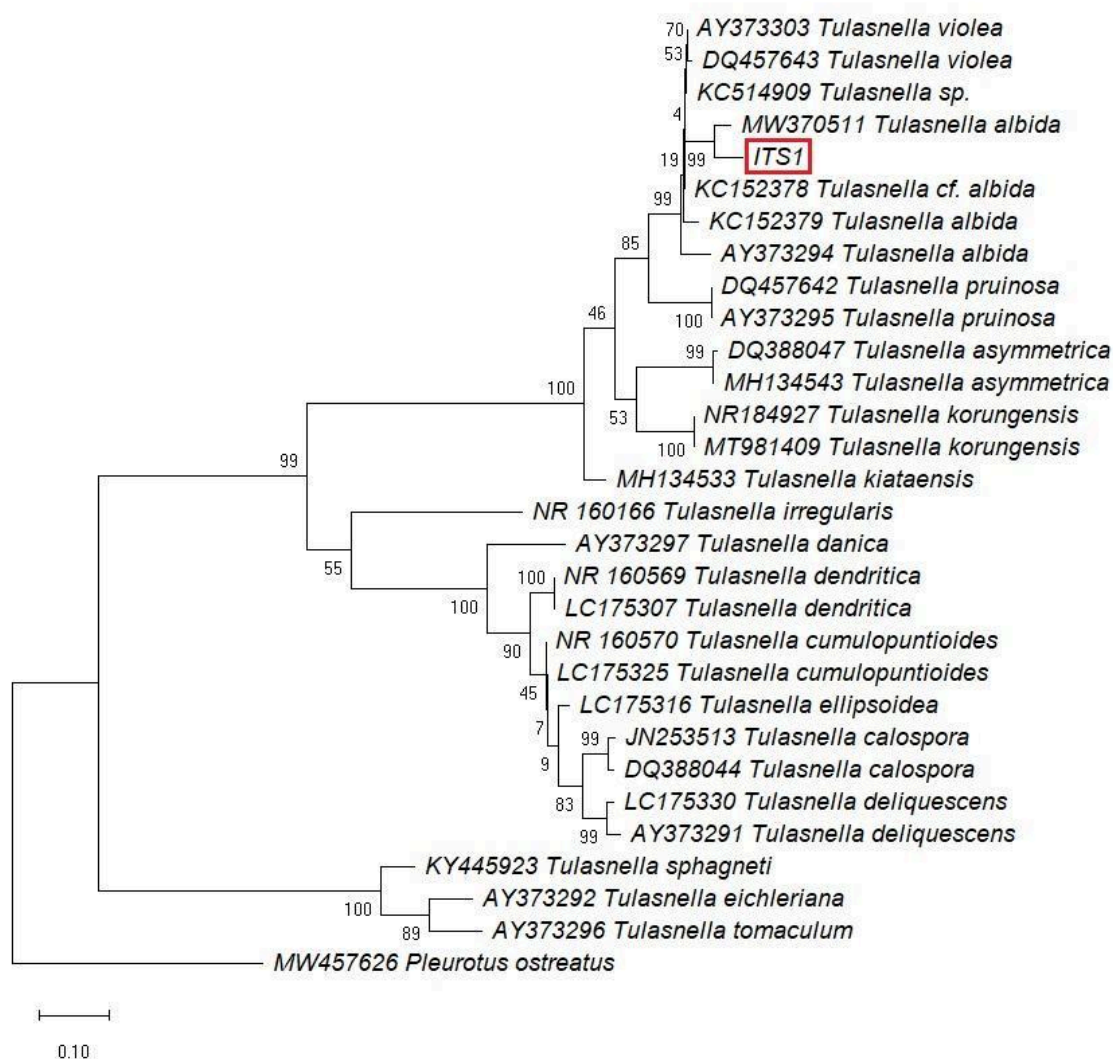


Figura 13, Árbol de máxima verosimilitud. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala y las longitudes de las ramas se miden en función del número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 30 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 726 posiciones en el conjunto de datos final. La cepa estudiada se encuentra remarcada con un cuadro rojo.

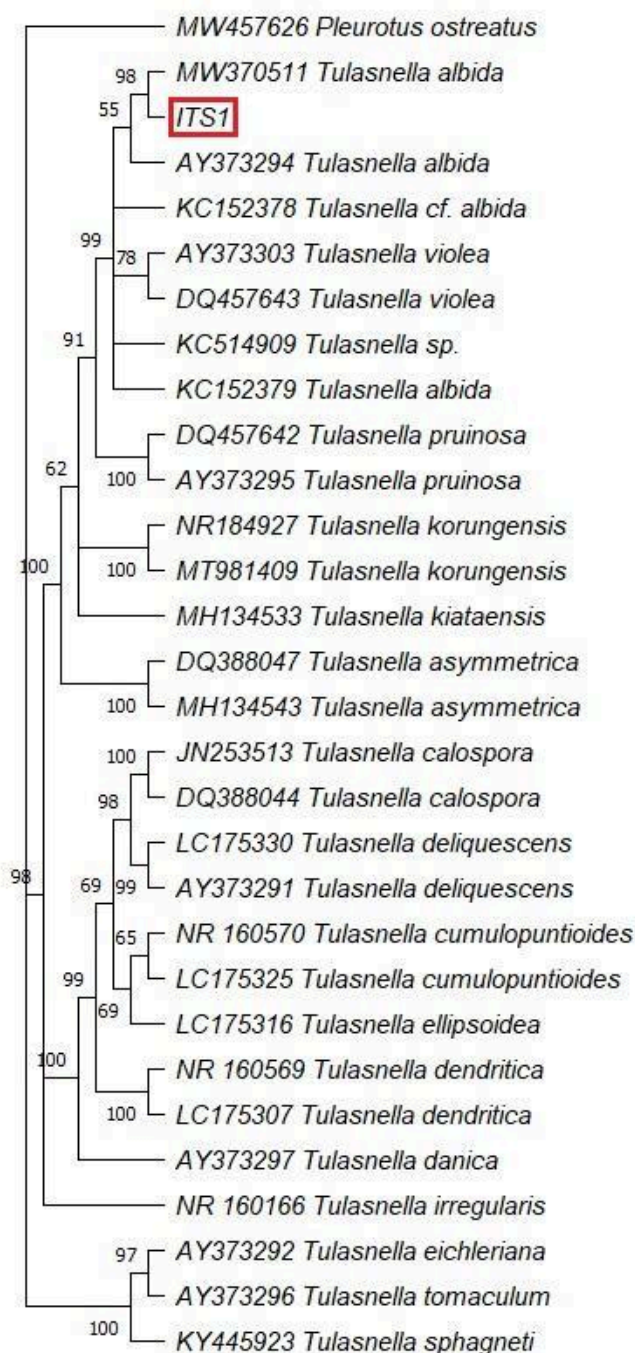


Figura 14. Árbol de Máxima Parsimonia. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas. Este análisis involucró 30 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 726 posiciones en el conjunto de datos final. La cepa estudiada se encuentra remarcada con un cuadro rojo.

Caracterización fisiológica

A continuación, se describen los resultados obtenidos para la curva de crecimiento, análisis de proteínas y azúcares reductores y perfil enzimático.

Curva de crecimiento: La **Figura 15** muestra las curvas de crecimiento para las 4 cepas de *T. albida*, utilizadas luego para la síntesis de NPs, bajo las condiciones ensayadas detalladas en materiales y métodos.

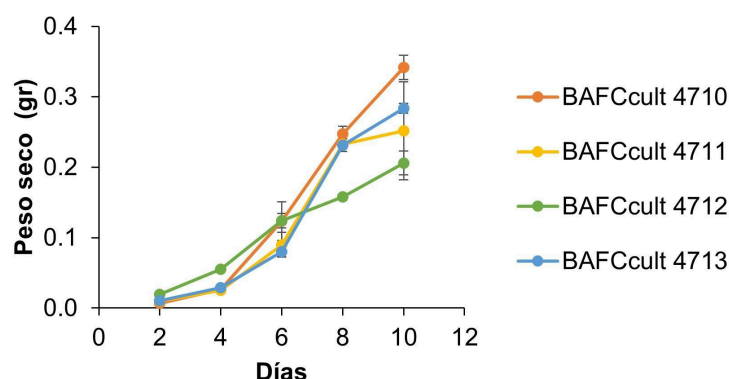


Figura 15: Curvas de crecimiento correspondientes a las cuatro cepas de *T. albida*, utilizadas para la síntesis de NPs.

Análisis de proteínas totales y azúcares reductores: Los análisis realizados mediante la metodología de Bradford para la cuantificación de proteínas y de Somogyi-Nelson para la cuantificación de azúcares reductores dieron valores cercanos a cero en todas las cepas y réplicas ensayadas.

Perfil enzimático: Dado el perfil ligninolítico de *T. albida*, se analizaron los sustratos con ácido tánico, ácido gálico, tirosina, verde de malaquita y azure B. Las cuatro cepas resultaron positivas (+) para la decoloración de verde de malaquita, y sólo la BAFCcult 4711 resultó positiva (+++) para la detección de tirosinasa. El resto de las reacciones dieron resultado negativo (-).

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (*Tulasnella albida*)

La **Figura 16(a)** muestra los espectros de extinción obtenidos para la síntesis de AgNPs con las cepas de *T. albida* a pH 9 y 28°C, con una concentración 0,5 mM. Es claramente visible la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 425 nm aproximadamente. La **Figura 16(b)** muestra la evolución del pico máximo de extinción en función del tiempo (en días) para las cepas analizadas como así también el ajuste de los datos, en cada caso, con una función exponencial creciente con asíntota de la forma:

$$y(t) = A(1 - e^{\frac{-t}{t_0}})$$

donde A es el valor asintótico máximo (en este caso representa el máximo valor del pico del plasmón) y t_0 el tiempo característico que indica la mayor o menor rapidez de la síntesis para alcanzar el valor asintótico A , según tenga un valor pequeño o grande, respectivamente.

En todos los casos se realizó una dilución 1:4, resultando en una concentración final de 0,125 mM. Se observa que, aunque todas las cepas presentan un comportamiento similar de síntesis, la cepa BAFCCult 4711 presenta un tiempo característico t_0 menor (0,36 días) comparado con las otras y un valor asintótico A mayor que el resto de las cepas (0,76), por lo que esta cepa presentaría una mayor velocidad de síntesis para alcanzar el valor de saturación. A pH 5 no se observaron resultados de síntesis.

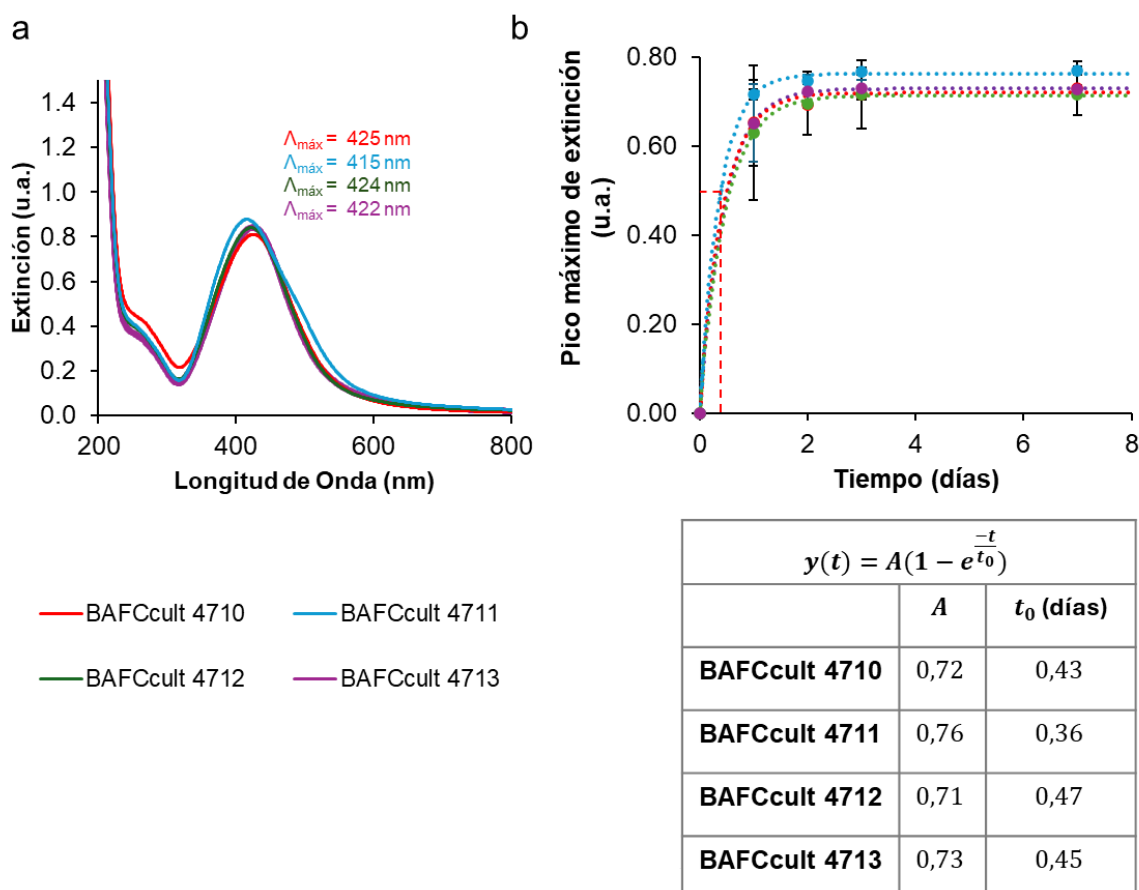


Figura 16. Espectroscopía de las AgNPs sintetizadas con las cepas de *T. albida* a pH 9. **(a)** Espectros de extinción de las AgNPs sintetizadas con las cuatro cepas de *T. albida* al día 7, dilución 1:4. **(b)** Picos máximos de extinción vs tiempo en días y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. A la derecha se detalla la ecuación utilizada para el ajuste y los valores de A y t_0 obtenidos para cada cepa.

Debido a que al finalizar el primer día de síntesis de AgNPs, la misma se encontraba muy avanzada, se realizó una experiencia con mayor frecuencia de muestreo para obtener valores intermedios de la variable que representa el pico de plasmón. La **Figura 17(a)** muestra los espectros de extinción obtenidos por la cepa BAFCCult 4711 de *T. albida* durante las primeras 12 horas con una concentración 0,5 mM, observándose el crecimiento de un plasmón centrado en alrededor de 415 nm. En este caso no se realizó ninguna dilución para la toma de mediciones. La **Figura 17(b)** muestra la intensidad del pico máximo de extinción registrado en función del tiempo, incluyendo el análisis de las primeras horas y de los días 1, 2, 3 y 7 (sin dilución), así como una nueva línea de tendencia que muestra que la síntesis tiene un comportamiento exponencial con saturación llegando al valor $A = 3,16$ luego de aproximadamente 50 hs (2,08 días) desde el comienzo de la síntesis, y un tiempo característico $t_0 = 17,1$ hs (0,7 días).

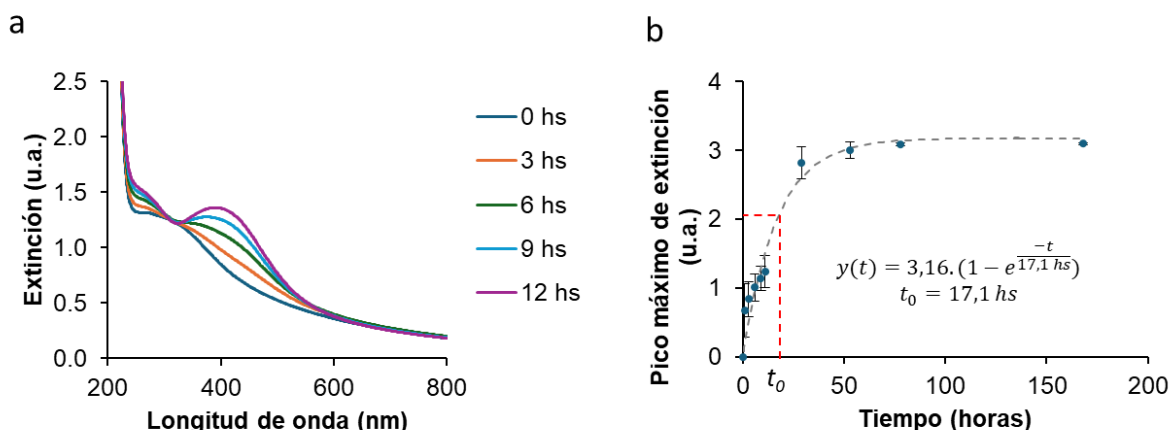


Figura 17. Espectroscopía de las AgNPs sintetizadas con la cepa de *T. albida* (BAFCcult 4711). **(a)** Espectros de extinción de la síntesis de AgNPs cada 3 hs. **(b)** Intensidad del pico de Extinción registrado en función del tiempo durante las primeras 12 horas de síntesis y del día 1 al 7 y línea de tendencia que muestra que la síntesis tiene un comportamiento exponencial llegando a la saturación en 3,16 y un valor de tiempo característico de 17,1 hs (0,7 días).

La **Figura 18** muestra los espectros de extinción de las AgNPs originales (las obtenidas luego de 7 días) y del sobrenadante de las mismas luego de ser centrifugadas una y dos veces. Se observa que la banda de plasmón disminuye en intensidad luego del primer centrifugado, pero que luego del segundo se mantiene casi constante, siendo suficiente un solo centrifugado para descartar las NPs de mayor tamaño. Esto indicaría que las distintas etapas de centrifugado permitirían llegar a una densidad de NPs constante. Por otro lado, con el fin de analizar la posible existencia de clusters de Ag de pocos átomos (que poseen fluorescencia en la región entre 300 y 380 nm), se sometió al sobrenadante de la última centrifugación a la medición del espectro de fluorescencia con excitación en 220 nm, no detectándose ninguna señal característica. Esto sugiere que la síntesis de NPs en este caso se completa en la dirección bottom-up sin dejar rastros detectables de clusters de pocos átomos.

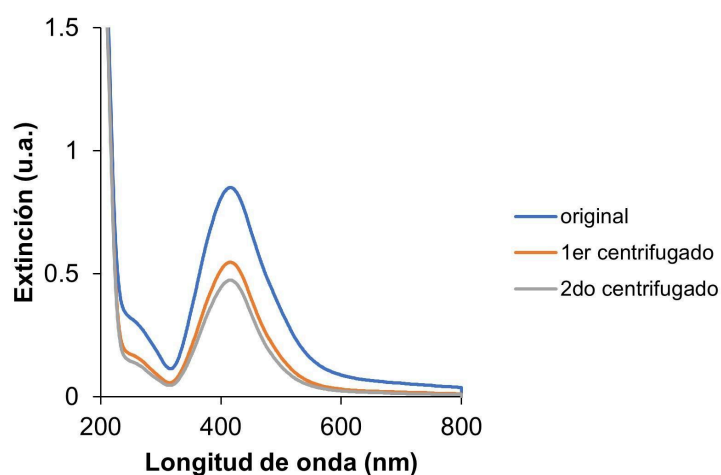


Figura 18. Espectros de extinción de la síntesis de AgNPs original y centrifugadas.

La **Figura 19** muestra el espectro de extinción obtenido para la síntesis de AgNPs utilizando la cepa BAFCcult 4711 a 28°C con una concentración de 5 mM, con la presencia de un plasmón centrado en 439 nm. En este caso se realizó una dilución 1:8 (concentración final 0,625 mM) para poder realizar la lectura en espectrofotómetro de manera confiable. El coloide obtenido fue de una coloración más oscura debido a la mayor presencia de AgNPs respecto a la síntesis con una concentración de 0,5 mM y un corrimiento del pico de 415 nm a 439 nm. Dado la alta dilución necesaria para las lecturas en el espectrofotómetro y a que se observa un corrimiento del pico del plasmón con la concentración de 5 mM, se decidió continuar los experimentos con la concentración 0,5 mM.

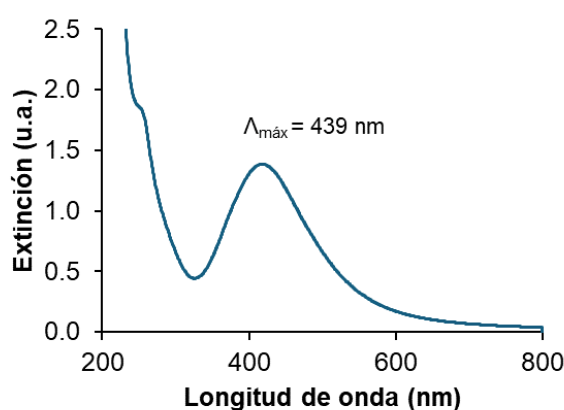


Figura 19: Espectro de extinción de las AgNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* BAFCcult 4711, concentración de AgNO₃ 5mM. Dilución 1:8.

La **Figura 20** muestra el espectro de extinción de la síntesis de AgNPs realizada a 6 °C (0,5 mM) con la cepa BAFCcult 4711, obteniéndose un coloide de color más claro que la síntesis a 28 °C. Se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 429 nm. La intensidad del pico del plasmón obtenido a baja temperatura evidencia menor intensidad que el obtenido a 28 °C, probablemente debido a una síntesis más lenta a causa de la baja temperatura.

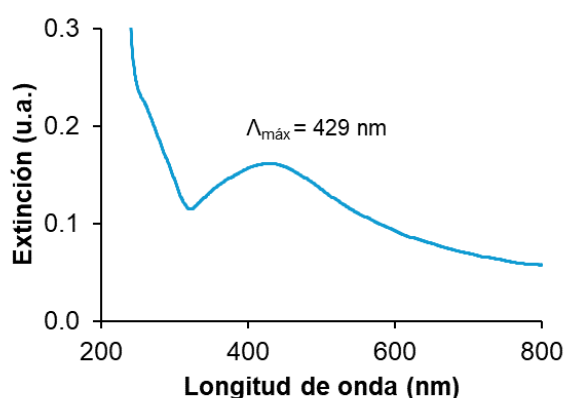


Figura 20. Espectro de extinción de las AgNPs sintetizadas a 6°C con la cepa BAFCcult 4711.

La **Figura 21** muestra las imágenes obtenidas mediante SEM de las AgNPs obtenidas con la cepa BAFCcult 4711. Se observan nanopartículas esféricas reunidas en cúmulos y aisladas.

En la **Figura 21(a)** se observan cúmulos de AgNPs debido a una consecuencia del proceso de secado sobre la grilla para su posterior observación. En la **Figura 21(b)** se muestra en una escala de 20 nm, AgNPs aisladas de aproximadamente 20 nm de diámetro con formas aproximadamente esféricas.

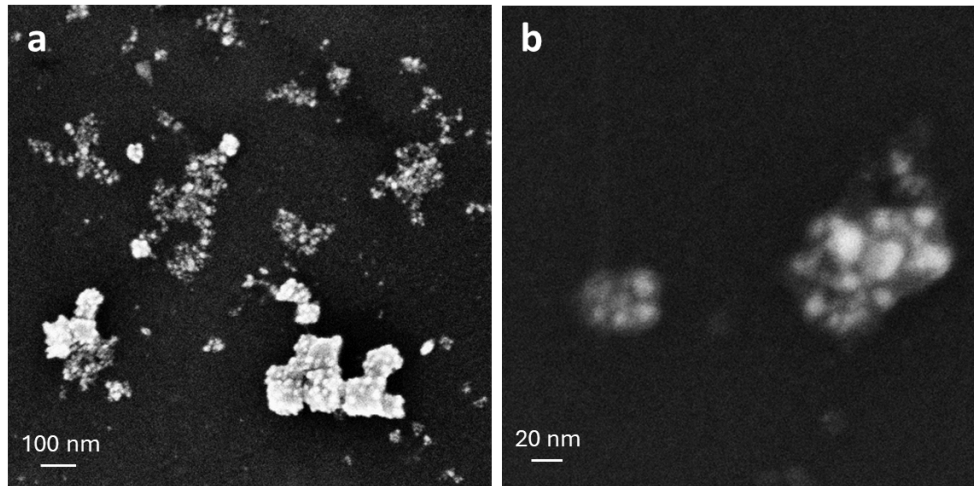


Figura 21. Imágenes SEM de las AgNPs sintetizadas con el hongo *T. albida* BAFCCult 4711. **(a)** Imagen panorámica. **(b)** Detalle de las AgNPs.

La **Figura 22(a)** muestra una vista panorámica TEM en campo oscuro de las AgNPs sintetizadas, donde se observan NPs aisladas y algunos aglomerados producidos por el proceso de secado. La **Figura 22(b)** muestra un primer plano en escala de 20 nm donde se observan NPs esféricas aisladas. En algunas de las NPs se observa un centro más brillante rodeado por un área más clara. La **Figura 22(c)** es una imagen de alta resolución de NPs típicas de núcleo-coraza, donde las líneas discontinuas curvas indican los límites entre el núcleo y su coraza. El histograma de tamaño correspondiente a la **Figura 22(b)** muestra una distribución de tamaño con un máximo de aproximadamente 2-3 nm de diámetro (**Fig. 22(d)**).

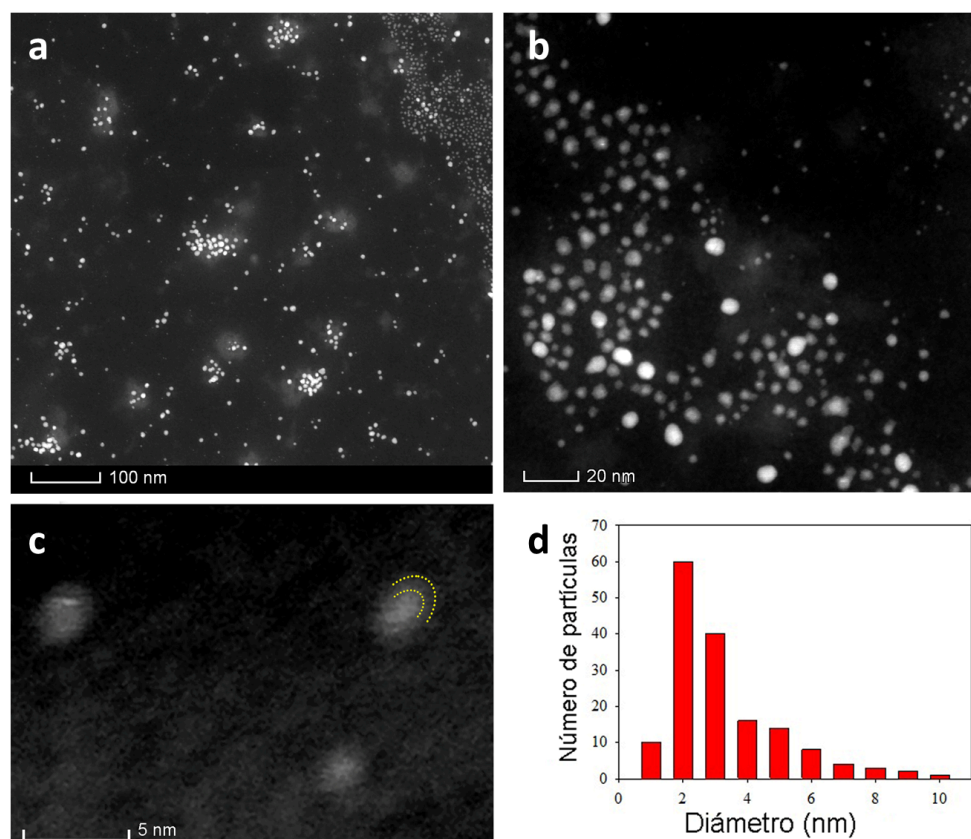


Figura 22. Imágenes TEM de las AgNPs sintetizadas con el hongo *T. albida* BAFCCult 4711. **(a)** Imagen panorámica en escala de 100 nm. **(b)** Detalle de un cúmulo de AgNPs en escala de 20 nm donde se observa que la forma de las mismas es aproximadamente esférica. **(c)** Detalle de las NPs donde se observan estructuras núcleo-coraza. **(d)** Histograma del tamaño de las AgNPs realizado por el equipo en base a la imagen (b).

Adicionalmente se realizó un histograma de distribución de tamaños de manera manual utilizando el programa ImageJ versión 1.53k (**Fig. 23**). A diferencia del histograma obtenido mediante el TEM, la distribución se observa un poco corrida hacia tamaños más grandes con un pico en 5 nm de diámetro. La diferencia puede deberse a que las NPs que presentan estructuras núcleo-coraza producen cierta indefinición en los bordes de las mismas, alterando los registros en los radios. La información obtenida a través de los dos histogramas, dan cuenta de los tamaños registrados en la **Figura 22(b)** donde se observan NPs con diámetros

menores o iguales que 10 nm, como así también en la **Figura 22(c)** donde se observan NPs cuyos diámetros son inferiores a 5 nm.

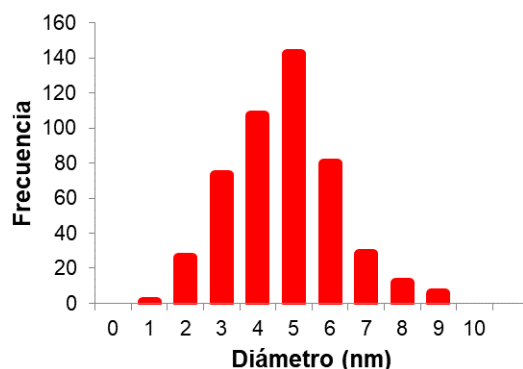


Figura 23. Histograma realizado manualmente en base a la imagen (b) de la Figura 22.

Los resultados que se muestran en la **Figura 24** corresponden al análisis de composición elemental de una imagen HAADF de AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711). La **Figura 24(a)** muestra AgNPs coloidales aisladas, rodeadas por una nube blanquecina. La **Figura 24(b)** revela la presencia de átomos de Ag en puntos de color verde. Se puede observar que se concentran en las NPs y su entorno cercano (capping). También se observan señales similares en el fondo de la imagen, indicando la presencia de pequeñas cantidades de plata. También se analizó la presencia de átomos de oxígeno en la misma área de estudio. La **Figura 24(c)** muestra la presencia de oxígeno en puntos de color rojo, observándose una clara concentración en las NPs y en el capping. La **Figura 24(d)** muestra los elementos plata y oxígeno superpuestos. La **Figura 24(e)** muestra el espectro EDS para un área seleccionada en las NPs de la **Figura 24(a)**. Se observan claramente los tres máximos correspondientes a Ag, así como la presencia de oxígeno. Los picos de Cu, C y Si corresponden a la interacción del haz de electrones con la grilla, compuesta de estos elementos. Un espectro similar para una región alejada de las NPs y con la idea de analizar el fondo de la imagen se ve en la **Figura 24(f)**, donde los picos de Ag prácticamente desaparecieron o presentan una intensidad insignificante. El pico O que aparece en ambas figuras puede corresponder a la oxidación de metales. Pequeñas cantidades de oxígeno y carbono podrían atribuirse a la capa orgánica que forma la cubierta de las AgNPs sintetizadas.

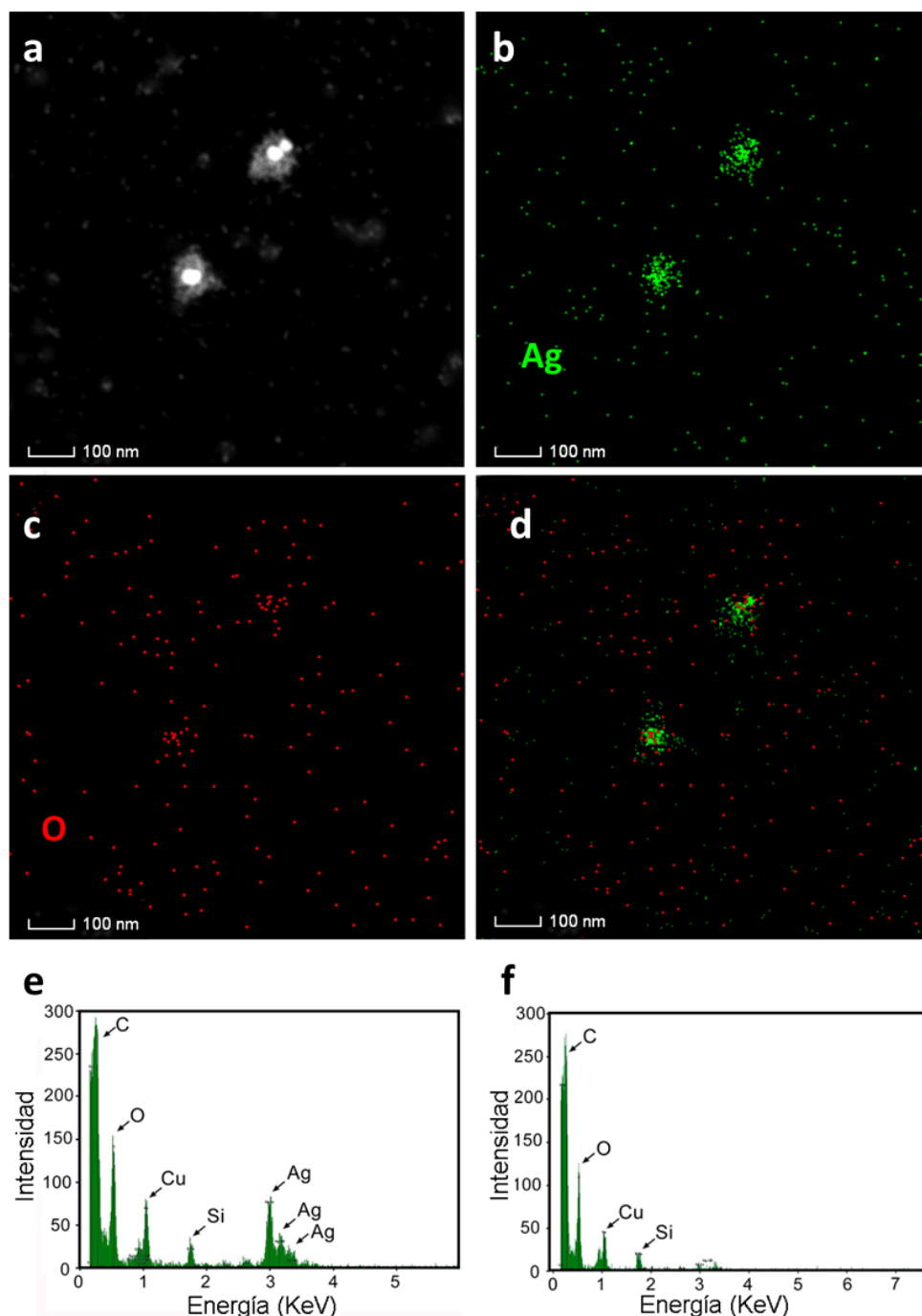


Figura 24. Análisis de composición elemental de las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711). **(a)** Imágenes de campo oscuro STEM (HAADF) de AgNPs. **(b)** Mapeo de la imagen HAADF de (a) para el elemento Ag. **(c)** Mapeo de la imagen HAADF de la Figura 24(a) para el elemento O. **(d)** Mapeo superpuesto de Ag y O. **(e)** Composición elemental EDS para el área seleccionada sobre una NP de (a) mostrando la presencia de Ag y O. **(f)** Composición elemental de EDS para una región del fondo de la grilla (alejada del área seleccionada de la Figura 24(a)).

La espectroscopía Micro Raman reveló la presencia de Ag_2O a través de varias líneas de corrimiento Raman. La **Figura 25** muestra los espectros Raman de una gota de muestra seca de AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711), colocada sobre un cubreobjetos. Las señales Raman indicadas por flechas en 240 , 490 y 565 cm^{-1} generalmente se asignan a

vibraciones de estiramiento de Ag_2O a granel (Martina *et al.* 2012). Algunos autores atribuyen las bandas alrededor de 1070 cm^{-1} a moléculas de oxígeno quimisorbidas en la superficie de las NPs (Wang *et al.*, 1999; Socrates, 2004), aunque existe un consenso general en asignarlas a modos vibratorios de Ag_2O (Martina *et al.* 2012). Estos resultados apoyan la conformación de una estructura núcleo-coraza Ag- Ag_2O como se observa en la **Figura 22(c)**.

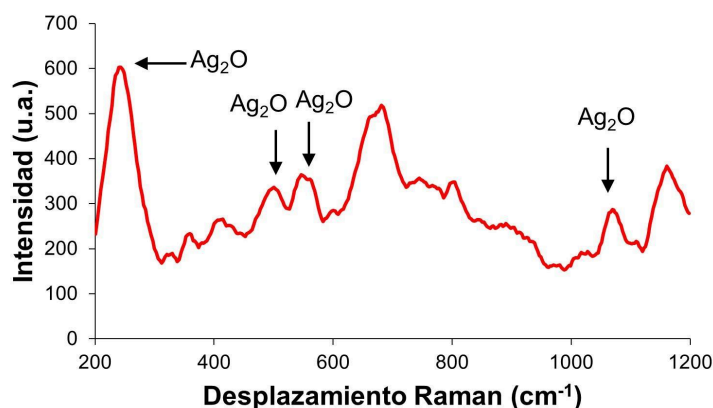


Figura 25. Espectro Raman de una gota seca de suspensión coloidal de AgNPs sintetizada con *T. albida* (BAFCcult 4711). Las flechas indican las bandas Raman característicos de Ag_2O .

La **Figura 26** muestra el espectro FTIR-ATR obtenido para AgNPs liofilizadas sintetizadas con la cepa *T. albida* (BAFCcult 4711). Se observan bandas en 3278 , 2917 , 1619 , 1550 , 1333 , 1030 , 831 , 766 y 693 cm^{-1} . En la **Tabla 5** se resumen las posibles asignaciones de grupos funcionales de las bandas de absorción.

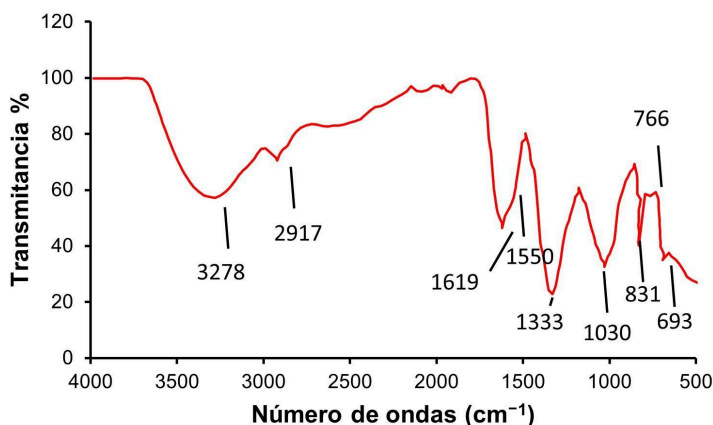


Figura 26. Espectro FTIR-ATR de muestras liofilizadas de AgNPs sintetizadas con *T. albida*, pH 9 (BAFCcult 4711).

Número de ondas (cm^{-1})	Grupo funcional	Referencia
3278	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2917	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Rani <i>et al.</i> , 2017
1619	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1550	banda atribuida a Amida II, derivada principalmente del estiramiento C-N junto con la flexión en el plano N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1333	banda atribuida a Amida III, debido a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1030	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> 2014
831	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
766	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
693	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 5. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711).

La **Figura 27** muestra el espectro de extinción óptica experimental producido por las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) a 28 °C, junto con el espectro teórico correspondiente a NPs de tipo núcleo-coraza utilizando la aproximación de Rayleigh. Para este caso se utilizó un radio de núcleo $r_1 = 0.9$ nm y un radio exterior $r_2 = 1.05$ nm. Como es sabido, la existencia de una coraza de Ag_2O produce el corrimiento del pico del plasmón hacia mayores longitudes de onda. Al considerar entonces una coraza de 0,15 nm de espesor se logra reproducir correctamente la posición del pico y la forma del RPS experimental del coloide. El radio de la estructura calculado según la teoría de Mie coincide con el observado en las AgNPs presentes en las imágenes TEM de la **Figura 22(c)**.

La **Figura 28** muestra el espectro de extinción óptica experimental producido por las AgNPs sintetizadas con la misma cepa a 6 °C. En línea de puntos rojos se muestra el ajuste teórico para NPs núcleo-coraza con dimensiones típicas de radio interior de 0,4 nm y radio exterior de 0,46 nm basado en la aproximación de Rayleigh. Este espectro muestra una buena concordancia con la resonancia plasmónica experimental.

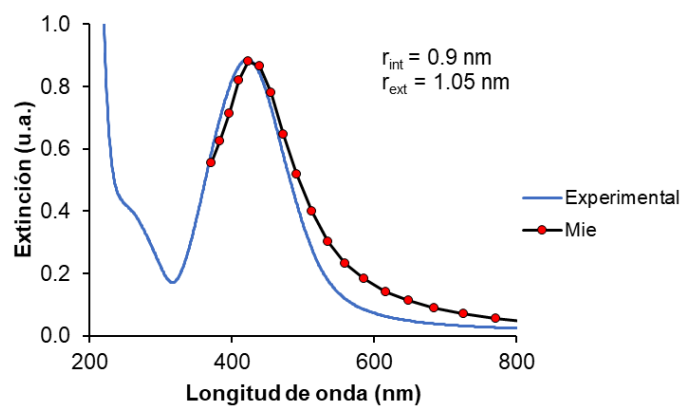


Figura 27. Espectro de extinción de la síntesis de AgNPs sintetizadas a 28°C y modelo teórico basado en la aproximación de Rayleigh para una estructura núcleo-coraza, $r_1 = 0,9$ nm; $r_2 = 1,05$ nm

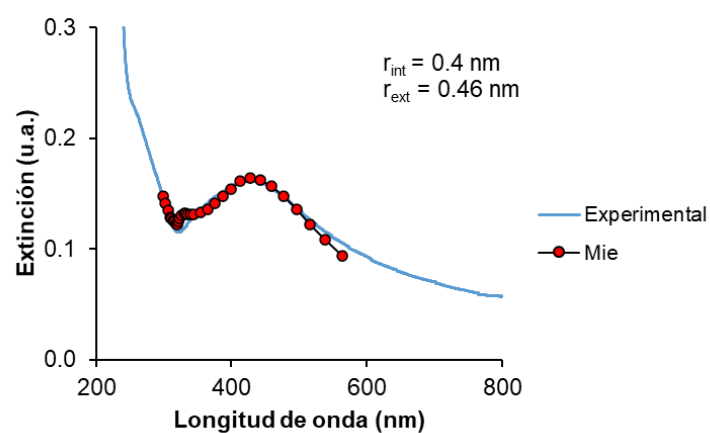


Figura 28. Espectro de extinción de la síntesis de AgNPs sintetizadas a 6°C y modelo teórico basado en la aproximación de Rayleigh para una estructura núcleo-coraza, $r_1 = 0,4$ nm; $r_2 = 0,46$ nm.

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (*Tulasnella albida*)

Las **Figuras 29(a)** y **29(b)** muestran los espectros de extinción obtenidos para la síntesis AuNPs obtenidas con la cepa de *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9 y pH 11 a 28°C, con una concentración de 0,5 mM. A pH 5 no se observaron resultados de síntesis. En ambos casos se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 520 nm aproximadamente: 528 nm a pH 9 y 516 nm a pH 11. Las **Figuras 29(c)** y **29(d)** muestran el valor máximo del espectro de extinción del RPS registrado en función del tiempo medido en días. A pH 9 se observa un tiempo característico $t_0 = 1,93$ días y un valor asintótico $A = 0,42$; mientras que a pH 11 se observa un tiempo característico $t_0 = 1,22$ días y un valor asintótico $A = 0,29$. Las **Figuras 29(e)** y **29(f)** muestran los espectros de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 9 y 11 respectivamente, luego de dos años de realizada la síntesis, donde se observa que la forma del plasmón se mantiene con el tiempo. Sin embargo, para pH 11 se observa un corrimiento del pico máximo de extinción de 516 nm a 536 nm luego de dos años de la fecha de fabricación. En el caso de pH 9 el pico se mantiene casi en el mismo lugar: 528 nm - 527 nm.

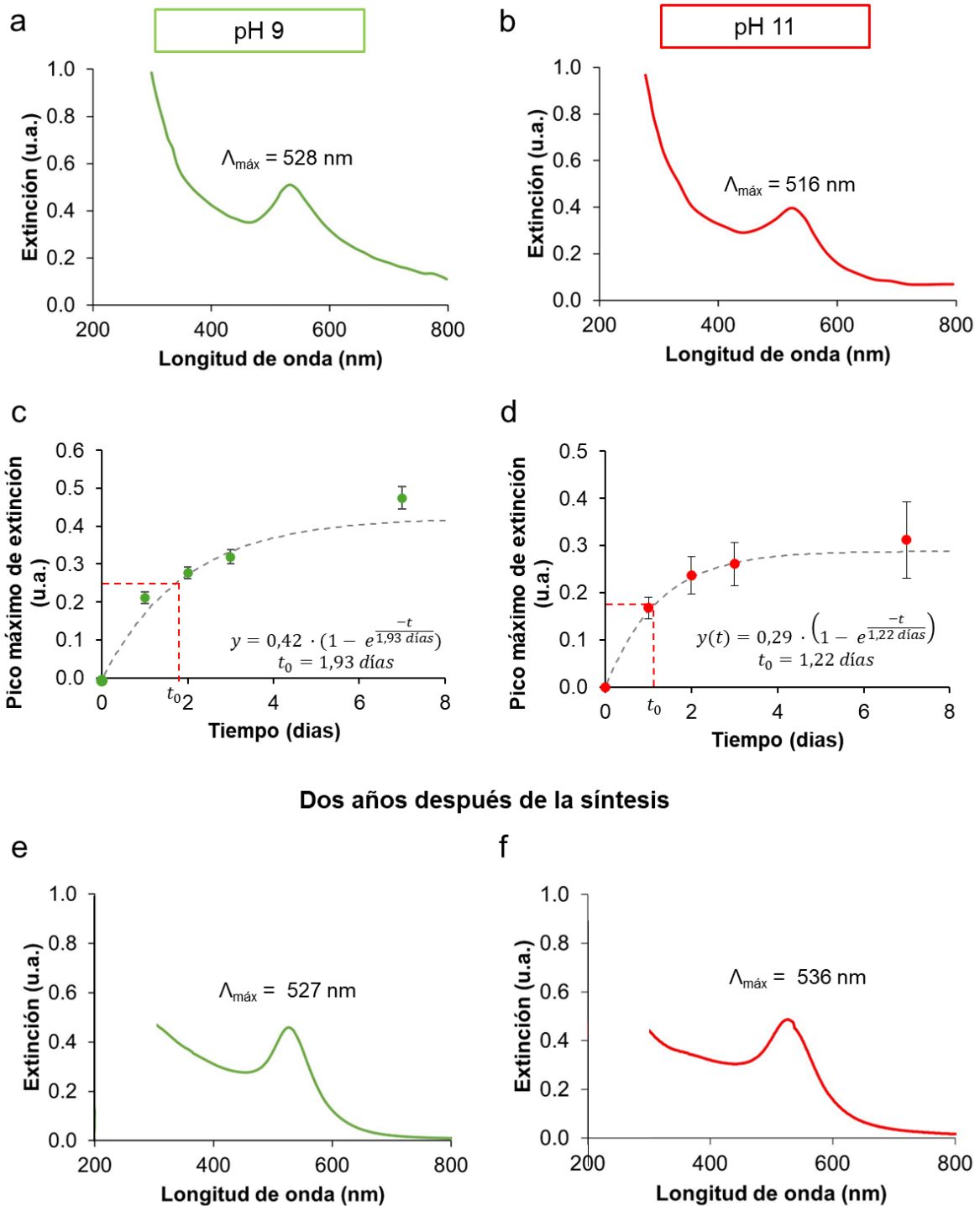


Figura 29. Espectroscopía de las AuNPs sintetizadas con la cepa *T. albida* (BAFCcult 4711). **(a)** Espectro de extinción de la síntesis de AuNPs con pH 9. **(b)** Espectro de extinción de la síntesis de AuNPs con pH 11. **(c)** Comportamiento del valor máximo del pico de extinción vs tiempo de la síntesis de AuNPs a pH 9 y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. **(d)** Comportamiento del pico de plasmón vs tiempo de la síntesis de AuNPs a pH 11 y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. **(e)** Espectro de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 9 luego de 2 años. **(f)** Espectro de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 11 luego de 2 años.

Las **Figuras 30(a)** y **30(b)** muestran imágenes obtenidas mediante SEM de las AuNPs sintetizadas con la cepa de *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9. Y en las **Figuras 30(c)** y **30(d)** las AuNPs sintetizadas a pH 11. Se observa que la mayoría de las AuNPs poseen una morfología aproximadamente esférica.

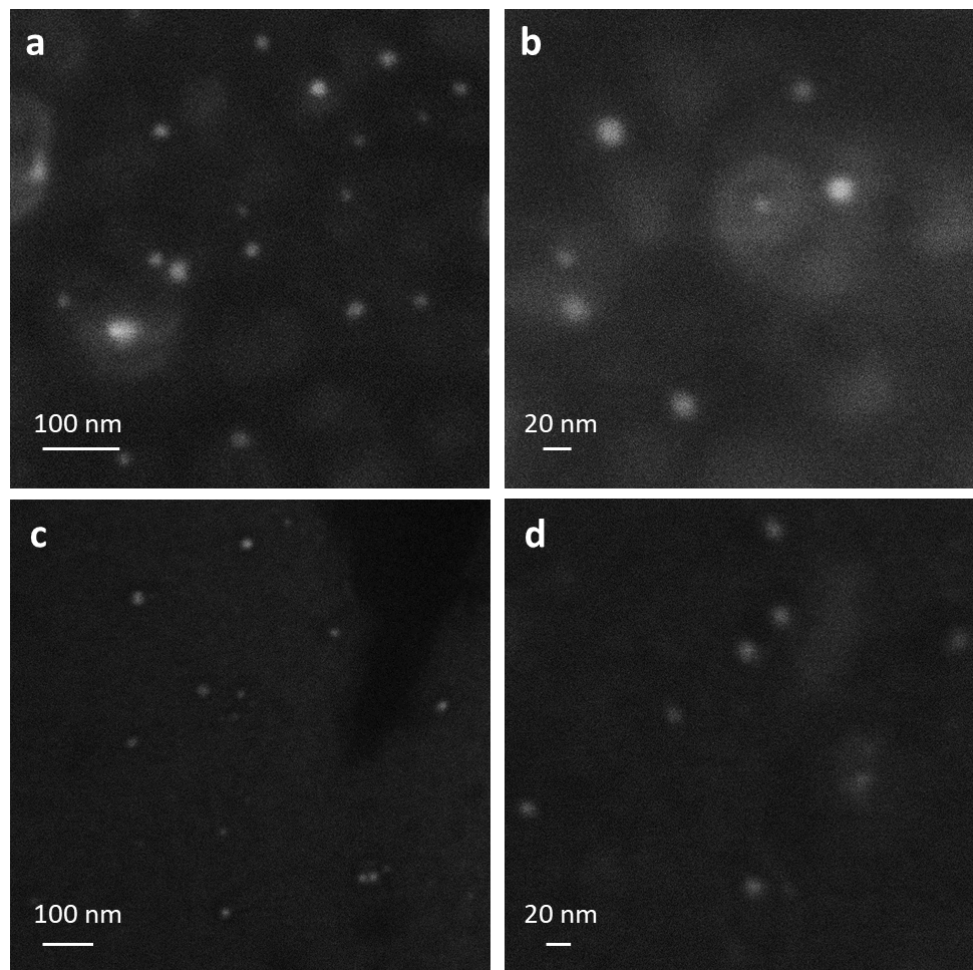


Figura 30. Imágenes SEM tomadas para las AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711). **(a)** pH 9, imagen panorámica. **(b)** pH 9, detalle de las NPs. **(c)** pH 11, imagen panorámica. **(d)** pH 11, detalle de las NPs.

La **Figura 31** muestra imágenes TEM de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9. En esta figura se muestran imágenes de AuNPs tomadas en diferentes sectores de la grilla. En este caso, con mayor definición de imagen se observan formas esféricas o cuasi esféricas de diferentes tamaños, en escalas de 20 nm y 50 nm.

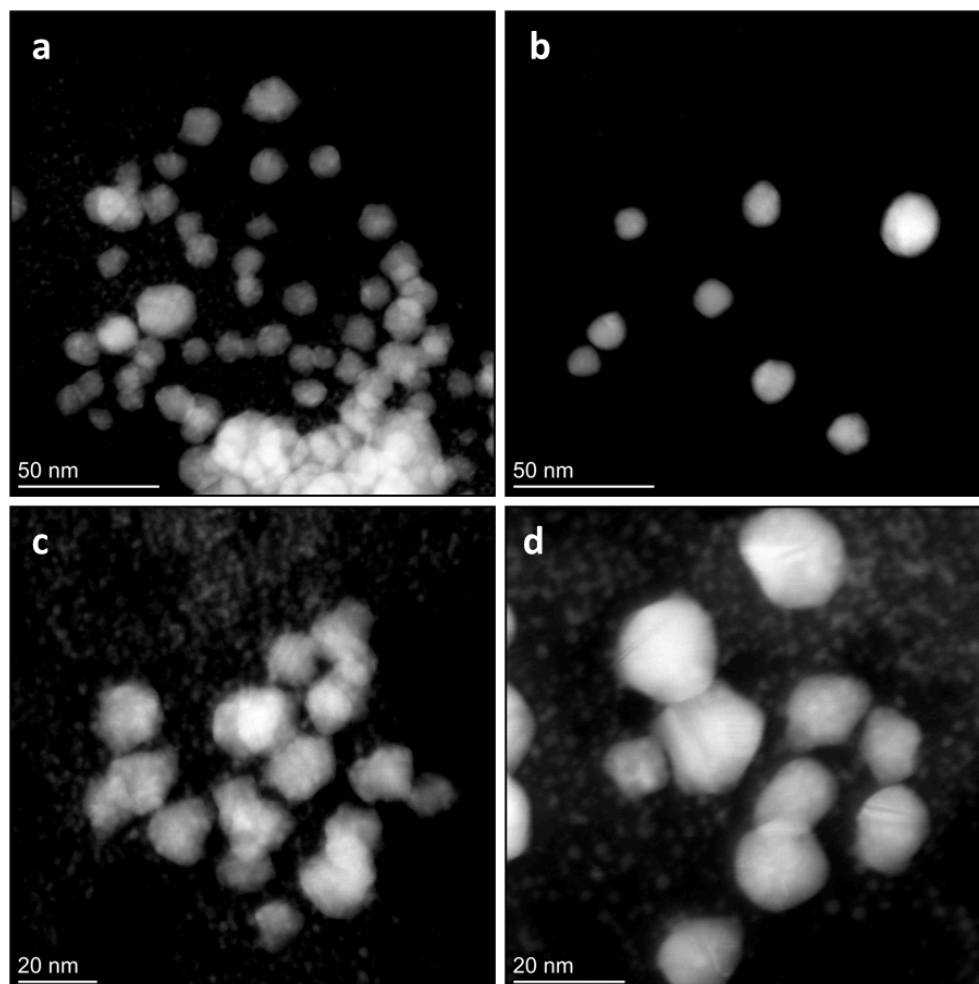


Figura 31. Imágenes TEM de AuNPs correspondientes a la síntesis con *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9. (a) y (b) Se observan formas cercanamente esféricas, en escalas de 50 nm. (c) y (d) se observan más claramente algunas formas irregulares, aunque cuasi esféricas, en escala de 20 nm.

La **Figura 32(a)** muestra una imagen TEM de AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 9, en escala de 10 nm. La **Figura 32(b)** muestra el mapeo realizado para detectar la presencia de Au, observándose que en su gran mayoría el Au está depositado sobre las NPs mostradas en la **Figura 32(a)**. La **Figura 32(c)** muestra la superposición de las **Figuras 32(a)** y **32(b)**. Finalmente, la **Figura 32(d)** muestra la presencia de Cl depositado en su gran mayoría sobre las NPs mostradas en la **Figura 32(a)**. Este elemento proviene del HCl utilizado para el control del pH.

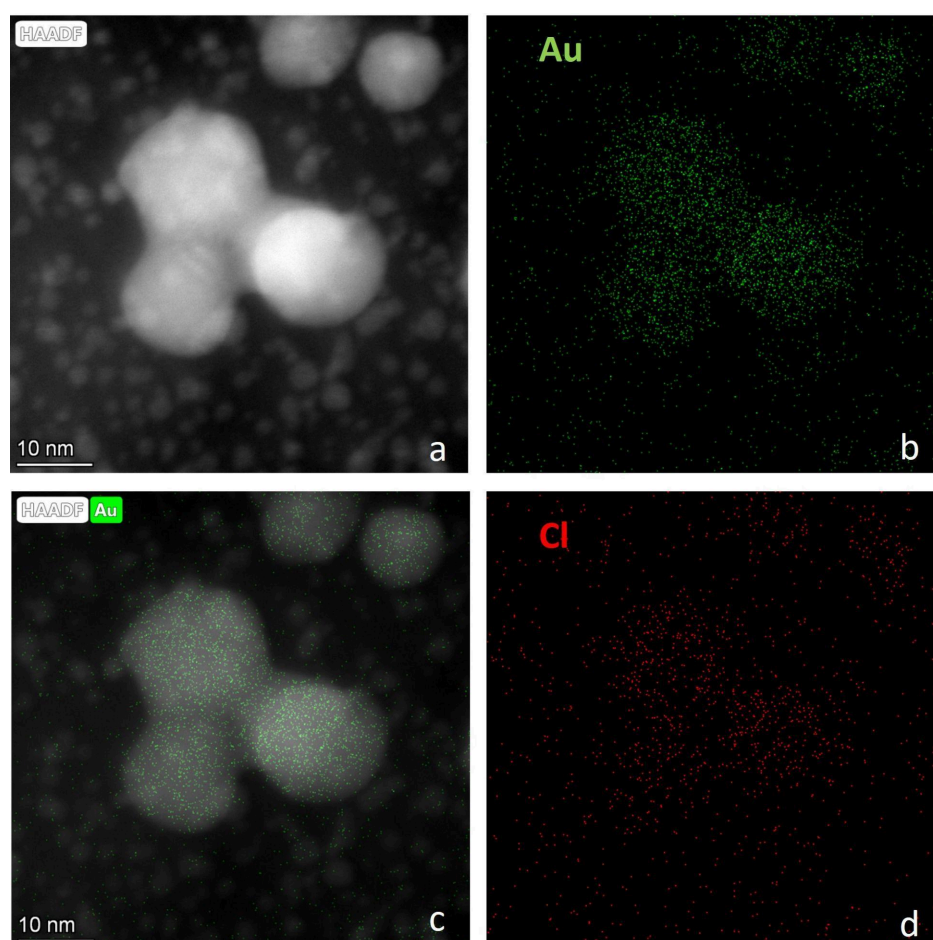


Figura 32. Imágenes TEM de AuNPs sintetizadas utilizando al hongo *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 9. **(a)** Imagen de campo oscuro correspondiente a AuNPs en escala de 10 nm. **(b)** Mapeo realizado sobre las AuNPs de la Figura 32(a), marcando en color verde la presencia de oro. **(c)** superposición de imagen a y b. **(d)** Mapeo realizado sobre las AuNPs marcando en rojo la presencia del elemento cloro.

La **Figura 33** muestra imágenes TEM de AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 9, de diferentes sectores de la grilla y en diferentes escalas. La **Figura 33(a)**, en escala de 50 nm, muestra NPs algo aglutinadas formando un cúmulo de dimensión mayor que 100 nm, dentro del cual hay algunas esféricas y otras con formas cuadradas o en general irregulares con aristas definidas (flechas amarillas). Las **Figuras 33(b)** y **32(c)** muestran NPs aisladas de formas irregulares y tamaños del orden de 15 a 20 nm aproximadamente, en otro sector de la grilla. La **Figura 33(d)** muestra el análisis EDS mostrando los picos de Au, como así también los de Cu y Si, elementos típicos de la composición de la grilla.

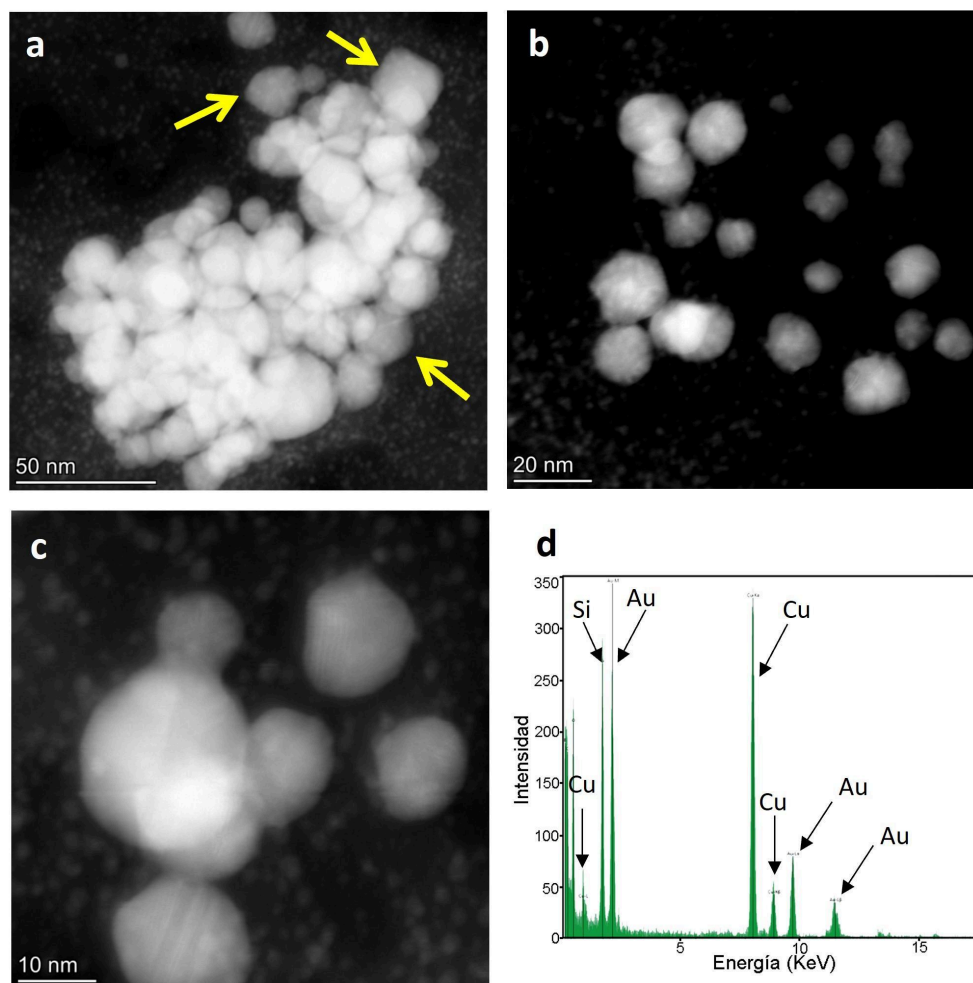


Figura 33. Imágenes TEM de AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 9. **(a)** AuNPs en escala de 50 nm algo aglutinadas, algunas esféricas y otras (en mucho menor proporción) con formas cuadradas o en general irregulares con aristas definidas (flechas amarillas). **(b)** AuNPs aisladas en escala de 20 nm. **(c)** AuNPs aisladas de formas irregulares en escala de 10 nm. **(d)** EDS mostrando los picos de Au provenientes de las NPs, como también Cu y Si característicos de la composición de la grilla.

La **Figura 34** muestra imágenes TEM de AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 11. Se muestran tomas panorámicas de diferentes zonas de la grilla en escalas de 500 y 200 nm, donde aparecen diferentes cúmulos de AuNPs. Se observa que las NPs se encuentran aglomeradas, aunque manteniendo su individualidad dentro de los cúmulos.

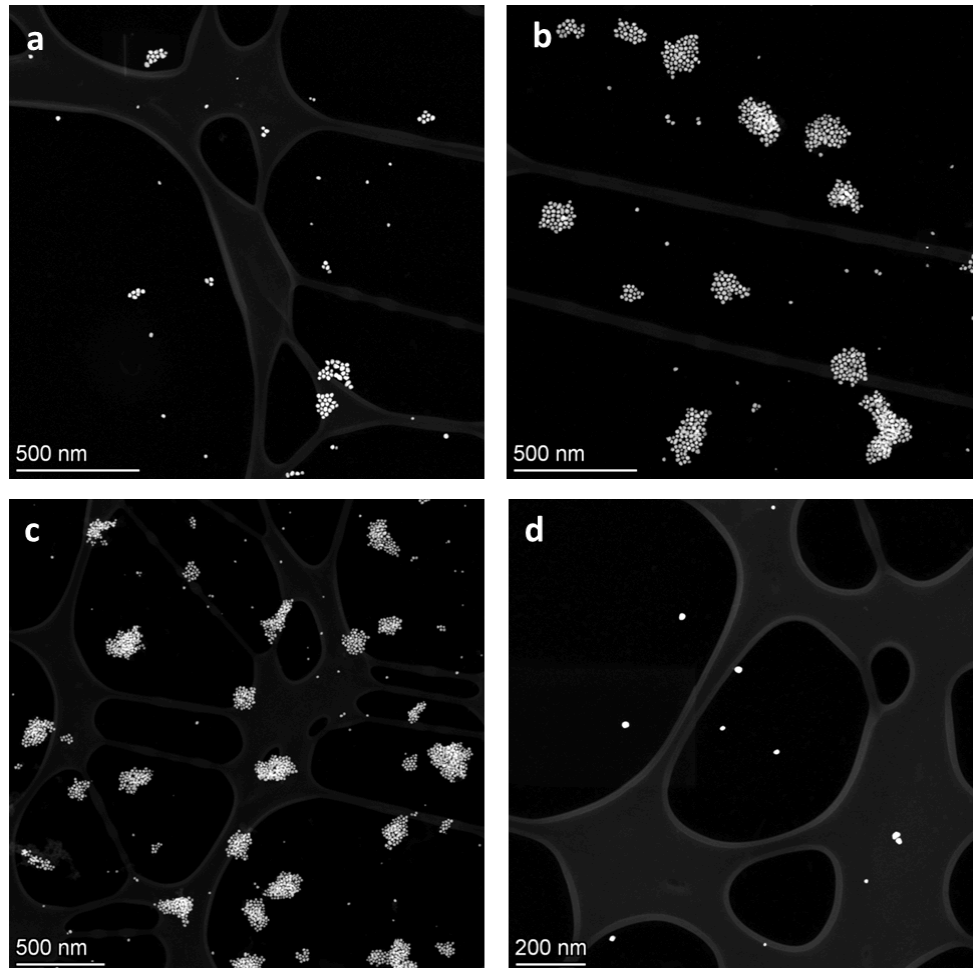


Figura 34. Imágenes TEM panorámicas de diferentes zonas de la grilla donde se observan cúmulos de AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 11. (escalas de 500 y 200 nm). **(a)-(c)** 500 nm, **(d)** 200 nm.

La **Figura 35** muestra otras imágenes TEM de las AuNPs obtenidas mediante la misma síntesis, pero en una escala de 50 nm, observando tres cúmulos diferentes (**Figuras 35(a), 35(b), 35(c)**), mientras que la **Figura 35(d)** exhibe una partícula aislada en una escala de 5 nm. En las cuatro figuras, las NPs presentan dimensiones típicas de entre 15 y 20 nm, la mayoría con formas esféricas y otras con formas de cuerpos poliédricos irregulares, algunos cercanamente esféricos. La **Figura 35(d)** muestra en particular una nanoestructura con forma piramidal.

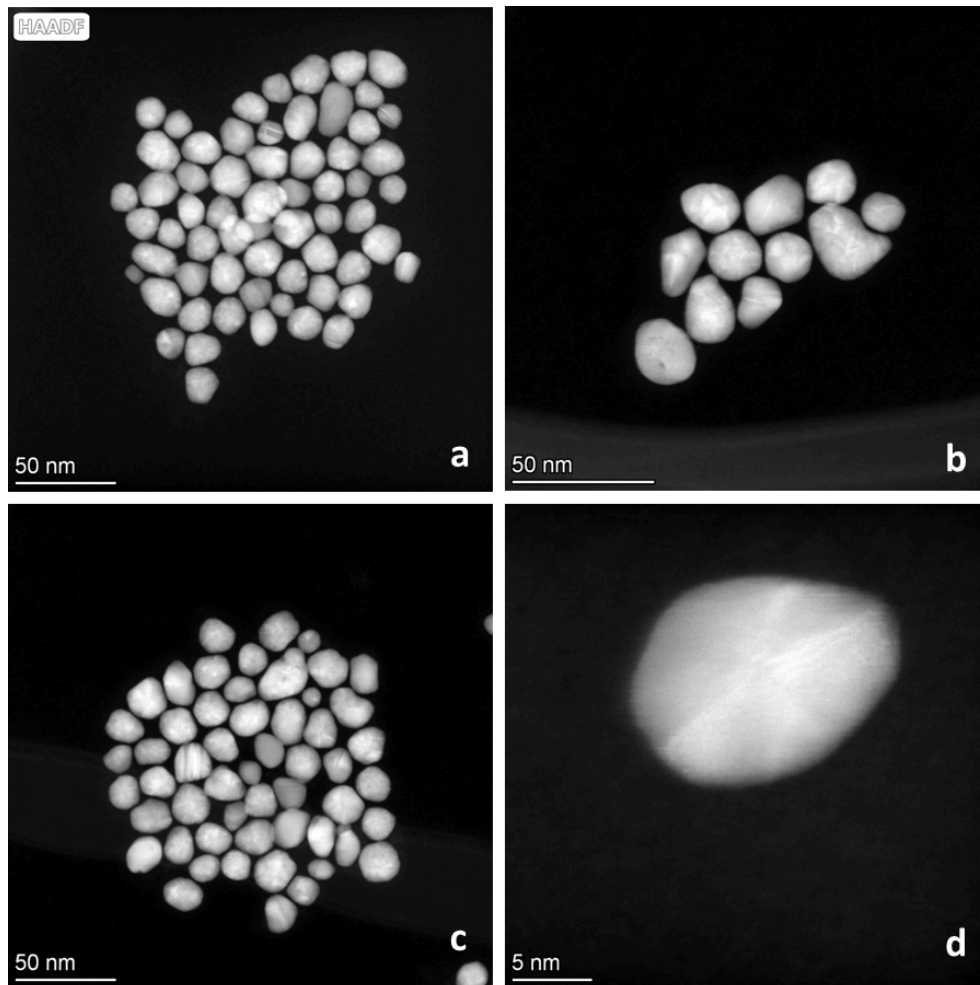


Figura 35. AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albidia* (BAFCcult 4711) a pH 11. **(a)-(c)** cúmulos de AuNPs en escala de 50 nm. **(d)** NP de Au aislada en una escala de 5 nm con forma piramidal.

La **Figura 36(a)** muestra la imagen HAADF obtenida para mostrar las AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) superpuestas con el mapeo que analiza la composición elemental de las mismas. Los puntos turquesas representan la presencia de átomos de Au (**Fig. 36(b)**). Se observa que hay una fuerte correlación entre la distribución de puntos y las nanoestructuras formadas, ya que los puntos turquesas están concentrados sobre las NPs. La **Figura 36(c)** muestra el espectro EDS de una zona central de la **Figura 36(a)**, sobre una NP, donde se observan los picos característicos del Au además de otros correspondientes a la presencia de Cu y C que son elementos provenientes de la misma grilla. Estos elementos se muestran también en el espectro EDS de la **Figura 36(d)**, enfocado en una zona del fondo, por fuera de las NPs, donde se observa la desaparición del elemento Au, quedando C y Cu proveniente de los elementos que componen la grilla.

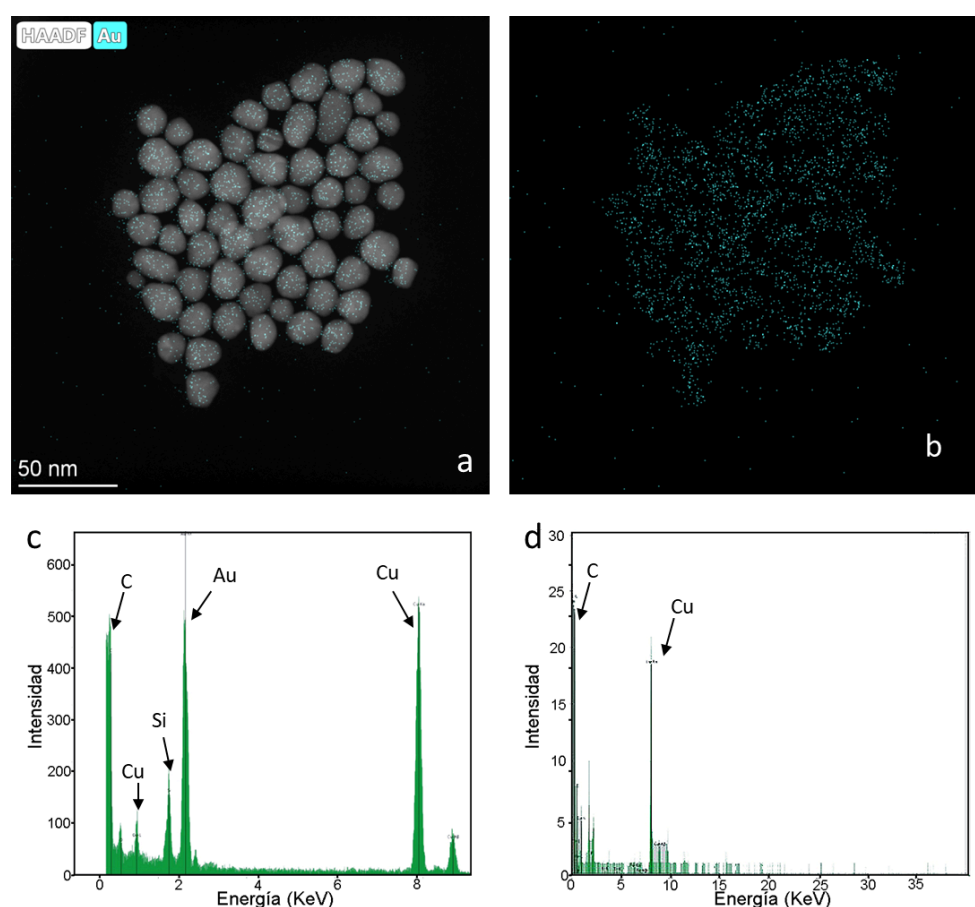


Figura 36. AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 11. **(a)** Imágenes superpuestas de AuNPs y distribución de puntos del mapeo indicando la presencia de Au, representados en turquesa. **(b)** Distribución de puntos turquesas representativos de la presencia del elemento Au. **(c)** Espectro EDS de la zona central de la Figura 36(a), sobre una NP de Au, **(d)** Espectro EDS enfocado en una zona del fondo, por fuera de las NPs, observando la ausencia de Au.

La **Figura 37(a)** muestra una AuNP aislada en campo brillante con un tamaño aproximado de 10 nm. En la **Figura 37(b)** se muestra el difractograma de electrones de esta NP. El patrón de anillos observado es típico de una estructura policristalina (múltiples planos de difracción) que está presente en la NP aislada. El diámetro de cada anillo se relaciona con la distancia interplanar cristalográfica de la NP.

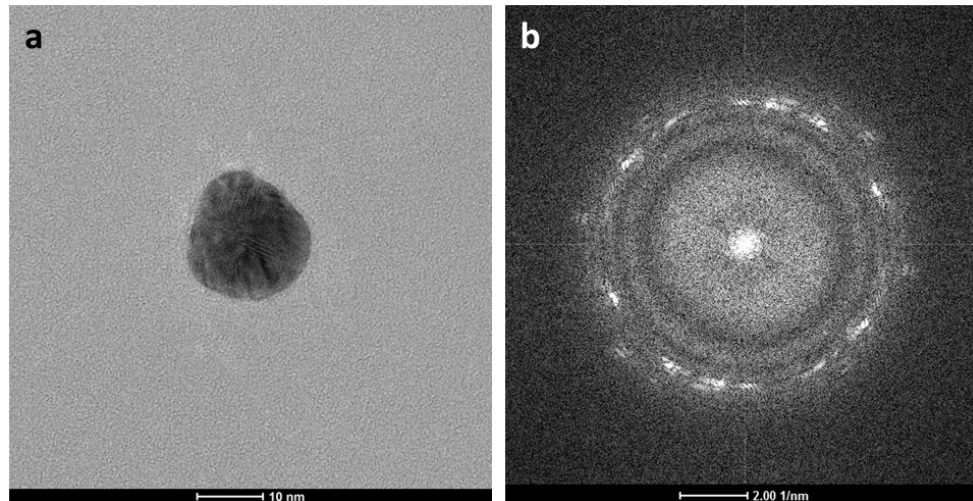


Figura 37. AuNP obtenida mediante la síntesis con *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 11. **(a)** imagen de NP aislada con un tamaño aproximado de 10 nm. **(b)** Difractograma de electrones de la NP presente en (a). La estructura de puntos distribuida a lo largo de toda la circunferencia indicaría que se trata de una estructura policristalina.

La **Figura 38** muestra los espectros FTIR-ATR obtenidos en este trabajo de tesis para AuNPs liofilizadas sintetizadas con la cepa *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9 (**Fig. 38(a)**) y a pH 11 (**Fig. 38(b)**). A pH 9 se observan bandas en 3274, 2920, 2852, 1635, 1540, 1242 y 1025 cm^{-1} . Mientras que a pH 11 se observan bandas en 3254, 2921, 2851, 1742, 1635, 1558, 1396, 1021 y 833 cm^{-1} . En la **Tabla 6** se detallan las posibles asignaciones de los bandas.

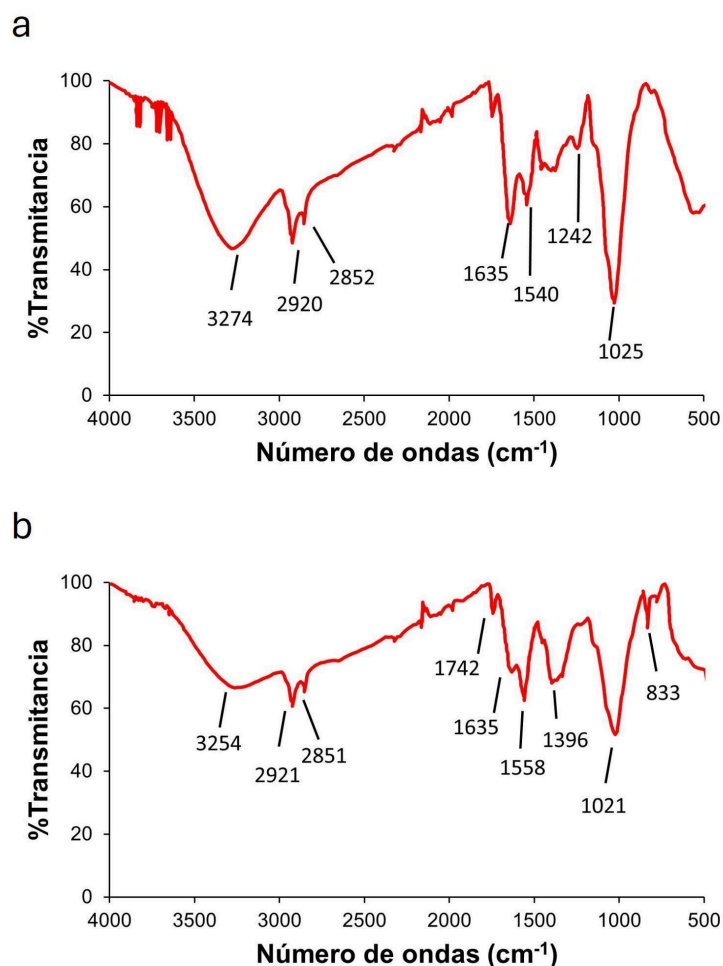


Figura 38. Espectros FTIR-ATR obtenidos de las AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711):
(a) pH 9; (b) pH 11.

Número de ondas (cm ⁻¹)		Grupo funcional	Referencia
pH 9	pH 11		
3274	3254	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2920	2921	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
2852	2851	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
	1742	vibraciones de estiramiento del grupo funcional C=O en cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos	Gannimani <i>et al.</i> , 2014
1635	1635	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1540	1558	banda atribuida a Amida II, derivada principalmente del estiramiento C-N junto con la flexión en el plano N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1242	1396	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1025	1021	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014
	833	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 6. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711).

Como puede verse en las **Figuras 33** (pH 9) y **35** (pH 11), las muestras de AuNPs están compuestas por partículas esféricas o cuasi esféricas en su gran mayoría y de otras que presentan diferentes morfologías, aunque en una proporción mucho menor. Las primeras son responsables de la aparición de la banda plasmónica (alrededor de 530 nm) mientras que las últimas modifican las “alas” del espectro en las regiones por debajo de 520 nm y por encima de 575 nm aproximadamente. Por esta razón sólo se realizó un ajuste parcial de los espectros trabajando en la región de la banda plasmónica del espectro. La **Figura 39** muestra los espectros de extinción experimentales producidos por coloides y los ajustes parciales de los mismos en círculos rojos, utilizando el programa MiePlot. Los espectros fueron ajustados utilizando las distribuciones log normal mostradas en los respectivos insets de las figuras. Las distribuciones de tamaños son extendidas e incluyen, además de las esferas pequeñas menores que 10 nm, los agregados de forma cuasi esféricas que se observan en las imágenes TEM de las **Figuras 32** y **33** para el caso de pH 9, y los numerosos cúmulos o agregados que se observan en las imágenes TEM de las **Figuras 34** y **35** para el caso de pH 11, cuyos tamaños se encuentran en el rango entre 20 y 100 nm aproximadamente. La presencia de estos cúmulos en solución es la responsable del ensanchamiento del espectro de extinción en la banda plasmónica que se observa experimentalmente. La inclusión de radios compatibles

con las dimensiones de estos cúmulos en la distribución de tamaños resulta imprescindible para el buen ajuste del espectro de extinción en la región de la banda plasmónica. En el caso de la síntesis a pH 9 el radio modal de las AuNPs esféricas presentes en la muestra resultó ser de 10 nm, mientras que a pH 11 el radio modal es de 7,5 nm.

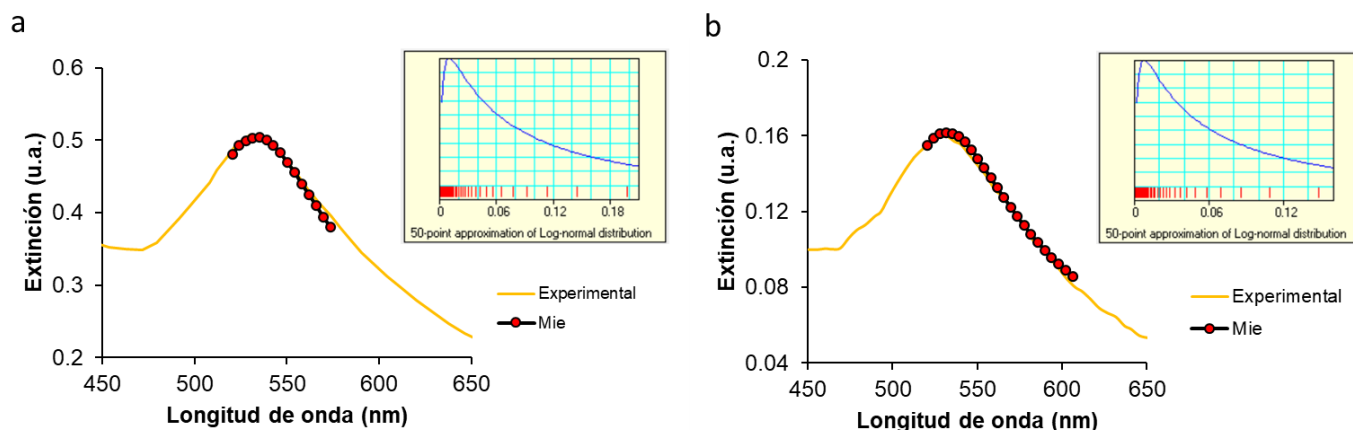


Figura 39. Espectros de extinción de AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) y ajuste basado en la teoría de Mie utilizando las distribuciones mostradas en los insets. **(a)** pH 9, radio modal de 10 nm; **(b)** pH 11, radio modal de 7,5 nm. Los inset en cada figura representan la distribución log normal de tamaños; eje X: radio en micrómetros; eje Y: frecuencia de aparición (sin unidades) calculada para 50 nanopartículas.

II.3.2. *Cerinosterus luteoalbus*

Caracterización morfológica

Cerinosterus luteoalbus. (de Hoog) R.T. Moore. In: Stud. Mycol. 30: 216. (1987)

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Basidiomycotina

Clase: Dacrymycetes

Subclase: *Incertae sedis*

Orden: Dacrymycetales

Familia: Dacrymycetaceae

Aspecto de la colonia: micelio de coloración amarilla de crecimiento lento, no llegando a cubrir la placa a los 30 días de inoculación. El reverso también es amarillo. El micelio es denso y se desarrolla en gran parte por dentro del agar.

Caracteres microscópicos: Micelio ramificado y tabicado, con gúttulas en su interior. Conidios de forma alargada de aproximadamente 5 μm , emergiendo en forma de roseta a partir de células conidiógenas. Conidiogénesis holoblástica. Presencia de células con hinchamientos.

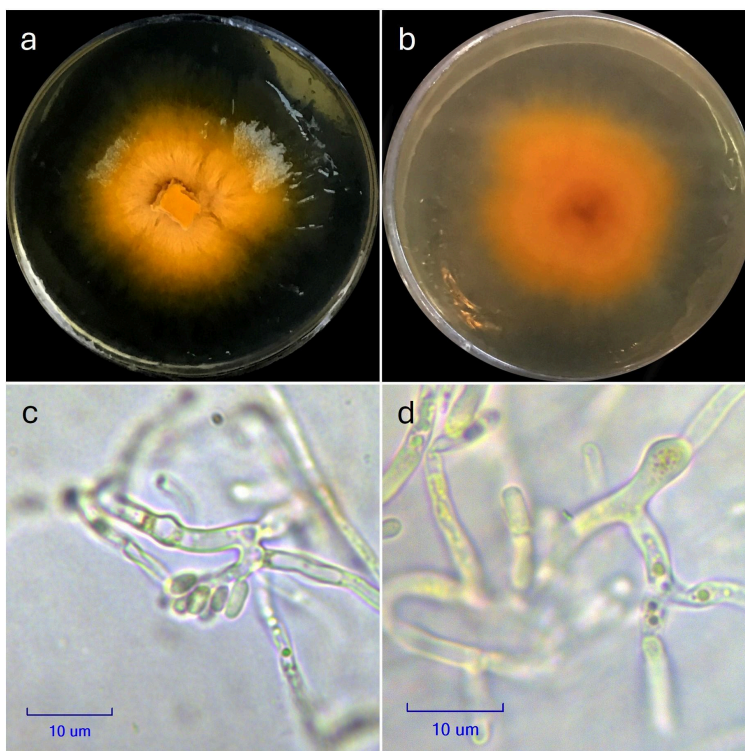


Figura 40. *Cerinosterus luteoalbus*. **(a)** Aspecto superficial de la colonia, luego de 2 meses de crecimiento. **(b)** Reverso de la colonia. **(c)** conidios y célula conidiógena. **(d)** Micelio con hinchamientos.

Caracterización molecular

La **Figura 41** muestra el árbol obtenido mediante el análisis de máxima verosimilitud realizado con la cepa de BAFCCult 4705 utilizada para los experimentos de síntesis de NPs. Las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos de las secuencias analizadas respaldaron la identificación de estas cepas como *Cerinosterus luteoalbus*. Las características morfológicas coinciden con la descripción de *Sporothrix luteoalba*, basónimo de *Cerinosterus luteoalbus* (Moore, 1987; Gaiser *et al.*, 2021).

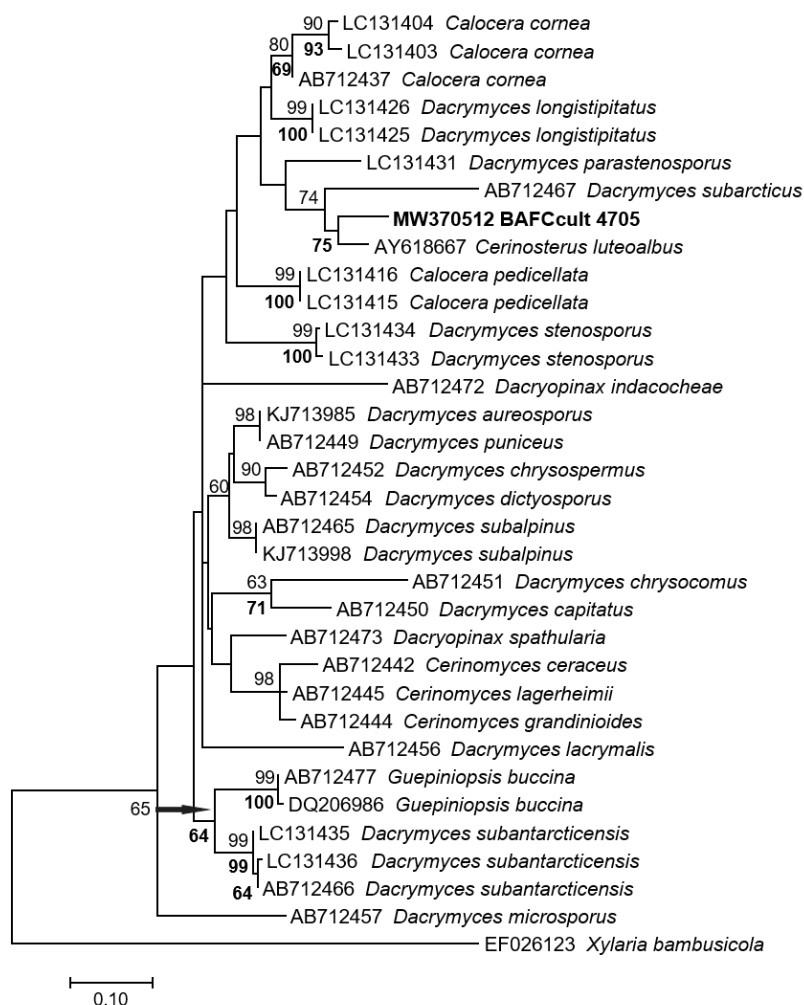


Figura 41. Árbol de máxima verosimilitud basado en la región ITS, Producido a partir de un conjunto de datos de 34 secuencias. El árbol fue construido bajo el modelo de Kimura 2 parámetros (K2) + distribución Gamma (G). Los valores de Bootstrap ≥ 60 se indican encima de las ramas. Las flechas indican los valores de Bootstrap de las respectivas ramas. La secuencia obtenida se indica en negrita. Los valores de Bootstrap ≥ 60 del árbol de parsimonia máxima se indican en negrita debajo de las ramas. Árbol extraído de Gaiser *et al.* (2021)

Caracterización fisiológica

A continuación se describen los resultados obtenidos para la curva de crecimiento, análisis de proteínas y azúcares reductores y perfil enzimático.

Curva de crecimiento: La **Figura 42** muestra la curva de crecimiento de la cepa de *C. luteoalbus* utilizada luego para la síntesis de NPs, bajo las condiciones ensayadas detalladas en materiales y métodos.

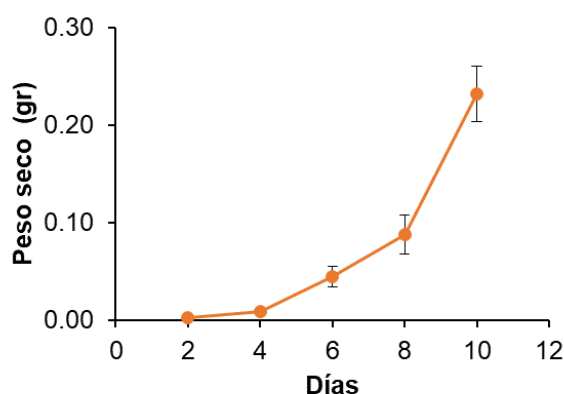


Figura 42: Curva de crecimiento correspondiente a la cepa de *C. luteoalbus* utilizada para la síntesis de NPs.

Análisis de proteínas totales y azúcares reductores: Los análisis realizados mediante la metodología de Bradford para la cuantificación de proteínas y de Somogyi-Nelson para la cuantificación de azúcares reductores dieron resultados cercanos a cero en todas las cepas y réplicas analizadas.

Perfil enzimático: En cuanto al perfil ligninolítico, se realizaron evaluaciones en medio con ácido tánico, ácido gálico y tirosina. En todos los casos la reacción fue negativa (-).

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (*Cerinosterus luteoalbus*)

La **Figura 43(a)** muestra el espectro de extinción obtenido para la síntesis de AgNPs a partir de *Cerinosterus luteoalbus* obtenido a pH 9 y 28°C, con una concentración de 0,5 mM. Se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 427 nm. A pH 5 no se observaron resultados de síntesis. La **Figura 43(b)** muestra la evolución del pico de extinción (máximo valor) en función de los días de síntesis, junto con el ajuste de crecimiento exponencial con asíntota. Del mismo se desprende un valor característico t_0 de 0,81 días y una asíntota con valor $A = 0,58$.

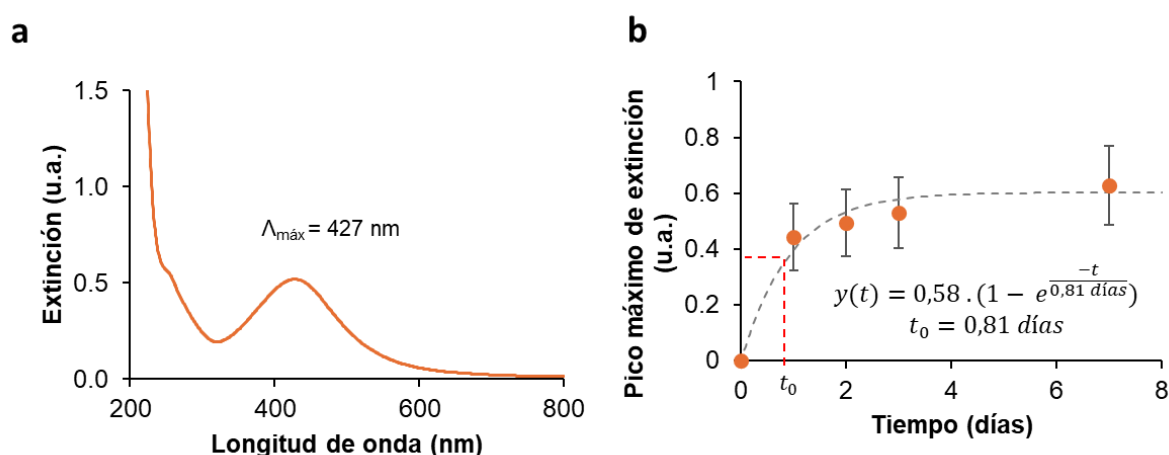


Figura 43. Espectro de extinción de las AgNPs sintetizadas con el hongo *C. luteoalbus*. **(a)** Espectro de extinción obtenido al séptimo día. **(b)** Evolución del máximo del espectro de extinción vs tiempo expresado en días y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar.

La **Figura 44** muestra las imágenes SEM de las AgNPs sintetizadas con la cepa de *C. luteoalbus*. Se observa que la mayoría de las AgNPs poseen una morfología esférica (**Fig. 44(a)**), aunque se logra observar en menor proporción NPs con otra morfología (**Fig. 44(b)**)

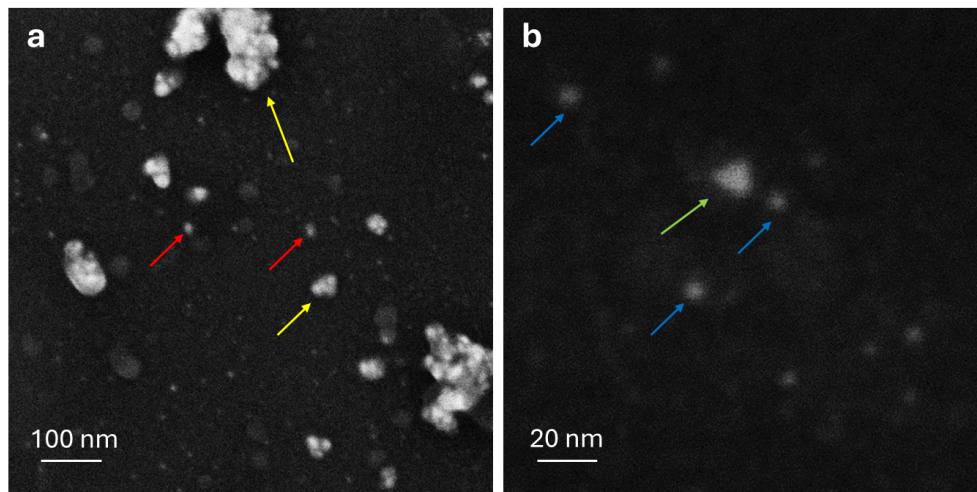


Figura 44. Imágenes SEM de las AgNPs sintetizadas con la cepa de *C. luteoalbus*. **(a)** Imagen panorámica, se observan NPs solitarias (flechas rojas) o aglomeradas (flechas amarillas). **(b)** Acercamiento de las AgNPs: se observan NPs esféricas (flecha azul) y una NP con forma de triángulo (flecha verde)

La **Figura 45** muestra imágenes TEM de las AgNPs obtenidas mediante la síntesis con *C. luteoalbus*. En esta figura se muestran imágenes de AgNPs tomadas en diferentes sectores de la grilla para mostrar variedad de formas y tamaños, en escalas de 20 nm y 50 nm, encontrando que la mayoría presentan formas esféricas o esferoidales, coexistiendo con otras formas, y algunos agregados o cúmulos de diversos tamaños.

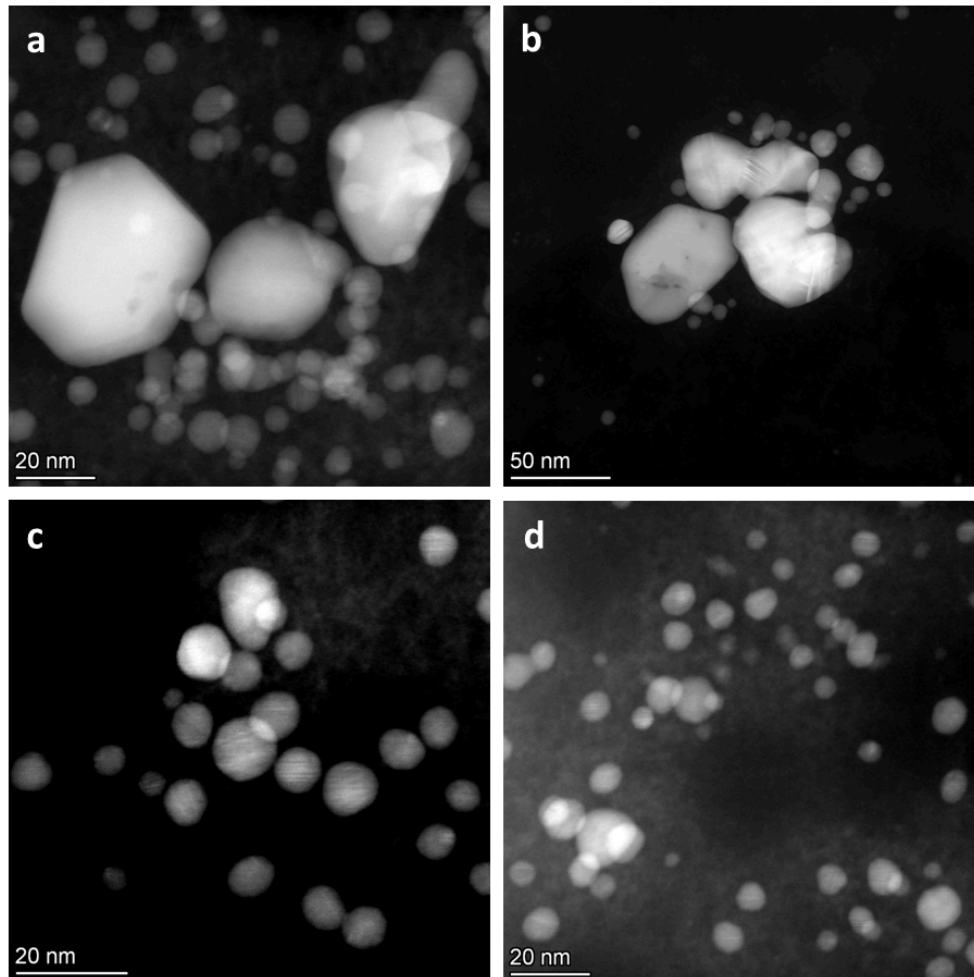


Figura 45. Imágenes TEM de las AgNPS sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9. **(a)** Mayoría de NPs pequeñas esferoidales y algunas hexagonales en el centro de la imagen. **(b)** Morfologías indefinidas de las NPs en el centro y esféricas en el resto de la imagen. **(c)** NPs esferoidales. **(d)** Ídem c

La **Figura 46** muestra AgNPs en una escala de 20 nm, obtenidas utilizando al hongo *C. luteoalbus*. La **Figura 46(a)** muestra en el centro, la imagen de una nanoestructura cuadrada de vértices redondeados, rodeada de numerosas nanoesferas de aproximadamente 4 nm de diámetro. La **Figura 46(b)** es una superposición de la **Figura 46(a)** con la **Figura 46(c)**. Los puntos rojos identifican átomos de plata constituyendo las NPs, a través de su emisión característica de rayos X. Se observa que el elemento plata reproduce la forma de las NPs. La **Figura 46(d)** identifica la presencia de cloro sobre las NPs, proveniente del HCl utilizado para controlar el pH del filtrado.

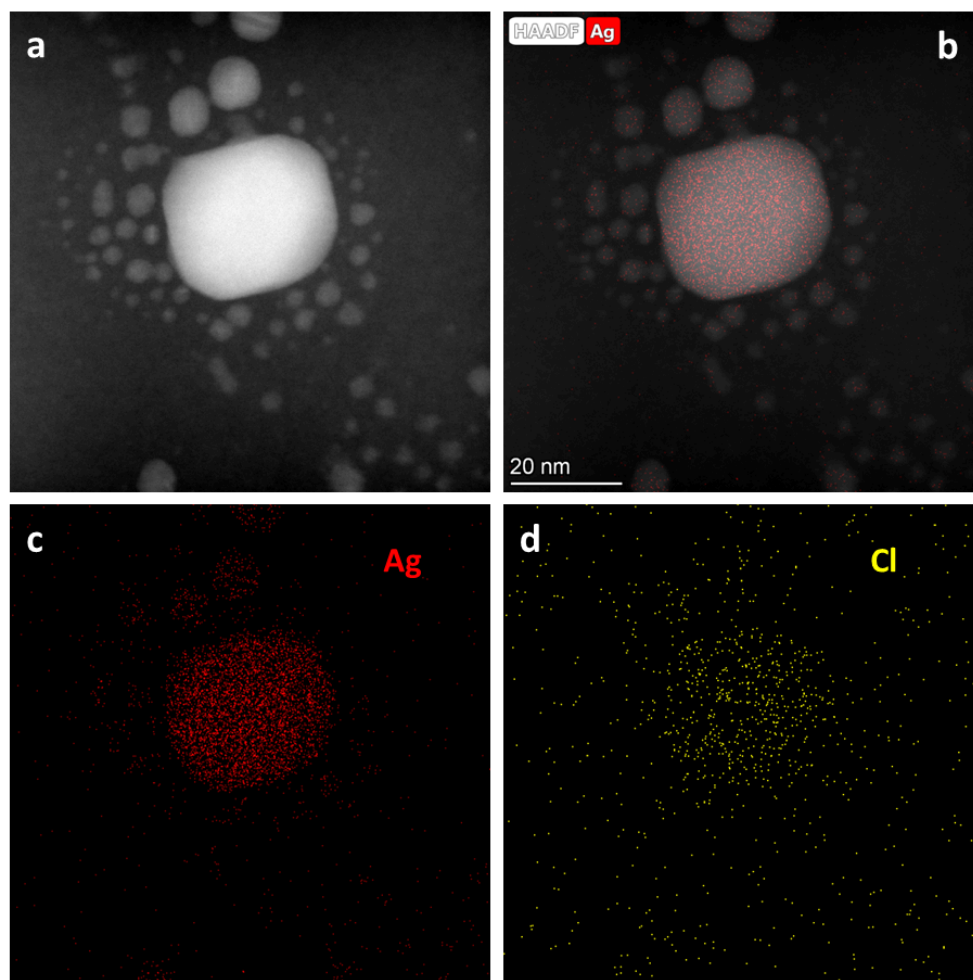


Figura 46. Imágenes TEM de las AgNPS sintetizadas con el hongo *C. luteoalbus*. **(a)** Imagen TEM de una AgNP cuadrada con bordes redondeados. **(b)** Superposición del mapeo del elemento plata con la imagen (a). **(c)** Mapeo que identifica la presencia de plata en la muestra (puntos rojos). **(d)** Mapeo que identifica la presencia de Cl.

En la **Figura 47** se registra otra zona de la muestra en escala de 50 nm. La **Figura 47(a)** muestra una estructura esférica en la zona central, rodeada de numerosas nanoesferas de diámetros cercanos a 5 nm aproximadamente. La **Figura 47(b)** muestra el mapeo del elemento plata en puntos rojos, observando que los mismos se depositan sobre las nanoesferas mostradas en la **Figura 47(a)**. Finalmente, en la **Figura 47(c)** se muestra el mapeo del elemento plata en puntos rojos y se puede observar que están localizados sobre las NPs presentes.

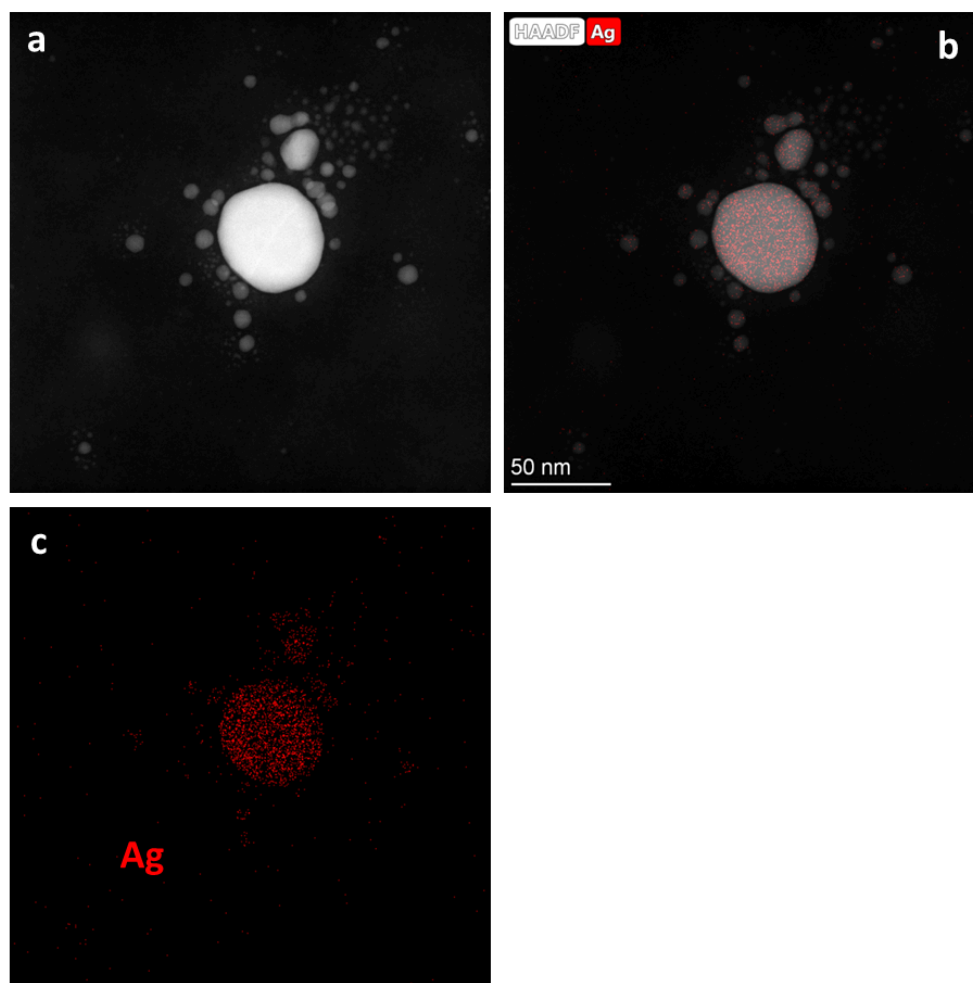


Figura 47. Imágenes TEM de las AgNPS sintetizadas con el hongo *C. luteoalbus*. **(a)** Imagen TEM de una AgNP esférica central y otras pequeñas rodeándola. **(b)** Superposición del mapeo de las Figuras 47(a) y 47(c). **(c)** Mapeo que identifica la presencia de plata en la muestra (puntos rojos).

La **Figura 48** muestra el análisis EDS en dos zonas diferentes de la **Figura 47**: sobre las NPs (**Fig. 48(a)**) y en el fondo, fuera de la zona de las NPs (**Fig. 48(b)**). En la **Figura 48(a)** se observa que entre 3 y 4 keV se encuentran los picos típicos de Ag, además de los conocidos picos de Cu, C y Si, elementos típicos de la composición de la grilla. En la **Figura 48(b)**, centrado en una zona alejada de las NPs, se puede analizar el fondo de la grilla, encontrando solamente los picos de Cu, C y Si presentes en la misma y la ausencia de picos de Ag.

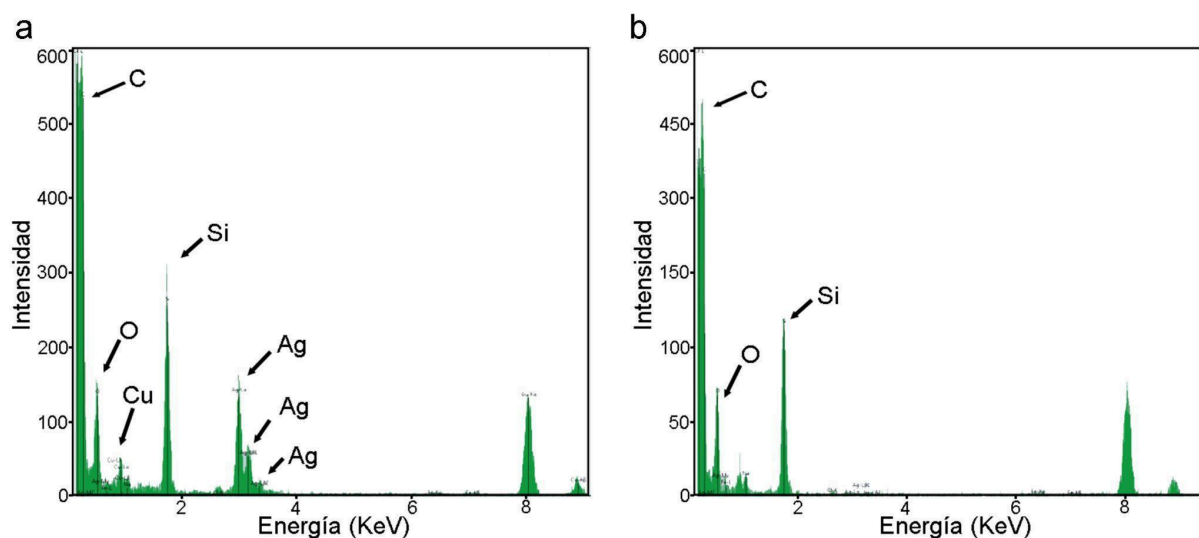


Figura 48. Análisis EDS realizado sobre una muestra de NPs sintetizadas con *C. luteoalbus*. **(a)** Análisis EDS realizado sobre las AgNPs. **(b)** Análisis EDS realizado sobre el fondo.

La **Figura 49** muestra el espectro FTIR-ATR obtenido para AgNPs liofilizadas sintetizadas con la cepa *C. luteoalbus*. Se observan picos en 3274, 2918, 2112, 1621, 1333, 1111, 1031, 831, 780, 693 y 616 cm^{-1} . En la **Tabla 7** se detallan las posibles asignaciones de los picos.

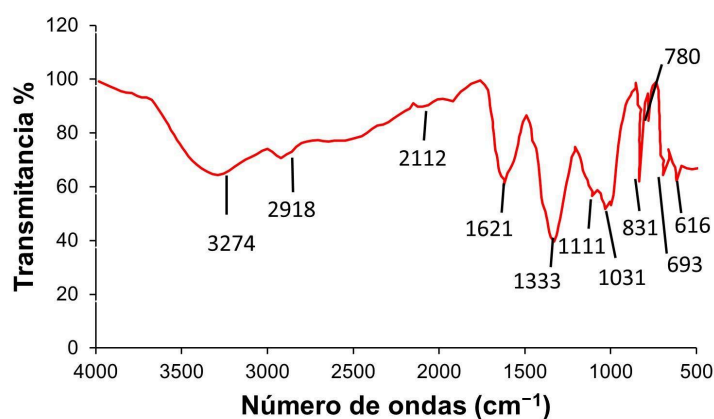


Figura 49. Espectro FTIR-ATR de muestras liofilizadas de AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*.

<i>Número de ondas (cm⁻¹)</i>	<i>Grupo funcional</i>	<i>Referencia</i>
3274	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2918	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Rani <i>et al.</i> , 2017
1621	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1333	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1031	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014
831	banda asignada a enlace C-H	Coates, 2000
780	banda asignada a enlace C-H	Coates, 2000
693	banda asignada a enlace C-H	Coates, 2000
616	banda asignada a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 7. posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*.

La **Figura 50** muestra el espectro experimental (línea continua) y el ajuste realizado (círculos rojos) para las AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*. De la misma manera que anteriormente, el espectro fue ajustado en la zona central de la banda plasmónica debido a que, si bien las AgNPs de la muestra presentaban formas esféricas en su mayoría, también existía una pequeña proporción de partículas que tenían otras formas no esféricas, produciendo alteraciones en los espectros de extinción, alterando las zonas laterales del mismo. El ajuste fue realizado utilizando Teoría de Mie con la distribución de tamaños mostrada en el inset de la figura. El radio modal de las AgNPs esféricas presentes en la muestra resultó ser de 49 nm, coincidiendo con las imágenes TEM mostradas en las **Figuras 46 y 47**.

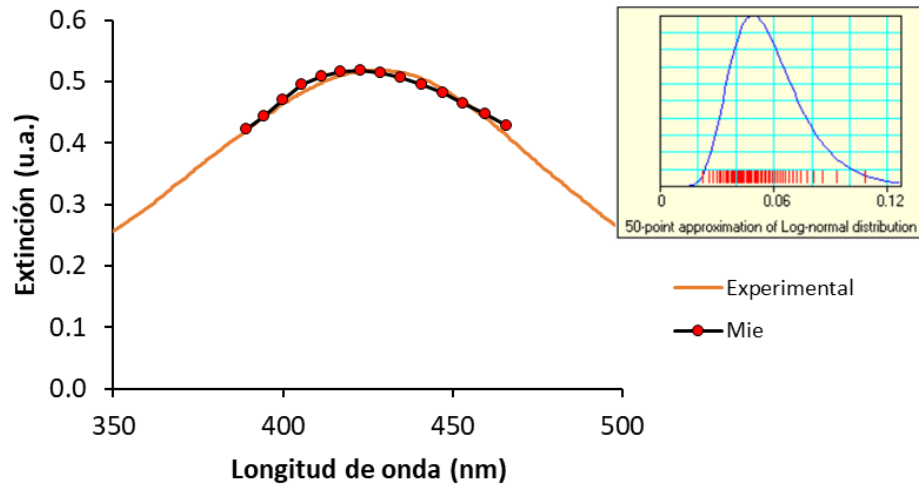


Figura 50. Espectro de extinción de la síntesis de AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* (línea continua) y modelo teórico basado en la teoría de Mie, arrojando un radio modal $r_m = 49$ nm y la distribución de tamaños mostrada en el inset (eje X: radio en μm ; eje Y: frecuencia de aparición (sin unidades) calculada para 50 nanopartículas).

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (*Cerinossterus luteoalbus*)

Las **Figuras 51(a)** y **51(b)** muestran los espectros de extinción obtenidos para la síntesis de AuNPs obtenidas a pH 9 y pH 11 a 28°C respectivamente, con una concentración de 0,5 mM, utilizando la cepa *C. luteoalbus*. En ambos casos se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta, aproximadamente, alrededor de 527 nm para pH 9 y de 522 nm para pH 11. A pH 5 no se observaron resultados de síntesis. Las **Figuras 51(c)** y **51(d)** muestran el máximo de extinción del RPS registrado en función del tiempo, expresado en días y el ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis, indicando un valor característico $t_0 = 2,93$ días y un valor $A = 0,22$ para pH 9; mientras que para pH 11 se encuentra un valor $t_0 = 3,1$ días y un valor $A = 0,16$. Las **Figuras 51(e)** y **51(f)** muestran los espectros de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 9 y 11 respectivamente, luego de dos años de realizada la síntesis. Se observa que la forma del plasmón se mantiene con el tiempo pero, sin embargo, se observa un corrimiento del pico máximo de extinción para ambos pH: a pH 9 de 527 nm a 536 nm y a pH 11 de 522 nm a 529 nm.

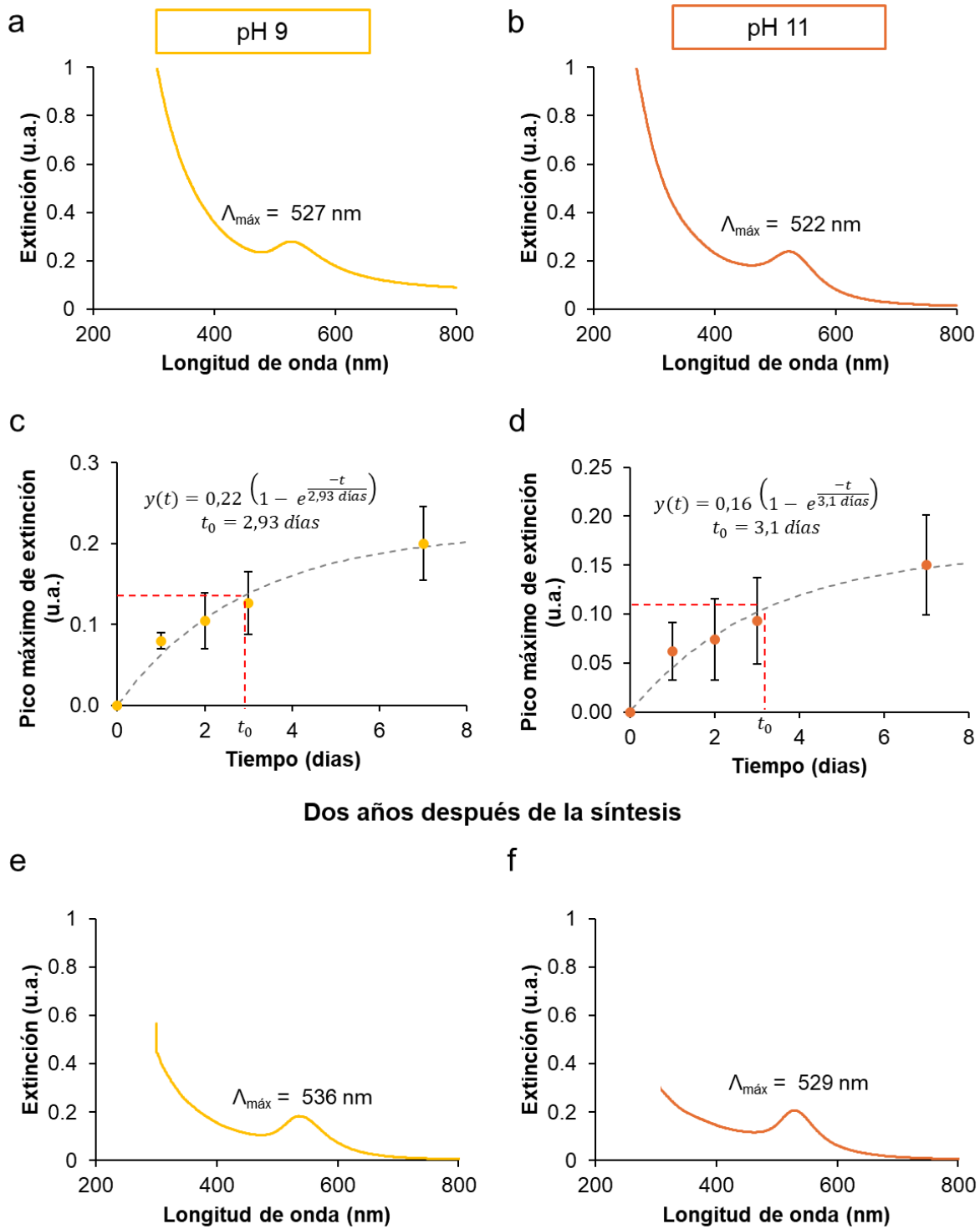


Figura 51. Espectroscopía de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*. **(a)** Espectro de extinción de la síntesis de AuNPs sintetizadas a pH 9. **(b)** Espectro de extinción de la síntesis de AuNPs sintetizadas a pH 11. **(c)** Comportamiento del valor máximo del pico de extinción vs tiempo de la síntesis de AuNPs a pH 9 y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar **(d)** Comportamiento del pico de plasmón vs tiempo de la síntesis de AuNPs a pH 11 y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. **(e)** Espectro de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 9 luego de 2 años. **(f)** Espectro de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 11 luego de 2 años.

La **Figura 52** muestra las imágenes SEM de las AuNPs producidas con la cepa de *C. luteoalbus* a pH 9 (**Figuras 52(a)** y **52(b)**) y a pH 11 (**Figuras 52(c)** y **52(d)**). En las **Figuras 52(a)** y **52(c)** se observan distintos aglomerados distribuidos en la placa a una escala de 100 nm, mientras que en las **Figuras 52(b)** y **52(d)** se observan aglomerados de NPs esféricas y otras de forma irregular a una escala de 20 nm.

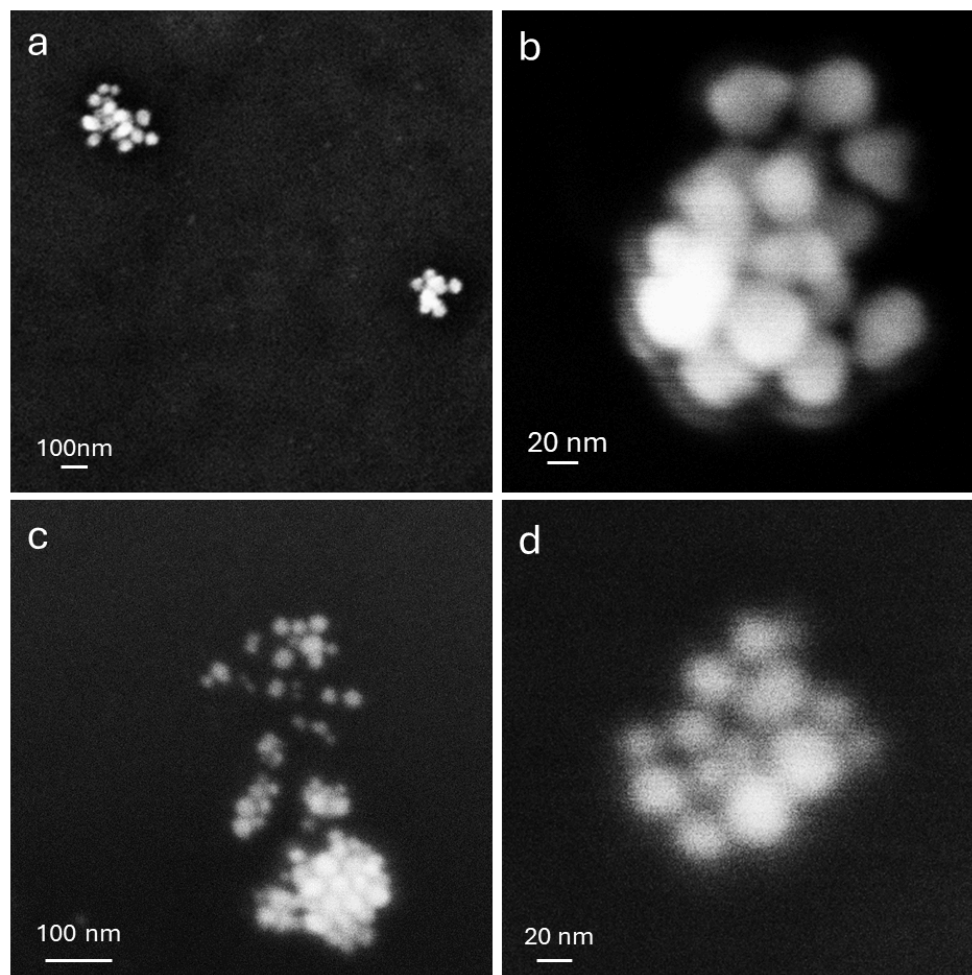


Figura 52. Imágenes SEM de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*. **(a)** pH 9, distintos aglomerados distribuidos en la escena. **(b)** pH 9, aglomerado de AuNPs con formas esféricas e irregulares. **(c)** pH 11, distintos aglomerados distribuidos en la imagen con NPs mayormente esféricas. **(d)** pH 11, aglomerado de AuNPs con formas mayormente esféricas.

La **Figura 53** muestra dos imágenes panorámicas TEM en campo oscuro de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *C. luteoalbus* a pH 9, en escalas de 500 y 200 nm. La **Figura 53(a)** muestra NPs cercanamente esféricas depositadas sobre una zona blanquecina. La **Figura 53(b)** muestra una región de la grilla que contiene NPs de 50 nm de diámetro aproximadamente.

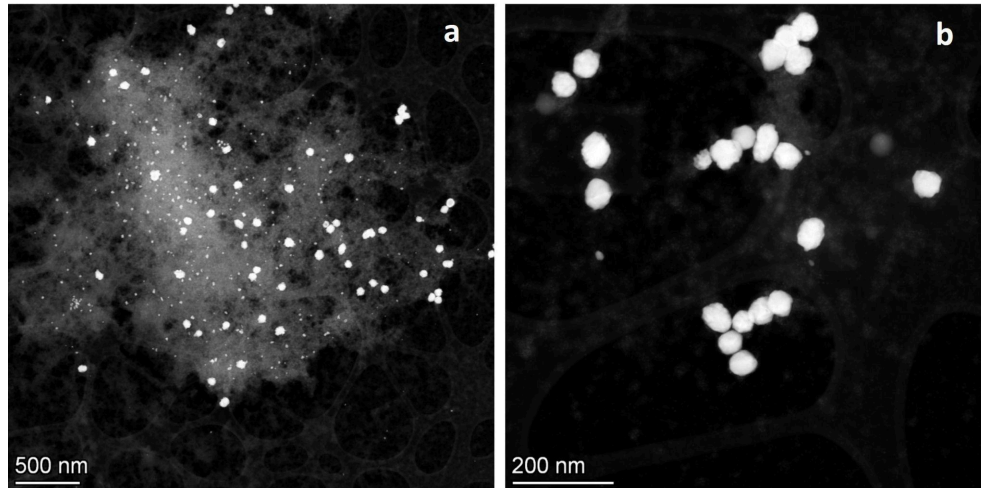


Figura 53. Imágenes panorámicas de AuNPs tomadas por TEM sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9.
(a) Escala de 500 nm. (b) Escala de 200 nm.

La **Figura 54(a)** muestra una panorámica (escala de 100 nm) en la que se observan NPs no estrictamente esféricas. En la **Figura 54(b)** se muestra el mapeo de componentes elementales (EDS) de Au superpuesta con la imagen de la **Figura 54(a)**, mientras que las **Figuras 54(c)** y **54(d)** muestran los mapeos de Au y Cl separadamente, concentrados en las regiones donde están las NPs.

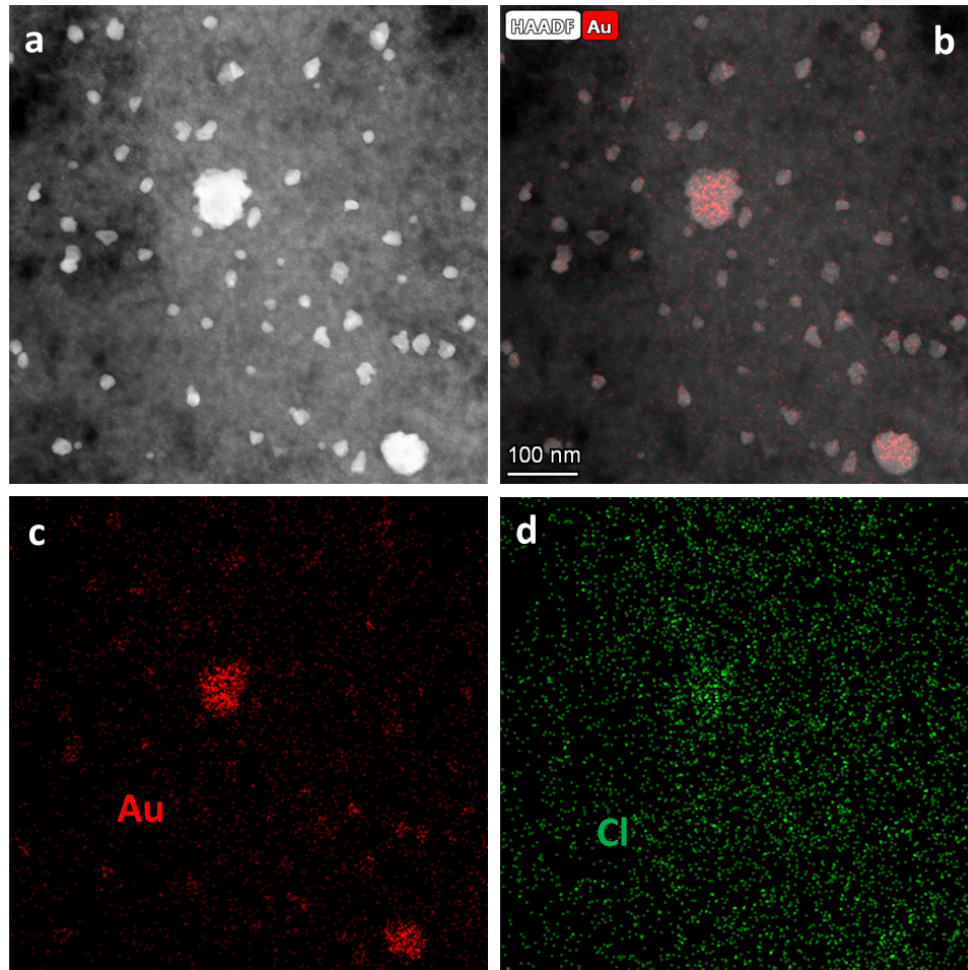


Figura 54 Imágenes TEM de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9. **(a)** Imagen panorámica donde se observan NPs no estrictamente esféricas. **(b)** Mapeo de componentes elementales de Au superpuesta con la imagen de (a). **(c)** Mapeo de componentes elementales de Au por separado. **(d)** Mapeo de componentes elementales de Cl.

La **Figura 55** muestra la imagen de otra AuNP aislada en escala de 20 nm sintetizada con *C. luteoalbus* a pH 9. La **Figura 55(a)** muestra que la forma es aproximadamente elipsoidal, de 40 nm de eje menor y 60 nm de eje mayor, sin embargo, no es una forma que represente a la mayoría de las NPs. La **Figura 55(b)** muestra el mapeo de la composición elemental del Au, observando que los puntos rojos se concentran espacialmente en la región donde se encuentra la NP. La **Figura 55(c)** muestra la superposición del mapeo del Au con la imagen de la NP de la Figura 55(a) que muestra la coincidencia espacial de las mismas. La **Figura 55(d)** muestra el mapeo de Cl (puntos verdes) proveniente del HCl (usado para el control del pH), también acumulado en la región donde se encuentra la NP.

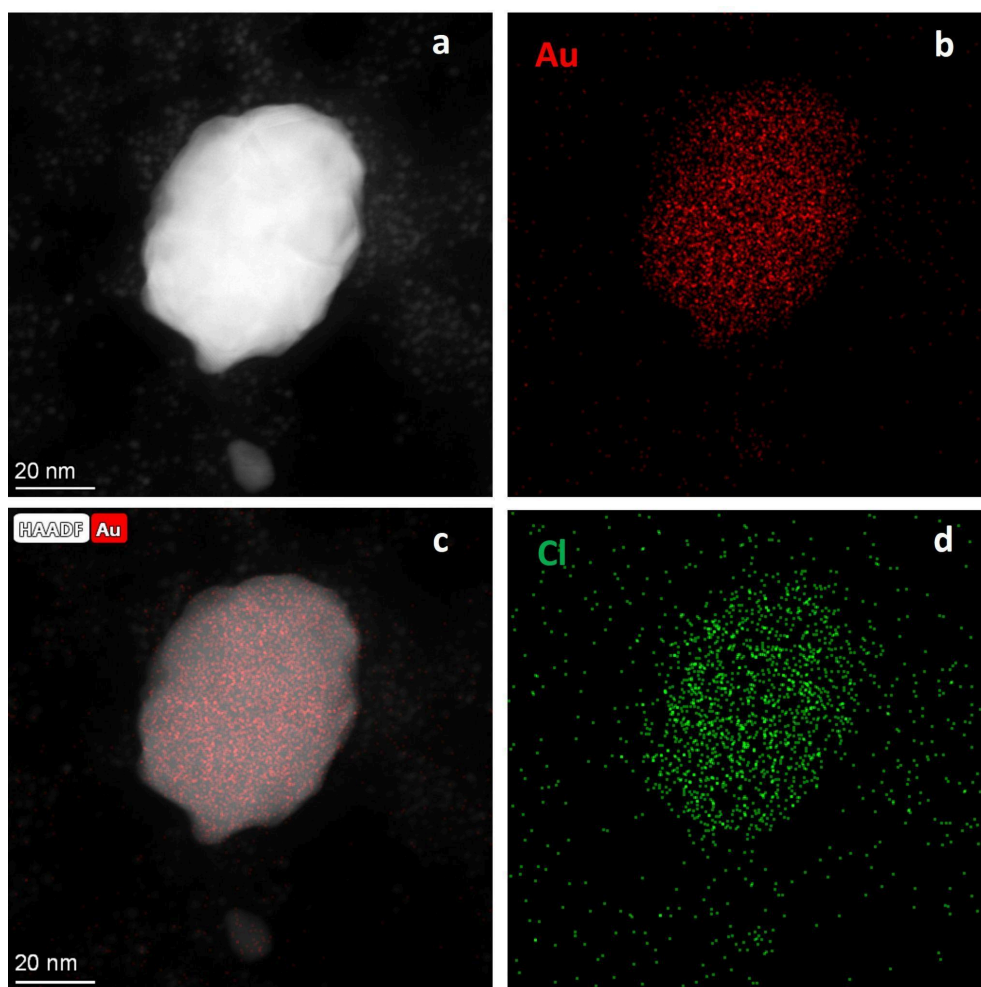


Figura 55. Imagen de una NP aislada sintetizada con *C. luteoalbus* a pH 9 en escala de 20 nm. **(a)** Se observa una forma aproximadamente elipsoidal, de 40 nm de eje menor y 60 nm de eje mayor. **(b)** Mapeo de la composición elemental del Au. **(c)** Superposición del mapeo de Au con la imagen de la NP de (a). **(d)** Mapeo de Cl marcado en puntos verdes, acumulado en la región donde se encuentra la NP.

La **Figura 56** muestra el espectro EDS de los componentes elementales de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *C. luteoalbus* a pH 9. Se puede observar el Au proveniente de la NP, Cu proveniente de la grilla y Cl proveniente del HCl utilizado para el control del pH.

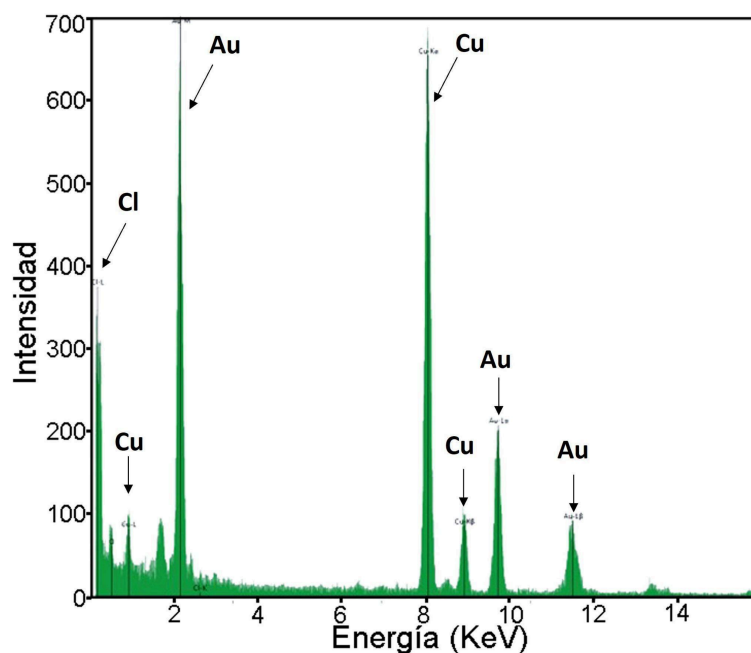


Figura 56. Espectro EDS de los componentes elementales. Se puede observar la presencia de Au de las NPs, Cu proveniente de la grilla y Cl proveniente del HCl utilizado para el control del pH.

La **Figura 57** muestra 3 imágenes de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *C. luteoalbus* a pH 9, en escalas de 50 nm (**Fig. 57(a)**, **57(b)** y **57(c)**) y otra en escala de 20 nm (**Fig. 57(d)**). En este último caso una de las NPs tiene un aspecto estratificado, que seguramente está relacionado con la forma de crecimiento que presenta este hongo con este valor de pH.

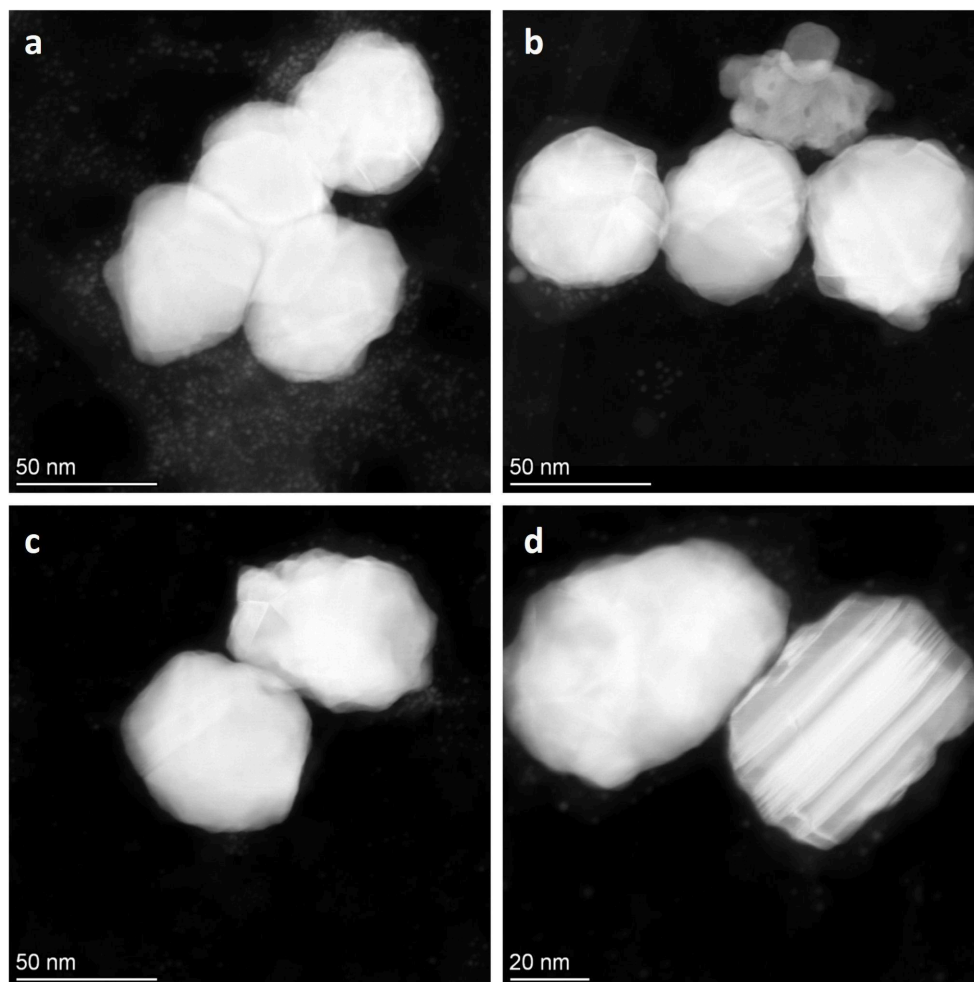


Figura 57. Imágenes TEM de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *C. luteoalbus* a pH 9. **(a)**, **(b)** y **(c)** Imágenes en escalas de 50 nm. **(d)** Imagen en escala de 20 nm donde una de las NPs presenta un aspecto estratificado.

La **Figura 58** es una imagen panorámica TEM campo oscuro de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. Se observan algunos aglomerados producidos durante el proceso de secado para la observación con el TEM.

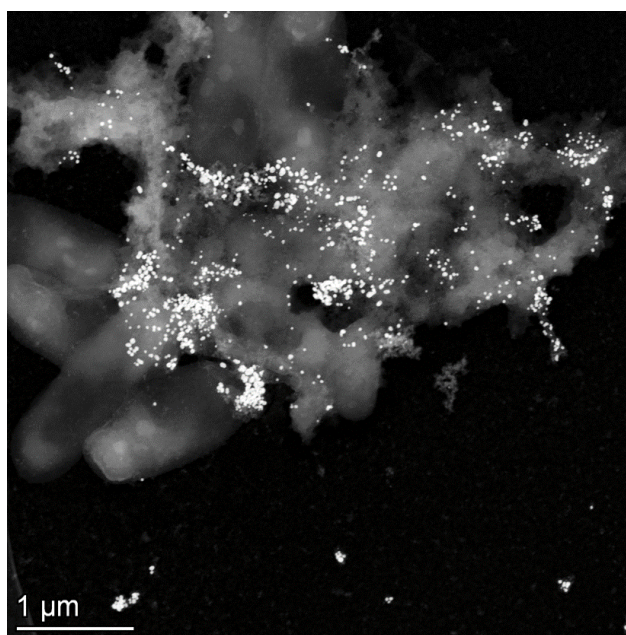


Figura 58. Imagen panorámica de la muestra de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. Se observan las AuNPs sobre un fondo blanquecino, probablemente impurezas de la muestra, y algunos aglomerados.

La **Figura 59** muestra diferentes imágenes panorámicas de AuNPs sintetizadas con *C. lutealbus* a pH 11 en escalas que van entre 200 nm y 20 nm. En esta zona de la grilla se observan nanoestructuras en su mayoría de formas esféricas (o cuasiesféricas), aunque algunas en menor proporción tienen formas hexagonales, cúbicas, pentagonales, elipsoidales, etc., tal como se indican con flechas amarillas.

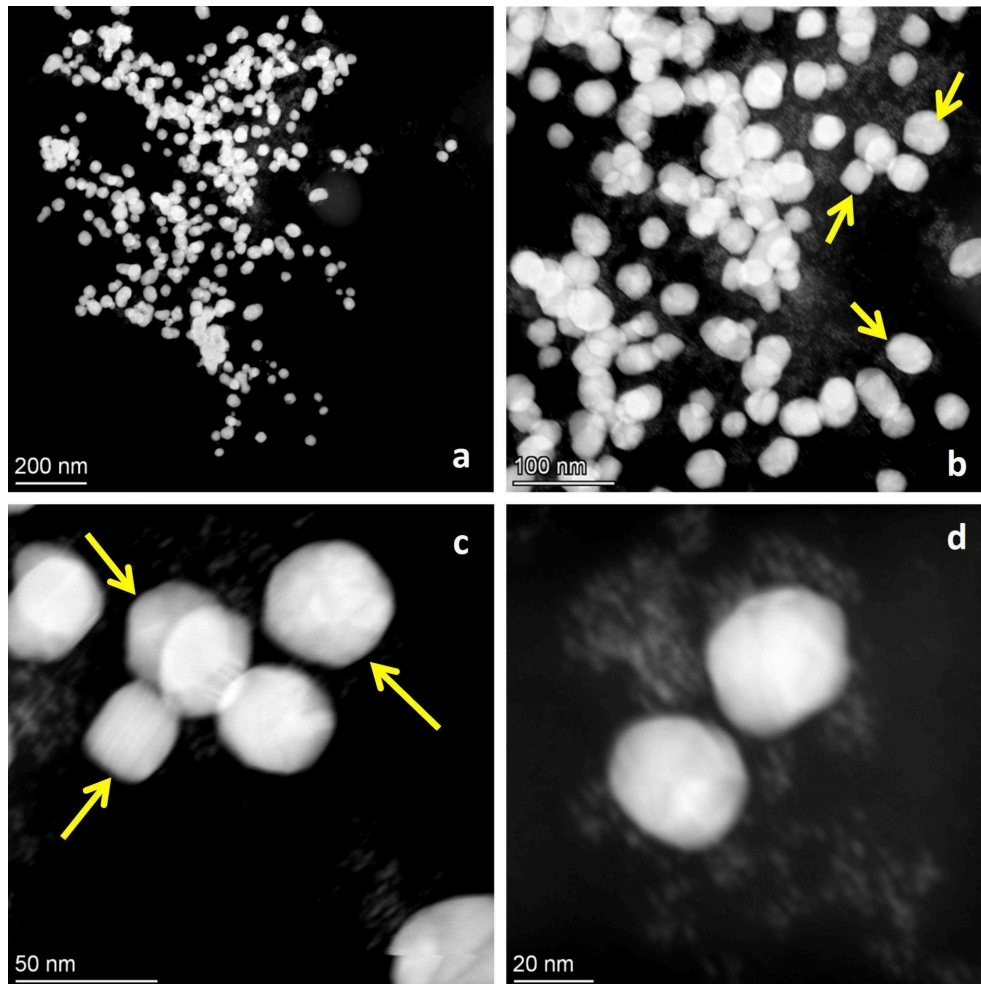


Figura 59. Imágenes de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11 a distintas escalas. **(a)** 200 nm. **(b)** 100 nm. **(c)** 50 nm. **(d)** 20 nm. Se observan nanoestructuras con distintas morfologías, indicadas con flechas amarillas.

La **Figura 60** muestra una imagen de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. La **Figura 60(a)** muestra una zona particular de la grilla sobre la que se realizó el análisis de composición elemental. La **Figura 60(b)** muestra en puntos rojos la presencia de Au acumulado en zonas espaciales que coinciden con los lugares donde se encuentran las NPs, como se observa en la superposición de la **Figura 60(c)**. La **Figura 60(d)** muestra en puntos verdes la presencia de Cl proveniente del HCl utilizado para el control del pH.

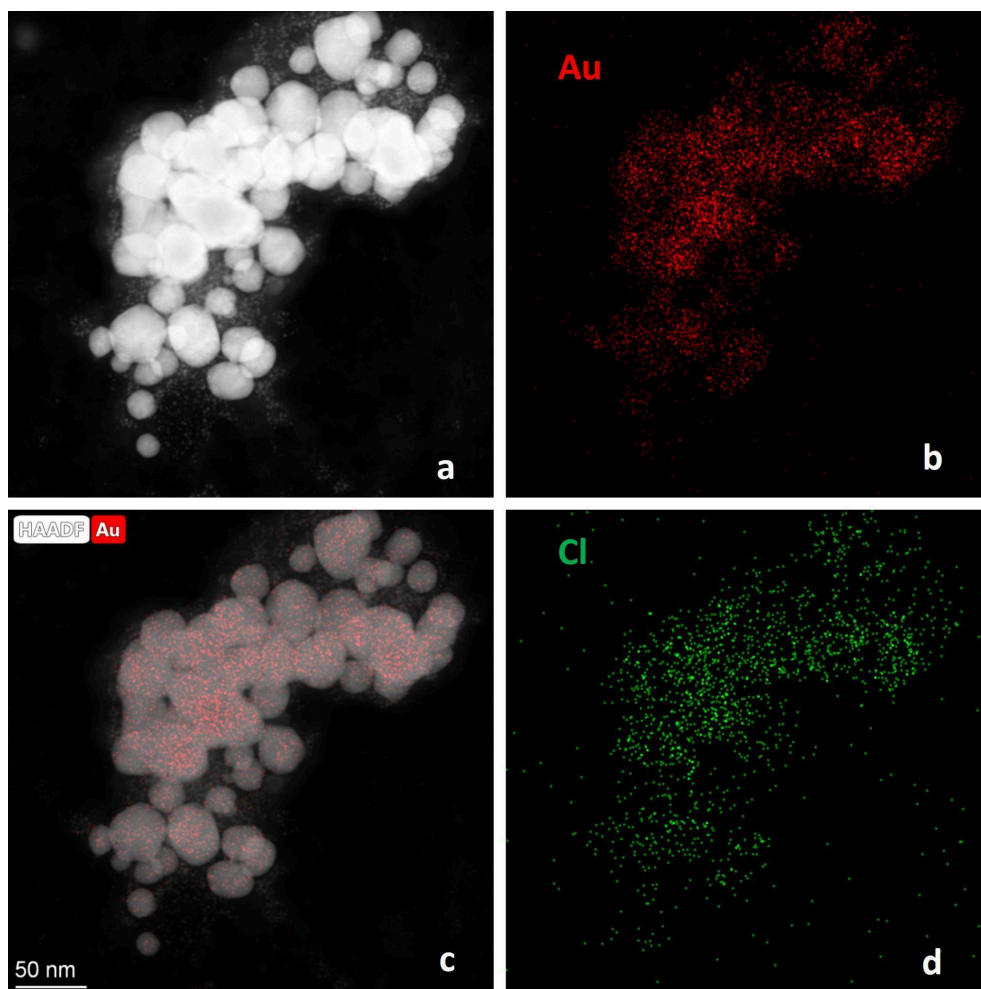


Figura 60. Imágenes de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. **(a)** AuNPs en escala de 50 nm. **(b)** Mapeo de la composición elemental de Au representada con puntos rojos. **(c)** Superposición de (a) y (b). **(d)** Mapeo de Cl marcado en puntos verdes, acumulado en la región donde se encuentran las NPs.

La **Figura 61** muestra el espectro EDS realizado sobre una zona con presencia de NPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11, que evidencia la presencia de Au y Cl provenientes del proceso de fabricación de las AuNPs y además Cu y Si provenientes de la composición de las grillas.

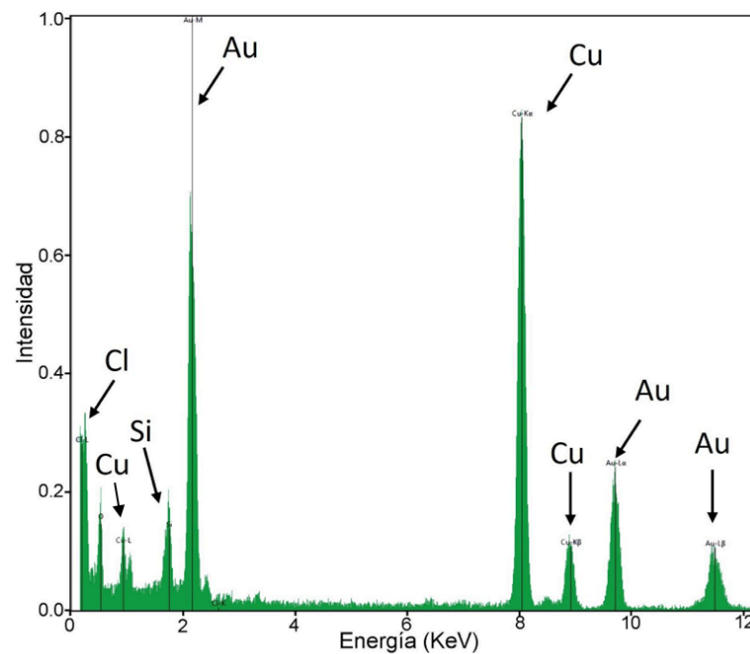


Figura 61. Espectro EDS realizado sobre una zona con presencia de NPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. Se observan picos correspondientes a Au, Cl provenientes del proceso de fabricación de las nanoestructuras y además Cu y Si provenientes de la composición de las grillas.

La **Figura 62** muestra NPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11 con otro tipo de formas, localizadas en otro sector de la grilla. Las **Figuras 62(a)** y **62(b)** muestran imágenes en escalas de 500 nm, conteniendo unas pocas NPs esféricas y gran cantidad de nanoestructuras en forma de agujas adosadas a material biológico. Ambos tipos de estructuras están señaladas con flechas amarillas. Las **Figuras 62(c)** y **62(d)** muestran nanoestructuras en forma de aguja depositadas sobre otra zona de la grilla.

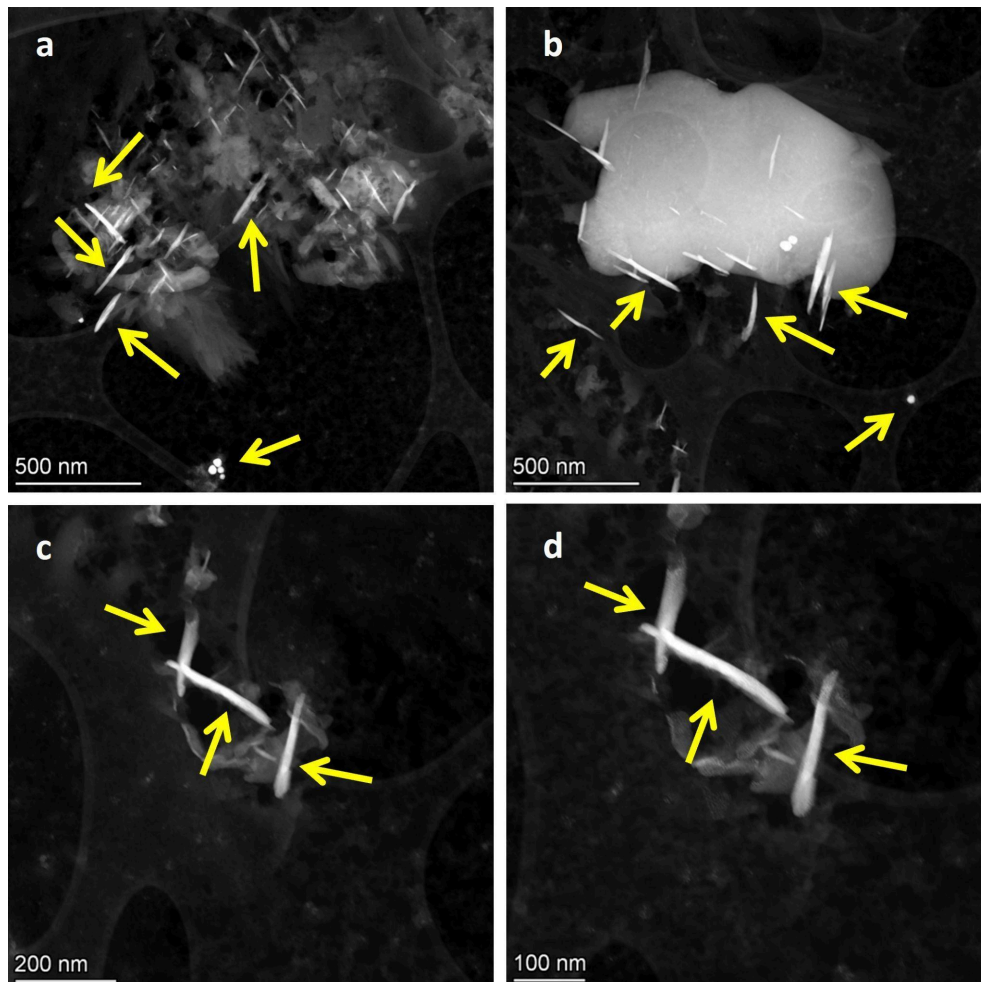


Figura 62. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. **(a)** y **(b)** Imágenes en escalas de 500 nm, donde se observan estructuras en forma de agujas y algunas NPs esféricas, ambas señaladas con flechas amarillas. **(c)** y **(d)** Nanoestructuras en forma de aguja depositadas sobre otra zona de la grilla.

La **Figura 63(a)** muestra una zona particular de la grilla sobre la que se realizó el análisis de la composición elemental de una nanoestructura particular sintetizada con *C. luteoalbus* a pH 11. La **Figura 63(b)** muestra en puntos rojos la presencia de Au acumulado en zonas donde se encuentran las nanoestructuras en forma de agujas. La superposición de las **Figuras 63(a)** y **63(b)** se observa en la **Figura 63(c)**. La **Figura 63(d)** muestra en puntos verdes la presencia de Cl proveniente del HCl utilizado para el control del pH, también depositado sobre la nanoestructura.

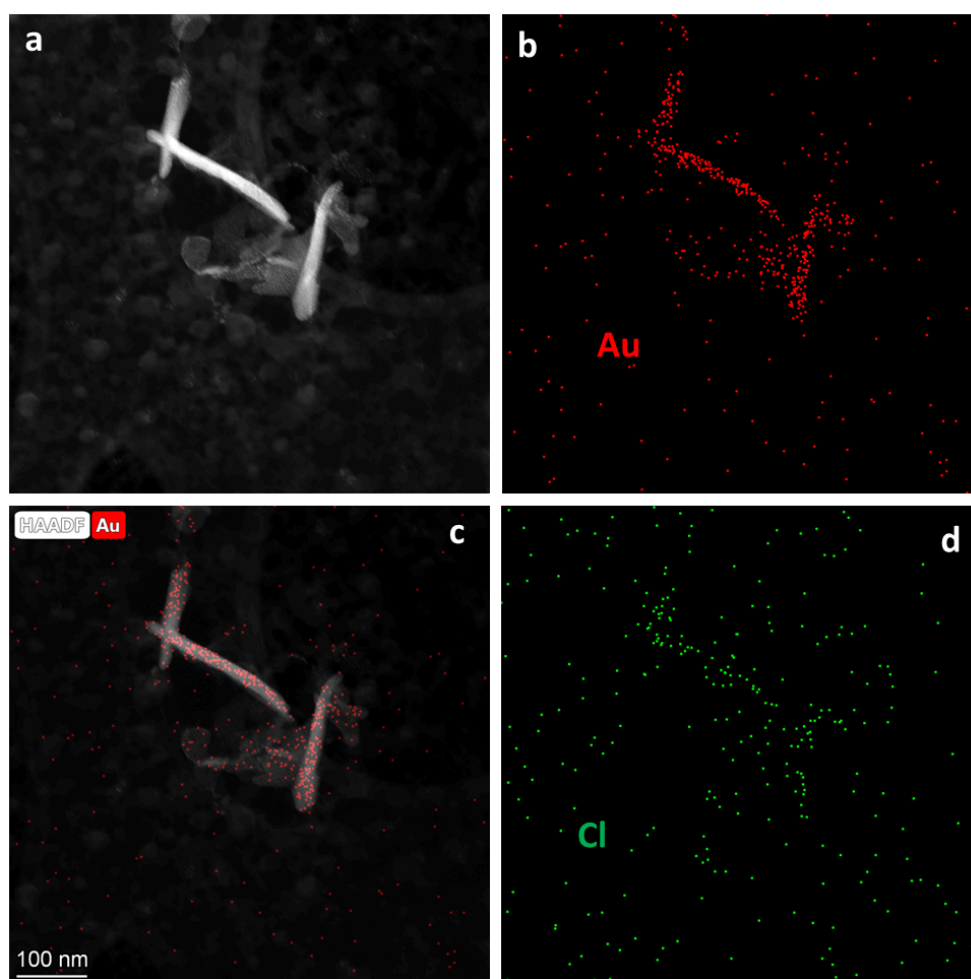


Figura 63. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11. **(a)** Zona de la grilla sobre la que se realizó el análisis de composición elemental de la nanoestructura observada. **(b)** Presencia de Au representado con puntos rojos depositados sobre las nanoagujas **(c)** Superposición de (a) y (b). **(d)** Presencia de Cl representado por puntos verdes.

La **Figura 64** muestra los espectros FTIR-ATR obtenidos para las AuNPs liofilizadas sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9 y pH 11 (**Fig. 64(a)** y **Fig. 64(b)**). A pH 9 se observan picos en 3254, 2915, 1634, 1539, 1395 y 1022 cm^{-1} . A pH 11 se observan picos en 3274, 2915, 2848, 1635, 1540, 1338, 998, 832 y 600 cm^{-1} . En la **Tabla 8** se detallan las posibles asignaciones de los picos.

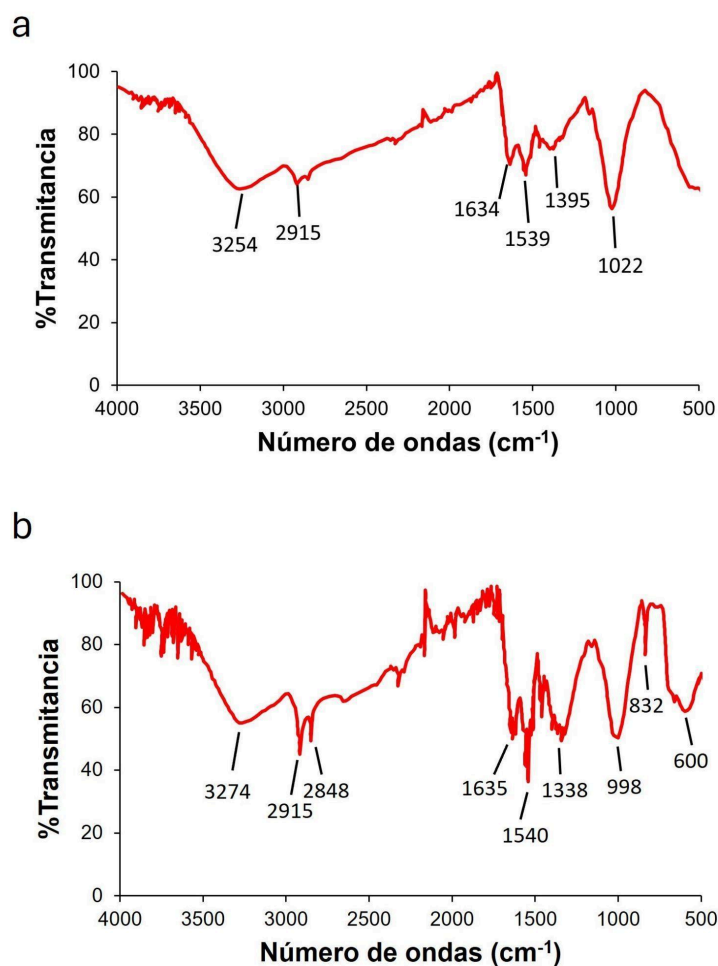


Figura 64. Espectros FTIR-ATR obtenidos de muestras liofilizadas de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*. **(a)** pH 9. **(b)** pH 11.

Número de ondas (cm ⁻¹)		Grupo funcional	Referencia
pH 9	pH 11		
3254	3274	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2915	2915	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
	2848	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
1634	1635	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1539	1540	banda atribuida a Amida II, derivada principalmente del estiramiento C-N junto con la flexión en el plano N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1395	1338	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1022	998	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014
	832	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
	600	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 8. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus*.

La **Figura 65** muestra el espectro experimental de extinción y el ajuste realizado para las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9. El espectro experimental fue ajustado con la distribución de tamaño mostrada en el inset de la figura. Esta distribución incluye distintos tamaños compatibles con las dimensiones de las NPs que aparecen en las imágenes SEM y TEM de las **Figuras 52 a 55 y 57**.

Dado que la muestra de AuNPs para este pH contiene mayoritariamente partículas esféricas y de otras geometrías cuasi esferoidales, se ajustó sólo la parte del espectro de extinción correspondiente al pico del plasmón, producido mayoritariamente por las NPs esféricas, ya que la presencia de las otras geometrías altera principalmente las alas laterales del espectro.

Respecto a las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 11, no fue posible realizar el análisis a través del ajuste del espectro de extinción experimental por Teoría de Mie, debido a la presencia de numerosas nanoestructuras con forma de agujas en la muestra, tal como se observa en las **Figuras 62 y 63**, que influyen fuertemente la respuesta de extinción.

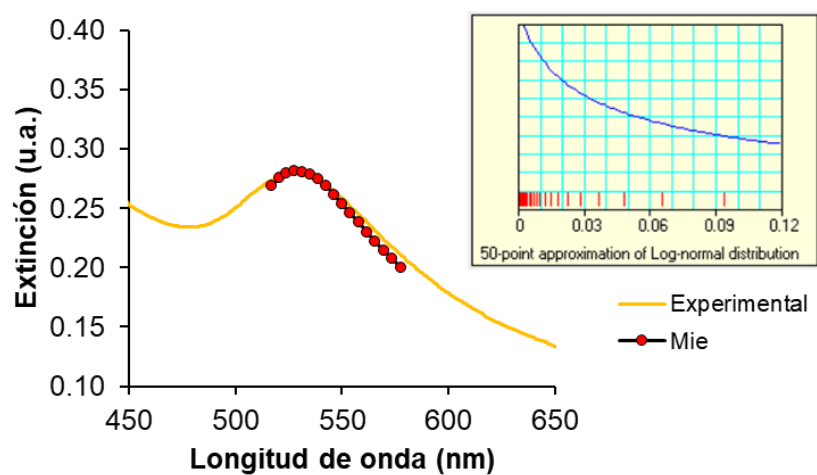


Figura 65. Espectro de extinción de AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9 y ajuste parcial usando el modelo teórico basado en teoría de Mie, de acuerdo a la distribución de tamaños mostrada en el inset del gráfico. El inset representa la distribución log normal de tamaños; eje X: radio en micrómetros; eje Y: frecuencia de aparición (sin unidades) calculado para 50 nanopartículas.

II.3.3. *Talaromyces assiutensis*

Caracterización morfológica

Talaromyces assiutensis, Samson & Abdel-Fattah, Persoonia 9(4): 501 (1978).

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Aspecto de la colonia: micelio blanquecino de crecimiento rápido. El reverso también es blanco. A los 7 días de crecimiento se empieza a observar sobre el micelio unas pequeñas estructuras esféricas que dan a la colonia un aspecto pulverulento y que se corresponden con ascomas cleistoteciales en formación.

Caracteres microscópicos: Micelio ramificado y tabicado, hialino. Ascosporas elipsoidales.

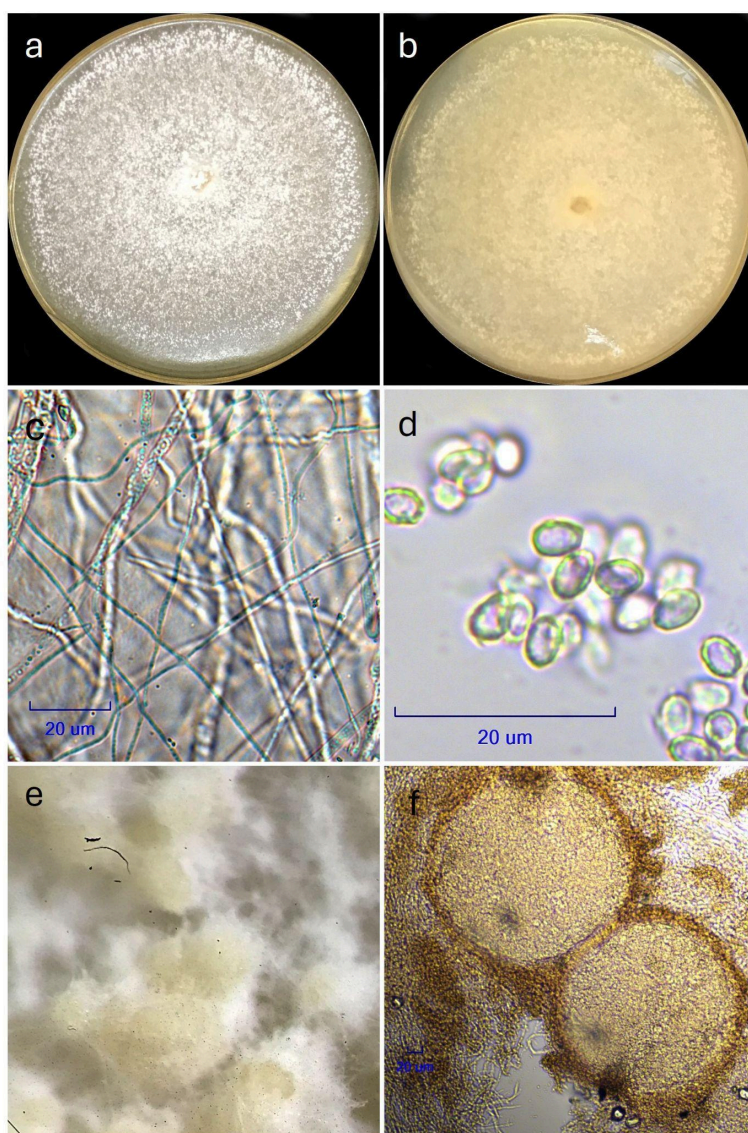


Figura 66. *Talaromyces assiutensis*. (a) Aspecto superficial de la colonia luego de dos semanas de crecimiento. (b) Reverso de la colonia. (c) Micelio. (d) Ascosporas. (e) Ascomas vistos bajo lupa. (f) Ascomas vistos bajo microscopio.

Caracterización molecular

Con el objetivo de corroborar la identificación taxonómica de la cepa, ésta se secuenció y se comparó con un total de 28 secuencias (**Tabla 2'**, **Anexo**). Se realizaron análisis de máxima verosimilitud y máxima parsimonia (MP). El árbol de máxima verosimilitud fue construido bajo el modelo de Kimura 2 parámetros (K2) + Distribución Gamma (G). El análisis de MP dio como resultado 4 árboles filogenéticos de máxima parsimonia. Los resultados obtenidos del análisis filogenético de máxima verosimilitud indican que la cepa está asociada a la especie *Talaromyces assiutensis*. El análisis de MP muestra una asociación entre la cepa estudiada y la especie *T. trachyspermus*, basónimo de *T. assiutensis*. Las **Figuras 67 y 68** muestran el árbol de máxima verosimilitud y el árbol consenso Bootstrap de máxima parsimonia respectivamente.

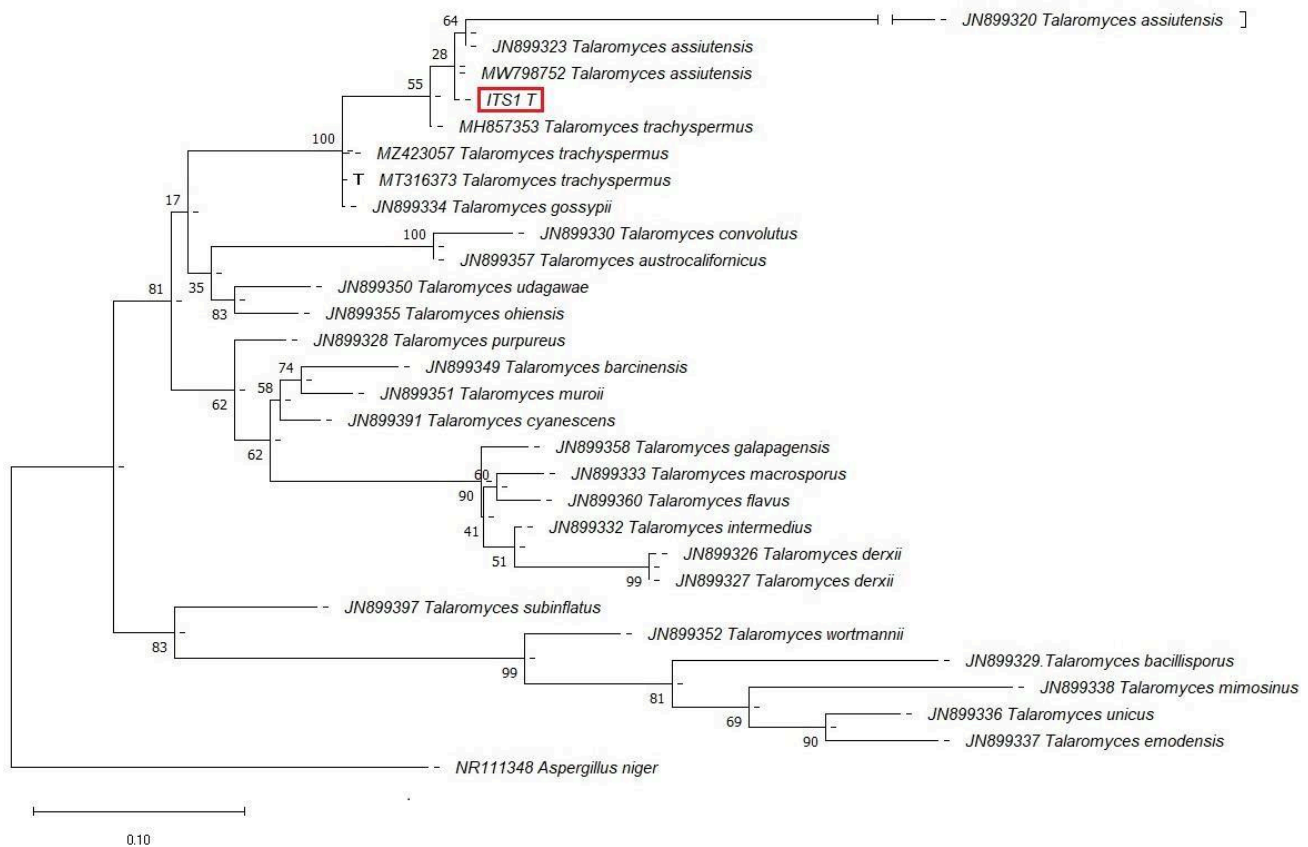


Figura 67. Árbol de máxima verosimilitud. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala y las longitudes de las ramas se miden en función del número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 29 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 1852 posiciones en el conjunto de datos finales. La cepa estudiada se encuentra remarcada con un cuadro rojo.

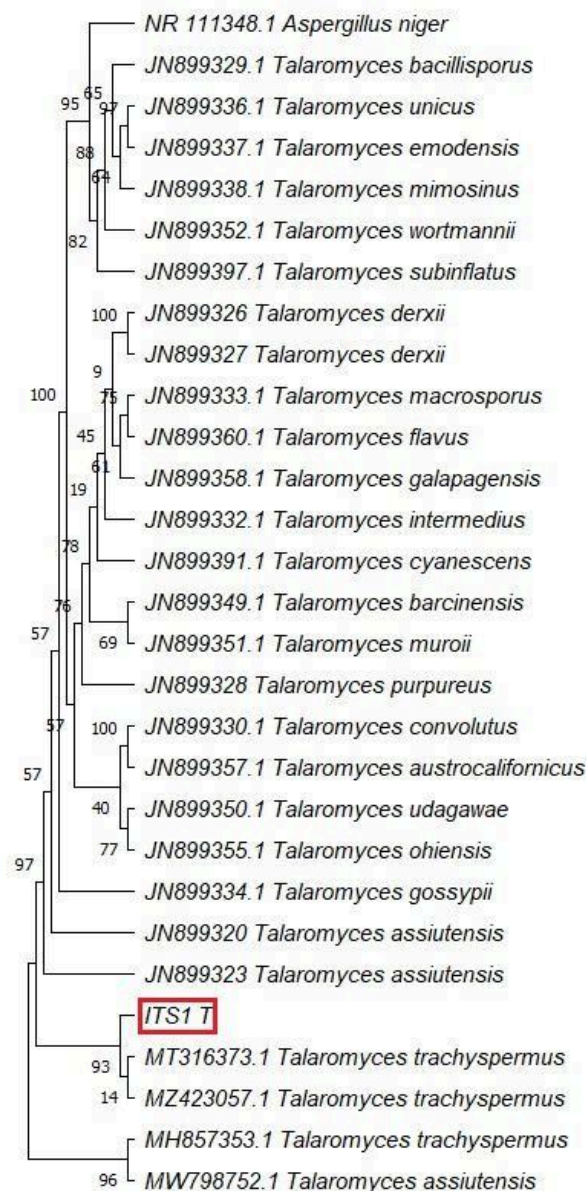


Figura 68. Árbol de Máxima Parsimonia. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas. Este análisis involucró 29 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 1852 posiciones en el conjunto de datos finales. La cepa estudiada se encuentra remarcada con un cuadro rojo.

Caracterización fisiológica

A continuación se describen los resultados obtenidos para la curva de crecimiento, análisis de proteínas y azúcares reductores y perfil enzimático.

Curva de crecimiento: La **Figura 69** muestra la curva de crecimiento para la cepa utilizada de *T. assiutensis* utilizada luego para la síntesis de NPs, bajo las condiciones ensayadas detalladas en materiales y métodos.

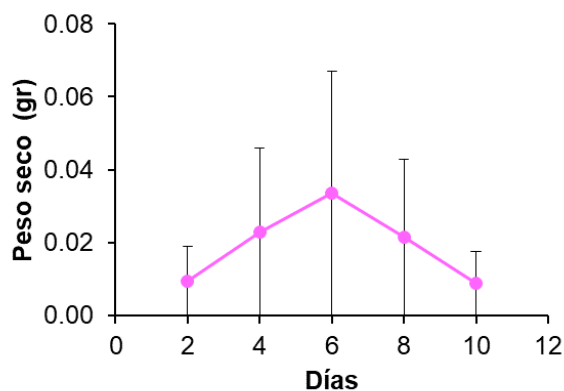


Figura 69. Curva de crecimiento correspondiente a la cepa de *T. assiutensis* utilizada para la síntesis de NPs.

Análisis de proteínas totales y azúcares reductores: Los análisis realizados mediante la metodología de Bradford para la cuantificación de proteínas y de Somogyi-Nelson para la cuantificación de azúcares reductores dieron resultados cercanos a cero en todas las cepas y réplicas ensayadas.

Perfil enzimático: Esta cepa fue obtenida en el contexto de una evaluación de hongos endófitos de raíz, por lo que se analizó su capacidad de solubilizar fósforo mediante su cultivo en sustrato NBRIP, siendo positiva la reacción (+++).

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (*Talaromyces assiutensis*)

La **Figura 70** muestra el espectro de extinción obtenido para la síntesis de AgNPs obtenidas a pH 9, concentración 0,5 mM (**Fig. 70(a)**), y los picos máximos de extinción en función del tiempo expresado en días y el ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis indicando un valor característico $t_0 = 0,75$ días y un valor $A = 1,24$ (**Fig. 70(b)**). Se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 412 nm. A pH 5 no se observaron resultados de síntesis.

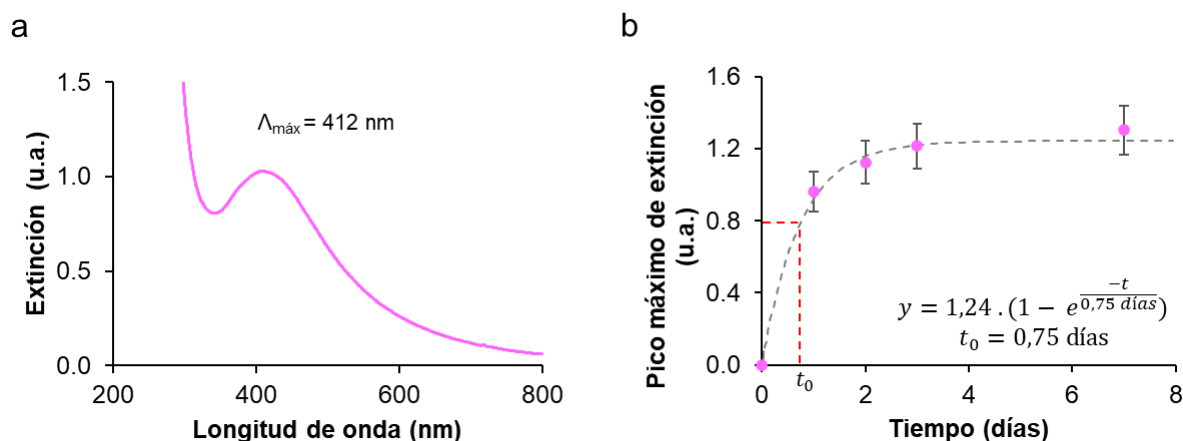


Figura 70. Espectroscopía de las AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. **(a)** Espectro de extinción de las AgNPs sintetizadas, al séptimo día. **(b)** Pico máximo del espectro de extinción vs días y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A), las barras de error representan el error estándar.

La **Figura 71** muestra las imágenes obtenidas mediante SEM de las AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. En la **Figura 71(a)** se observan algunos cúmulos de AgNPs rodeadas de material biológico en una escala de 100 nm. En la **Figura 71(b)** se observa con mayor detalle en escala de 20 nm un aglomerado de AgNPs, rodeada de con gran cantidad de material biológico.

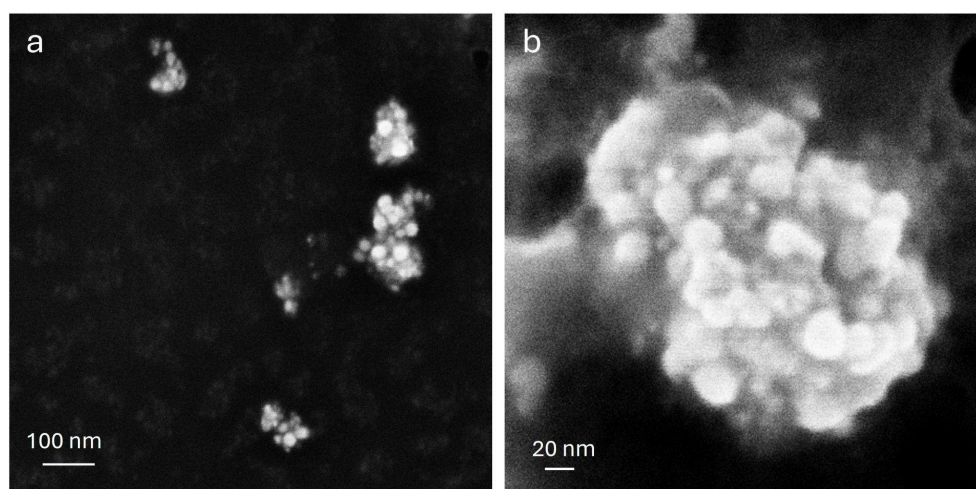


Figura 71. Imágenes SEM de las AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. **(a)** Imagen panorámica. **(b)** Detalle de las NPs.

La **Figura 72(a)** muestra la imagen HAADF de NPs esféricas sintetizadas con *T. assiutensis*, distribuidas en la periferia de estructuras en forma de placas (nanoplates). La **Figura 72(b)** muestra un mapeo EDS de Ag donde se observa que este elemento se distribuye fundamentalmente sobre los bordes donde además se ven depositadas otras NPs esféricas. La **Figura 72(c)** muestra una superposición de las **Figuras 72(a)** y **72(b)**. La **Figura 72(d)** muestra un mapeo EDS de Cl. La **Figura 72(e)** muestra la superposición de las **Figuras 72(a)** y **72(d)**.

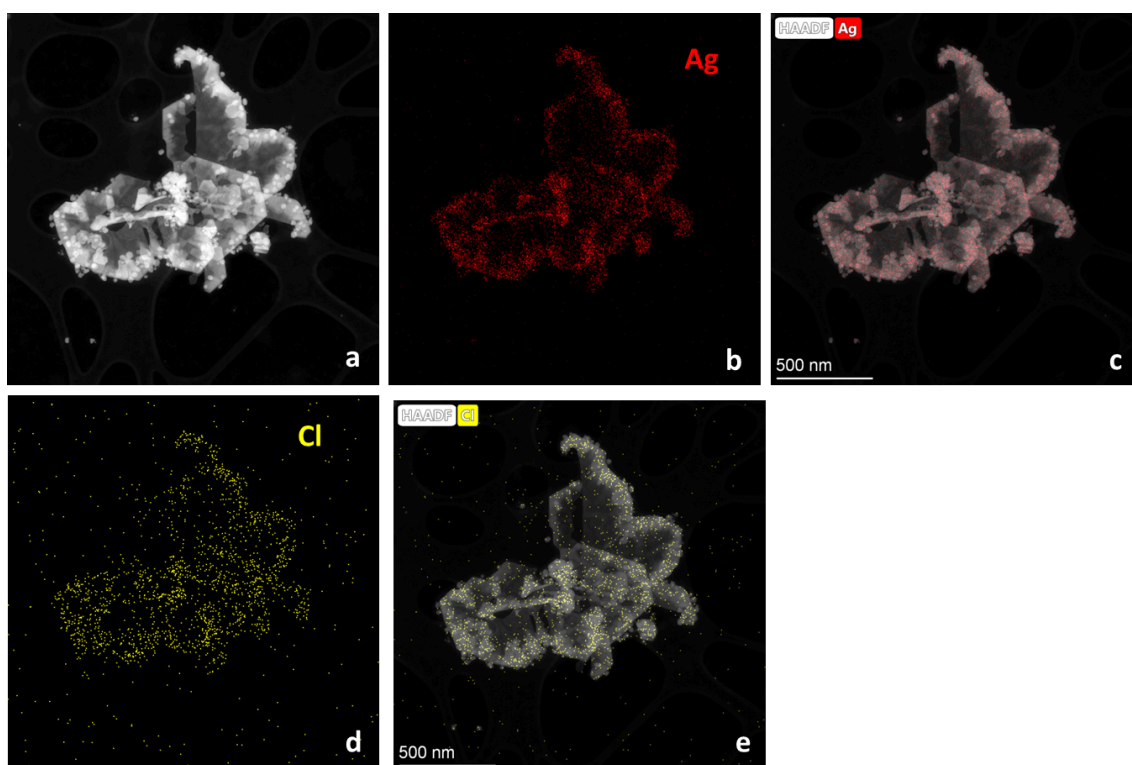


Figura 72. Imagen HAADF de NPs esféricas distribuidas en la periferia de estructuras en forma de placas. **(a)** Imagen original. **(b)** Mapeo de Ag (puntos rojos). **(c)** Superposición de (a) y (b). **(d)** Mapeo de Cl. **(e)** Superposición de (a) y (d).

La **Figura 73** muestra otras imágenes de AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis* registradas en escalas de 200 nm y 50 nm (**Fig. 73(a)** a **73(c)**) donde pueden observarse disposiciones de AgNPs de diferentes formas y tamaños. En la **Figura 73(d)** se muestra el espectro EDS realizado en la región señalada por el cuadrado amarillo, mostrando la composición elemental del fondo de la **Figura 73(c)**. Se observa que aparecen elementos como O, Na, Cu, Si, Cl y muy poca Ag, coincidiendo con lo esperado.

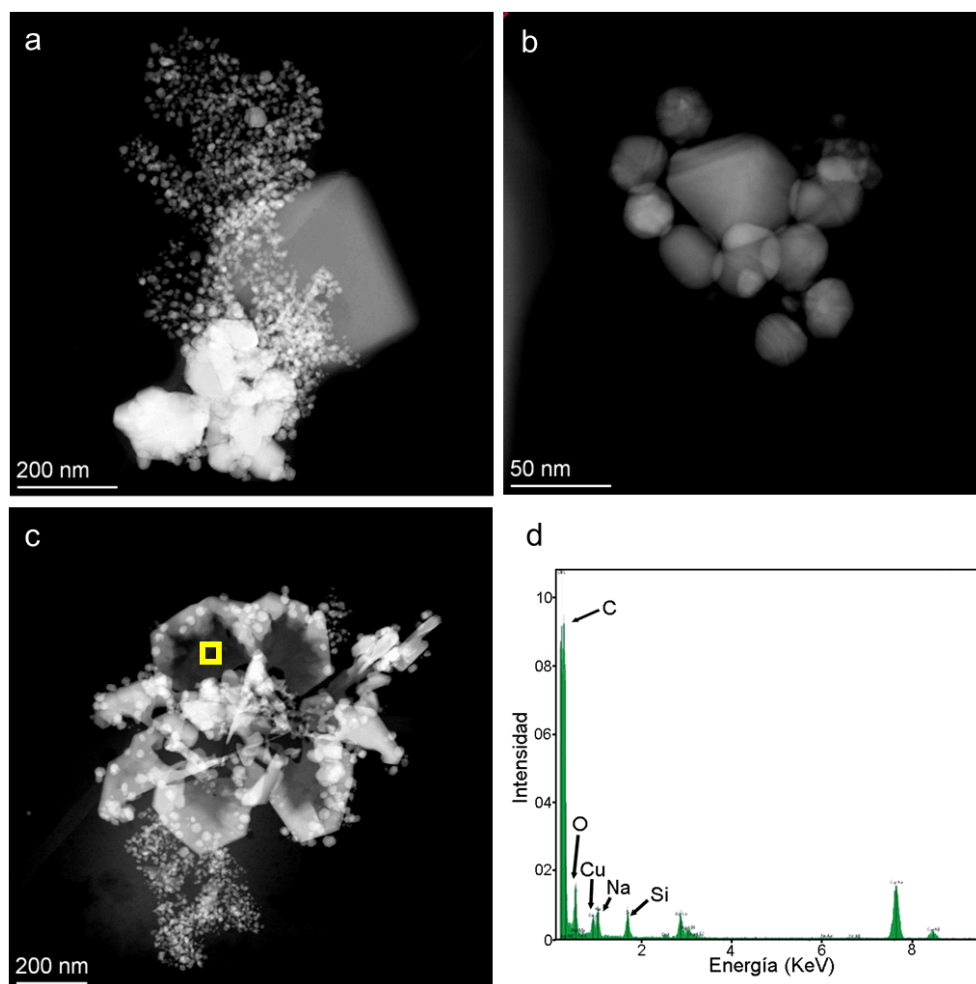


Figura 73. Imágenes TEM de AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. **(a)** y **(c)** Imágenes registradas en escalas de 200 nm donde pueden observarse disposiciones de AgNPs de diferentes formas y tamaños. **(b)** Detalle en escala de 50 nm. **(d)** Espectro EDS realizado en la región señalada por el cuadrado amarillo (fondo) observándose la aparición de O, Na, Cu, Si, Cl y escasa Ag.

La **Figura 74(a)** muestra diferentes nanoestructuras en escala de 500 nm, tal como las dos formas prismáticas y una cilíndrica con incrustaciones. La **Figura 74(b)** es una ampliación del extremo inferior en escala de 200 nm, donde se observa un detalle de la estructura filamentosa decorada por nanoesferas, agujas y otras formas.

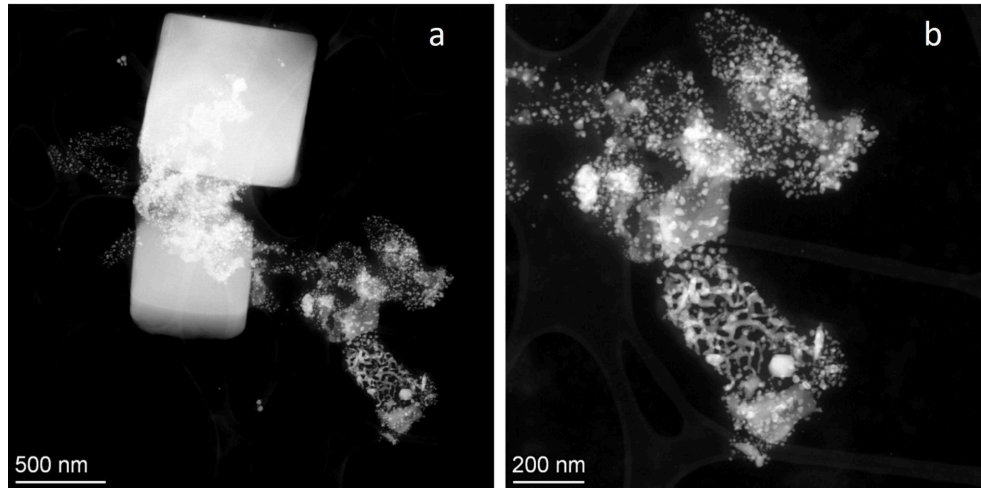


Figura 74. Imágenes TEM de nanoestructuras sintetizadas con *T. assiutensis*. **(a)** Nanoestructuras en escala de 500 nm: dos formas prismáticas y una cilíndrica con incrustaciones. **(b)** Ampliación del extremo inferior en escala de 200 nm, donde se observa una estructura filamentosa, nanoesferas, agujas y otras formas.

La **Figura 75** muestra una imagen HAADF de AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis* en escala de 100 nm. La **Figura 75(a)** muestra estructuras filamentosas decoradas por NPs esféricas y hexagonales. La **Figura 75(b)** muestra el mapeo de Ag superpuesto a la imagen de la **Figura 75(a)**, observándose que la estructura filamentosa también está conformada por el elemento Ag. La **Figura 75(c)** muestra el mapeo de Ag, mientras que la **Figura 75(d)** muestra el componente Cl depositado sobre las nanoestructuras observadas en la **Figura 75(a)**.

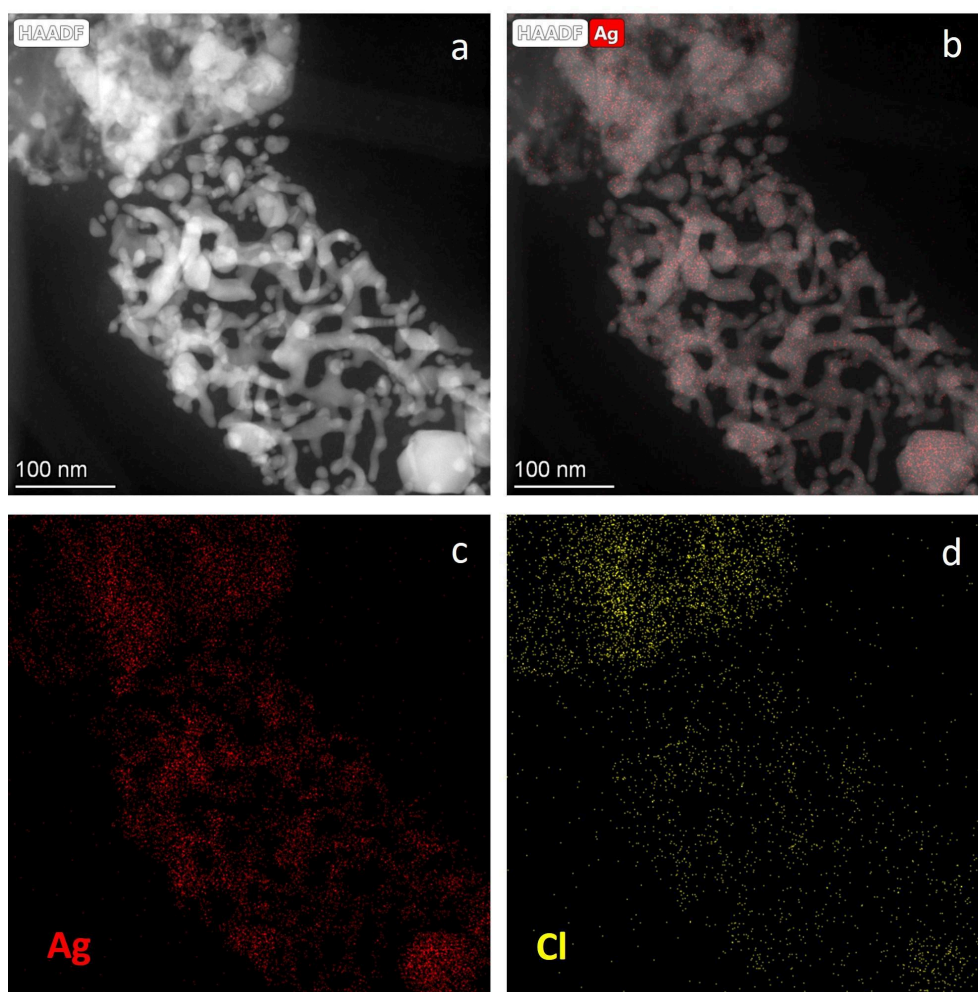


Figura 75. Imagen HAADF de NPs de Ag sintetizadas con *T. assiutensis*, en escala de 100 nm. **(a)** Estructuras filamentosas decoradas por NPs esféricas y hexagonales. **(b)** Mapeo de Ag superpuesto a la imagen de (a). **(c)** Mapeo de Ag. **(d)** Mapeo de Cl.

La **Figura 76** muestra el espectro FTIR-ATR obtenido para las AgNPs liofilizadas sintetizadas con *T. assiutensis*. Se observan picos en 3274, 2919, 1624, 1318, 1031, 831, 774, 617 y 511 cm^{-1} . En la **Tabla 9** se detallan las posibles asignaciones a las bandas de absorbancia.

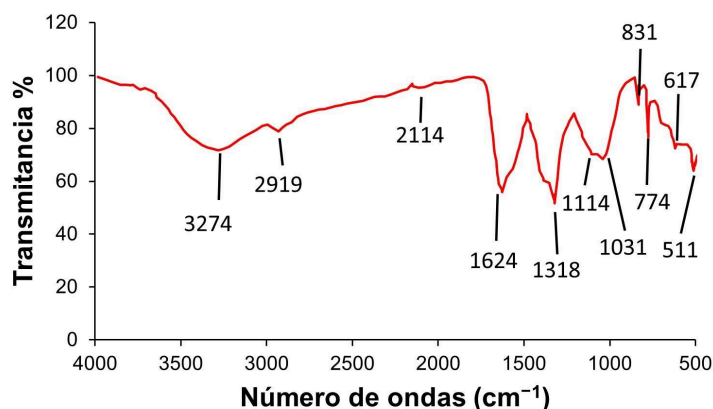


Figura 76. Espectro FTIR-ATR de muestras liofilizadas de AgNPs sintetizadas con el hongo *T. assiutensis*.

Número de ondas (cm^{-1})	Grupo funcional	Referencia
3274	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2919	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Rani <i>et al.</i> , 2017
1624	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1318	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1031	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014
831	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
774	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
617	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000
511	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 9. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*.

El espectro de extinción de esta cepa no pudo ser ajustado mediante la teoría de Mie debido a la fuerte presencia de estructuras no esféricas en el coloide.

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (*Talaromyces assiutensis*)

La **Figura 77(a)** muestra el espectro de extinción obtenido para la síntesis AuNPs obtenidas a pH 5 y 28°C, concentración 0,5 mM. A pH 9 y pH 11 no se observaron resultados de síntesis. Se observa la aparición de una banda plasmónica cuyo máximo se presenta alrededor de 546 nm y otro incipiente pico alrededor de 700 nm. La **Figura 77(b)** muestra el máximo de extinción del RPS registrado en función del tiempo expresado en días. Se observa un comportamiento diferente de las otras cepas estudiadas, alcanzando al primer día de síntesis un máximo cercano a 1,03 y disminuyendo hasta quedar en 0,72 durante los días posteriores. La medición luego de dos años de realizada la síntesis no pudo ser llevada a cabo debido a que las AuNPs se encontraban precipitadas.

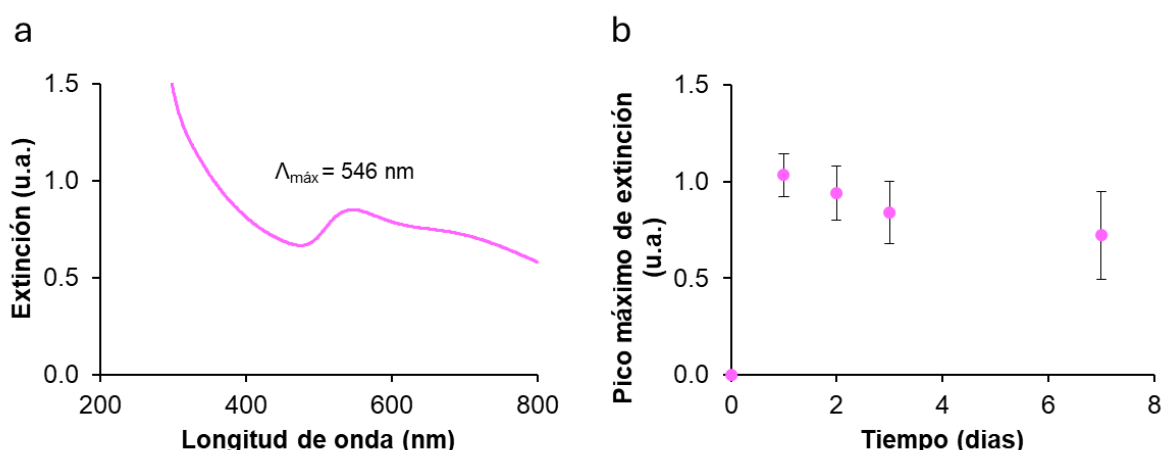


Figura 77. Espectroscopía de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. **(a)** Espectro de extinción de las AuNPs sintetizadas a pH 5. **(b)** Máximos de extinción del RPS principal en función del tiempo. Las barras de error representan el error estándar.

La **Figura 78** muestra las imágenes obtenidas mediante SEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5. Se observa que la mayoría de las AuNPs poseen una morfología esférica (**Fig. 78(a)**), aunque se logra observar NPs con otras morfologías (**Fig. 78(b)**).

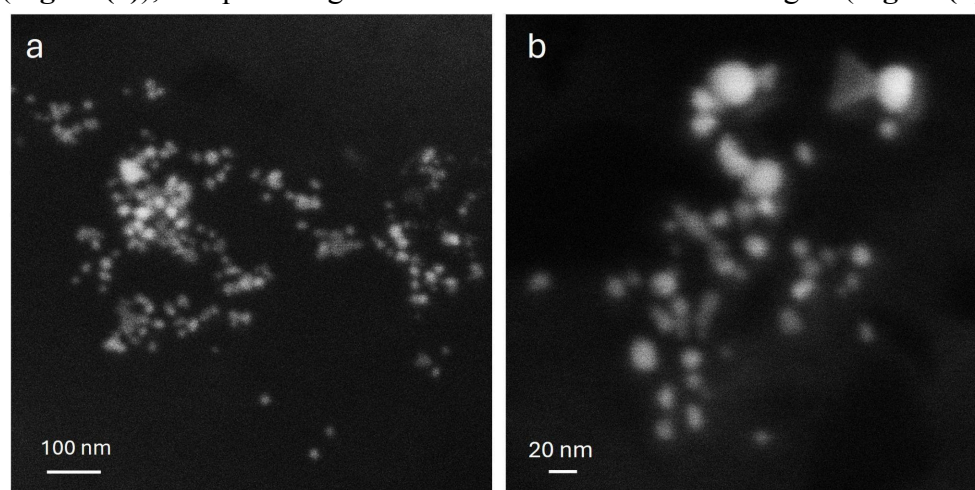


Figura 78. Imágenes SEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5. **(a)** Escala de 100 nm, imagen panorámica. **(b)** Escala de 20 nm, se observan formas esféricas, triangulares y alargadas.

En la **Figura 79** se muestran diferentes imágenes TEM donde se observan mayoritariamente esferas, pero también otras nanoestructuras como triángulos, poliedros y algunas agujas, en escalas de 200 y 100 nm

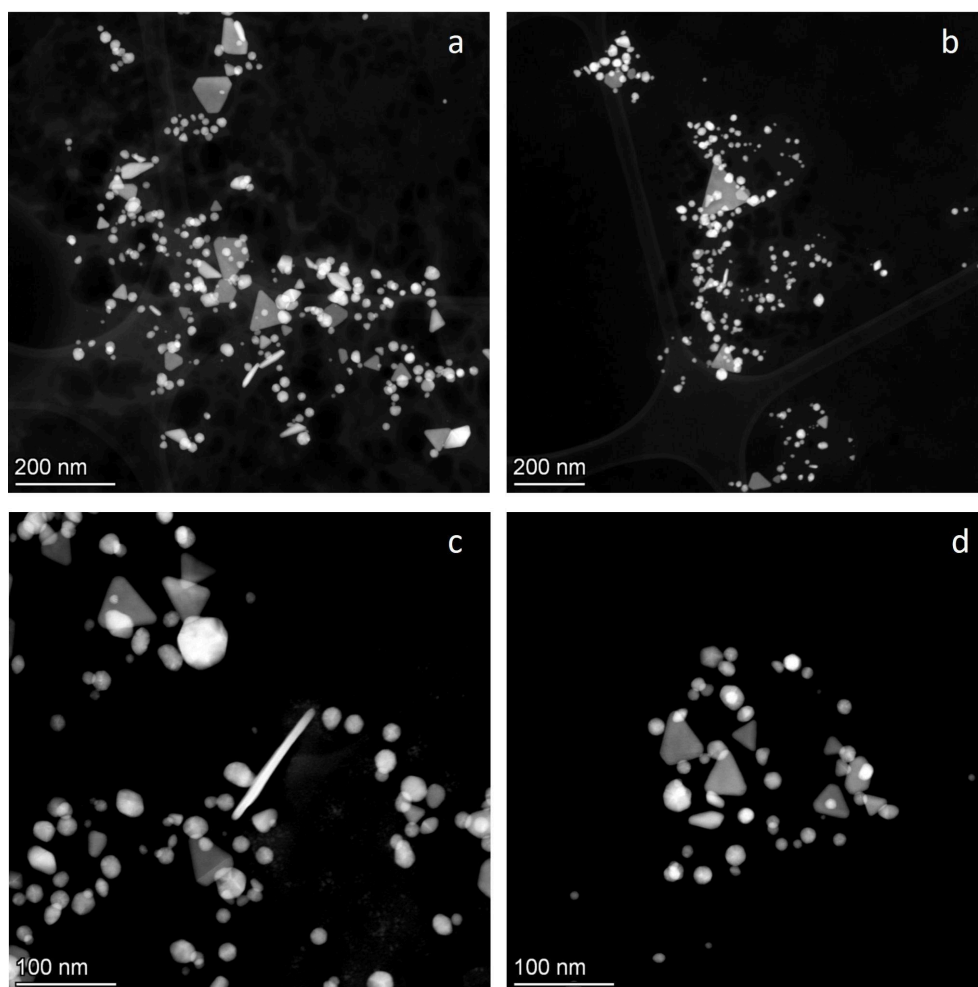


Figura 79. Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5 mostrando diferentes nanoestructuras. **(a)-(c)** Escala de 200 nm. **(d)** Escala de 100 nm.

En la **Figura 80** se muestra una imagen TEM de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. assiutensis*. En la **Figura 80(a)**, mediante el análisis de campo oscuro, se observa la coexistencia de diferentes formas tales como esferas, elipsoides y triángulos en una escala de 50 nm. En la **Figura 80(b)** se presenta el mapeo para determinar la composición elemental de la **Figura 80(a)**. Los puntos turquesas representan la presencia de átomos de Au, observando que hay una fuerte correlación entre la distribución de puntos turquesas concentrados sobre las diferentes formas de las nanoestructuras (**Fig. 80(c)**).

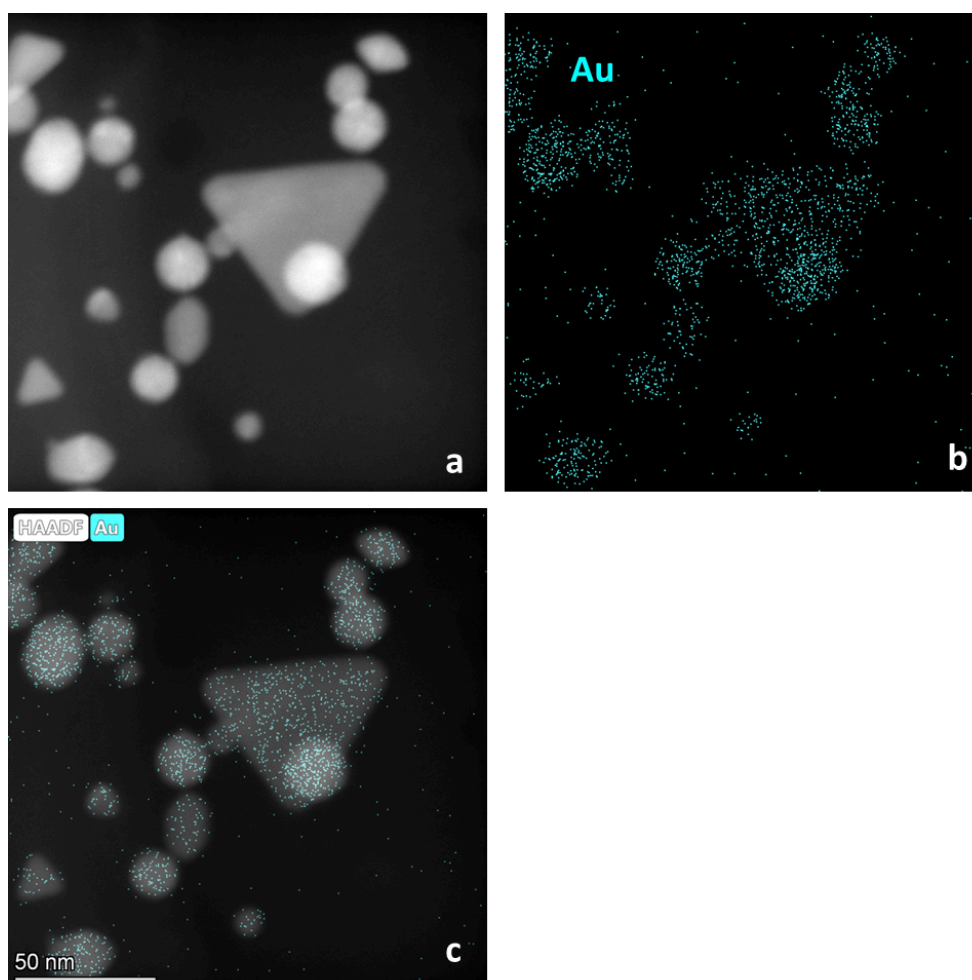


Figura 80. Imagen TEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5. **(a)** AuNPs de diferentes formas en una escala de 50 nm. **(b)** Análisis para determinar la composición elemental de (a), los puntos turquesas representan la presencia de átomos de Au. **(c)** Superposición de (a) y (b).

En la **Figura 81** se muestra otra región de la grilla en escala de 50 nm. En la **Figura 81(a)** se observan estructuras nanométricas de diferentes formas y tamaños, como esferas, triángulos, pirámides pentagonales, hexágonos, elipses, de dimensiones comprendidas entre 10 y 50 nm. En la **Figura 81(b)** se presenta el mapeo para determinar la composición elemental de la **Figura 81(a)**.

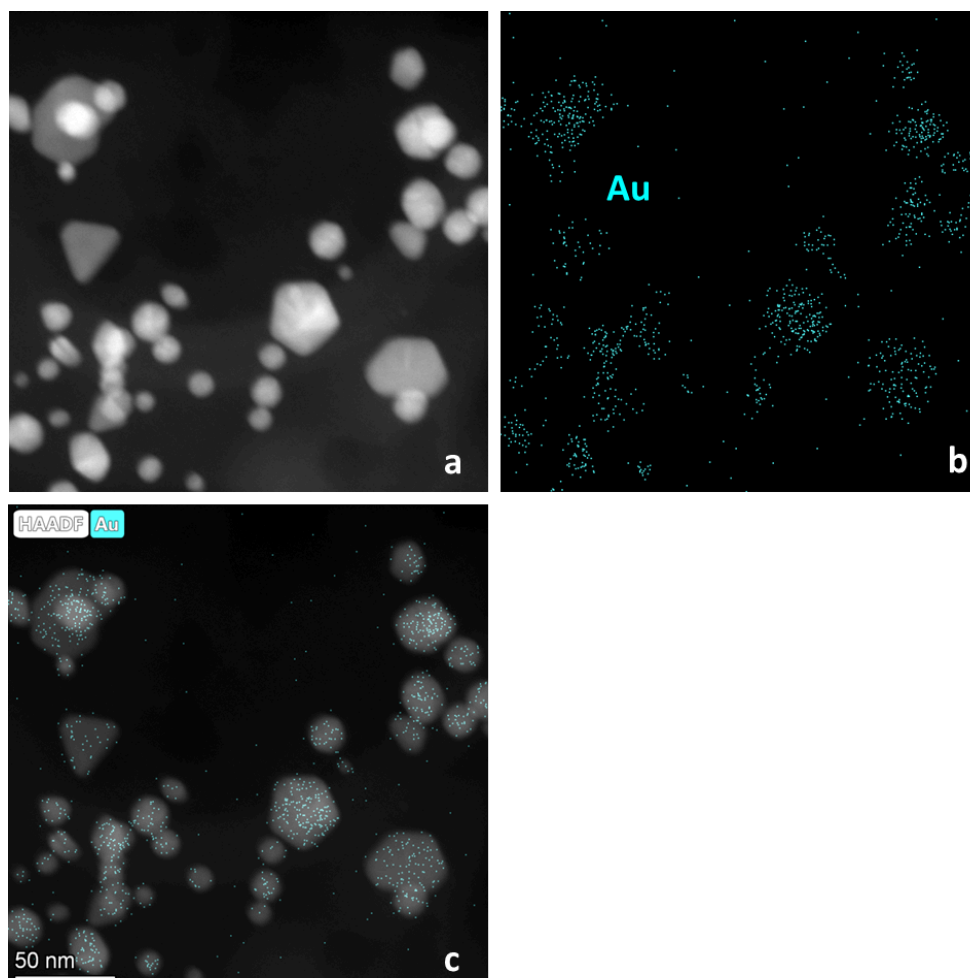


Figura 81. Imagen TEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5. **(a)** Distintas estructuras nanométricas de diferentes formas y tamaños. **(b)** Mapeo para determinar la composición elemental de (a), los puntos turquesas representan la presencia de átomos de Au. **(c)** Superposición de (a) y (b).

En la **Figura 82(a)** se pueden observar nanoestructuras de diferentes formas y tamaños en una escala de 50 nm, entre ellas algunas con forma de aguja, coexistiendo con las esféricas, triangulares y poliédricas en general. La **Figura 82(b)** muestra el elemento Au a través de los puntos turquesas que aparecen delineando las formas de las nanoestructuras. En la **Figura 82(c)** se observa la superposición de la **Figura 82(a)** y **82(b)**.

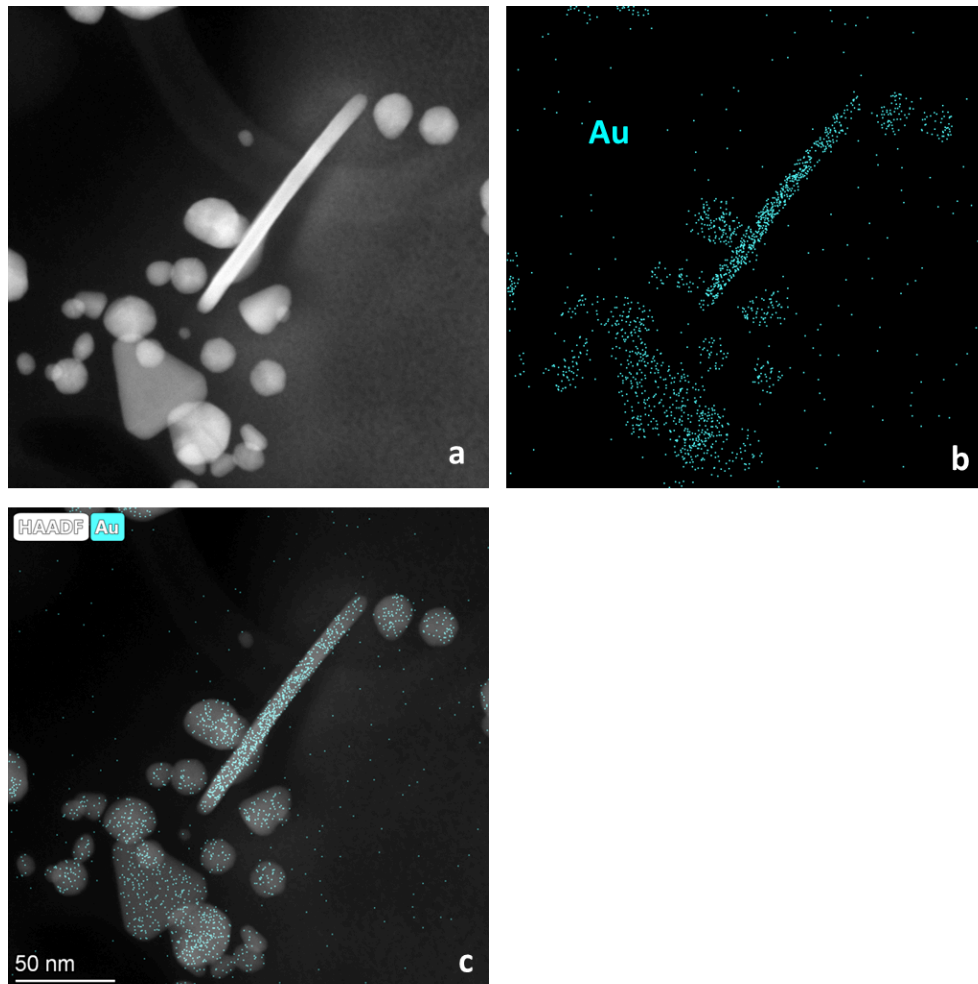


Figura 82. Imagen TEM de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5. **(a)** Nanoestructuras con forma de aguja, coexistiendo con las esféricas, triangulares y poliédricas de diferentes tamaños en una escala de 50 nm. **(b)** Mapeo para determinar la composición elemental de (a), los puntos turquesas representan la presencia de átomos de Au. **(c)** Superposición de (a) y (b).

La **Figura 83** muestra el espectro FTIR-ATR obtenido para las AuNPs liofilizadas sintetizadas con *T. assiutensis*. a pH 5. Se observan picos en 3196, 2920, 2851, 1742, 1636, 1541, 1398, 1025 y 805 cm^{-1} . La **Tabla 10** detalla las posibles asignaciones de las bandas de absorción.

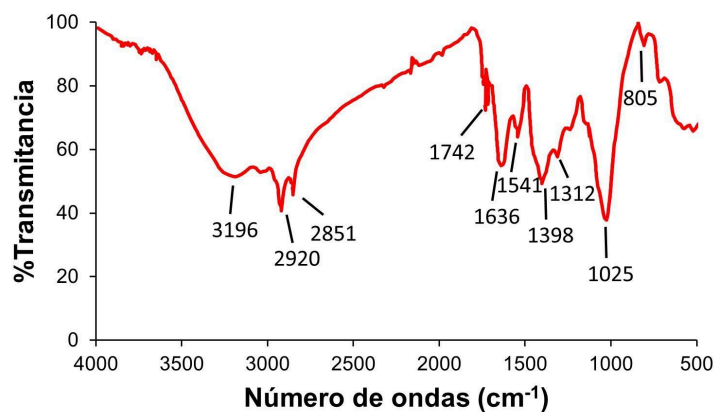


Figura 83. Espectro FTIR realizado sobre las AuNPs liofilizadas sintetizadas con *T. assiutensis*. a pH 5.

Número de ondas (cm^{-1})	Grupo funcional	Referencia
3196	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2920	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022.
2851	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
1742	vibraciones de estiramiento del grupo funcional C=O en cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos	Gannimani <i>et al.</i> , 2014
1636	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1541	banda atribuida a Amida II, derivada principalmente del estiramiento C-N junto con la flexión en el plano N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1398	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1025	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014
805	banda atribuida a enlace C-H	Coates, 2000

Tabla 10. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*.

El ajuste del espectro experimental para las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5 no pudo ser realizado debido a la fuerte presencia de otras estructuras no esféricas en la muestra, lo que altera el espectro de extinción de manera tal que aparece un segundo pico a los 700 nm aproximadamente.

II.3.4. *Trametes trogii*

Caracterización morfológica

Trametes trogii, Berk. In: in Trog, Mittheil. d. schweiz. Naturf. Ges. in Bern 2: 52. (1850)

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Agaricomycotina

Clase: Agaricomycetes

Subclase: *Incertae sedis*

Orden: Polyporales

Familia: Polyporaceae

Aspecto de la colonia: micelio blanquecino de crecimiento muy rápido, a medida que envejece el micelio se vuelve más amarillento. El reverso también es blanco.

Caracteres microscópicos: Micelio ramificado y tabicado, hialino, fibulado. No se observaron estructuras de reproducción bajo las condiciones de cultivo ensayadas hasta el día 30.

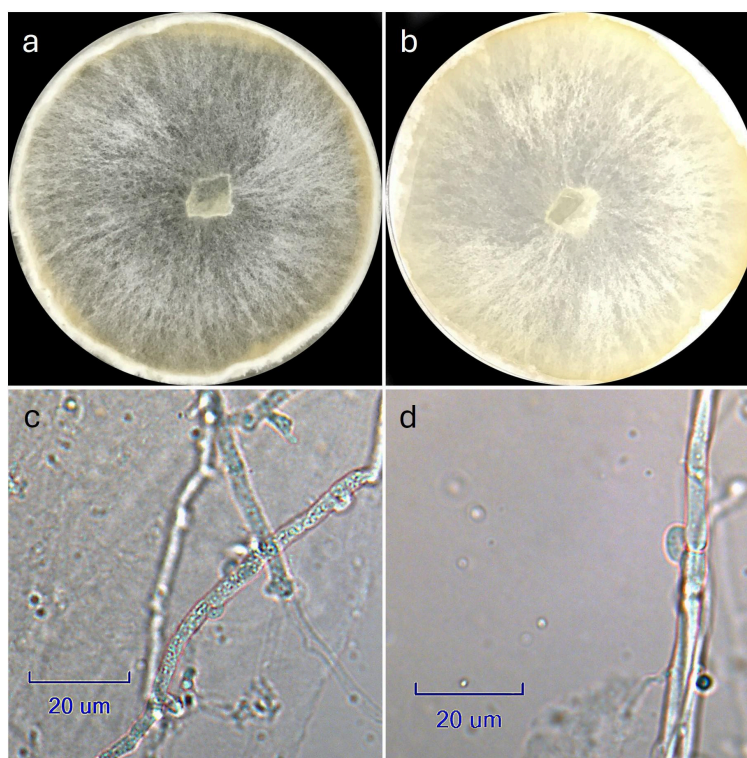


Figura 84. *Trametes trogii*. **(a)** Aspecto superficial de la colonia luego de dos semanas de crecimiento. **(b)** Reverso de la colonia. **(c)** y **(d)** Micelio tabicado con fibulas.

Caracterización fisiológica

Curva de crecimiento: La **Figura 85** muestra la curva de crecimiento para la cepa de *T. trogii* utilizada luego para la síntesis de NPs, bajo las condiciones ensayadas detalladas en materiales y métodos.

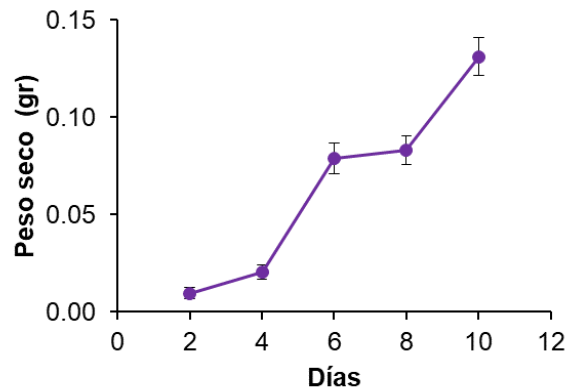


Figura 85. Curva de crecimiento correspondiente a la cepa de *T. trogii* utilizada para la síntesis de NPs.

Análisis de proteínas totales y azúcares reductores: Los análisis realizados mediante la metodología de Bradford para la cuantificación de proteínas y de Somogyi-Nelson para la cuantificación de azúcares reductores dieron resultados cercanos a cero en todas las cepas y réplicas ensayadas.

Perfil enzimático: La cepa de *T. trogii* es conocida por ser una cepa altamente ligninolítica. La cepa dio resultados positivos para ácido tánico (+++), ácido gálico (+++), tirosina (+++), verde de malaquita (+++) y Azure B (+++).

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata (*Trametes trogii*)

La cepa de *T. trogii* bajo las condiciones ensayadas no mostró resultados de síntesis.

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro (*Trametes trogii*)

La **Figura 86(a)** muestra el espectro de extinción obtenido para la síntesis AuNPs obtenidas a pH 5, 28°C y concentración 0,5 mM. Se observa que el máximo del pico del plasmón se encuentra en $\lambda_{\text{máx}} = 535 \text{ nm}$. La **Figura 86(b)** muestra el máximo de extinción del RPS registrado en función del tiempo expresado en los días de la síntesis y el ajuste de tendencia exponencial con saturación A de la síntesis, indicando un valor característico $t_0 = 5,04$ días y un valor $A = 1,34$. La **Figura 86(c)** muestra el espectro de extinción de las AuNPs luego de dos años de realizada la síntesis, donde se observa que la posición del pico máximo del plasmón se mantiene en 535 nm, aunque aparece hacia la derecha un incipiente crecimiento de la extinción (máximo secundario) en la zona entre 600 y 700 nm, lo que sugiere la presencia de otras estructuras no esféricas de tamaños mayores en el coloide, probablemente formadas durante esos años debido a la coalescencia de algunas NPs.

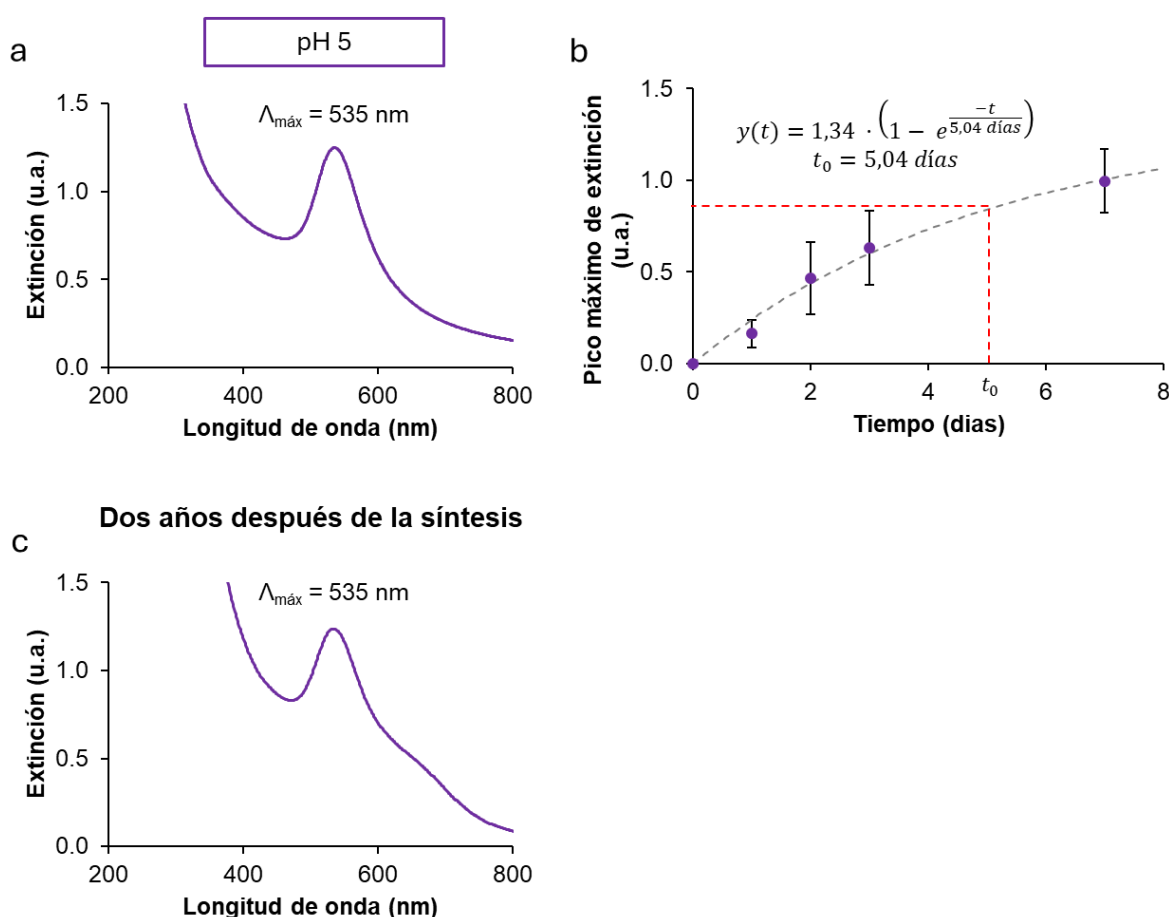


Figura 86. Espectros de extinción de las AuNPs sintetizadas por *T. trogii* a pH 5. **(a)** Espectro de extinción al día 7 del comienzo de la síntesis. **(b)** Evolución del valor del pico máximo de extinción en función del tiempo de síntesis y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A). Las barras representan el error estándar. **(c)** Espectro de extinción de las AuNPs luego de 2 años de conservación.

La **Figura 87** muestra las imágenes obtenidas mediante SEM de las AuNPs obtenidas con *T. trogii*. Se observan NPs esféricas en escala de 100 nm (**Fig. 87(a)**) y 20 nm (**Fig. 87(b)**).

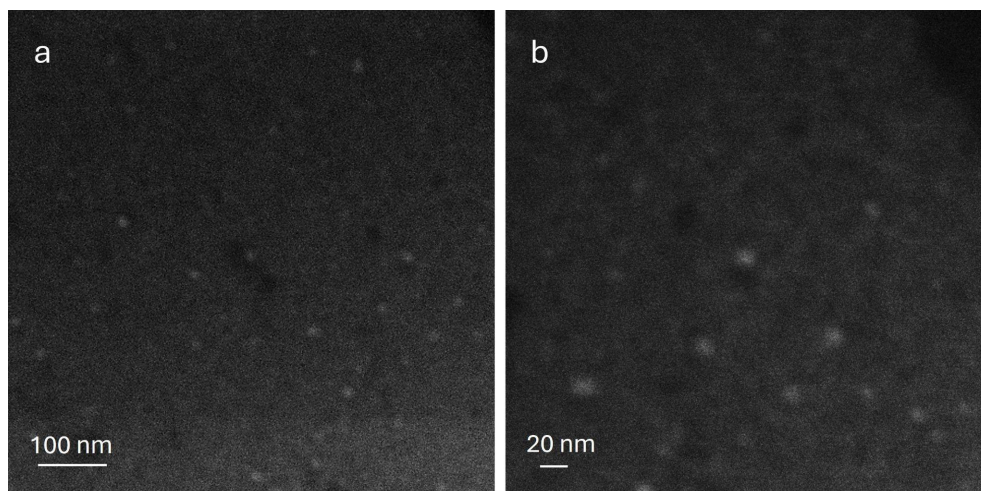


Figura 87. Imágenes SEM de las AuNPs sintetizadas con *T. trogii* donde se observan NPs esféricas. **(a)** Vista panorámica a una escala de 100 nm. **(b)** Acercamiento con una escala de 20 nm.

Las **Figuras 88** y **89** muestran las imágenes TEM de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis con *T. trogii*. En la **Figura 88** se pueden observar imágenes en diferentes escalas que muestran conglomerados de NPs sintetizadas con *T. trogii* a pH 5. En la escala de 100 nm se pueden observar AuNPs esféricas en su gran mayoría, coexistiendo con diferentes formas triangulares, pentagonales, hexagonales, etc.

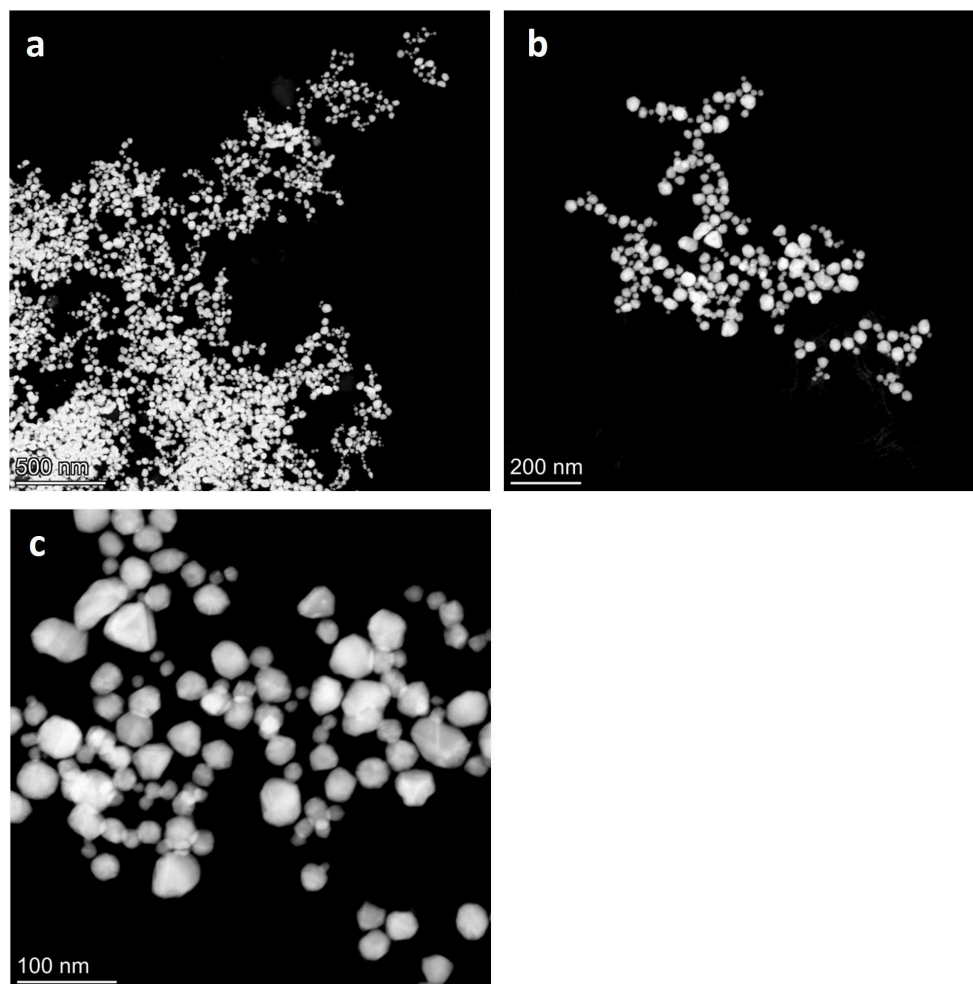


Figura 88. Imágenes TEM en diferentes zonas de las AuNPs sintetizadas con *T. trogii* a pH 5 en distintas escalas. **(a)** 500 nm. **(b)** 200 nm. **(c)** 100 nm.

En las **Figuras 89(a) y 89(b)** se observan diferentes sectores de la muestra en escalas de 20 y 5 nm, distinguiendo formas aproximadamente esféricas. Particularmente, en la **Figura 89(c)** se pueden observar débilmente los planos de Bragg que aparecen cuando los átomos de oro están ordenados regularmente, señalados con flecha amarilla, mostrando la naturaleza cristalina de las NP.

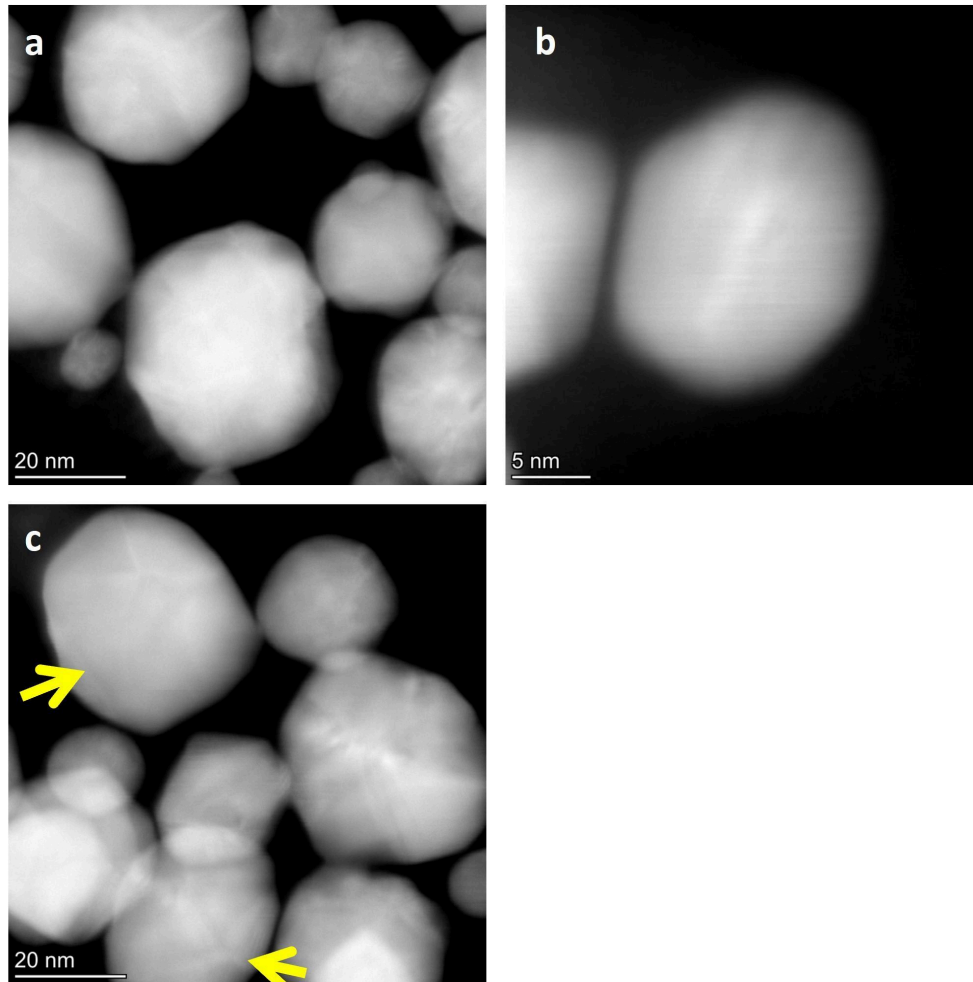


Figura 89. Diferentes sectores de la muestra en diferentes escalas distinguiendo formas aproximadamente esféricas: a-20 nm; b- 5 nm; c- planos de Bragg señalados con flecha amarilla, mostrando la naturaleza cristalina de las AuNPs.

La **Figura 90(a)** muestra el espectro EDS tomado sobre una AuNP sintetizada con *T. trogii* a pH 5, observándose la presencia de Au y Cl, además de los elementos Cu, C y Si, propios de la grilla. La **Figura 90(b)** muestra el espectro tomado sobre el fondo de la grilla, observándose una escasa proporción de Au, proveniente de la contaminación del fondo de la misma.

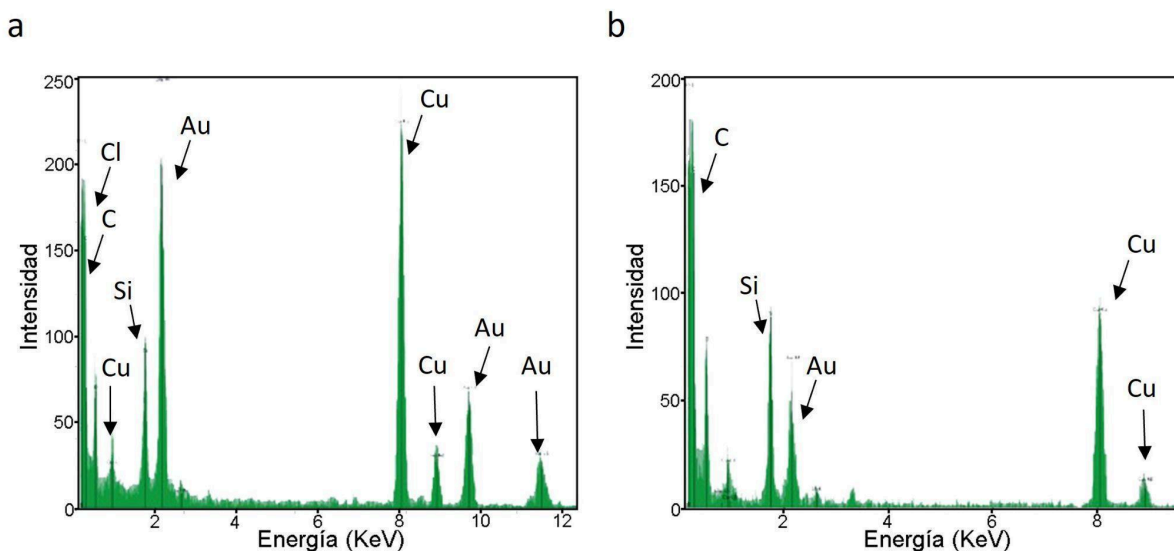


Figura 90. EDS realizado sobre una muestra de AuNPs sintetizadas con *T. trogii* a pH 5. **(a)** Espectro tomado sobre una NP, observándose la presencia de Au, Cl, Cu, C y Si. **(b)** Espectro tomado sobre el fondo, observándose una escasa proporción de Au.

La **Figura 91** muestra una imagen de AuNPs sintetizadas con *T. trogii* en escala de 100 nm (**Fig. 91(a)**). La **Figura 91(b)** muestra el mapeo realizado para detectar la presencia de Au en color verde, observándose que en su gran mayoría el Au está depositado sobre las NPs. La **Figura 91(c)** muestra la superposición de las **Figuras 91(a)** y **91(b)**. La **Figura 91(d)** muestra la presencia de Cl depositado en su gran mayoría sobre las NPs.

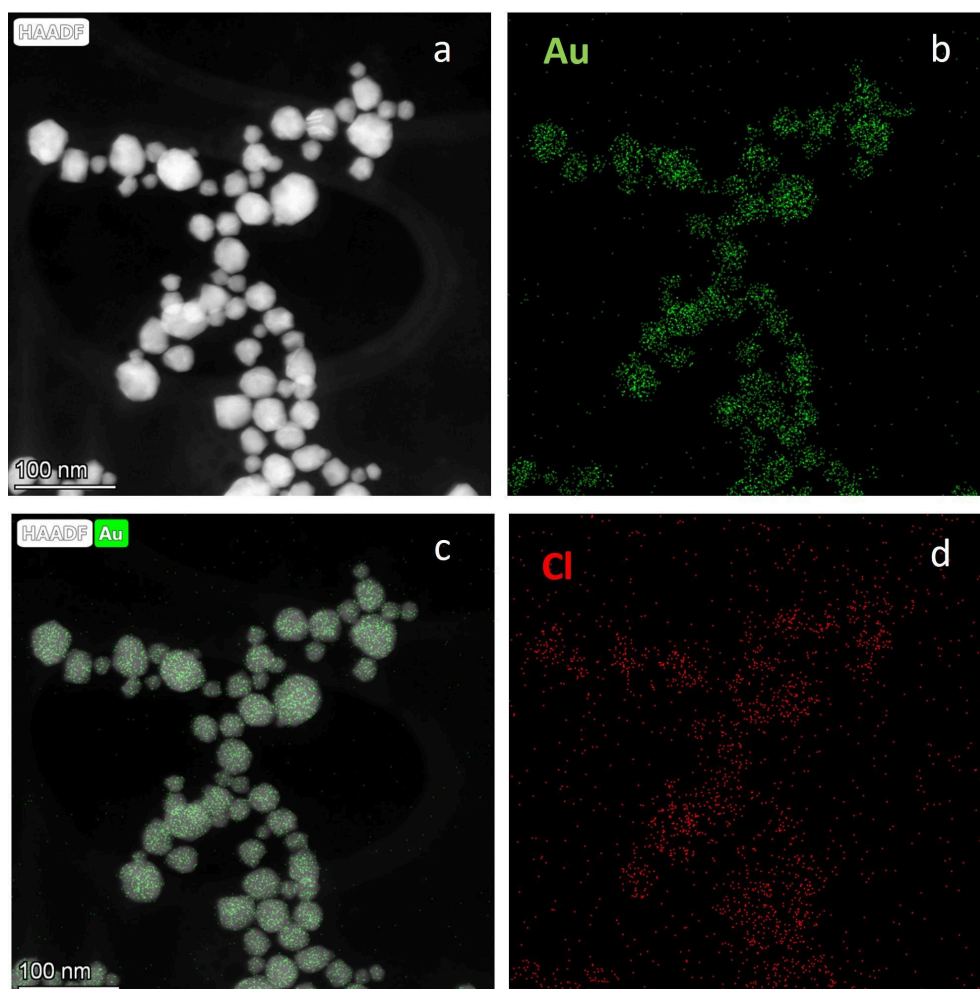


Figura 91. Imagen de AuNPs sintetizadas con *T. trogii* a pH 5. **(a)** NPs en escala de 100 nm. **(b)** Mapeo realizado para detectar la presencia de Au representado por puntos verdes. **(c)** superposición de (a) y (b). **(d)** Mapeo realizado para detectar la presencia de Cl representado en puntos rojos.

La **Figura 92** muestra débilmente los planos de Bragg del Au en una NP sintetizada con *T. trogii*, indicando que se trata de una estructura cristalina.

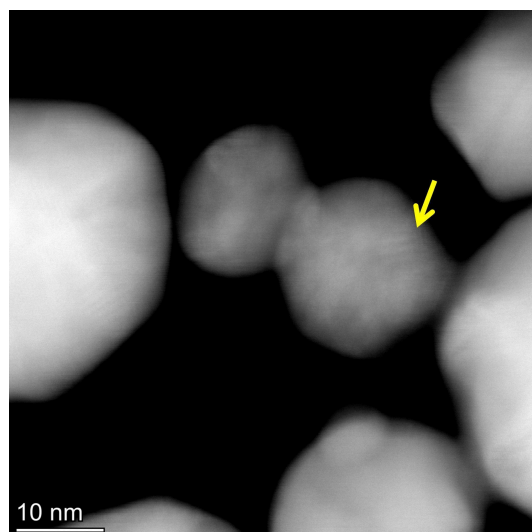


Figura 92. AuNP sintetizada con *T. trogii* donde se observan débilmente los planos de Bragg (flecha amarilla).

La **Figura 93** muestra el espectro FTIR-ATR obtenido para las AuNPs liofilizadas sintetizadas con *T. trogii* a pH 5. Se observan picos en 3209, 2915, 2849, 1635, 1558, 1396 y 1049 cm^{-1} . La **Tabla 11** detalla las posibles asignaciones de las bandas de absorción.

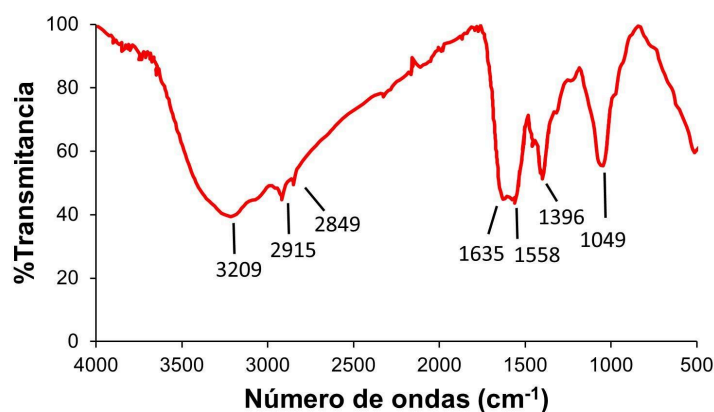


Figura 93. Espectro FTIR realizado sobre las AuNPs sintetizadas con *T. trogii* a pH 5.

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referencia
3209	vibraciones de estiramiento O-H de alcoholes y fenoles	Akinfenwa <i>et al.</i> , 2021
2915	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
2849	vibraciones de estiramiento C-H de compuestos alcanos	Dang <i>et al.</i> , 2022
1635	banda atribuida a Amida I, causada principalmente por vibraciones de estiramiento de C=O acopladas débilmente con el estiramiento de C-N y la flexión de N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1558	banda atribuida a Amida II, derivada principalmente del estiramiento C-N junto con la flexión en el plano N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1396	banda atribuida a Amida III, debida a una mezcla compleja de flexión de N-H y estiramiento de C-N junto con vibraciones de deformación de C-H y N-H	Glassford <i>et al.</i> , 2013
1049	vibraciones de estiramiento C-N de aminas alifáticas	Singh <i>et al.</i> , 2014

Tabla 11. Posibles asignaciones de grupos funcionales correspondientes a las bandas de absorción del espectro FTIR-ATR de las AuNPs sintetizadas con *T. troglia*.

La **Figura 94** muestra el ajuste realizado para las AuNPs sintetizadas con *T. troglia* a pH 5. El espectro experimental (línea continua) fue ajustado utilizando la distribución del inset de la figura, por medio de teoría de Mie (círculos rojos). Dado que las muestras de AuNPs no eran estrictamente esféricas, se ajustó el modelo considerando solamente los alrededores del pico del plasmón. El radio modal de las AgNPs esféricas presentes en la muestra resultó de 12,5 nm, como se muestra en las **Figuras 89 y 92**, pero la distribución incluida en el inset muestra que también están presentes otros tamaños como se muestran en las **Figuras 88 y 91**. En este caso se observa un buen ajuste para ambos lados del pico.

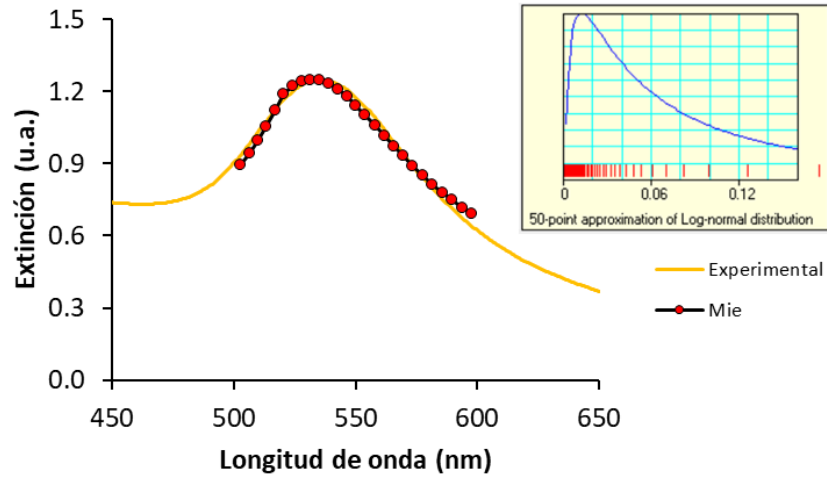


Figura 94. Espectro de extinción de la síntesis de AuNPs sintetizadas con el hongo *T. troglia* a pH 5 y ajuste con modelo teórico basado en la teoría de Mie utilizando la distribución mostrada en el inset, considerando un radio modal $r = 12,5$ nm. El inset representa la distribución log normal de tamaños; eje X: radio en micrómetros; eje Y: frecuencia de aparición (sin unidades) calculado para 50 nanopartículas.

II.4. DISCUSIÓN

En esta sección de la tesis se reporta por primera vez la síntesis de AgNPs y AuNPs mediadas por *Tulasnella albida*, *Cerinosterus luteoalbus*, *Trametes Trogii* y *Talaromyces assiutensis*, evaluando distintos pH, caracterizándose las NPs obtenidas mediante la utilización de 6 técnicas analíticas diferentes. Adicionalmente se evalúa por primera vez para estas especies la dinámica y rendimiento de las síntesis analizadas, estableciendo un análisis comparativo. Se realizaron ensayos preliminares sobre un conjunto de cepas psicotolerantes aisladas de la Antártida, debido al potencial biotecnológico que poseen los organismos extremófilos (Beeler & Singh, 2016), seleccionando aquéllas más idóneas. Asimismo, se seleccionaron otras cepas con distintos perfiles para explorar la capacidad de varios grupos funcionales en cuanto a la síntesis de NPs. En conjunto, se presentan los resultados de los análisis realizados sobre 26 ensayos de síntesis de NPs.

Caracterización de las cepas

Las cepas seleccionadas pudieron ser caracterizadas morfológicamente y se caracterizaron molecularmente dos cepas: *T. albida* (BAFCcult 4711) y *T. assiutensis*. También se llevó a cabo una caracterización fisiológica de las cepas. Las curvas de crecimiento nos permiten saber el estado metabólico en el que se encuentra el hongo a la hora de la síntesis de NPs (Hamedí *et al.*, 2014). Las curvas de crecimiento de *T. albida*, *C. luteoalbus* y *T. trogii* indicarían que el micelio utilizado para la generación del filtrado fúngico, empleado luego en la síntesis de NPs, se encuentra en activo crecimiento. En cuanto a *T. assiutensis*, se observa que se produce una autólisis (la "autodestrucción" de cultivos de micelio envejecidos y constituyentes intracelulares) probablemente debido al crecimiento excesivo del micelio en el medio de cultivo en el que se han agotado los nutrientes, comportamiento que se encuentra en coincidencia con lo observado por Melgar *et al.*, (2013). Es sabido que a medida que aumenta la edad del cultivo, el medio de crecimiento puede enriquecerse notablemente con compuestos liberados como resultado de la autólisis. La degradación de la pared celular por glucanasas y quitinasas puede hacer que esta estructura se vuelva porosa y, junto con la lisis de la membrana plasmática, las proteínas intracelulares pueden filtrarse al medio externo, y participar en eventos posteriores relacionados con la síntesis de NPs (Li *et al.*, 2022). No obstante esto, las cepas evaluadas en crecimiento activo se correlacionaron con mejores perfiles de síntesis, por lo que la evaluación en el caso de *T. assiutensis* a un tiempo menor de cultivo podría dar resultados diferentes.

Entre los mecanismos de síntesis biológica más relevantes mencionados en bibliografía se encuentran los siguientes:

1. La síntesis está vinculada a los polímeros de la pared celular o las quinonas lanzadera de electrones.
2. La reducción del ion ocurre bajo la canalización por una reductasa dependiente de nitrato (NADPH).

3. Las NPs se estabilizan mediante proteínas y péptidos fúngicos debido a la atracción electrostática entre grupos amina libres o residuos de cisteína en las proteínas con grupos carboxilato. (Zhao *et al.*, 2018)

Sin embargo, el mecanismo exacto es aún desconocido y podría incluso variar según el organismo: Spagnoletti *et al.*, (2021), mediante estudios de proteómica analizaron el filtrado fúngico de *Macrophomina phaseolina* que utilizaron para sintetizar AgNPs y de la corona presente en las NPs, encontrando mayormente hidrolasas y oxidoreductasas en ambos casos. Molnár *et al.*, (2018) utilizando el fluido extracelular de *Thermoascus thermophilus* para la síntesis de AuNPs observaron que fracciones conteniendo biomoléculas de pequeño peso molecular, incluidos péptidos, mono y oligosacáridos, metabolitos primarios, aminoácidos, cofactores, entre otros, fueron capaces de sintetizar AuNPs pero resultando inestables en el tiempo, mientras que fracciones con biomoléculas de más de 3 kDa aunque no fueron capaces de sintetizar AuNPs sí sirvieron para estabilizar las NPs.

Como parte de las caracterizaciones fúngicas se ha estudiado el perfil enzimático de cada cepa de acuerdo al grupo funcional al que ha sido asignada en bibliografía. Algunas de las enzimas evaluadas han sido relacionadas con el proceso de síntesis de NPs (Durán *et al.*, 2015). En la **Tabla 12** se comparan los resultados de los ensayos de actividad enzimática realizados para cada cepa

<i>Cepa</i>	<i>Orden</i>	<i>Ácido tánico</i>	<i>Ácido gálico</i>	<i>Tirosina</i>	<i>Verde de malaquita</i>	<i>Azure B</i>	<i>CMC</i>	<i>NBRIP</i>	<i>Síntesis AgNPs</i>		<i>Síntesis AuNPs</i>		
									<i>pH 5</i>	<i>pH 9</i>	<i>pH 5</i>	<i>pH 9</i>	<i>pH 11</i>
<i>T. albida</i> (BAFCcult 4713)	Cantharellales (Basidiomycota)	-	-	-	+	-	X	X	-	+++	X	X	X
<i>T. albida</i> (BAFCcult 4710)		-	-	+++	+	-	X	X	-	+++	X	X	X
<i>T. albida</i> (BAFCcult 4712)		-	-	-	+	-	X	X	-	+++	X	X	X
<i>T. albida</i> (BAFCcult 4711)		-	-	-	+	-	-	X	-	+++	-	+	+
<i>C. luteoalbus</i> (BAFCcult 4705)	Dacrymycetales (Basidiomycota)	-	-	-	X	X	X	X	-	+	-	+	+
<i>T. assiutensis</i>	Eurotiales (Ascomycota)	X	X	X	X	X	X	+++	-	++	+	-	-
<i>T. trogii</i> (BAFCcult 463)	Polyporales (Basidiomycota)	+++	+++	+++	+++	+++	X	X	-	-	++	-	-

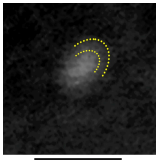
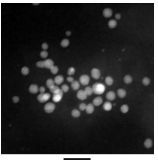
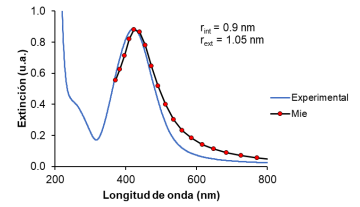
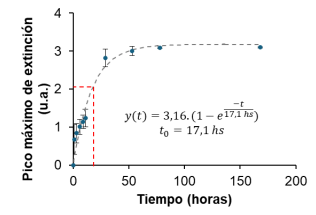
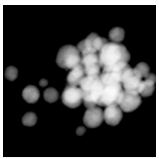
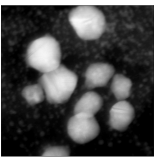
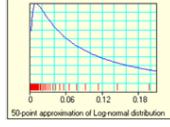
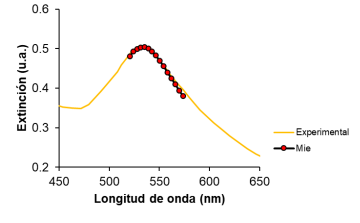
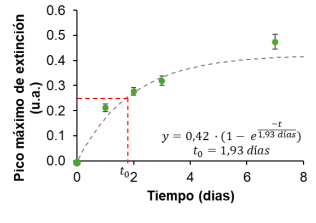
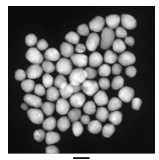
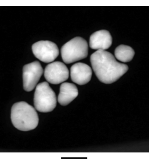
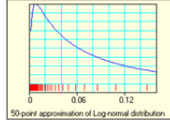
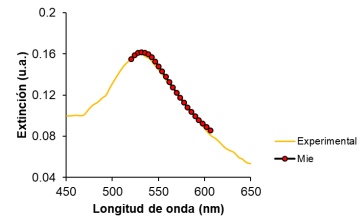
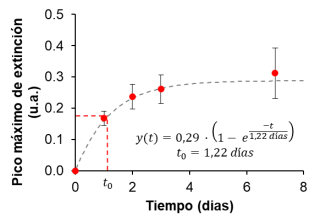
Tabla 12. Ensayos de detección de actividad enzimática realizados para cada cepa. El símbolo (-) indica ausencia de reacción/síntesis; el símbolo (+) indica presencia de reacción/síntesis. (+) intensidad/síntesis baja, (++) intensidad/síntesis media, (+++) intensidad/síntesis alta. La “X” indica ensayos no realizados.

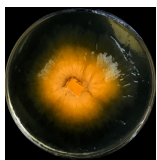
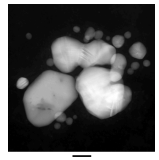
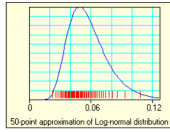
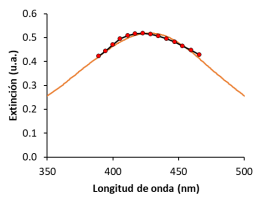
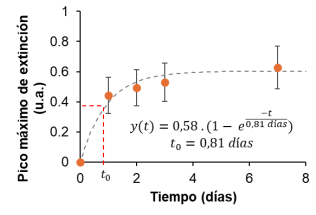
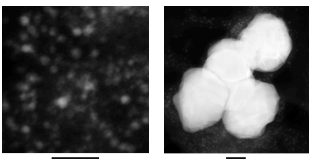
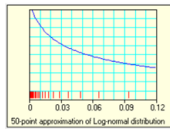
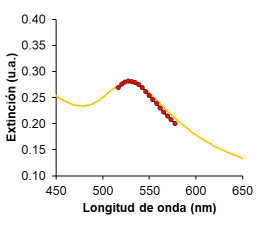
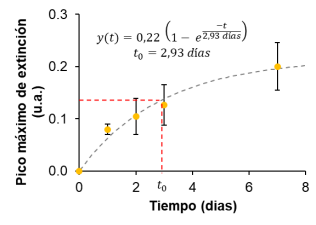
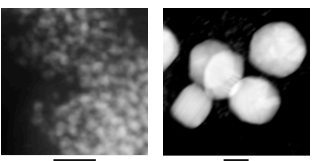
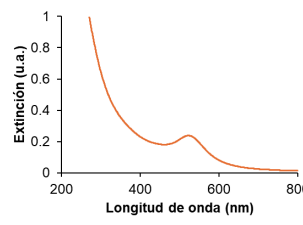
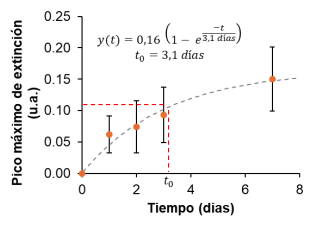
El género *Tulasnella*, que comprende especies saprotróficas y micorrícicas (Preußing *et al.*, 2010), ha sido registrado recientemente en madera en descomposición de diferentes construcciones y artefactos de la Isla Decepción (Held & Blanchette, 2017) y edificios considerados patrimonio histórico, como el Museo Casa Moneta, ubicado en las Islas Orcadas del Sur (Gaiser *et al.*, 2021). Existen pocos informes sobre los perfiles enzimáticos de los miembros de este género. Sin embargo, Adamo *et al.*, (2020) demostraron que *Tulasnella calospora* tiene un aparato robusto para la degradación de la celulosa cristalina. En particular, la cepa de *T. albida* (BAFCcult 4711) presenta actividad tirosinasa pero sin embargo no presenta mayor productividad en la síntesis de AgNPs comparada con el resto de las cepas del mismo hongo. *Trametes trogii* es un basidiomiceto de pudrición blanca distribuido mundialmente que ha sido reconocido como una excelente fuente de enzimas ligninolíticas, siendo un productor de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y oxidasas auxiliares productoras de H₂O₂, como la glioxal oxidasa; sin embargo, la propiedad más destacada de *T. trogii* es su capacidad para expresar altos niveles de lacasas (Campos *et al.*, 2016). En cuanto a los ensayos de este trabajo, *T. trogii* es la cepa con mejor actividad ligninolítica pero bajo las condiciones ensayadas no produjo síntesis de AgNPs. Sin embargo, en un trabajo anterior, bajo condiciones diferentes, el mismo hongo demostró capacidad sintetizadora con buenos resultados (Kobashigawa *et al.*, 2019). Por su lado, *C. luteoalbus* y *T. assiutensis* presentan perfiles enzimáticos diferentes a los hongos anteriores y también mostraron resultados positivos en la síntesis de AgNPs y AuNPs. Hasta la fecha no se han encontrado registros bibliográficos sobre el perfil enzimático de *C. luteoalbus*, sin embargo, se sabe que la subclase Dacrimycetidae incluye especies con perfil de pudrición castaña (Shirouzu *et al.*, 2014), siendo escasa la información sobre la síntesis de NPs con el uso de este tipo de hongos (Tończyk *et al.*, 2023). Por su parte, *T. assiutensis* posee un perfil enzimático solubilizador de fósforo. La síntesis de AgNPs y AuNPs utilizando hongos solubilizadores de fósforo ha sido previamente estudiada por otros autores (Fatima *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las enzimas fosfatasa alcalina tienen eficacia antimicrobiana contra microbios patógenos. Un estudio demostró que el extracto de *Fusarium oxysporum* (organismo solubilizador de fósforo) fue extremadamente eficaz para sintetizar AgNPs, siendo utilizadas como agentes de biocontrol eficaces para reducir una variedad de cepas de bacterias y hongos patógenos que podrían deberse a la presencia de proteínas solubilizadoras de fosfato en la matriz extracelular de *F. oxysporum* (Abdel-Hadi *et al.*, 2023).

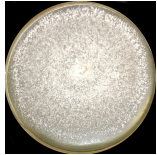
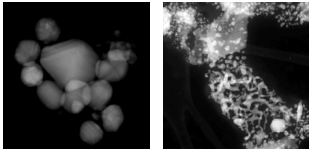
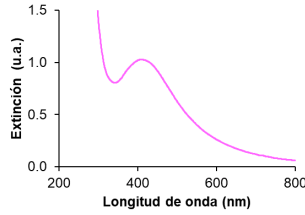
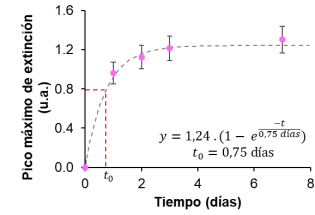
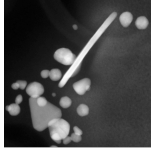
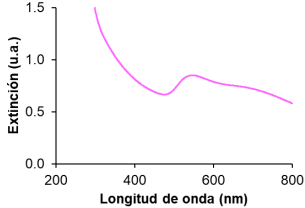
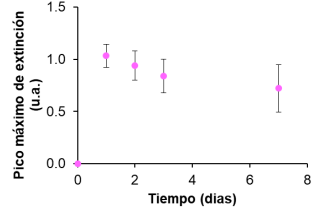
Los ensayos enzimáticos realizados permiten concluir que no existiría una asociación específica entre los perfiles enzimáticos estudiados y la capacidad de síntesis de los organismos utilizados, y que el mecanismo variaría dependiendo del tipo de NPs que se sintetizan. Además, si bien los resultados mediante las técnicas utilizadas para cuantificar las proteínas y azúcares reductores presentes en el filtrado fúngico no dieron valores detectables (lo que sugiere que la concentración de las moléculas involucradas en la síntesis se encuentra en muy bajas proporciones y que aún un bajísimo nivel de estos componentes muestran actividad capaz de generar resultados promisorios en la síntesis de NPs), los estudios posteriores de FTIR-ATR demostraron la presencia de proteínas en los filtrados que juegan un papel importante en la síntesis de NPs.

Síntesis de nanopartículas

La **Tabla 13** resume en forma comparativa, algunos de los resultados obtenidos en esta sección de la tesis relacionados con la síntesis de NPs. A continuación se hace un análisis de los resultados divididos en *Síntesis de AgNPs* y *Síntesis de AuNPs*.

Cepa	Metal	pH	Forma	TEM	Radio modal	Espectro de extinción y evolución del pico de plasmón	$\lambda_{\text{máx}}$	A to
<i>Tulasnella albida</i> 	Ag	5	No se obtuvieron NPs					
		9	Esféricas con estructura núcleo-coraza	  5 nm 20 nm	$r_1 = 0,9 \text{ nm};$ $r_2 = 1,05 \text{ nm}$	 	415	A=3,16 to=0,7
	Au	5	No se obtuvieron NPs					
		9	Mayoría esféricas, algunas poliédricas	  10 nm 20 nm	$r_m = 10 \text{ nm}$ en distribución mostrada 	 	528	A=0,42 to=1,93
		11	Mayoría esféricas, algunas poliédricas	  20 nm 20 nm	$r_m = 7,5 \text{ nm}$ en distribución mostrada 	 	516	A=0,29 to=1,22

<i>Cerinossterus luteoalbus</i> 	Ag	5	No se obtuvieron NPs						
		9	Mayoría esféricas, algunos hexágonos y cuadrados	 20 nm	$r_m = 49 \text{ nm}$ en distribución mostrada 	 Extinción (u.a.) vs Longitud de onda (nm)	 Pico máximo de extinción (u.a.) vs Tiempo (días)	427	$A=0,58$ $t_0=0,81$
	Au	5	No se obtuvieron NPs						
		9	Mayoría esféricas, algunas poliédricas	 10 nm 20 nm	$r_m = 1,5 \text{ nm}$ en distribución mostrada 	 Extinción (u.a.) vs Longitud de onda (nm)	 Pico máximo de extinción (u.a.) vs Tiempo (días)	527	$A=0,22$ $t_0=2,93$
	Au	11	Mayoría esféricas, algunas poliédricas y algunas agujas	 10 nm 20 nm	No se pudo realizar	 Extinción (u.a.) vs Longitud de onda (nm)	 Pico máximo de extinción (u.a.) vs Tiempo (días)	522	$A=0.16$ $t_0=3,1$

<i>Talaromyces assiutensis</i> 	Ag	5	No se obtuvieron NPs				
		9	Mayoría esféricas, algunas placas y algunos filamentos 	No se pudo realizar	 	412	$A=1,24$ $t_0=0,75$
	Au	5	Mayoría esféricas, algunas triangulares, poliédricas y agujas 	No se pudo realizar	 	546	No se pudo realizar
		9	No se obtuvieron NPs				
		11	No se obtuvieron NPs				

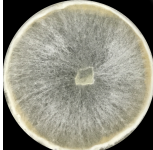
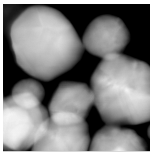
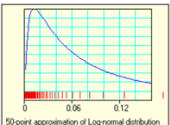
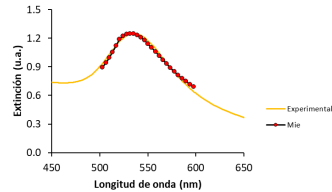
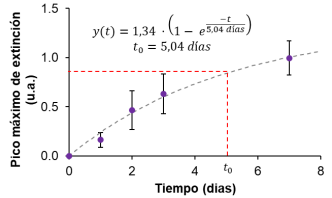
 Trametes trogii	Ag	5	No se obtuvieron NPs						
		9	No se obtuvieron NPs						
	Au	5	Esféricas, poliédricas	 20 nm	$r_m = 12,5 \text{ nm}$ en distribución mostrada 			535	$A=1,34$ $t_0=5,04$
		9	No se obtuvieron NPs						
		11	No se obtuvieron NPs						

Tabla 13. Resumen de resultados del capítulo II. Se muestran las cepas estudiadas con los metales utilizados a diferentes pH. Se describen las morfologías determinadas a partir de las imágenes TEM y se muestran los espectros de extinción experimentales ajustados por una distribución log normal con radio modal óptimo de esferas según Teoría de Mie. Finalmente, se muestra la evolución del máximo del plasmón en función del tiempo de síntesis con una curva de ajuste exponencial asintótica determinando la absorbancia máxima A y el tiempo característico t_0 (días).

Síntesis de AgNPs

En la **Figura 95(a)** se grafica, a modo comparativo, el espectro de extinción de todas las cepas obtenido al día 7, a pH 9, 28°C, 0.5mM, y en la **Figura 95(b)** la comparación del máximo de extinción de los plasmones obtenidos en función de los días. Es importante destacar que todos los espectros experimentales obtenidos para el caso de AgNPs presentan una resonancia plasmónica alrededor de 410-420 nm, lo cual denota la presencia mayoritaria de formas esféricas o cercanamente esféricas.

Para *T. albida* se realizaron diluciones (1:4) en todos los casos para que la lectura fuera confiable. En el caso de este mismo hongo, al día 3 se logra una estabilización del plasmón y además todas las cepas presentaron mayor rendimiento de producción de AgNPs respecto al resto de las cepas estudiadas. En particular la cepa BAFCCult 4711 presenta levemente un mejor perfil de producción (mayor valor de A). Le sigue la cepa de *T. assiutensis* y luego la de *C. luteoalbus*, aunque en ambos casos muy por debajo del nivel de producción de *T. albida*. Los ajustes realizados sobre el progreso de la síntesis muestran que *T. albida* alcanzaría más rápido el valor asintótico, seguido por *T. assiutensis* y luego por *C. luteoalbus*. El análisis de la síntesis durante las primeras 12 horas de incubación permitieron realizar un mejor ajuste de los valores de t_0 y A para la cepa BAFCCult 4711. En el caso de *T. assiutensis* se observa mayor absorción en la zona de 200-300 nm probablemente por la presencia de material biológico que no fue bien filtrado (Omran *et al.*, 2018; Gemishev *et al.*, 2019). En todos los casos estudiados no se obtuvieron resultados de síntesis a pH 5. El filtrado de *T. trogii* no logró sintetizar AgNPs en ninguno de los pH analizados.

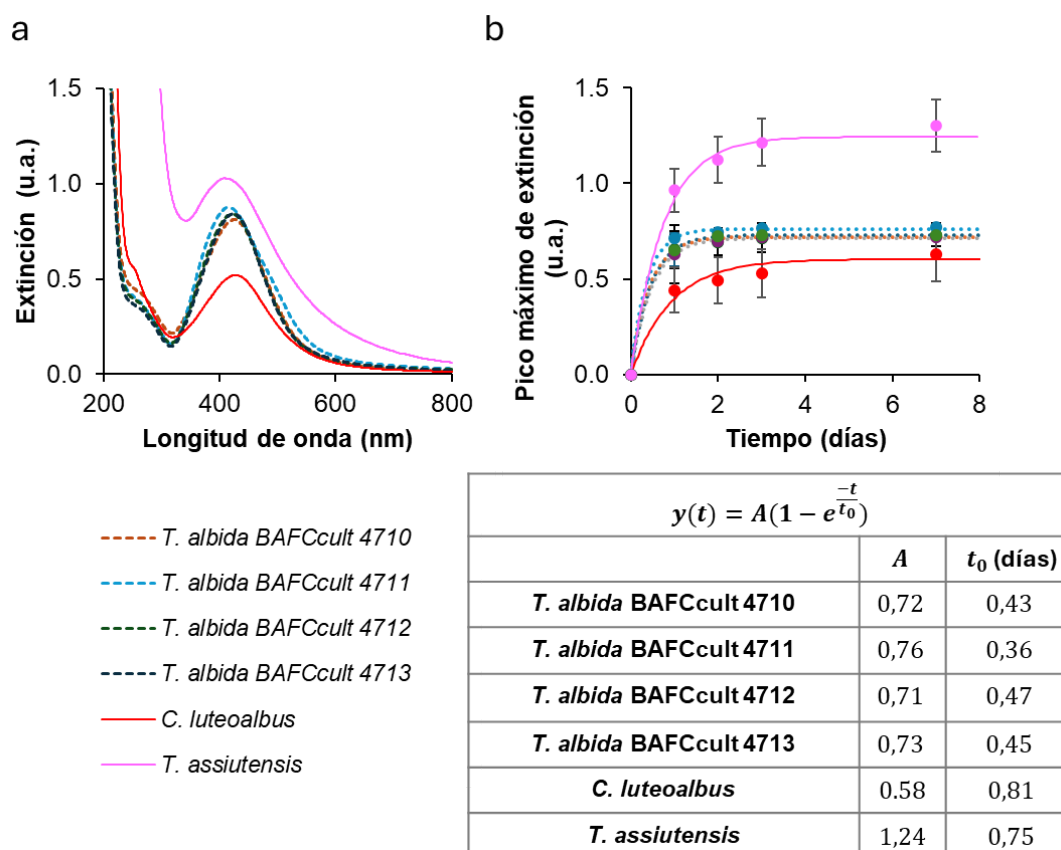


Figura 95. Comparación de la síntesis de AgNPs entre cepas bajo las mismas condiciones de síntesis y a los mismos tiempos de medición. **(a)** Espectros de extinción tomados para las AgNPs sintetizadas por todas las cepas que dieron resultado a pH 9, 0,5mM. Notar que en el caso de *T. albida* se realizó una dilución 1:4 (líneas punteadas). **(b)** Pico máximo de plasmón vs días de todas las cepas y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. Se detalla en una tabla la ecuación utilizada para el ajuste y los valores de A y t_0 obtenidos para cada cepa.

Las imágenes de SEM permitieron corroborar la presencia de AgNPs rodeadas por una capa de origen orgánico alrededor de las mismas, probablemente proteínas que actúan como capping (Khalil *et al.*, 2019). En las imágenes TEM se puede observar con mayor resolución la morfología de las NPs. En algunos casos se detectó la presencia de Cl debido al HCl utilizado para regular el pH para la síntesis (Satpathy *et al.*, 2018; Chandraker *et al.*, 2022). En el caso de *T. albida* (BAFCcult 4711) se observan AgNPs esféricas, con un tamaño 2,1 nm de diámetro. En el caso de *C. luteoalbus* se observan AgNPs de morfología variada, en su mayoría esferas, con presencia de algunos hexágonos o cuadrados. En el caso de *T. assiutensis* se observan numerosas NPs esféricas, algunas estructuras en forma de placas y otras filamentosas, adornadas por AgNPs de muy variada morfología. Se sabe que distintas concentraciones de iones Cl^- alteran el crecimiento de las AgNPs (Zhang *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016; Yoo *et al.*, 2019), por lo que las distintas morfologías halladas en este trabajo podrían estar atribuidas a esta causa. Una teoría para explicar la aparición de crecimiento anisotrópico es la "hipótesis de adsorción selectiva de facetas", en la que se cree que un ligando orgánico se une selectivamente a una faceta cristalina particular, reduciendo su

energía superficial, y ralentizando la velocidad de crecimiento de esa faceta en relación con las otras facetas (Scarabelli *et al.*, 2023). También se ha demostrado que la adición de trazas de sales implica un impacto en la población de las semillas (Langley *et al.*, 2013). En este trabajo, es posible que el Cl presente en el filtrado haya influido en la formación de semillas o que se hayan formado algunas NPs de AgCl, funcionando como semilla para posterior formación de los nanofilamentos. Por otro lado, *T. assiutensis* es en particular un hongo que produce mucho micelio en la etapa de cultivo y crecimiento, y que resulta muy difícil de filtrar. Es evidente que el filtrado en este caso ha sido deficiente por lo que tanto en las imágenes de SEM y TEM se observan restos de micelio que dificultan el análisis.

En todos los casos se pudo llevar a cabo la técnica EDS para corroborar la composición de las AgNPs. Mediante esta técnica también se pudo detectar la presencia de oxígeno en las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) debido a la oxidación de las mismas, lo que produce un tipo de NP que se denomina núcleo-coraza con un núcleo de plata y un recubrimiento de óxido de plata (Santillán *et al.*, 2011). La presencia de óxido también fue confirmada con la técnica de Raman realizada sobre la muestra de AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711), cuyo espectro muestra los picos característicos correspondientes a Ag₂O. El óxido presente en las NPs produce una alteración en el espectro de extinción respecto al que se esperaría si las NPs fueran puramente de plata, generando un desplazamiento del pico del plasmón hacia mayores longitudes de onda. Esto fue tenido en cuenta a la hora de realizar el modelado mediante la teoría de Mie. La curva calculada es similar a la curva experimental, obteniéndose un radio modal similar a lo observado en las imágenes TEM. El ajuste del espectro de extinción para el caso de *C. luteoalbus* fue realizado por teoría de Mie con una distribución log normal de radio modal de 49 nm, tal como se muestra en la **Tabla 13**. Las figuras TEM correspondientes muestran NPs mayoritariamente esféricas con tamaños compatibles con los mostrados en la distribución. Por último, el espectro obtenido con *T. assiutensis* no pudo ser ajustado debido a la presencia de estructuras no esféricas presente en la muestra. Estos resultados indicarían que la muestra de NPs más homogénea sería la obtenida con *T. albida*.

Se utilizó al hongo *T. albida*, aislado de la Antártida, de conocido perfil psicrotolerante (Gaiser *et al.*, 2021) por lo que se estudió también la síntesis a bajas temperaturas (6°C). Se obtuvieron resultados positivos, aunque con menor rendimiento que a 28°C, probablemente debido a que a menor temperatura la síntesis es más lenta. Sin embargo, resulta interesante notar que el hongo no necesita de altas temperaturas para fabricar AgNPs. El modelado mediante la teoría de Mie también demostró la presencia de óxido en las NPs y que las NPs obtenidas son de menor tamaño. Una síntesis a bajas temperaturas resulta interesante a nivel industrial porque representa un amplio rango térmico en el que la síntesis puede ocurrir, significando un menor gasto de energía al no tener que disponer de una temperatura especial, y porque cuenta con la posibilidad de recubrir nanomateriales con biomoléculas novedosas que pueden aportar propiedades innovadoras (Javani *et al.*, 2015).

En base a los análisis realizados sobre la síntesis de AgNPs realizadas con 4 cepas de *T. albida*, y las cepas de *C. luteoalbus*, *T. assiutensis* y *T. trogii*, bajo las mismas condiciones, y

las caracterizaciones realizadas, se determina que el organismo más prometedor en cuanto a su rendimiento de síntesis (mayor plasmón y valor de A) y en la morfología más homogénea sería la cepa de *T. albida* BAFCCult 4711. Se destaca que este es un organismo de fácil manejo ya que no genera pigmentos en el cultivo y, a pesar de tener un crecimiento relativamente lento, generando poca biomasa, es capaz de producir los metabolitos suficientes para sintetizar AgNPs en mayor proporción que el resto de las cepas analizadas, e incluso es capaz de sintetizar AgNPs a baja temperatura.

Síntesis de AuNPs

Es importante destacar que todos los espectros experimentales presentan una resonancia plasmónica alrededor de 520 nm, lo cual denota la presencia mayoritaria de NPs de formas esféricas o cercanamente esféricas. Sin embargo, en algunos casos se observaron (en mucho menor proporción) algunas formas que se apartaban de la esfericidad.

Las síntesis de AuNPs utilizando las distintas cepas de hongos y a distintos pH dieron resultados heterogéneos en cuanto a tamaño, formas y rendimiento. La **Figura 96(a)** muestra, a modo comparativo, los espectros de extinción de las AuNPs sintetizadas al día 7 con cada cepa y pH estudiado que dieron resultados positivos en la síntesis. La **Figura 96(b)** muestra los picos máximos de extinción en función de los días y los ajustes de tendencia exponencial con asíntota (A) de las síntesis. Observando estas figuras y los valores de A , surgidos del ajuste para cada síntesis, puede inferirse que la mayor producción se obtiene al utilizar a *T. troglia* a pH 5, aunque su valor de tiempo característico t_0 es visiblemente mayor al resto de las síntesis estudiadas. Este hongo, además, no logra alcanzar la asíntota A en los tiempos analizados. El espectro de las AuNPs sintetizadas con *T. assiutensis* a pH 5 resulta en un plasmón sumamente ensanchado, presentando un segundo máximo en la zona cercana a 700 nm, seguramente debido a las diferentes estructuras de morfologías no esferoidales como triángulos, agujas, etc., tal como se observan en las imágenes TEM. Es interesante además observar que el pico máximo de plasmón se obtiene al día 1 y luego el mismo va disminuyendo, desapareciendo el registro del plasmón a los dos años. Probablemente el mayor tamaño de las NPs haga que éstas precipiten y sean menos estables. Seguirían en nivel decreciente de producción *T. albida* (BAFCCult 4711) a pH 9 y pH 11 y finalmente *C. luteoalbus* a pH 9 y pH 11, basándonos en los valores de A , surgidos del ajuste y altura del plasmón. Tanto con *T. albida* como con *C. luteoalbus*, un menor pH implica un mejor rendimiento.

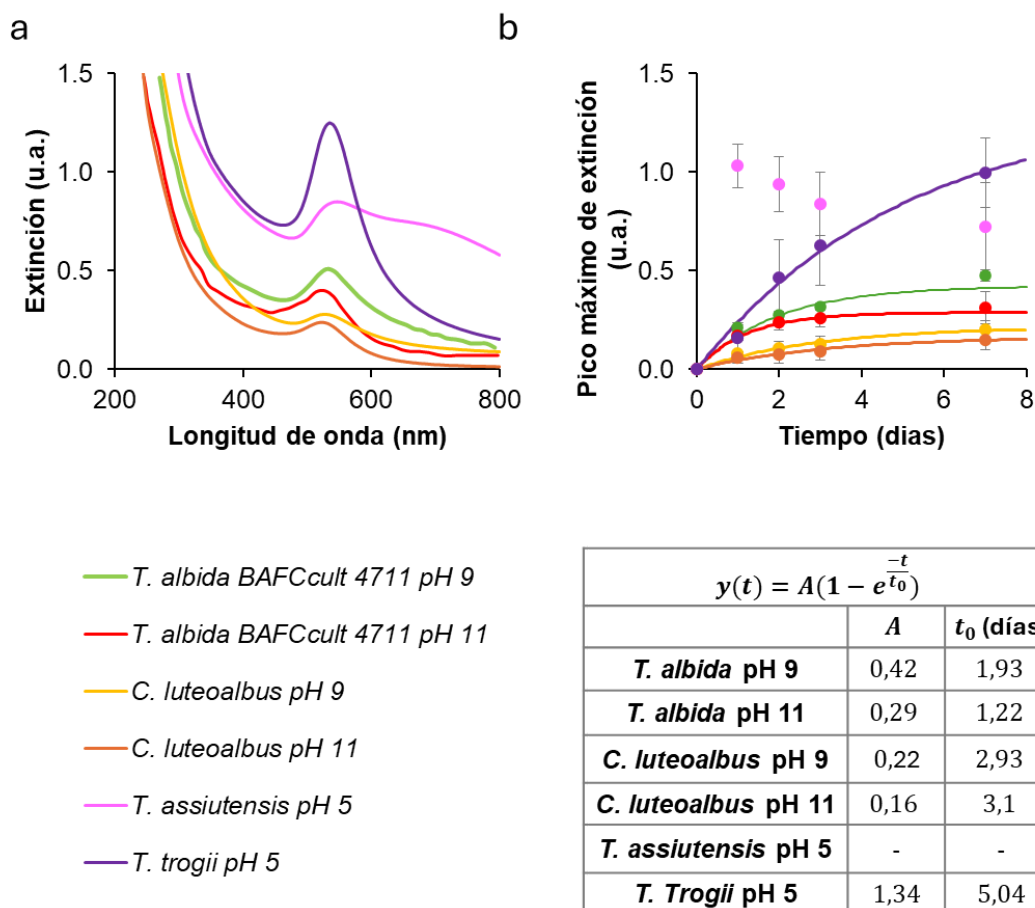


Figura 96. Comparación de la síntesis de AuNPs entre cepas. **(a)** Espectros de extinción tomados para las AuNPs sintetizadas por todas las cepas que dieron resultado. **(b)** Pico máximo de plasmón vs tiempo en días y ajuste de tendencia exponencial con asíntota (A) de la síntesis. Las barras de error representan el error estándar. Se detalla en una tabla la ecuación utilizada para el ajuste y los valores de A y t_0 obtenidos para cada cepa.

La medición del espectro de extinción luego de dos años de realizada la síntesis mostró un aspecto similar en todos los casos en los que pudieron ser realizados. Las mediciones con las AuNPs sintetizadas con *T. albida* y *C. luteoalbus* luego de dos años mostraron un plasmón similar, aunque con un corrimiento del pico hacia el rojo en todos los casos (lo que indicaría un aumento en el tamaño de las AuNPs, Ten Hove *et al.*, 2018), salvo en el caso de las AuNPs sintetizadas con *T. albida* a pH 9 en cuyo caso el plasmón casi no cambia de lugar por lo que se puede asumir que éstas no varían su tamaño. En el caso de *T. trogii* se observa que el pico del plasmón se mantiene en el mismo valor de longitud de onda, aunque hacia longitudes de ondas más grandes se presenta una deformación, indicando la presencia de estructuras no esféricas en la muestra. En el caso de *T. assiutensis* no se pudo volver a medir el espectro de extinción de las AuNPs dado que las mismas, probablemente por su tamaño, se hayan aglomerado y precipitado. Los resultados de las mediciones que se pudieron hacer luego de dos años (*T. albida* y *C. luteoalbus*, pH 5 y pH 9) indicarían que, si bien algunas de las NPs aumentan su tamaño, la muestra en general se mantiene estable en el tiempo.

En todos los casos, las imágenes TEM revelan la presencia de NPs esféricas en su gran mayoría, y en menor proporción se observaron también otras morfologías: *T. albida* (BAFCcult 4711) tanto a pH 9 como pH 11 produjo AuNPs irregulares, poliédricas, de pequeño tamaño; *C. luteoalbus* a pH 9 también produjo pequeñas NPs poliédricas, mientras que a pH 11 además de estructuras irregulares produjo NPs en forma de aguja. La síntesis con *T. assiutensis* a pH 5 mostró resultados muy variados dando como resultados AuNPs esféricas y algunas otras como triangulares, poliédricas y en forma de agujas lo que se refleja claramente en el espectro de extinción. Por último, la síntesis con *T. trogii* a pH 5 también da como resultado AuNPs de distintas formas poliédricas. En varios de los análisis EDS se observa la presencia de cloro sobre las NPs sintetizadas que puede provenir del HCl utilizado para el control del pH o del mismo precursor. Al igual que en la síntesis de AgNPs, es probable que la presencia de Cl influya en el crecimiento de las mismas interfiriendo en su formación y estructura final (Rai *et al.*, 2006; Personick & Mirkin, 2013; Chen *et al.*, 20219).

Se utilizó el modelo teórico de Mie para el ajuste de la zona central del plasmón experimental de las AuNPs debido a que la presencia de NPs de formas no esféricas alteran las zonas laterales del espectro de extinción, pudiéndose observar más de un pico plasmónico según el caso (Noguez, 2007; Gao *et al.*, 2021). Sin embargo, en este trabajo, en aquellos casos en los que bajo microscopía TEM se observaron morfologías no esféricas, se encontró que éstas estaban en una muy baja proporción respecto a las NPs esféricas, no modificando de manera considerable la banda plasmónica del espectro de extinción (Park *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). En todos los casos se logró un buen ajuste de la zona del plasmón del espectro experimental salvo el caso de *T. assiutensis* y de *C. luteoalbus* a pH 11, ya que presentaban algunas formas no esféricas que impedían aplicar el modelo desarrollado por Mie. Según el modelo teórico, la población de AuNPs esféricas sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) a pH 9 tienen un radio modal de 10 nm y las sintetizadas a pH 11 de 7,5 nm. Esto coincidiría con los resultados obtenidos por Pourali *et al.*, (2021) que estudiaron la síntesis de AuNPs utilizando al hongo *Fusarium oxysporum* observando que a pH más alcalinos obtenían NPs más pequeñas. Además, al comparar la síntesis a pH 9 con la síntesis a pH 11 se observa un corrimiento hacia el azul en el pico del plasmón, indicando una disminución del tamaño (Ten Hove *et al.*, 2018). Las AuNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* a pH 9 presentan un radio modal de 1,5 nm y una distribución de tamaño como la que se muestra en la **Tabla 13**. Las AuNPs sintetizadas con *T. trogii* tienen un radio modal de 12,5 nm. En base a estos resultados puede inferirse que el filtrado fúngico de *C. luteoalbus* produce AuNPs de menor tamaño, aunque el ajuste en ambos pH no llega a ser muy bueno para longitudes de ondas más bajas. El mejor ajuste se obtuvo con las AuNPs sintetizadas con *T. trogii* quizás porque, aunque haya presencia de formas poliédricas, la población de NPs esféricas es mayor. Los ajustes realizados para las AuNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) son más pobres comparados con los hongos anteriores probablemente porque la población de NPs presenta formas características poliédricas en su mayoría que generan diferentes contribuciones en el espectro de extinción, ensanchando el pico del plasmón. El estudio del efecto del pH en la síntesis de AuNPs es complejo y varía sus resultados dependiendo del autor y el organismo utilizado y, al igual que en esta tesis, distintos trabajos muestran diferentes valores óptimos de pH en cada caso (Tidke *et al.*, 2014; Pei *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019). En base a los

resultados obtenidos de la síntesis de AuNPs realizadas con las cepas de *T. albida* BAFCCult 4711, *C. luteoalbus*, *T. assiutensis* y *T. trogii*, bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura y pH, y las caracterizaciones realizadas, el organismo más prometedor en cuanto a su rendimiento de síntesis sería *T. trogii* a pH 5. Además podría suponerse que este organismo produce mayor cantidad de AuNPs esféricas dado que el pico del plasmón no se encuentra tan ensanchado como el resto de las cepas y, por otro lado, el ajuste teórico de la teoría de Mie fue el mejor en este caso. También es un organismo de fácil manejo ya que no genera pigmentos en el cultivo y es fácil de filtrar.

Efecto del pH

Se han encontrado pocos trabajos que comparen la síntesis de AgNPs y AuNPs utilizando el mismo organismo y analizando diferentes pH, reportándose que el óptimo valor de pH para la síntesis variaría según los organismos empleados, así como también que el pH no sería el mismo para ambos tipos de NPs en todas las especies estudiadas (Soliman *et al.*, (2022) y (2023); Balakumaran *et al.*, (2016); Lim *et al.*, (2011); Mishra *et al.*, (2011); Tidke *et al.* (2014)). Respecto a los resultados obtenidos con diferentes pH en nuestro caso, se observa que tanto *T. albida* como *C. luteoalbus* pueden producir ambos tipos de NPs a pH alcalino, mientras que *T. assiutensis* puede producir AgNPs a pH alcalino, pero AuNPs a pH ácido. *T. trogii* sólo pudo producir AuNPs a pH ácido. De esta manera, se halló más variación en la síntesis de AuNPs siendo positiva en algunos casos a pH alcalinos (9 y 11) y en otros casos sólo a pH ácido (5), comparada con el caso de AgNPs donde la síntesis siempre se produjo a pH 9. Se observa que los tiempos característicos t_0 son menores en las síntesis realizadas de AgNPs así como los valores asintóticos de A son mayores. Esto indicaría una producción más rápida de AgNPs comparada con las de AuNPs en todos los casos estudiados. Además, se observa que el tamaño de las AuNPs sintetizadas resultó menor en los casos en los que la síntesis se produjo a pH básicos, y mayor en el caso en el que la síntesis se produjo a pH ácido. En el caso de *C. luteoalbus* con un pH más alcalino aparecen estructuras en forma de agujas. Esto no sucede con *T. albida* donde en la síntesis de AuNPs se observa variación de tamaño (más pequeñas a mayor pH) y la formación de poliedros en ambos pH. Por su lado, *T. assiutensis* y *T. trogii* que produjeron AuNPs a pH 5, mostraron una producción de NPs con diferente morfología (además de esferas, en el primer caso se observaron agujas y triángulos, y en el segundo caso poliedros). Similar es el caso de las AgNPs donde, trabajando a igual pH y variando la cepa utilizada para la síntesis, se obtienen: sólo esferas (*T. albida*); esferas con algunos hexágonos y cuadrados (*C. luteoalbus*) y esferas con algunas placas y algunos filamentos (*T. assiutensis*).

Estas diferencias observadas podrían explicarse teniendo en cuenta que el pH: influye en la carga neta de una proteína, y su valor influye directamente en la solubilidad, agregación y cristalización de la proteína (Gitlin *et al.*, 2006); posiblemente cambie el rendimiento de la producción de NPs al afectar la disponibilidad de grupos funcionales relacionados con el agente reductor (Akhtar *et al.*, 2013); y que las variaciones del pH además inciden directamente en los potenciales de reducción de los grupos funcionales presentes en el filtrado fúngico.

En cuanto a la síntesis de AgNPs, estudios previos demostraron que pH básicos son mejores debido a que este rango beneficia la reducción de iones Ag^+ al proporcionar electrones para la reacción. Como resultado, hay más aniones hidróxido (OH^-) disponibles, aumentando la fuerza de reducción (Alves & Murray, 2022). A pH ácido, debido a que el proceso de nucleación para la formación de nanocristales de plata es lento, se obtiene como resultado una pequeña cantidad de partículas de gran tamaño. En cambio, a pH alcalino, debido a que los iones OH^- son fácilmente accesibles, se produce un rápido proceso de nucleación, lo que resulta en la formación de una gran cantidad de partículas pequeñas. (Al-Soub *et al.*, 2022). Los resultados de este trabajo para la síntesis de AgNPs concuerdan con la información hallada habiendo obtenido resultados sólo en pH alcalino (9) pero no a pH ácido (5).

Respecto a la síntesis de AuNPs, los resultados coinciden con Tidke *et al.*, (2014) que, utilizando al hongo *Fusarium acuminatum* indican que la síntesis más eficaz de AuNPs tiene lugar en pH ácido. Esto puede explicarse debido a que a pH bajo la protonación de los grupos funcionales da como resultado una carga positiva general, lo que facilitaría la sorción impulsada electrostáticamente de iones AuCl_4^- [Au(III)] cargados negativamente y una mejor síntesis (Das *et al.*, 2012), y que a pH bajo, los grupos amino, sulfhidrilo y ácido carboxílico (que participan en la síntesis de NPs) están cargados positivamente, lo que altera la carga superficial de las biomoléculas, dando como resultado una leve reducción y heterogeneidad de las partículas sintetizadas (Priyadarshini *et al.*, 2014).

Es claramente observable que la morfología que se obtiene en cada caso depende mucho de la cepa que se utilice y la presencia de Cl^- , y que la influencia del pH estaría más relacionada con el tamaño de las NPs y con las condiciones necesarias para la síntesis.

No se han hallado registros previos de la evaluación de síntesis de AgNPs y AuNPs ni del efecto del pH hasta el momento utilizando los géneros *Tulasnella* y *Cerinosterus*. Por otro lado, sí existen trabajos previos utilizando la misma cepa de *Trametes trogii* y analizando la síntesis de AgNPs (Kobashigawa *et al.*, 2019), pero en este caso la síntesis se realizó utilizando pH 13, obteniéndose NPs esféricas. Cepas pertenecientes a miembros del género *Talaromyces* fueron utilizadas por diversos autores analizando la síntesis de AgNPs obteniendo resultados óptimos a pH 8 (Elmayah *et al.*, 2022) y de AuNPs también con resultados óptimos a pH 8 (Priyadarshini *et al.*, 2014). Los ensayos realizados en este trabajo coinciden con los registros bibliográficos en cuanto a la heterogeneidad de resultados respecto de la síntesis de AgNPs y AuNPs y la variación del pH, variando además según el organismo. En la **Tabla 14** se brinda una comparación cualitativa de la síntesis de AuNPs según el pH (ácido a la izquierda y alcalino a la derecha) y de la síntesis AgNPs (izquierda) contra la síntesis de AuNPs (derecha), ambas a pH 9, analizando cómo varían los valores de t_0 , A y el tamaño de las NPs obtenidas (en base a estimaciones por el radio calculado con la teoría de Mie). No se realiza una comparación de tamaños entre la síntesis de AgNPs y AuNPs dado que para el primer caso sólo se pudo calcular el radio modal para las AgNPs sintetizadas con *T. albida*.

→	t_0	A	tamaño	←
pH ácido (<7) (síntesis de AuNPs)	>	>	<	pH alcalino (>7) (síntesis de AuNPs)
síntesis de AgNPs (pH 9)	<	>	no son comparables	síntesis de AuNPs (pH 9)

Tabla 14. Comparación cualitativa de los valores de t_0 , A de la síntesis y tamaños de AuNPs según el pH, y comparación entre síntesis de AgNPs y AuNPs.

FTIR

La técnica FTIR/ATR es un método poderoso para obtener información relevante para comprender la adsorción de proteínas a las superficies (Chittur, 1998). En los espectros de FTIR-ATR de las tres cepas que dieron resultados positivos para la síntesis de AgNPs, se observan patrones parecidos con mayor o menor intensidad. Los resultados sugieren que el mecanismo de síntesis estaría relacionado a estructuras proteicas como se menciona en la bibliografía (Dhanasekar *et al.*, 2015; Owaid *et al.*, 2019; Osorio-Echavarría *et al.*, 2021). Estudios han demostrado que el espectro infrarrojo de las proteínas presenta cinco bandas características, tres de las cuales se conocen como bandas de amida y que se utilizan frecuentemente en estudios estructurales de proteínas (Singh *et al.*, 1993). En todos los casos estudiados en este trabajo se registraron picos que fueron asignados a bandas amidas, por lo que se asume la presencia de proteínas como partícipes de la síntesis de NPs.

En la **Figura 97** se observa el espectro de FTIR de AgNPs sintetizadas por ablación láser sin recubrimiento, suspendidas en agua. En esta figura no se observan los picos característicos correspondientes a la presencia de amidas ni otros grupos funcionales, demostrando que las bandas asignadas en los FTIR de las AgNPs sintetizadas con hongos, están asociadas a los componentes biológicos presentes en los filtrados utilizados para la síntesis de NPs.

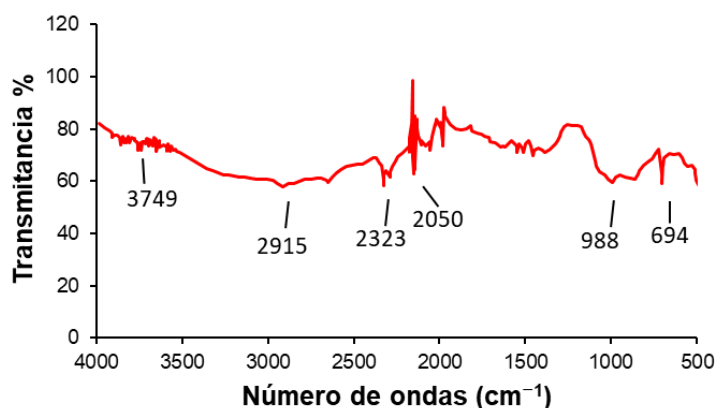


Figura 97. Espectro FTIR-ATR de muestras liofilizadas de AgNPs sintetizadas por ablación láser, suspendidas en agua.

La **Figura 98** muestra el espectro FTIR realizado sobre AuNPs de 15 nm de diámetro, rodeadas por citratos. En esta figura se observan picos en 3274, 1567 y 1387 cm^{-1} , que se corresponden con vibraciones de estiramiento $\nu(\text{O-H})\text{COOH}$ libre, vibración $\nu(\text{COO}^-)$ y vibraciones de estiramiento de la banda $\nu(\text{COO}^-)$ respectivamente (Sakellari *et al.*, 2020). En este espectro, al igual que en el de las AgNPs obtenidas por ablación en agua no se observan los picos característicos correspondientes a la presencia de amidas ni otros grupos funcionales, demostrando que las bandas asignadas en los FTIR de las AuNPs sintetizadas con hongos, están asociadas a los componentes biológicos presentes en los filtrados utilizados para la síntesis de NPs.

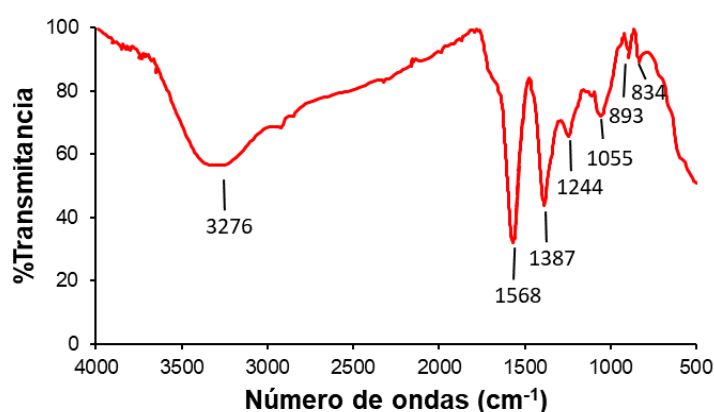


Figura 98. Espectro FTIR-ATR de muestras liofilizadas de AuNPs sintetizadas cubiertas con citrato de 15 nm de diámetro.

Otros trabajos estudiaron la mico síntesis de AuNPs y AgNPs encontrando diferencias en los espectros FTIR, indicando que probablemente distintos componentes intervengan en la síntesis de las NPs y su estabilización (Gholami-Shabani *et al.*, 2022; Sheikh & Awad, 2022; Soliman *et al.*, 2022). En este trabajo, los espectros y picos presentes son similares tanto para las AgNPs como las AuNPs sintetizadas. Sin embargo, teniendo en cuenta que los resultados de síntesis utilizando el mismo organismo en algunos de los casos estudiados fueron contrapuestos (por ejemplo, positiva para AuNPs pero negativa para AgNPs), es posible proponer que el mecanismo en ambas situaciones debe diferir a pesar de estar presentes las mismas biomoléculas. Por otro lado, al tener las cepas distintos perfiles enzimáticos, las proteínas presentes en cada filtrado son diferentes, por lo que un comportamiento diferente a distintos pH es esperable.

Los resultados de este trabajo indicarían que no existe un mecanismo único y que la cualidad de estas proteínas es la que le da un perfil de síntesis particular a cada hongo.

Discusión general

Una de las limitaciones del uso de hongos para la síntesis de NPs metálicas a gran escala es el tiempo que lleva obtener suficiente biomasa fúngica para la síntesis y la imposibilidad de reutilizar la misma biomasa para un nuevo conjunto de síntesis (Shende *et al.*, 2017). Se ha comprobado que la cantidad de biomasa utilizada para la síntesis puede incurrir en diferencias en cuanto a las propiedades de las NPs obtenidas, en algunos casos las mejores eficiencias se consiguieron con mayor biomasa y otras veces con menor cantidad (Guilger-Casagrande & Lima, 2019). Un análisis comparando la cantidad de biomasa utilizada para obtener el filtrado fúngico con la altura del plasmón otorga otra idea de eficiencia del hongo en la síntesis de NPs. En este trabajo, en el caso de las AgNPs (**Tabla 15**) se observa claramente que, bajo estas condiciones de ensayo y esta definición, el hongo más eficiente resulta ser *T. albida*, seguido de *C. luteoalbus* y por último *T. assiutensis* en todos los casos a pH 9. En cuanto a las AuNPs (**Tabla 16**), se observa que la mayor eficiencia se obtiene utilizando al hongo *T. trogii* a pH 5, diferenciándose ampliamente del resto de los hongos. En ambos casos se observa que la cantidad de biomasa no está directamente relacionada con la mayor producción de NPs. Estos resultados coincidirían con los valores de t_0 y de A analizados previamente.

Plata			
	biomasa (gr)	altura de plasmón	altura de plasmón/biomasa
<i>T. albida</i>	0,16	3.08*	19.25
<i>C. luteoalbus</i>	0,07	0,63	9,00
<i>T. assiutensis</i>	0,22	1,3	5,91
<i>T. trogii</i>	0,08	-----	-----

Tabla 15. Comparación de la biomasa del hongo utilizado para la obtención del filtrado utilizado en la síntesis de AgNPs a pH 9 y de la altura del plasmón obtenido. *multiplicado por el factor de dilución 4.

Oro				
	biomasa (gr)	pH	altura de plasmon	altura de plasmon/biomasa
<i>T. albida</i>	0,16	9	0,42	2,63
		11	0,29	1,81
<i>C. luteoalbus</i>	0,07	9	0,2	2,86
		11	0,15	2,14
<i>T. assiutensis</i>	0,22	5	0,72	3,27
<i>T. trogii</i>	0,08	5	0,99	12,38

Tabla 16. Comparación de la biomasa del hongo utilizado para la obtención del filtrado utilizado en la síntesis de AuNPs y de la altura del plasmón obtenido.

El presente trabajo proporciona, además, evidencia de que una de las cepas antárticas de *T. albida* es capaz de sintetizar AgNPs a baja temperatura (6°C). Los microorganismos adaptados al frío tienen un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas, ofreciendo numerosas ventajas: capacidad de crecimiento, actividades enzimáticas y eficiencias catalíticas en un rango de temperaturas bajo, evitando el riesgo de contaminación microbiana

e incluso ahorrando energía. Estas capacidades otorgan flexibilidad en los procesos de industrialización, permitiendo la síntesis fuera de condiciones óptimas.

A partir de los estudios aquí presentados se demuestra que los organismos analizados son capaces de sintetizar NPs, habiéndose llevado a cabo una caracterización de las mismas mediante el uso de diversas técnicas. Aunque no se logra dilucidar el mecanismo de síntesis, se demuestra que éste debe involucrar biomoléculas. Además, el mecanismo debe diferir según el organismo, variando el pH óptimo según cada caso. *T. albida* (pH 9) resulta ser el organismo más prometedor para las AgNPs, obteniéndose NPs esféricas y siendo además capaz de sintetizar AgNPs a baja temperatura y de fácil manejo. En el caso de las AuNPs el organismo más prometedor resulta ser *T. troglit* (pH 5). Para este organismo, también de fácil manejo, se observa que luego de dos años aparecen estructuras no esféricas en baja concentración en el coloide, aunque, sin embargo, el pico central se mantiene en la misma longitud de onda y no aparece un segundo pico en longitudes de onda mayores, lo que habla de cierta estabilidad de las AuNPs esféricas.

En base a los resultados de esta sección de la tesis, se aceptan las hipótesis de que existen organismos fúngicos capaces de sintetizar NPs, con poca variación intraespecífica en el caso de *T. albida*. Además, se observó que el pH produjo variaciones en los tamaños, así como en el rendimiento y eficiencia de síntesis, variando su efecto en cada cepa estudiada. En algunos casos se observó la aparición de NPs con morfología no esférica, pero esto probablemente se pueda atribuir a la presencia de Cl en las muestras.

II.5. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Hadi, A., Iqbal, D., Alharbi, R., Jahan, S., Darwish, O., Alshehri, B., Banawas, S., Palanisamy, M., Ismail, A., Aldosari, S., Alsaweed, M., Madkhali, Y., Kamal, M. & Fatima, F. (2023). Myco-Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Bioactive Role against Pathogenic Microbes. *Biology*, 12(5), 661.

Adamo, M., Chialva, M., Calevo, J., De Rose, S., Girlanda, M., Perotto, S. & Balestrini, R. (2020). The dark side of orchid symbiosis: can *Tulasnella calospora* decompose host tissues?. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3139.

Akhtar, M. S., Panwar, J. & Yun, Y. S. (2013). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(6), 591-602.

Akinfenwa, A. O., Abdul, N. S., Docrat, F. T., Marnewick, J. L., Luckay, R. C. & Hussein, A. A. (2021). Cytotoxic effects of Phytomediated silver and gold nanoparticles synthesised from rooibos (*Aspalathus linearis*), and Aspalathin. *Plants*, 10(11), 2460.

Al-Soub, A., Khleifat, K., Al-Tarawneh, A., Al-Limoun, M., Alfarrayeh, I., Al Sarayreh, A., Qaisi, A. Y., Qaralleh, H., Alqaraleh, M. & Albashaireh, A. (2022). Silver nanoparticles biosynthesis using an airborne fungal isolate, *Aspergillus flavus*: optimization, characterization and antibacterial activity. *Iranian Journal of Microbiology*, 14(4), 518.

Alves, M. F. & Murray, P. G. (2022). Biological synthesis of monodisperse uniform-size silver nanoparticles (AgNPs) by fungal cell-free extracts at elevated temperature and pH. *Journal of Fungi*, 8(5), 439.

Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M. & Iati, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002.

Balakumaran, M. D., Ramachandran, R., Balashanmugam, P., Mukeshkumar, D. J. & Kalaichelvan, P. T. (2016). Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiological Research*, 182, 8-20.

Begum, R., Farooqi, Z. H., Naseem, K., Ali, F., Batool, M., Xiao, J. & Irfan, A. (2018). Applications of UV/Vis spectroscopy in characterization and catalytic activity of noble metal nanoparticles fabricated in responsive polymer microgels: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(6), 503-516.

Beeler, E. & Singh, O. V. (2016). Extremophiles as sources of inorganic bio-nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 156.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Campos, P. A., Levin, L. N. & Wirth, S. A. (2016). Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochemistry*, 51(7), 895-903.
- Chandraker, S. K., Lal, M., Dhruve, P., Yadav, A. K., Singh, R. P., Varma, R. S. & Shukla, R. (2022). Bioengineered and biocompatible silver nanoparticles from *Thalictrum foliolosum* DC and their biomedical applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 24(8), 2479-2494.
- Chen, Z., Balankura, T., Fichthorn, K. A. & Rioux, R. M. (2019). Revisiting the polyol synthesis of silver nanostructures: role of chloride in nanocube formation. *ACS Nano*, 13(2), 1849-1860.
- Chittur, K. K. (1998). FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 19(4-5), 357-369.
- Choi, Y., Kang, S., Cha, S. H., Kim, H. S., Song, K., Lee, Y. J., Kim, K., Kim, Y. S., Cho, S. & Park, Y. (2018). Platycodon saponins from Platycodi Radix (*Platycodon grandiflorum*) for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13, 1-10.
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 12, 10815-10837.
- Dang, V. S., Tran, H. H., Dieu, P. T. T., Tran, M. T., Dang, C. H., Mai, D. T., Doan, V. D., Nguyen, T. L. H., Chi, T. T. T. & Nguyen, T. D. (2022). Effective catalysis and antibacterial activity of silver and gold nanoparticles biosynthesized by *Phlogacanthus turgidus*. *Research on Chemical Intermediates*, 48(5), 2047-2067.
- Das, S. K., Liang, J., Schmidt, M., Laffir, F. & Marsili, E. (2012). Biomineralization mechanism of gold by zygomycete fungi *Rhizopous oryzae*. *Acs Nano*, 6(7), 6165-6173.
- Dhanasekar, N. N., Rahul, G. R., Narayanan, K. B., Raman, G. & Sakthivel, N. (2015). Green chemistry approach for the synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Alternaria* sp. *J Microbiol Biotechnol*, 25(7), 1129-1135.
- Dikshit, P. K., Kumar, J., Das, A. K., Sadhu, S., Sharma, S., Singh, S., Gupta, P. K. & Kim, B. S. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11(8), 902.
- Durán, M., Silveira, C. P. & Durán, N. (2015). Catalytic role of traditional enzymes for biosynthesis of biogenic metallic nanoparticles: a mini-review. *IET Nanobiotechnology*, 9(5), 314-323.

Elmayah, N. M., El-Fallal, A. A., Abou-Dobara, M. I. & Khalifa, M. E. (2022). Response Surface Method for Optimizing the Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Talaromyces stipitatus* and Their Antimicrobial Activity. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(3).

Fatima, F., Bajpai, P., Pathak, N., Singh, S., Priya, S. & Verma, S. R. (2015). Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiology*, 15(1), 1-10.

Gaiser, R. F., Robles, C. A., Kobashigawa, J. M., Pereira, S., Skronski, N. & Carmaran, C. C. (2021). Mycobiota associated to Casa Moneta Museum wood, South Orkney Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 44, 1817-1831.

Gannimani, R., Perumal, A., Krishna, S. B., Sershen, Muthusamy, K., Mishra, A. & Govender, P. (2014). Synthesis and antibacterial activity of silver and gold nanoparticles produced using aqueous seed extract of *Protorhus longifolia* as a reducing agent. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(4), 1669-1679.

Gao, Z., Shao, S., Gao, W., Tang, D., Tang, D., Zou, S., Kim, M. J. & Xia, X. (2021). Morphology-invariant metallic nanoparticles with tunable plasmonic properties. *ACS Nano*, 15(2), 2428-2438.

Gemishev, O. T., Panayotova, M. I., Mintcheva, N. N., Djerahov, L. P., Tyuliev, G. T. & Gicheva, G. D. (2019). A green approach for silver nanoparticles preparation by cell-free extract from *Trichoderma reesei* fungi and their characterization. *Materials Research Express*, 6(9), 095040.

Gholami-Shabani, M., Sotoodehnejadnematalahi, F., Shams-Ghahfarokhi, M., Eslamifar, A. & Razzaghi-Abyaneh, M. (2022). Physicochemical properties, anticancer and antimicrobial activities of metallic nanoparticles green synthesized by *Aspergillus kambarensis*. *IET Nanobiotechnology*, 16(1), 1-13.

Gitlin, I., Carbeck, J. D. & Whitesides, G. M. (2006). Why are proteins charged? Networks of charge-charge interactions in proteins measured by charge ladders and capillary electrophoresis. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(19), 3022-3060.

Glassford, S. E., Byrne, B. & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12), 2849-2858.

Guilger-Casagrande, M. & Lima, R. D. (2019). Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 287.

Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).

- Hamed, S., Shojaosadati, S. A., Shokrollahzadeh, S. & Hashemi-Najafabadi, S. (2014). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using a novel and non-pathogenic fungus, *Neurospora intermedia*: controlled synthesis and antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 693-704.
- Held, B. W. & Blanchette, R. A. (2017). Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. *Fungal Biology*, 121(2), 145-157.
- Hodoroaba, V. D. (2020). Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 397-417). Elsevier.
- Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* (pp. 17-43). Woodhead publishing.
- Jadoun, S., Chauhan, N. P. S., Zarrintaj, P., Barani, M., Varma, R. S., Chinnam, S. & Rahdar, A. (2022). Synthesis of nanoparticles using microorganisms and their applications: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 20(5), 3153-3197.
- Johnson, P. B. & Christy, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*, 6(12), 4370.
- Khalil, N. M., Abd El-Ghany, M. N. & Rodríguez-Couto, S. (2019). Antifungal and anti-mycotoxin efficacy of biogenic silver nanoparticles produced by *Fusarium chlamydosporum* and *Penicillium chrysogenum* at non-cytotoxic doses. *Chemosphere*, 218, 477-486.
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K. & Asiri, A. M. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 317-344.
- Kobashigawa, J. M., Robles, C. A., Ricci, M. L. M. & Carmarán, C. C. (2019). Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1331-1337.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Hong, X., Wen, J., Xiong, X. & Hu, Y. (2016). Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 4489-4497.
- Javani, S., Marín, I., Amils, R. & Abad, J. P. (2015). Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483, 60-69.

- Langley, D., Giusti, G., Mayousse, C., Celle, C., Bellet, D. & Simonato, J. P. (2013). Flexible transparent conductive materials based on silver nanowire networks: a review. *Nanotechnology*, 24(45), 452001.
- Levin, L. & Forchiassin, F. (2001). Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnologica*, 21(2), 179-186.
- Levin, L., Forchiassin, F. & Viale, A. (2005). Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry*, 40(3-4), 1381-1387.
- Li, Q., Liu, F., Li, M., Chen, C. & Gadd, G. M. (2022). Nanoparticle and nanomineral production by fungi. *Fungal Biology Reviews*, 41, 31-44.
- Lim, H. A., Mishra, A. & Yun, S. I. (2011). Effect of pH on the extra cellular synthesis of gold and silver nanoparticles by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(1), 518-522.
- Liu, H., Zhu, N., Luo, D., Li, M., Wu, P. & Mo, Y. (2019). Spherical gold nanoparticles (AuNPs) formation by selected intracellular protein fraction of fungi. *Beilstein. Arch*, 1, 34.
- Loshchinina, E. A., Vetchinkina, E. P. & Kupryashina, M. A. (2022). Diversity of biogenic nanoparticles obtained by the fungi-mediated synthesis: A review. *Biomimetics*, 8(1), 1.
- Martina, I., Wiesinger, R., Jembrih-Simbürger, D. & Schreiner, M. (2012). Micro-Raman characterisation of silver corrosion products: instrumental set up and reference database. *E-Preserv Sci*, 9, 1-8.
- Melgar, G. Z., Assis, F. V. S. D., Rocha, L. C. D., Fanti, S. C., Sette, L. D. & Porto, A. L. M. (2013). Growth curves of filamentous fungi for utilization in biocatalytic reduction of cyclohexanones. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 13(5), 29-37.
- Mishra, A., Tripathy, S. K., Wahab, R., Jeong, S. H., Hwang, I., Yang, Y. B., ... & Yun, S. I. (2011). Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C 2 C 12 cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 617-630.
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Kónya, Z., Tóth-Szeles, E., Szűcs, R. & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific reports*, 8(1), 3943.
- Moore, R. T. (1987). Micromorphology of yeasts and yeast-like fungi and its taxonomic implications. *Studies in Mycology*, 30, 203-226.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem*, 153(2), 375-380.

Nguyen, T. B., Thu Vu, T. K., Nguyen, Q. D., Nguyen, T. D., Nguyen, T. A. & Trinh, T. H. (2012). Preparation of metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering by laser ablation method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(2), 025016.

Noguez, C. (2007). Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), 3806-3819.

Omran, B. A., Nassar, H. N., Fatthallah, N. A., Hamdy, A., El-Shatoury, E. H. & El-Gendy, N. S. (2018). Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 370-382.

Osorio-Echavarría, J., Osorio-Echavarría, J., Ossa-Orozco, C. P. & Gómez-Vanegas, N. A. (2021). Synthesis of silver nanoparticles using white-rot fungus *Anamorphous Bjerkandera* sp. R1: Influence of silver nitrate concentration and fungus growth time. *Scientific Reports*, 11(1), 3842.

Owaid, M. N., Rabeea, M. A., Aziz, A. A., Jameel, M. S. & Dheyab, M. A. (2019). Mushroom-assisted synthesis of triangle gold nanoparticles using the aqueous extract of fresh *Lentinula edodes* (shiitake), Omphalotaceae. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 12, 100270.

Park, J. S., Ahn, E. Y. & Park, Y. (2017). Asymmetric dumbbell-shaped silver nanoparticles and spherical gold nanoparticles green-synthesized by mangosteen (*Garcinia mangostana*) pericarp waste extracts. *International Journal of Nanomedicine*, 6895-6908.

Pei, X., Qu, Y., Shen, W., Li, H., Zhang, X., Li, S., Zhang, Z. & Li, X. (2017). Green synthesis of gold nanoparticles using fungus *Mariannaea* sp. HJ and their catalysis in reduction of 4-nitrophenol. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21649-21659.

Personick, M. L. & Mirkin, C. A. (2013). Making sense of the mayhem behind shape control in the synthesis of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 135(49), 18238-18247.

Pourali, P., Benada, O., Pátek, M., Neuhöferová, E., Dzmitruk, V. & Benson, V. (2021). Response of biological gold nanoparticles to different pH values: Is it possible to prepare both negatively and positively charged nanoparticles?. *Applied Sciences*, 11(23), 11559.

Preußing, M., Nebel, M., Oberwinkler, F. & Weiß, M. (2010). Diverging diversity patterns in the *Tulasnella* (Basidiomycota, Tulasnellales) mycobionts of *Aneura pinguis* (Marchantiophyta, Metzgeriales) from Europe and Ecuador. *Mycorrhiza*, 20, 147-159.

- Priyadarshini, E., Pradhan, N., Sukla, L. B., Panda, P. K. & Mishra, B. K. (2014). Biogenic synthesis of floral-shaped gold nanoparticles using a novel strain, *Talaromyces flavus*. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1055-1063.
- Pyatenko, A., Yamaguchi, M. & Suzuki, M. (2007). Synthesis of spherical silver nanoparticles with controllable sizes in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(22), 7910-7917.
- Qiu, J. H., Zhou, P., Gao, X. Y., Yu, J. N., Wang, S. Y., Li, J., Zheng, Y. X., Yang, Y. M., Song, Q. H. & Chen, L. Y. (2005). Ellipsometric study of the optical properties of silver oxide prepared by reactive magnetron sputtering. *J. Korean Phys. Soc*, 46(9), 269.
- Rai, A., Singh, A., Ahmad, A. & Sastry, M. (2006). Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir*, 22(2), 736-741.
- Rani, R., Sharma, D., Chaturvedi, M. & Yadav, J. P. (2017). Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles of endophytic fungi *Aspergillus terreus*. *J Nanomed Nanotechnol*, 8(4), 1000457.
- Sakellari, G. I., Hondow, N. & Gardiner, P. H. (2020). Factors influencing the surface functionalization of citrate stabilized gold nanoparticles with cysteamine, 3-mercaptopropionic acid or l-selenocystine for sensor applications. *Chemosensors*, 8(3), 80.
- Santillán, J. M. J., Scaffardi, L. B. & Schinca, D. C. (2011). Quantitative optical extinction-based parametric method for sizing a single core-shell Ag-Ag₂O nanoparticle. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(10), 105104.
- Satpathy, S., Patra, A., Ahirwar, B. & Delwar Hussain, M. (2018). Antioxidant and anticancer activities of green synthesized silver nanoparticles using aqueous extract of tubers of *Pueraria tuberosa*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), 71-85.
- Scarabelli, L., Sun, M., Zhuo, X., Yoo, S., Millstone, J. E., Jones, M. R. & Liz-Marzán, L. M. (2023). Plate-Like Colloidal Metal Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 123(7), 3493-3542.
- Šebesta, M., Vojtková, H., Cyprichová, V., Ingle, A. P., Urík, M. & Kolenčík, M. (2022). Mycosynthesis of metal-containing nanoparticles—Fungal metal resistance and mechanisms of synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14084.
- Schinca, D. C. & Scaffardi, L. B. (2008). Core and shell sizing of small silver-coated nanospheres by optical extinction spectroscopy. *Nanotechnology*, 19(49), 495712.
- Sheikh, H. & Awad, M. F. (2022). Biogenesis of nanoparticles with inhibitory effects on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 60, 26-35.
- Shende, S., Gade, A. & Rai, M. (2017). Large-scale synthesis and antibacterial activity of fungal-derived silver nanoparticles. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 427-434.

Shirouzu, T., Osono, T. & Hirose, D. (2014). Resource utilization of wood decomposers: mycelium nuclear phases and host tree species affect wood decomposition by Dacrymycetes. *Fungal Ecology*, 9, 11-16.

Singh, B. R., DeOliveira, D. B., Fu, F. N. & Fuller, M. P. (1993, May). Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation. In *Biomolecular Spectroscopy III* (Vol. 1890, pp. 47-55). SPIE.

Singh, D., Rathod, V., Ninganagouda, S., Hiremath, J., Singh, A. K. & Mathew, J. (2014). Optimization and characterization of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and application studies against MDR E. coli and S. aureus. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014.

Socrates, G. (2004). Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. John Wiley & Sons.

Soliman, M. K., Abu-Elghait, M., Salem, S. S. & Azab, M. S. (2022). Multifunctional properties of silver and gold nanoparticles synthesis by *Fusarium pseudonygamai*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.

Soliman, M. K., Salem, S. S., Abu-Elghait, M. & Azab, M. S. (2023). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles and their efficacy towards antibacterial, antibiofilm, cytotoxicity, and antioxidant activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(2), 1158-1183.

Spagnoletti, F. N., Kronberg, F., Spedalieri, C., Munarriz, E. & Giacometti, R. (2021). Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 297, 113434.

Stalpers, J. A. (1978). Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology*, (16).

Ten Hove, J. B., Schijven, L. M., Wang, J. & Velders, A. H. (2018). Size-controlled and water-soluble gold nanoparticles using UV-induced ligand exchange and phase transfer. *Chemical Communications*, 54(95), 13355-13358.

Tidke, P. R., Gupta, I., Gade, A. K. & Rai, M. (2014). Fungus-mediated synthesis of gold nanoparticles and standardization of parameters for its biosynthesis. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 13(4), 397-402.

Tończyk, A., Niedziałkowska, K. & Lisowska, K. (2023). Optimizing the microbial synthesis of silver nanoparticles using *Gloeophyllum striatum* and their antimicrobial potential evaluation. *Scientific Reports*, 13(1), 21124.

Vladár, A. E. & Hodoroaba, V. D. (2020). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 7-27). Elsevier.

Wang, C. B., Deo, G. & Wachs, I. E. (1999). Interaction of polycrystalline silver with oxygen, water, carbon dioxide, ethylene, and methanol: in situ Raman and catalytic studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(27), 5645-5656.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.

Yoo, J., So, H., Yang, M. & Lee, K. J. (2019). Effect of chloride ion on synthesis of silver nanoparticle using retrieved silver chloride as a precursor from the electronic scrap. *Applied Surface Science*, 475, 781-784.

Zhang, L., Li, X., He, R., Wu, L., Zhang, L. & Zeng, J. (2015). Chloride-induced shape transformation of silver nanoparticles in a water environment. *Environmental Pollution*, 204, 145-151.

Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M. S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., Zhu, J., Shi, J., Huangm Q., Yang, H. & Jin, M. (2018). Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 817-835.

CAPÍTULO III
ENSAYOS BIOLÓGICOS:
EFFECTOS TÓXICOS

CAPÍTULO III

ENSAYOS BIOLÓGICOS: EFECTOS TÓXICOS

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el mercado de la nanotecnología ha experimentado un gran desarrollo mostrando un aumento gradual en la producción comercial de productos procesados con nanotecnología, lo que ha llevado inevitablemente a un mayor riesgo de liberación de NPs al medio ambiente. Estos componentes (independientemente de su origen) pueden afectar posteriormente a los constituyentes bióticos del entorno, desde microorganismos hasta plantas y animales complejos (Burketová *et al.*, 2022), e incluso pueden interrumpir de manera muy agresiva en las interacciones beneficiosas entre los microorganismos del suelo y los microorganismos asociados a plantas y animales (Ameen *et al.*, 2021).

Uno de los ámbitos en los que se ha propuesto el uso de NPs en los últimos años es en la agricultura. Debido a sus propiedades antimicrobianas, las AgNPs han sido estudiadas ampliamente para su uso en el control de patógenos de plantas como hongos, bacterias y virus, y para el control de insectos. Este uso de AgNPs en la protección de plantas supone la liberación intencional en el medio ambiente de estos compuestos como nano pesticidas (Kookana *et al.*, 2014). En este escenario, las propiedades que presentan estos materiales podrían volverse desventajosas si se implementan de manera descontrolada ya que tales atributos como, por ejemplo, su papel como agente antimicrobiano, no son selectivos para los microorganismos, lo que genera una gran posibilidad de efectos citotóxicos en organismos no objetivos (Rana *et al.*, 2020).

Si bien, la toxicidad de las AgNPs ha sido estudiada utilizando diferentes sistemas modelo, como algas, bacterias, levaduras, pulgas de agua, artemia, peces, peces cebras embrionarios y adultos, ratones, ratas y plantas (Rajan *et al.*, 2022), los trabajos realizados suelen evaluar el impacto de las NPs solo en uno o dos tipos de modelos biológicos (planta, bacteria, hongo o animal) (Mondal *et al.*, 2022; Soleimani *et al.*, 2022). Sin embargo, la complejidad y heterogeneidad de estos compuestos impone la necesidad de ampliación de estos estudios a medida que nuevas formas de síntesis o nuevos tipos de NPs son obtenidas. En este contexto es de gran importancia que los estudios sobre síntesis de NPs sean acompañados con evaluaciones que determinen los impactos en los diferentes aspectos ecosistémicos, comenzando por los componentes bióticos, incluyendo los ensamblajes de las comunidades que frecuentemente modulan interacciones biológicas vitales para los organismos.

A lo largo de este capítulo se llevarán a cabo las actividades relacionadas con el objetivo 7:

Estudiar el efecto de las NPs de plata sintetizadas en el desarrollo de modelos biológicos.

Teniendo en cuenta la complejidad tanto técnica como taxonómica de los estudios de las secciones III.2 y III.3, se decidió realizar la evaluación sólo con las AgNPs obtenidas

utilizando *T. albida* (BAFCcult 4711), considerando que, desde el punto de vista de eficiencia de síntesis, resultaron las de mayor potencial de aplicación.

Los análisis llevados adelante serán presentados en 3 secciones diferentes cada una con una breve introducción, desarrollo experimental, y resultados. Finalmente, los resultados obtenidos se discutirán de forma integrada.

III.1. EFECTOS EN PLANTAS

A partir del uso generalizado de las NPs metálicas en diferentes campos de aplicación, se han reportado variados efectos tanto negativos como positivos en modelos vegetales, en estudios evaluando los efectos de la exposición de estos organismos a las AgNPs (Yan & Chen, 2019). La vía fitotóxica ha sido estudiada y se ha comprendido parcialmente: la plata (como elemento, ion o NP) se acumula en raíces/hojas y desencadena el mecanismo de defensa a nivel celular y tisular, que altera el metabolismo, las actividades antioxidantes y la expresión proteómica relacionada. Las respuestas a la exposición a AgNPs incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, actividades de superóxido dismutasa, cambios en el nivel de H_2O_2 , contenido total de clorofila, prolina, carotenoides, ascorbato y glutatión, etc. Dichos procesos conducen a cambios morfológicos anormales, supresión de fotosíntesis y/o transpiración, entre otros síntomas (Budhani *et al.*, 2019).

Con el fin de evaluar el impacto de la AgNPs obtenidas durante este estudio se analizaron los efectos sobre algunos indicadores de desarrollo vegetal, utilizando el poroto mung como modelo ya que es recomendado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) y la sociedad americana para el testeo de materiales (Lee *et al.*, 2012).

III.1.1. *Phaseolus radiatus*



Phaseolus radiatus L (sinónimo: *Vigna radiata* L) también conocido como “poroto mung”, es un importante cultivo alimentario y comercial en los sistemas agrícolas a base de arroz del sur y sudeste de Asia, aunque también se produce en otras partes del mundo. Pertenecce a la familia de las leguminosas. Generalmente se cultiva por su semilla comestible ya que es una fuente rica en proteínas, minerales y vitaminas. Es un cultivo tropical y subtropical y

requiere una temperatura cálida de 30 a 35 ° C. Su cultivo autopolinizado crece bien en suelos arenosos y francos, con un pH del suelo de 6.2 a 7.2. Su tasa de crecimiento es rápida y generalmente requiere de 70 a 90 días para madurar y llegando a una altura máxima de un metro. Tiene un fuerte sistema de raíces con nodulación para fijar el nitrógeno atmosférico. Se cultiva tanto en verano como en primavera, se siembra en junio y julio; como cosecha de primavera se siembra desde mediados de marzo hasta abril. (Zaid *et al.*, 2012).

En esta sección se analiza el impacto de las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCCult 4711; 0,5 mM; 28°C), *C. luteoalbus* y *T. assiutensis* en la germinación y desarrollo de plántulas de *P. radiatus*.

III.1.1.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Aplicación en semilla (Pre Ensayo)

Se utilizaron 15 semillas (réplicas) de *Phaseolus radiatus* por tratamiento. Los tratamientos consistieron en:

- Solución de AgNPs sintetizadas por *T. albida* (AgNO₃ 0.5mM)
- Solución de AgNO₃ 0.5mM
- Filtrado fúngico de *T. albida*
- H₂O

Las semillas fueron puestas en tubos de ensayos, apoyadas sobre un acetato, con un fondo líquido (10 mL) correspondiente a cada tratamiento. Se determinó el porcentaje de germinación y de plántulas que se desarrollaron (plántulas que desarrollaron vástago) a los 4 días de comenzado el ensayo.

Aplicación en plántula

Siguiendo la metodología de Lee *et al.*, (2012), se seleccionó un grupo de semillas y se las colocó en cama húmeda, en cámara de cultivo a 24 °C en oscuridad para su germinación. Se seleccionaron 10 semillas (réplicas) germinadas con una radícula de aproximadamente 2 mm por tratamiento. Dichas semillas fueron puestas en tubos de ensayos, apoyadas sobre un acetato, con un fondo líquido (10 mL) correspondiente a cada tratamiento. Adicionalmente se analizó el impacto de AgNO₃ para evaluar el posible efecto del precursor que no fue convertido a Ag⁰ durante la síntesis (0,5 mg/L, Li *et al.*, 2017) y se implementó adicionalmente un ensayo con la misma concentración de AgNO₃ utilizada para la síntesis de NPs (0,5 mM).

Los tratamientos fueron los siguientes:

- A. Solución de AgNPs sintetizadas por *T. albida* (AgNO₃ 0,5 mM)
- B. Solución de AgNPs sintetizadas por *C. luteoalbus* (AgNO₃ 0,5 mM)
- C. Solución de AgNPs sintetizadas por *T. assiutensis* (AgNO₃ 0,5 mM)
- D. Solución de AgNO₃ 0,5 mM
- E. Solución de AgNO₃ 0,5 mg/L (0,003 mM)
- F. Filtrado fúngico del hongo correspondiente a la síntesis
- G. H₂O

Los tratamientos fueron comparados de la siguiente manera:

- Experimento 1: A + F + G
- Experimento 2: B + F + G
- Experimento 3: C + F + G
- Experimento 4: D + G
- Experimento 5: E + G

Al décimo día las plántulas fueron cosechadas y se determinaron el largo de vástago, largo de raíz midiéndose con hoja milimetrada, y el peso fresco y peso seco utilizando una balanza analítica. Para la estimación de peso seco las plántulas fueron colocadas en estufa a 60° C hasta alcanzar un peso estable. En la **Figura 99** se esquematiza el procedimiento experimental utilizado.

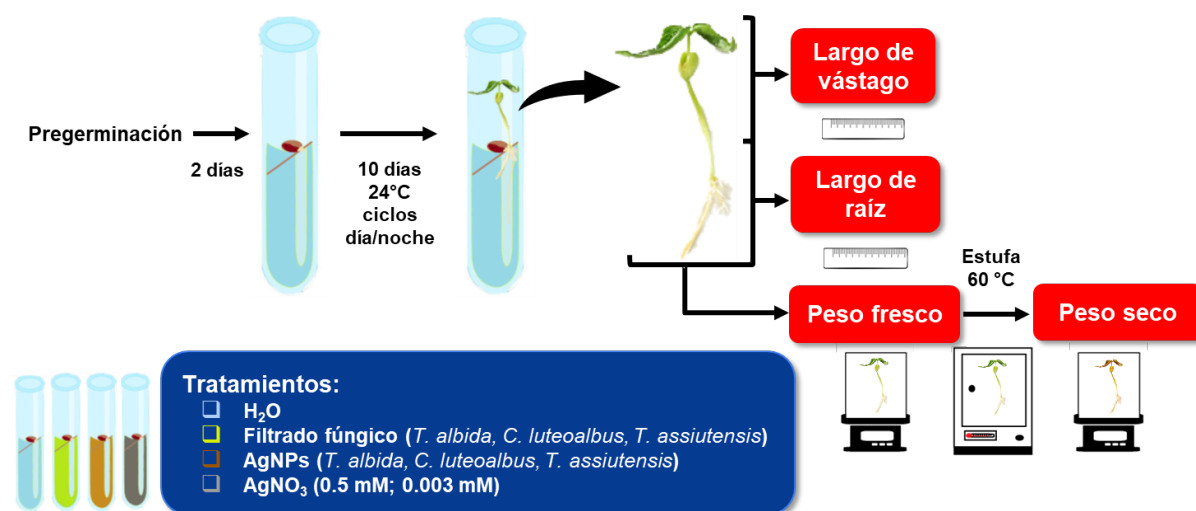


Figura 99. Esquema del procedimiento experimental utilizado para analizar el desarrollo de plántulas de *P. radiatus* al ser expuestas a distintos tratamientos. Se analizaron 10 plantas por tratamiento.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba estadística paramétrica de análisis de la varianza (Analysis of Variance, ANOVA) de un factor y las medias se compararon entre tratamientos mediante la prueba de Tukey (valor-p = 0,05). Para ello se utilizó el programa Infostat versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

III.1.1.2. RESULTADOS

Se analizó el impacto de las AgNPs sintetizadas con *T. albida*, *C. luteoalbus* y *T. assiutensis* en un organismo modelo de plantas: *P. radiatus*. Se realizó primero un preensayo para analizar el impacto en la germinación de las semillas y luego se realizó un ensayo con semillas ya germinadas.

Aplicación en semillas

La **Figura 100(a)** muestra el porcentaje de semillas germinadas a través del tiempo según los tratamientos. Para el caso de los tratamientos con H₂O, filtrado y AgNPs, se realizó un ajuste de tendencia exponencial con la forma $\% \text{ Semillas germinadas} = 100 * (1 - e^{-\frac{t}{t_0}})$, donde el valor de t_0 para el tratamiento con H₂O es 0,66 días; para el tratamiento con el filtrado 0,37 días y para el tratamiento con AgNPs 1,34 días; observándose un enlentecimiento del tiempo de germinación en aquellas semillas tratadas con AgNPs. Para el caso del tratamiento con AgNO₃ no se pudo hacer un ajuste, observándose un nivel más bajo de germinación para todos los tiempos analizados. La **Figura 100(b)** muestra el porcentaje de semillas que, luego de la germinación, lograron desarrollarse en plántula. Los valores obtenidos para la estimación del porcentaje de plántulas que se desarrollaron con la aplicación de filtrado fúngico no varían respecto del control. Por otro lado, en estas concentraciones de AgNO₃, las plántulas no mostraron desarrollo, y las semillas tratadas con AgNPs aunque muestran un buen porcentaje de germinación presentan una menor proporción en cuanto al porcentaje de plántulas que se desarrollaron respecto al control.

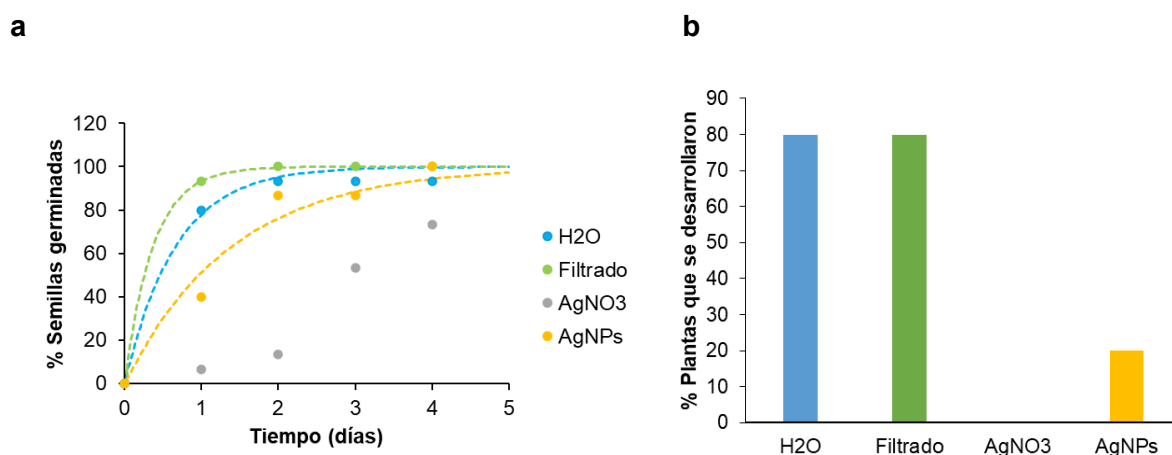


Figura 100. (a) porcentaje de semillas germinadas en función de los días, con un ajuste exponencial realizado para los tratamientos con H₂O, filtrado y AgNPs. **(b)** porcentaje de plantas que se desarrollaron al cuarto día.

Aplicación en plántulas

Las **Figuras 101 a 105** muestran el largo del vástago y de raíz, y el peso fresco y seco, según los distintos tratamientos, y en la **Figura 106** se ilustra fotográficamente el desarrollo de las plántulas según cada tratamiento. Los resultados muestran que la aplicación de AgNPs sintetizadas con *T. albida* para los cuatro estimadores analizados presentan diferencias significativas respecto del control. Por su parte, las AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* y *T. assiutensis* muestran un impacto en el largo del vástago y de la raíz pero no se llegan a observar diferencias significativas en el peso. Sin embargo, como se observa en las fotografías (**Fig. 106**), la exposición de las plántulas a estos tratamientos impide el correcto desarrollo de las mismas. En la **Figura 106** se observa, además, que las plántulas tratadas con AgNO_3 0.5 mM no presentaron desarrollo, mientras que las tratadas con una concentración de 0,5 mg/L (0,003 mM) presentaron un desarrollo similar al control.

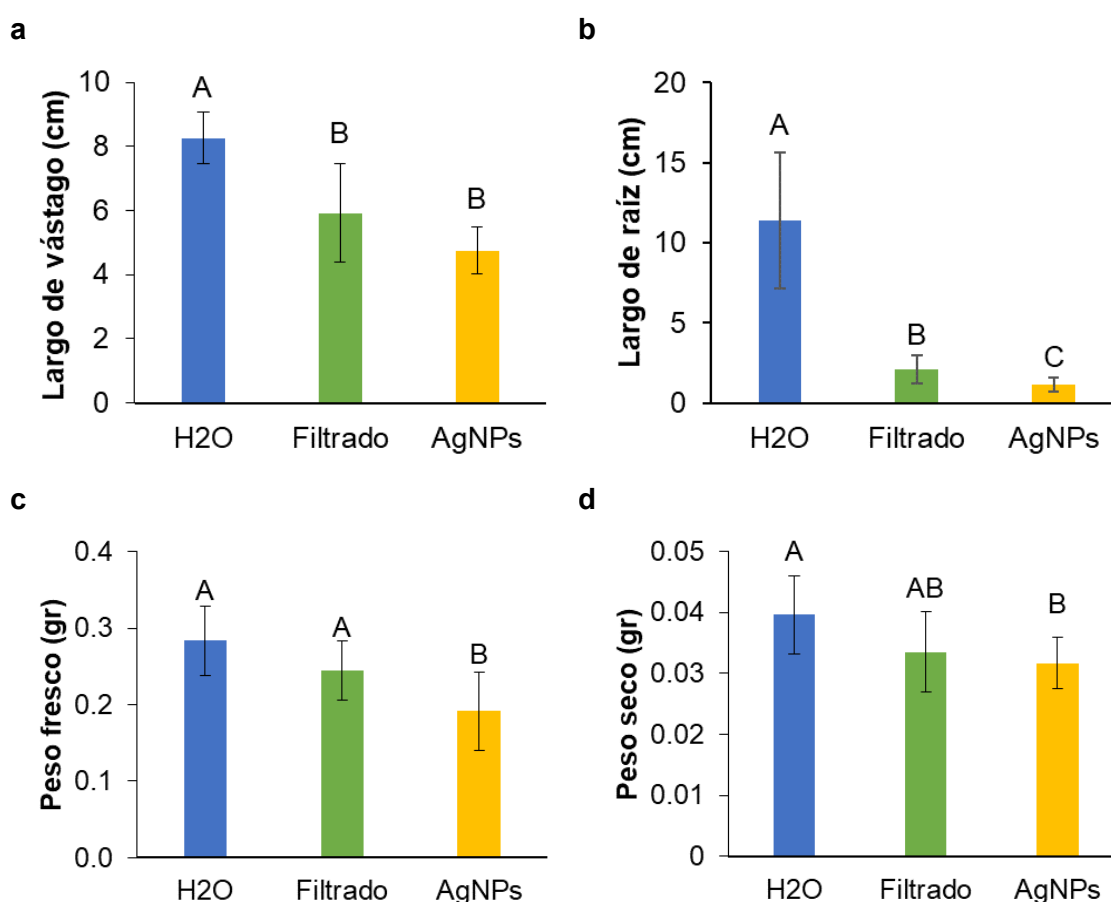


Figura 101. Comparación según los distintos tratamientos con AgNPs sintetizadas con *T. albida* y filtrado fúngico de: **(a)** largo de vástago. **(b)** largo de raíz. **(c)** peso fresco. **(d)** peso seco. Las barras representan el error estándar. Distintas letras significan diferencias significativas.

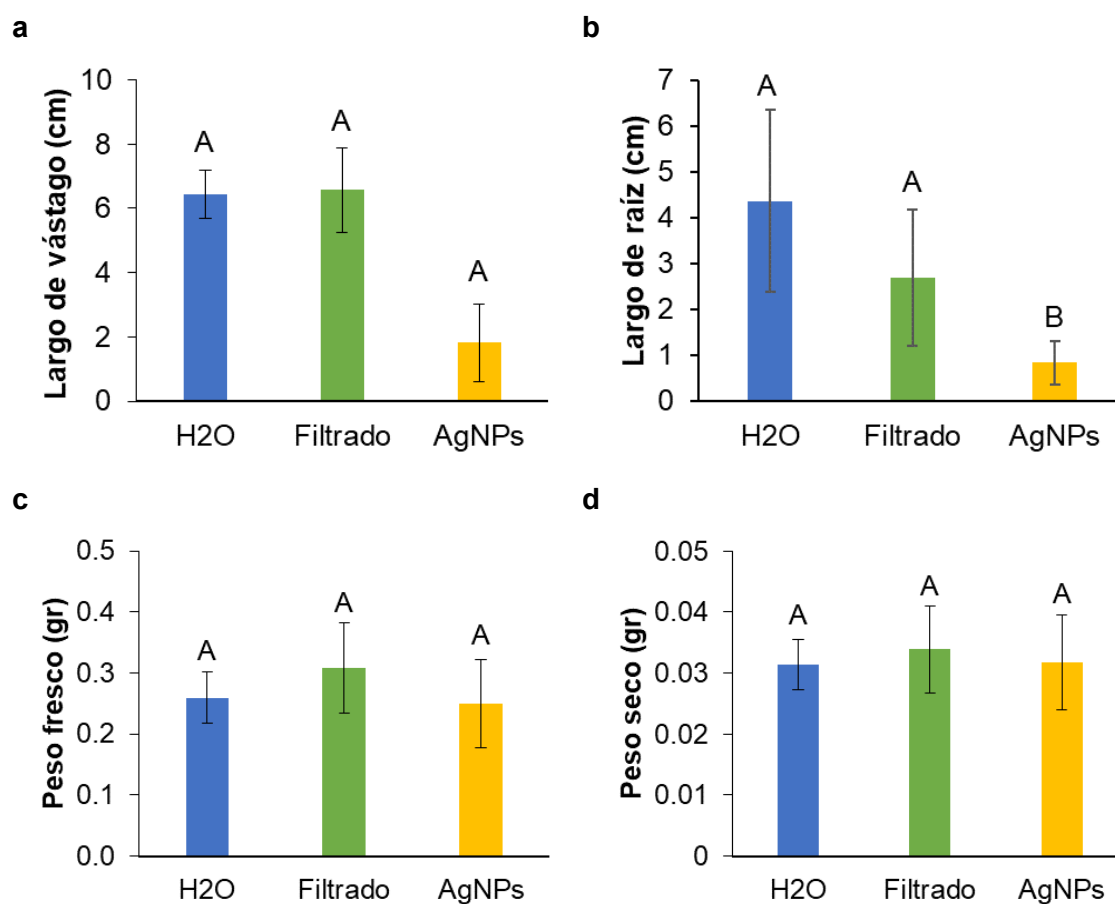


Figura 102. comparación según los distintos tratamientos con AgNPs sintetizadas con *C. luteoalbus* y filtrado fúngico de: **(a)** largo de vástago. **(b)** largo de raíz. **(c)** peso fresco. **(d)** peso seco. Las barras representan el error estándar. Distintas letras significan diferencias significativas.

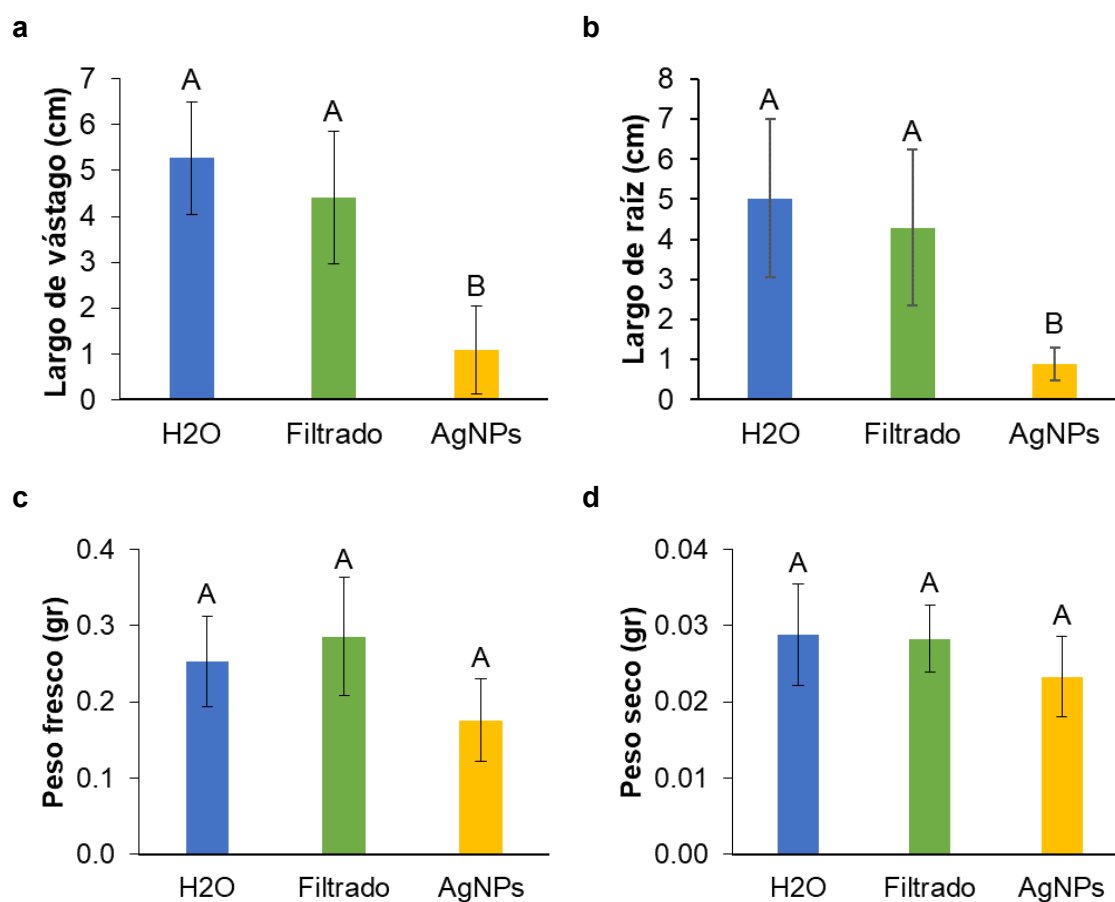


Figura 103. Comparación según los distintos tratamientos con AgNPs sintetizadas con *T. assiutensis*. y filtrado fúngico de: **(a)** largo de vástago. **(b)** largo de raíz. **(c)** peso fresco. **(d)** peso seco. Las barras representan el error estándar. Distintas letras significan diferencias significativas.

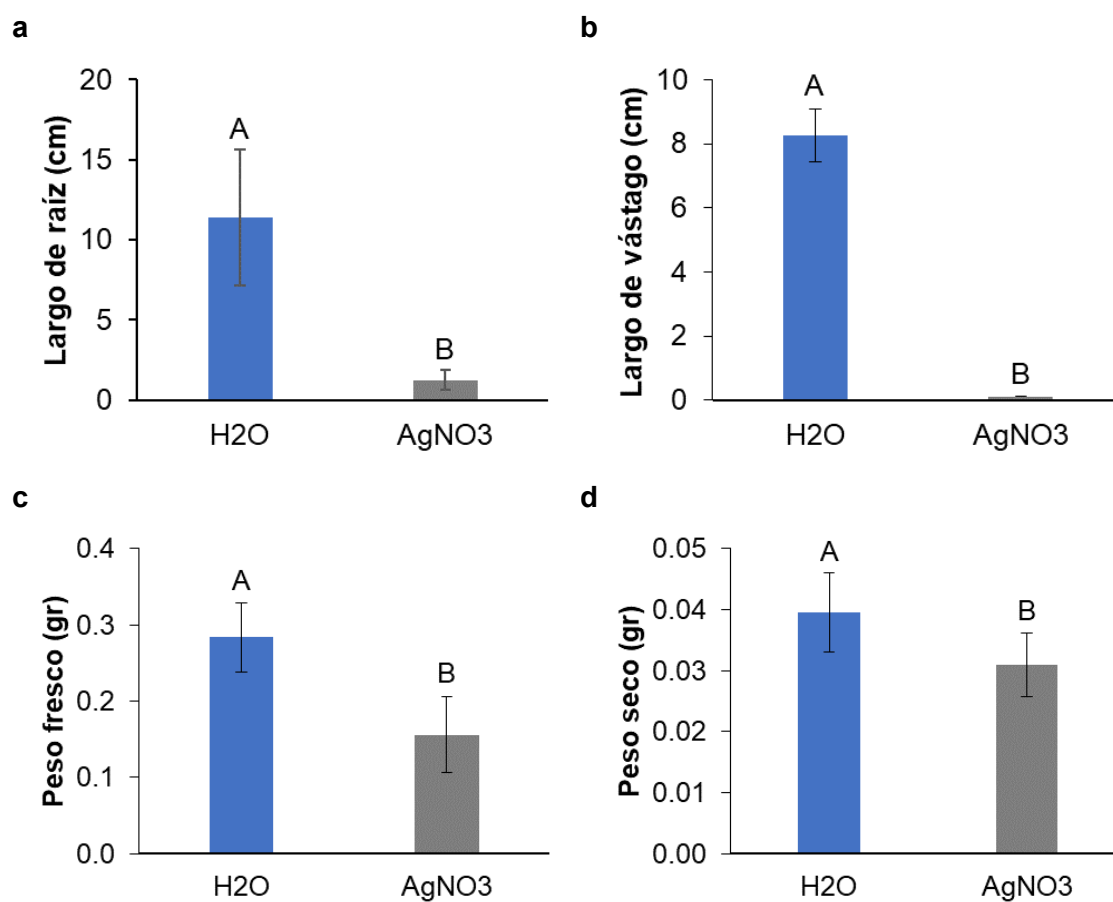


Figura 104. Comparación de control con AgNO₃ 0,5 mM de: **(a)** largo de vástago. **(b)** largo de raíz. **(c)** peso fresco. **(d)** peso seco. Las barras representan el error estándar. Distintas letras significan diferencias significativas.

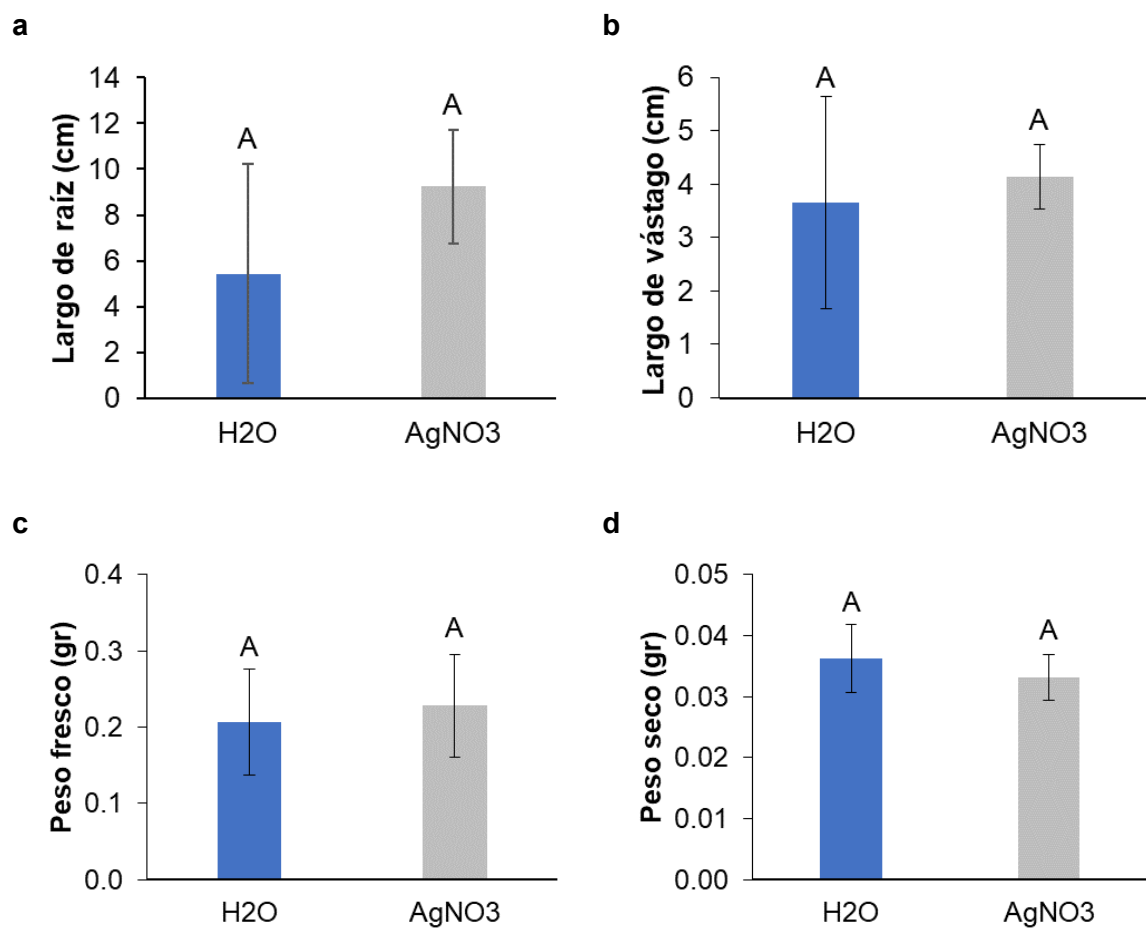


Figura 105. Comparación de control con AgNO_3 0,5 mg/L (0,003 mM) de: **(a)** largo de vástago. **(b)** largo de raíz. **(c)** peso fresco. **(d)** peso seco. Las barras representan el error estándar. Distintas letras significan diferencias significativas.

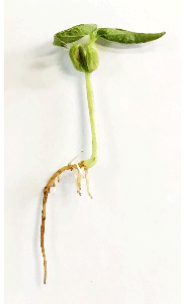
a			b		
					
H ₂ O	Filtrado	AgNPs	H ₂ O	Filtrado	AgNPs
c			d		
					
H ₂ O	Filtrado	AgNPs	H ₂ O	AgNO ₃ 0,5 mM	
e					
					
H ₂ O	AgNO ₃ 0,5 mg/L (0,003 mM)				

Figura 106. Plántula desarrollada en cada tratamiento: **(a)** Experimento con *T. albida*. **(b)** Experimento con *C. luteoalbus*. **(c)** Experimento con *T. assiutensis* **(d)** Experimento con AgNO₃ 0,5 mM. **(e)** Experimento con AgNO₃ 0,5 mg/L (0,003 mM).

III.2. EFECTOS EN COMUNIDADES ENDOFÍTICAS FÚNGICAS Y CEPAS DE HONGOS SELECCIONADAS

III.2.1. Efectos en comunidad endofítica de *Phaseolus radiatus*

Los endófitos son organismos que colonizan asintomáticamente el interior de las plantas durante una parte o todo su ciclo de vida. Han sido encontrados en todas las especies vegetales estudiadas y en diferentes regiones climáticas del mundo, perteneciendo principalmente a especies fúngicas y bacterianas. Estos organismos pueden conferir beneficios a sus hospederos, como la protección frente a herbívoros y patógenos, adaptación a condiciones de estrés, promoción del crecimiento y activación de mecanismos de defensa (Rodríguez *et al.*, 2009). A cambio, los endófitos se benefician de las plantas hospedantes a través de varios medios, incluido el suministro de nutrición, la protección contra la desecación, la estructura espacial y la transmisión reproductiva de propágulos a la próxima generación de hospedadores en el caso de transmisión vertical (Suryanarayanan *et al.*, 2009). Los endófitos pueden afectar la biología de las plantas mediante la producción de diversas entidades químicas que incluyen, entre otras, hormonas de crecimiento de las plantas y mediante la modulación de la expresión genética de defensa y otras vías metabólicas secundarias del huésped.

La tecnología endofítica puede ser empleada para la producción eficiente de plantas y productos vegetales de importancia agrícola y económica (Wani *et al.*, 2015). Es por esto que el estudio de estas comunidades y los factores que la comprometen deberían ser considerados al determinar el impacto de productos liberados en los ecosistemas. En nuestro conocimiento existen pocos trabajos que estudien el impacto de NPs en comunidades endofíticas fúngicas, así como no se han hecho estudios sobre la comunidad endofítica de hojas en *P. radiatus* y el impacto de AgNPs en las características de las mismas. En esta sección se estudia el impacto de las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCCult 4711) en la comunidad endofítica fungica foliar de *P. radiatus*.

III.2.1.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Siembra y aplicación de tratamientos

Se pregerminaron semillas de *P. radiatus* durante dos días. Luego se seleccionaron aquellas semillas con radícula de 2mm y se las sembró en bandejas con plugs conteniendo sustrato comercial Grow Mix® (Densidad Sustrato Seco: 140-180 Kg/m³, porosidad del aire 20-25%; retención de agua 60%) y perlita (2:1). Las bandejas fueron colocadas en el campo experimental de la facultad durante 28 días y regadas con agua cada 2 a 3 días. A los 21 días de crecimiento se aplicó aleatoriamente el tratamiento sobre las plántulas mediante aspersión. Cada tratamiento se aplicó sobre 50 plántulas, para lo cual fueron recubiertas con un embudo con el fin de evitar contaminaciones cruzadas. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Agua (H₂O);
- Filtrado fúngico de *T. albida*;
- AgNO₃ 0,5 mM;
- AgNPs sintetizadas con el filtrado fúngico de *T. albida*.

En la **Figura 107** se presenta un esquema del procedimiento experimental utilizado para el ensayo.

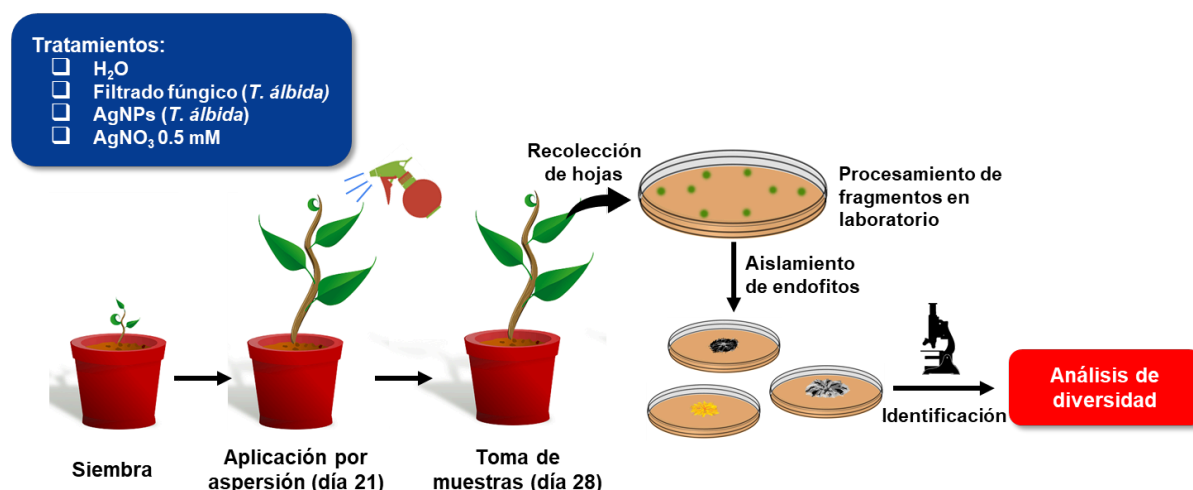


Figura 107. Esquema del procedimiento experimental utilizado para analizar la comunidad endofítica de *P. radiatus* al ser expuesta a distintos tratamientos. Se analizaron 50 plantas por tratamiento, con un total de 200 fragmentos de hojas procesadas, de los cuales se realizaron los aislamientos de hongos para su posterior análisis de diversidad.

Recolección de muestras y aislamiento de endófitos

Al 7^{mo} día de aplicado el tratamiento se procedió a la toma y procesamiento de muestras. Se recolectó 1 hoja por planta y se llevaron al laboratorio para su procesamiento. Las muestras se conservaron en la heladera para evitar cambios en la comunidad endofítica. Las muestras fueron tratadas bajo flujo donde de cada hoja se extrajeron 4 fragmentos del mismo tamaño, cortados con sacabocados de 0,5 cm. Los fragmentos se esterilizaron superficialmente según el siguiente protocolo: 1 minuto en alcohol etílico 70%, 2 minutos en hipoclorito de sodio

4%, 30 segundos en alcohol etílico 50% y tres lavados consecutivos de 3 minutos en agua estéril. Los fragmentos fueron colocados sobre placas de petri de 12 cm con MEAc de manera equidistante. Durante los siguientes dos días se observó la aparición de colonias fúngicas, recuperando todo micelio que surja desde el interior del fragmento de hoja (Zhang *et al.*, 2014). Los aislamientos obtenidos se repicaron hasta obtener cultivos puros (condiciones de cultivo: 25 °C y oscuridad) y se conservaron en cámara de cultivo a 4°C hasta realizar la identificación taxonómica.

Identificación de endófitos

Se realizaron preparados de las muestras entre porta y cubreobjetos, montados en agua o floxina, según fuera necesario. Se observaron características macromorfológicas de las colonias, coloración y textura del micelio, reverso de la caja, estructuras reproductivas, etc., y estructuras micromorfológicas bajo lupa y microscopio óptico Olympus BX41, U-TV1-2, T7 (Tokio, Japón) con cámara Infinity1 anexa, registrándose fotográficamente estructuras sexuales y asexuales, esporas y toda estructura pertinente. Las cepas se agruparon en morfotipos. Para la identificación taxonómica de cada cepa se utilizaron claves y bibliografía especializada.

Análisis de datos

Se calculó el índice de aislamiento (IA) como el número total de aislamientos sobre el total de fragmentos analizados, y se calculó la frecuencia porcentual de aislamientos. Se determinó el número de aislamientos por hoja y se evaluó en un diseño completamente al azar mediante el Modelo Lineal Generalizado con distribución Poisson y función de enlace logarítmico. Se compararon las medias ajustadas con Tukey al 5% de significancia, utilizando el programa estadístico Rstudio versión 2023.03.1+446. Se calculó la frecuencia de cada especie y la frecuencia del taxón en total y por tratamiento.

La similitud entre las comunidades endofíticas de las plantas afectadas por los distintos tratamientos fue evaluada por medio del índice de similitud de Sørensen (So) según la siguiente expresión:

$$So = \frac{2c}{a+b}$$

Donde:

a = número de especies presentes en plantas con el tratamiento A

b = número de especies presentes en plantas con el tratamiento B

c = número de especies presentes en plantas con ambos tratamientos.

Se analizaron las comunidades endofíticas evaluando riqueza, abundancia y diversidad, utilizando diferentes índices para cada una de las comunidades estudiadas. Los análisis se realizaron mediante el programa EstimateS versión 9.1 (Colwell, 2013). Para estimar la riqueza se calcularon las curvas suavizadas de acumulación de especies de acuerdo a los siguientes estimadores no paramétricos: ACE, ICE, Chao 1, Chao 2, jackknife de primer y segundo orden (Jack 1 y Jack 2 respectivamente), bootstrap y MMRuns. La diversidad de

especies para cada comunidad se evaluó según los índices de Simpson inverso ($1/D$), el de Shannon-Wiener (H) y el de Shannon exponencial.

III.2.1.2. RESULTADOS

Se analizó el efecto de las AgNPs sintetizadas utilizando el hongo *T. albida* (BAFCcult 4711) en la comunidad endofítica foliar de *P. radiatus*. Se analizaron un total de 800 fragmentos a partir de los cuales se obtuvieron un total de 349 aislamientos (IA = 0.44). Setenta y tres (73) se aislaron del tratamiento con H₂O (IA = 0.37), 126 del tratamiento con el filtrado (IA = 0.63), 81 del tratamiento con AgNO₃ (IA = 0.41) y 69 del tratamiento con AgNPs (IA = 0.34) (Tabla 17). En la Figura 108 se representa gráficamente la frecuencia porcentual de aislamiento por tratamiento, siendo 22.05% para el tratamiento con H₂O, 38.07% para el tratamiento con el filtrado, 24.47% para el tratamiento con AgNO₃ y 20.85% para el tratamiento con AgNPs. El análisis del número de aislamientos por hoja indica que sólo hay diferencias significativas en el tratamiento con el filtrado, siendo en éste mayor el número de aislamientos (Fig. 109).

Tratamientos	Aislamientos	IA
Agua	73	0.37
Filtrado	126	0.63
AgNO ₃	81	0.41
AgNPs	69	0.34
Total	349	0.44

Tabla 17. Aislamientos e índice de aislamientos por tratamiento.

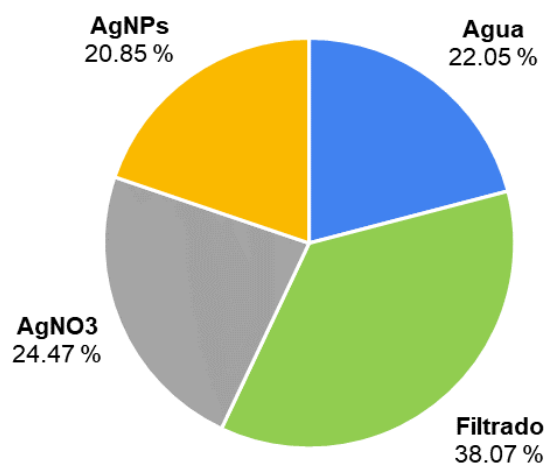


Figura 108. Frecuencia porcentual de aislamiento por tratamiento

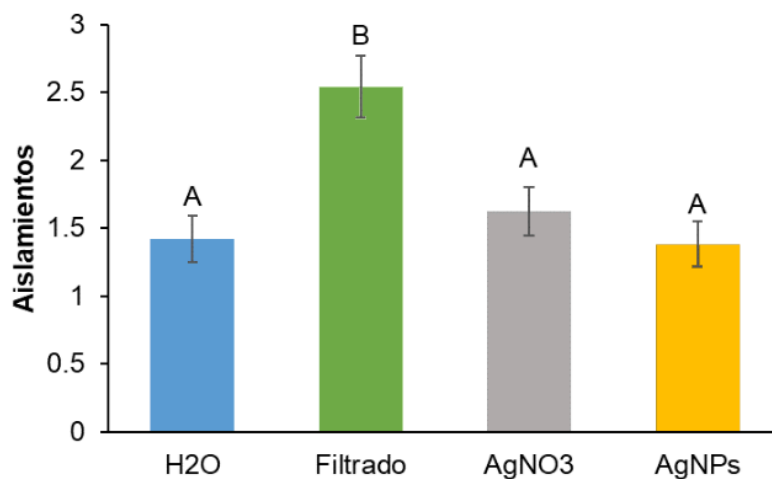


Figura 109. Número de aislamientos por hoja según cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan el error estándar.

En la **Tabla 18** se detallan los taxones encontrados en todo el experimento y en la **Figura 110** se disponen gráficamente los resultados. Las especies más frecuentes fueron *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Chaetomium* sp. y *Nigrospora* sp.

<i>Especie</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Frecuencia del taxón</i>
<i>Alternaria</i> sp.	197	59,52
<i>Epicoccum</i> sp.	42	12,69
<i>Chaetomium</i> sp.	42	12,69
<i>Nigrospora</i> sp.	21	6,34
<i>Cladosporium</i> sp.	4	1,21
<i>Arthrimum</i> sp.	3	0,91
<i>Sordaria</i> sp.	2	0,60
<i>Drechslera</i> sp.	1	0,30
Micelio Estéril	32	9,37
total	343	

Tabla 18. Frecuencia de especies identificadas sin discriminar por tratamiento.

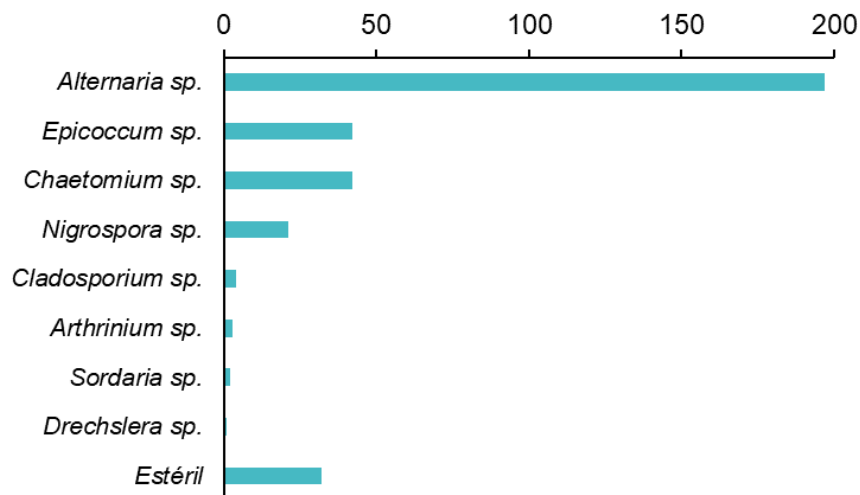


Figura 110. Disposición gráfica de la frecuencia de especies identificadas sin discriminar por tratamiento.

En la **Figura 111** se ilustran algunas de las estructuras de estas especies observadas al microscopio.

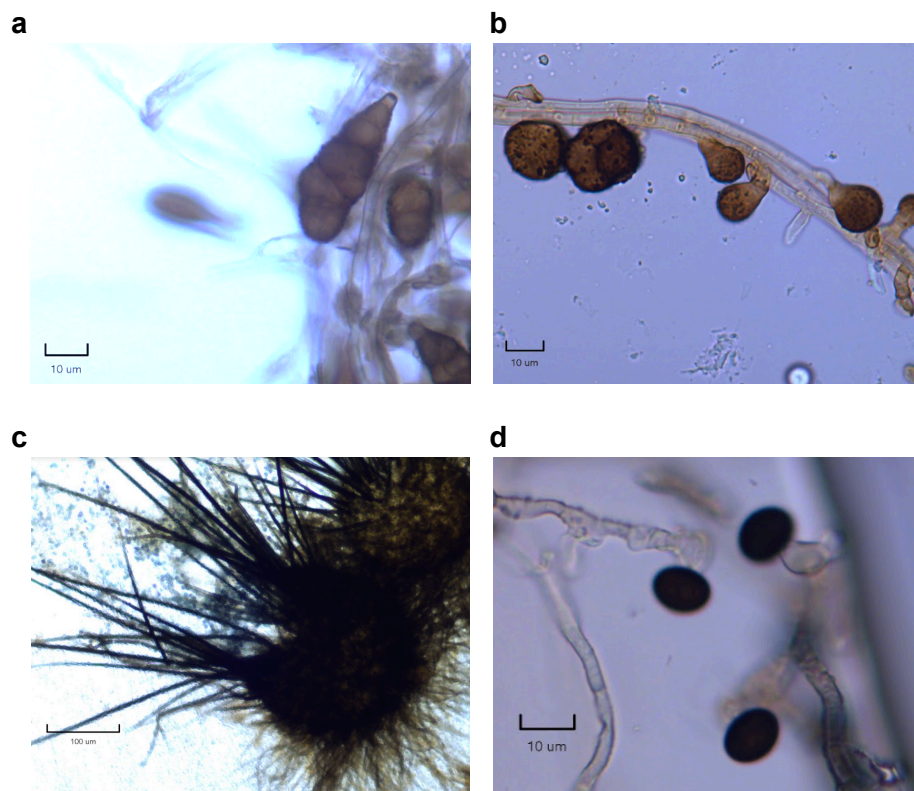


Figura 111. Estructuras reproductivas identificadas de las especies más frecuentes. **(a)** Conidios multicelulares con septos transversales, longitudinales y oblicuos con paredes verrugosas (*Alternaria sp.*). **(b)** Conidios individuales en formación sobre conidióforos ligeramente pigmentados y conidios multicelulares, con pigmentación oscura y una superficie externa verrugosa (*Epicoccum sp.*). **(c)** Ascomas (periteciales) y ascos con ascosporas (*Chaetomium sp.*). **(d)** Hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos y conidios negros, solitarios, unicelulares, ligeramente aplanados horizontalmente con un surco germinativo ecuatorial (*Nigrospora sp.*).

En la **Figura 112** se detallan las frecuencias de especies por tratamiento. En todos los casos *Alternaria* sp. representa más del 50% de los aislamientos. En el tratamiento con H₂O se encontraron 12 taxones, en el tratamiento con filtrado se encontraron 14 taxones, en el tratamiento con AgNO₃ se encontraron 12 taxones y en el tratamiento con AgNPs se encontraron 9 taxones. La **Figura 113** es un diagrama de Venn de las especies encontradas en las plantas afectadas por los distintos tratamientos. Se puede observar que en el tratamiento con H₂O se encontraron 3 taxones únicos, en el tratamiento con el filtrado 7 taxones, en el tratamiento con AgNO₃ 4 taxones y en el tratamiento con AgNPs 2 taxones.

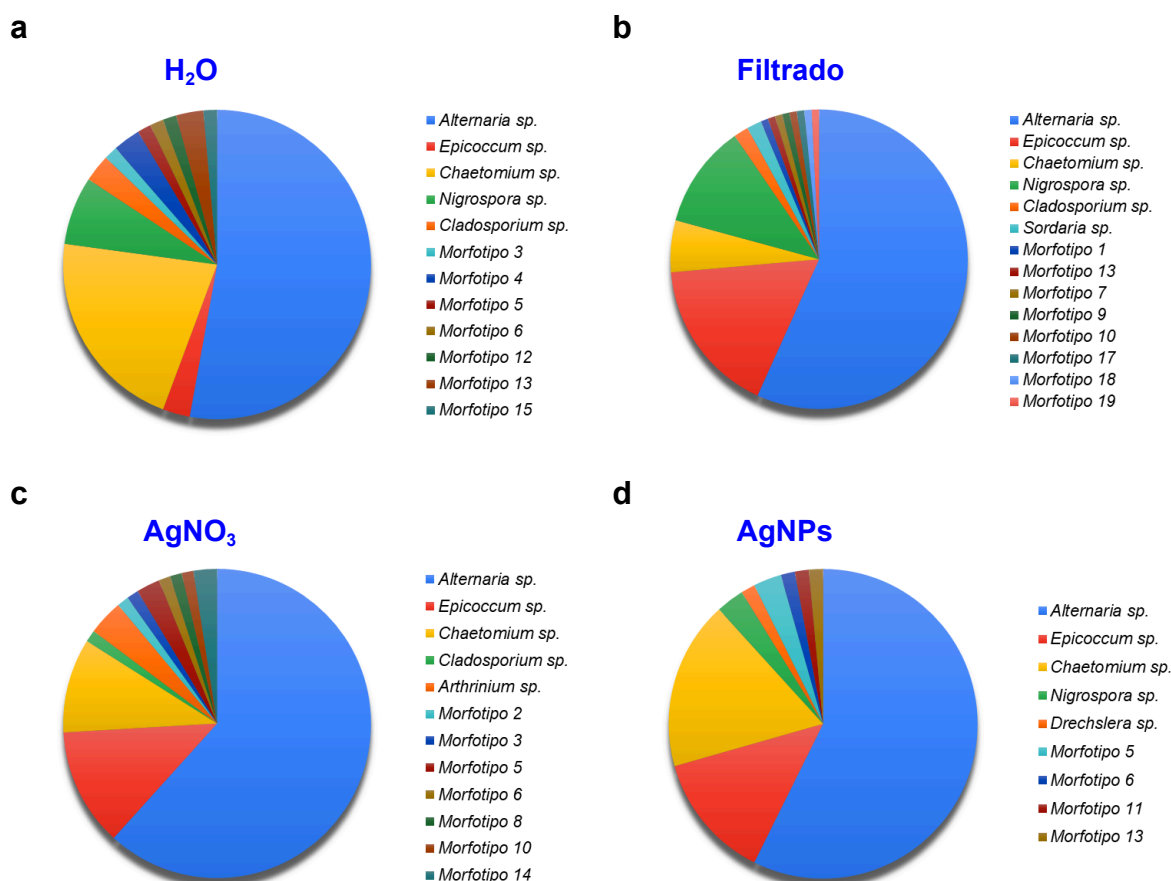


Figura 112. Frecuencias de especies por tratamiento. (a) H₂O. (b) Filtrado. (c) AgNO₃. (d) AgNPs.

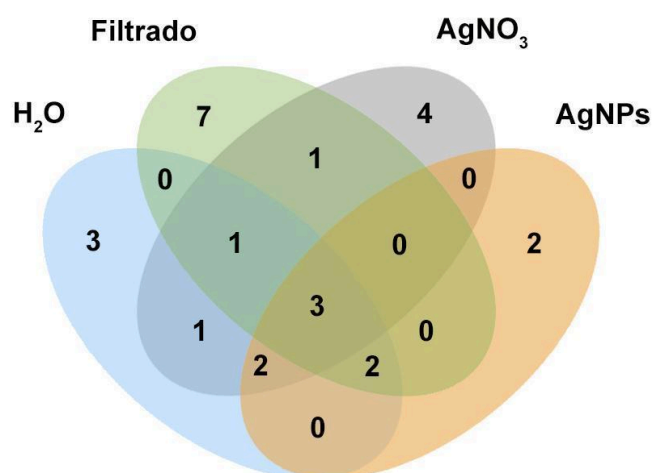


Figura 113. Diagrama de Venn de las distintas especies encontradas por tratamiento.

El índice de similitud de Sørensen fue mayor para el tratamiento control con AgNPs y menor entre el tratamiento con el extracto y AgNPs (**Tabla 19**).

<i>Sørensen</i>			
Tratamiento	AgNPs	Nitrato	Filtrado
Control	0.70	0.56	0.43
AgNPs		0.45	0.32
Nitrato			0.52

Tabla 19. Índices de similitud de Sørensen

En la **Figura 114** se muestran las curvas de acumulación de especies esperadas en cada tratamiento en función del número de muestras analizadas (esfuerzo de muestreo). Todas las curvas muestran un comportamiento similar sin alcanzar la asíntota (máximo de riqueza).

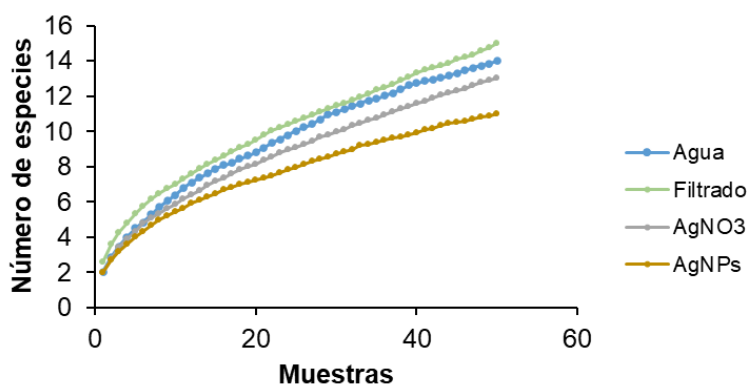


Figura 114. Curvas de acumulación de especies.

Se analizó el comportamiento de diferentes estimadores de riqueza con el fin de seleccionar aquel que resultara menos sensible al tamaño de muestra (aislamientos totales) en todos los tratamientos, para comparar los diferentes tratamientos. El estimador Bootstrap Mean (**Fig. 115**) fue seleccionado en base al análisis realizado. Este estimador tiene en cuenta la

probabilidad de que una especie sea muestreada a medida que aumenta el número de muestras (Smith & van Belle, 1984). El tratamiento con el filtrado mostró el mayor valor, seguido del H₂O, luego el AgNO₃ y por último el tratamiento con AgNPs (**Tabla 20**).

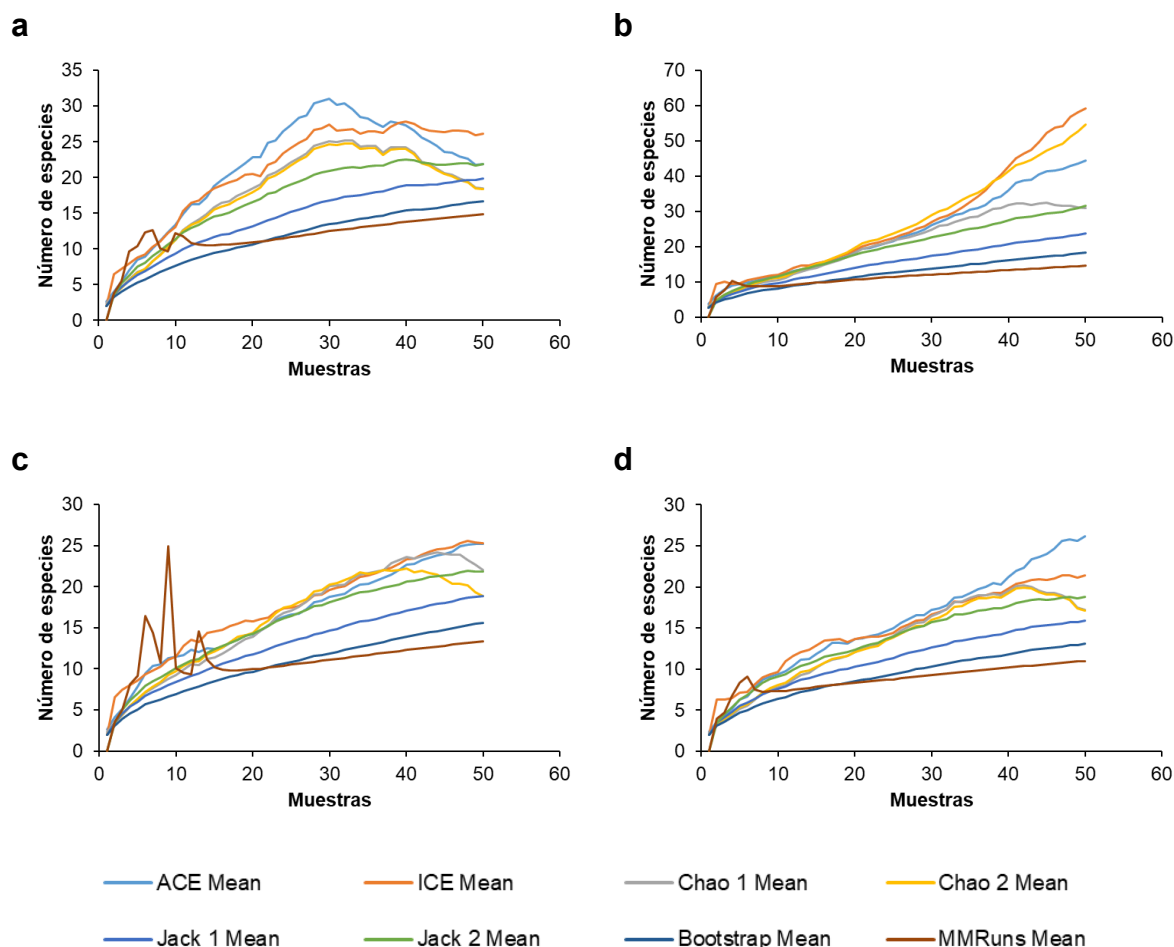


Figura 115. Curvas suavizadas de acumulación de la riqueza según los estimadores no paramétricos ACE, ICE, Chao 1, Chao 2, Jack 1, Jack 2, Bootstrap y MMRuns, para los diferentes tratamientos considerados. **(a)** H₂O. **(b)** Filtrado. **(c)** AgNO₃. **(d)** AgNPs.

De igual manera se analizó el comportamiento de diferentes índices de diversidad con el fin de seleccionar aquel menos sensible al tamaño de muestra en todos los tratamientos, escogiéndose al índice de diversidad de Shannon-Weiner (Shannon Mean) (**Fig. 116**). La mayor diversidad se encontró en las plantas con el tratamiento con el filtrado, luego las plantas aplicadas con AgNO₃, seguido de las plantas con H₂O y por último las plantas aplicadas con AgNPs (**Tabla 20**).

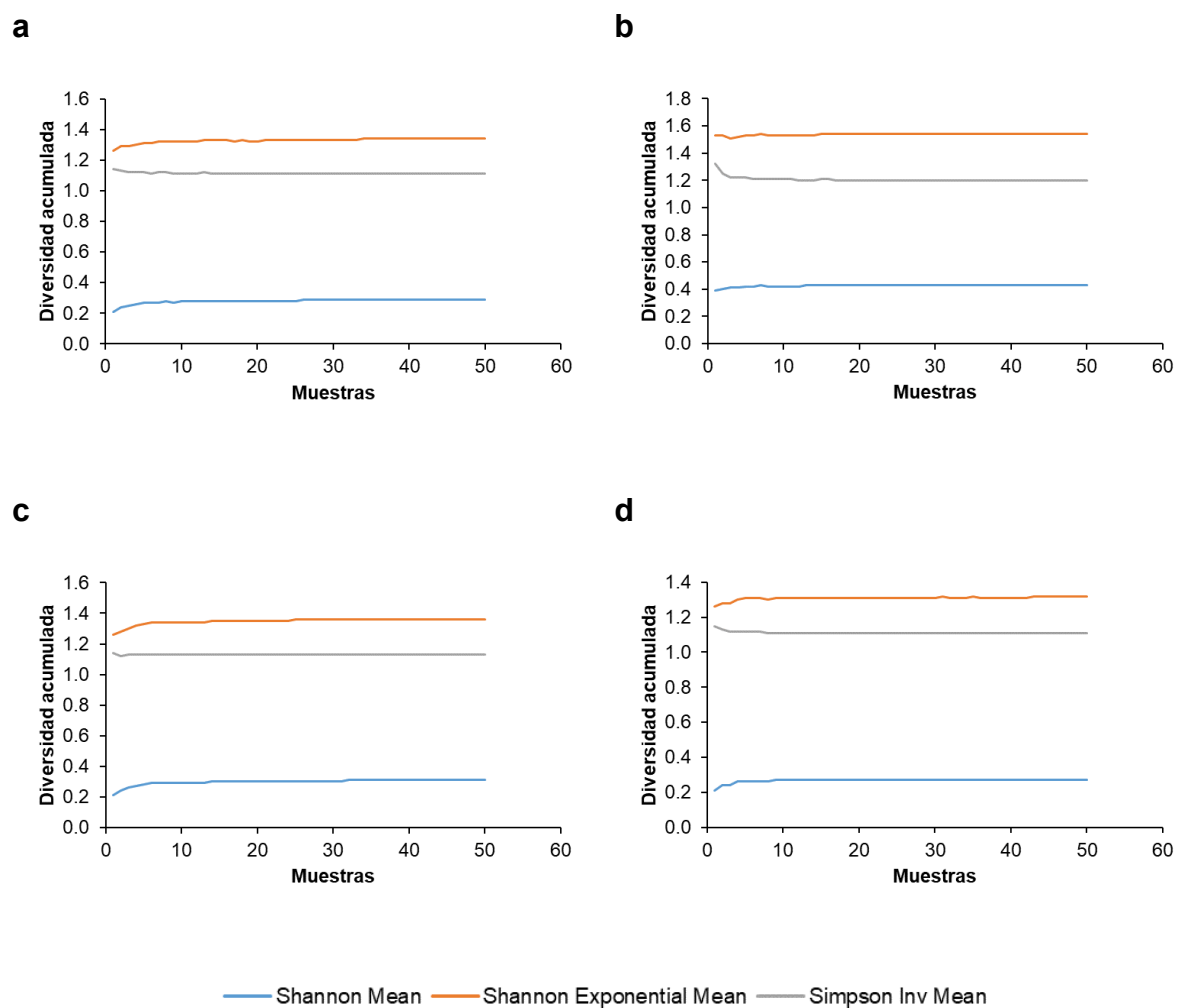


Figura 116. Comportamiento de diferentes índices de diversidad en función de las muestras para los distintos tratamientos considerados: a) H₂O; b) Filtrado; c) AgNO₃; d) AgNPs.

	<i>H₂O</i>	<i>Filtrado</i>	<i>AgNO₃</i>	<i>AgNPs</i>
<i>Riqueza</i>	12	14	12	9
<i>Riqueza estimada por estimador Bootstrap Mean</i>	16.71	18.41	15.58	13.08
<i>Índice de Shannon-Wiener</i>	0.29	0.43	0.31	0.27

Tabla 20. Riqueza, riqueza estimada e índice de diversidad de especies endofíticas para los distintos tratamientos.

III.2.2. Efectos en cepas fúngicas endofíticas

Como fue mencionado en el ítem anterior, los hongos que se desarrollan de forma endofítica son, en muchos casos, determinantes de la respuesta de la planta a diferentes factores ya sean bióticos o abióticos. En muchos casos se ha probado que uno de los componentes de la comunidad fúngica modula fuertemente estas respuestas o incluso pueden modular el establecimiento de otras interacciones (D’Jonsiles *et al.*, 2019). Es por esto que en este estudio se incluyó la evaluación del impacto de las NPs sobre cepas modelo con efectos positivos, en este caso para *Brassica napus* también conocida como colza o canola.

Brassica napus es un cultivo económicamente importante en diferentes continentes, incluidas las regiones templadas y subtropicales de Europa, Canadá, el sur de Asia, China y Australia. Su cultivo generalizado también trae contratiempos, ya que alberga patógenos fúngicos, oomicetos y quítridos que pueden conducir a una grave pérdida de rendimiento (Hu *et al.*, 2021). Las cepas utilizadas en esta sección (*Alternaria* y *Stemphylium*) han sido aisladas por un trabajo de tesis de doctorado realizado en el laboratorio (Gaiser, 2023) que demostró que las mismas confieren resistencia en plantas de colza al estrés abiótico causado por condiciones salinas.

El género *Alternaria* está ampliamente distribuido en materiales orgánicos en descomposición, así como en muchos cultivos alimentarios y forrajeros y plantas silvestres y tiene aproximadamente 50 especies conocidas. Las especies de este género son principalmente saprófitos que se encuentran comúnmente en el suelo o en tejidos vegetales en descomposición; algunos de ellos han adquirido capacidades patógenas (Rosa *et al.*, 2009). *Stemphylium* es un hongo filamentoso dematiáceo que se encuentra ampliamente distribuido en la vegetación en descomposición y en el suelo. Es comúnmente considerado como un contaminante (Elkhateeb & Daba, 2021).

El mecanismo por el cual las AgNPs afectan a organismos fúngicos no está completamente dilucidado; sin embargo, algunos estudios señalan que las nanopartículas de plata provocan cambios en la dinámica de la membrana plasmática de las células fúngicas que conducen a la pérdida de integridad, aumento de la permeabilización y despolarización de la misma. Por otro lado, las AgNPs liberan iones Ag^+ que interactúan con el oxígeno provocando un aumento de los niveles intracelulares de ROS y una acumulación de radicales hidroxilo, pudiendo desencadenar disfunción mitocondrial y alteración de la síntesis de ATP, fragmentación del ADN y apoptosis (Guilger-Casagrande *et al.*, 2021). En esta sección de la tesis se analiza el impacto de la aplicación de las AgNPs en el desarrollo de la colonia de endófitos cultivados *in vitro*.

III.2.2.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El ensayo se realizó sobre los hongos *Stemphylium* sp. y *Alternaria* sp., endófitos aislados de hojas de colza. Para ello se llevó adelante una evaluación sobre el crecimiento en placas de petri luego de la aplicación mediante aspersión (aproximadamente 0,15 µl por tratamiento) sobre el agar donde se desarrolla el inóculo del producto correspondiente a cada uno de los tratamientos

Los organismos se inocularon en el centro de placas de petri con MEAc. Al día 1, cuando se consideró que el inóculo ya había comenzado el crecimiento, se realizó la aplicación de los tratamientos. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Control sin aplicación
- Agua
- Filtrado fúngico de *T. albida*
- AgNPs sintetizadas con el filtrado de *T. albida*

Un conjunto de placas se dejó crecer sin la aplicación de ningún tratamiento hasta el día 4, cuando se considera que el inóculo ya se estableció en la placa (análogo al establecimiento sobre la hoja de colza). En este momento se realizó una aplicación de AgNPs. Se midió el radio del crecimiento de la colonia de todas las placas durante 15 días cada 2 a 3 días. Se realizaron 5 placas por tratamiento. En la **Figura 117** se esquematiza el procedimiento utilizado. Se analizó estadísticamente la diferencia en el crecimiento del radio mediante un modelo de medidas repetidas, asumiendo una matriz de covarianza desestructurada con el programa RStudio versión 2023.03.1+446.

Se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento de los inóculos tratados con AgNPs usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{R-r}{R}$$

donde R es el radio de la colonia del inóculo control y r es el radio de la colonia del inóculo tratado.

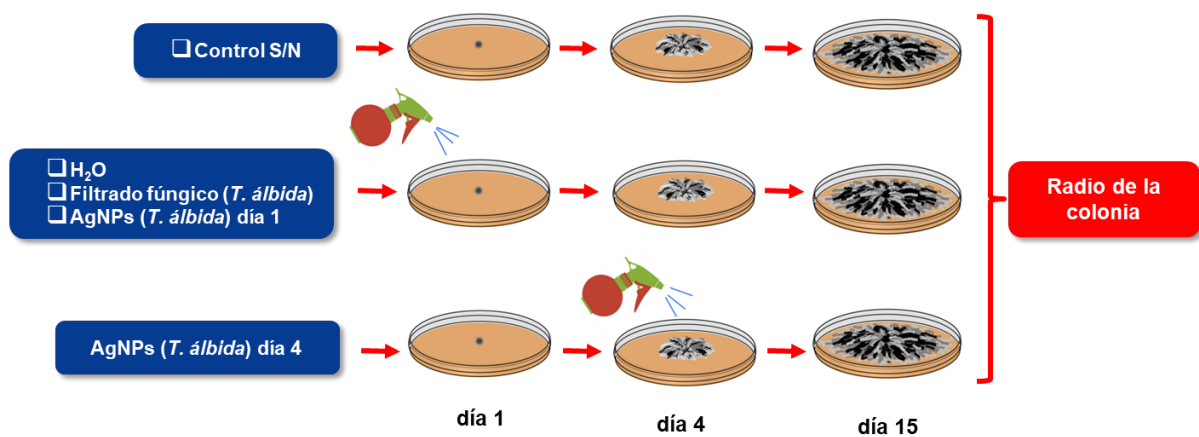


Figura 117. Esquema del procedimiento experimental utilizado para analizar el crecimiento de *Alternaria* sp. y *Stemphylium* sp. en placas de petri, al ser sometidos a distintos tratamientos. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. S/N = sin nada. Se midió el radio de la colonia durante 15 días cada dos a tres días.

III.2.2.2. RESULTADOS

En esta sección del trabajo se analizó el impacto de las AgNPs sintetizadas con el hongo *T. albida* en el desarrollo de dos cepas fúngicas endofíticas aisladas de hojas de colza.

La **Figura 118(a)** y **118(b)** muestra los radios de crecimiento de las colonias para *Stemphylium* sp. y *Alternaria* sp. en función del tiempo y para los distintos tratamientos. En el caso de *Stemphylium* sp. se observa que la aplicación de AgNPs al día 1 genera un menor crecimiento y la colonia no logra alcanzar el tamaño del control al día 15. Por su lado, la aplicación de AgNPs al día 4 no modificó el crecimiento de la colonia respecto del control. En el caso de *Alternaria* sp. la aplicación de AgNPs al día 1 también produce un crecimiento inicial menor de la colonia, aunque al día 13 ya no hay diferencias significativas respecto del control. La aplicación de AgNPs al día 4 en este caso tampoco produce diferencias significativas, aunque aparece una leve tendencia de enlentecimiento. En ambos casos el filtrado fúngico no produjo efectos. La aplicación de AgNPs sobre el cultivo de *Alternaria* sp. produjo un crecimiento anómalo en la colonia. Esto mismo no se observó en la aplicación en el cultivo de *Stemphylium* sp. (**Fig. 119**).

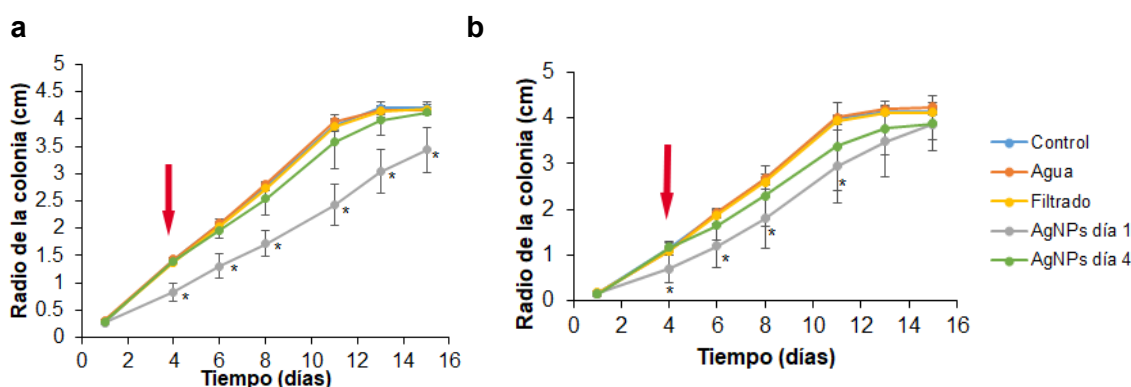


Figura 118. Radio de crecimiento en función de los días. La flecha roja indica el momento en el que se aplicaron las nanopartículas al tratamiento “AgNPs día 4”. Las barras representan el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas. **(a)** *Stemphylium* sp. **(b)** *Alternaria* sp.

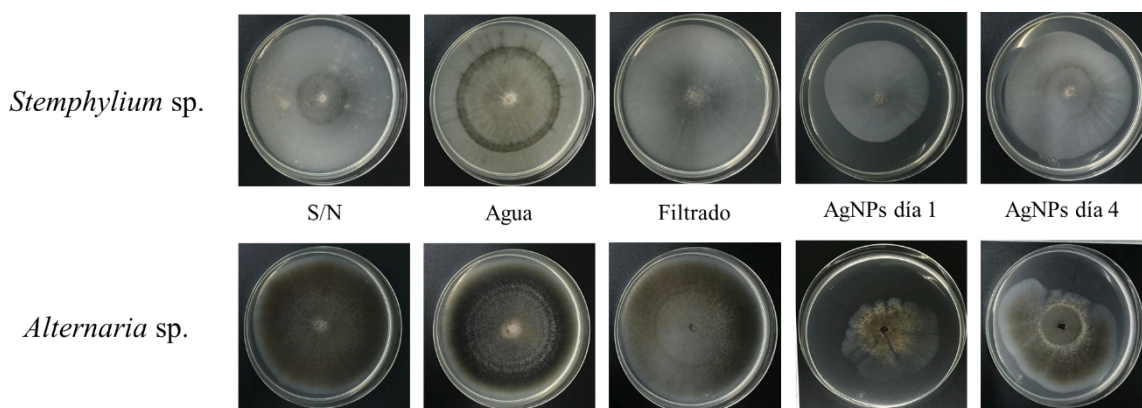


Figura 119. Estado de la colonia al finalizar el experimento de los distintos tratamientos. Se observa un crecimiento anómalo en la colonia de *Alternaria* sp. tratada con AgNPs.

La **Tabla 21** muestra los porcentajes de inhibición para los distintos organismos y tratamientos por día de medición. Se observa que la aplicación de AgNPs al día 1 genera un mayor porcentaje de inhibición siendo más relevante durante los primeros 11 días. En el caso de la aplicación al día 4 la inhibición de crecimiento en todos los casos fue menor al 20%.

<i>Hongo (tratamiento)</i>	<i>día 4</i>	<i>día 6</i>	<i>día 8</i>	<i>día 11</i>	<i>día 13</i>	<i>día 15</i>
<i>Alternaria sp. (AgNPs día 1)</i>	0.39	0.38	0.33	0.26	0.16	0.07
<i>Alternaria sp. (AgNPs día 4)</i>		0.14	0.14	0.15	0.09	0.06
<i>Stemphylium sp. (AgNPs día 1)</i>	0.42	0.38	0.38	0.38	0.28	0.18
<i>Stemphylium sp. (AgNPs día 4)</i>		0.06	0.09	0.08	0.05	0.02

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de crecimiento de los inóculos según organismo y tratamiento para los distintos días de medición.

III.3. EFECTOS EN INSECTOS Y SU COMUNIDAD MICOBÍOTICA ASOCIADA AL INTESTINO

Debido al creciente interés de los últimos años por el uso de nanopartículas en la agricultura (Hazarika *et al.*, 2022), la mayoría de los estudios realizados sobre la toxicidad de AgNPs en insectos han sido diseñados para evaluar sus efectos como insecticidas. (Tortella *et al.*, 2020). Sin embargo, el efecto de las NPs en insectos que son plagas de almacenamiento ha sido poco estudiado (Rouhani *et al.*, 2013). En esta sección se estudia el impacto de las AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711) en el desarrollo del insecto *Tenebrio molitor* y su microbiota intestinal.

III.3.1 *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor L. (Coleoptera: Tenebrionidae), también denominado “gusano de la harina”, es un insecto holometábolo. Los escarabajos de *Tenebrio* son negros o marrones oscuros y se alimentan de productos de granos. Es una plaga importante de la poscosecha que se extiende por todo el mundo. (Sallam, 2013). Se consideran una plaga secundaria, a pesar de que las larvas son capaces de dañar granos enteros que han permanecido largos períodos almacenados (Dell'Orto & Arias, 1985). En el último tiempo, además, el gusano de la harina se ha comenzado a promover como un insecto beneficioso debido a su alto contenido de nutrientes, lo que lo convierte en una fuente de alimentos viable (Vigneron *et al.*, 2019), y por su capacidad de degradar el poliestireno y desechos plásticos (Brandon *et al.*, 2018). Estos atributos hacen que *T. molitor* sea atractivo para la cría en masa. Además, su ciclo de vida corto y fácil recolección hacen a los escarabajos del gusano de la harina un buen organismo modelo de estudio (Simon *et al.*, 2013). Por otro lado, y teniendo en cuenta la facilidad de cría son organismos modelos utilizados en diversos estudios de impacto ambiental y toxicológicos (Canteri de Souza *et al.*, 2018; Brai *et al.*, 2023), pudiendo incluir estudios del impacto en la microbiota intestinal (Jung *et al.*, 2014).

Ciclo de vida

Los insectos experimentan una metamorfosis completa desde el huevo hasta el escarabajo adulto en 4 a 5 meses a través de las etapas larval y pupal, la hembra pone hasta 500 huevos pequeños, esféricos y blancos que eclosionan en larvas comestibles de color amarillo-marrón. Luego, las larvas se someten a numerosas mudas en las cuales la cutícula y el exoesqueleto se desprenden por otras nuevas, pasando por 14 a 20 estadios de crecimiento (Park *et al.*, 2014), hasta cambiar a la etapa pupal, donde el insecto permanece latente y sin alimentación. Al salir de la pupa los adultos son de color blanquecino y conforme pase el tiempo van adquiriendo un tono marrón. En una semana ya adquieren el color negro-marrón propio del adulto y son sexualmente maduros (Ong *et al.*, 2018) (**Fig. 120**).

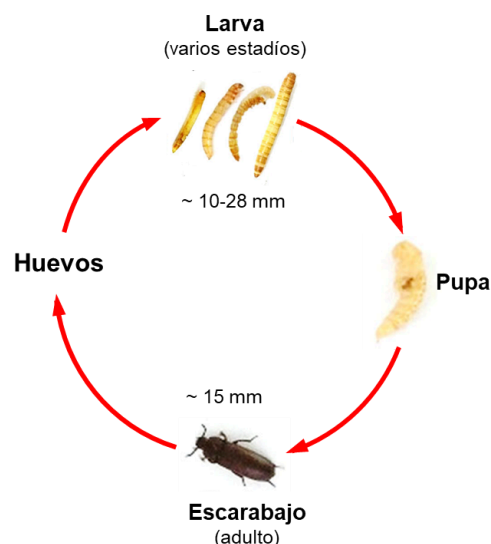


Figura 120. Ciclo de vida de *T. molitor*. Adaptado de Ong *et al.*, (2018).

III.3.2 Microbiota intestinal

El intestino es el lugar donde los animales digieren los alimentos y absorben los nutrientes. La microbiota es un elemento indispensable en las funciones intestinales y la diferenciación de sus hospedantes. El éxito evolutivo y de diversificación de los insectos depende del microbioma beneficioso, que se sabe que promueve el fitness de los insectos, protege a los hospedantes contra parásitos y patógenos, desintoxica sustancias químicas y estimula las respuestas inmunes (Zhang *et al.*, 2022). A pesar del constante aumento en el uso de nanomateriales aún existen importantes lagunas de conocimiento en el campo y su posible toxicidad para los organismos, así como se desconoce su efecto sobre la composición de la microbiota intestinal de la mayoría de los animales (Muhammad *et al.*, 2022).

Las asociaciones microbianas con intestinos de insecto pueden estudiarse mediante dos aproximaciones: de cultivo dependiente, en la cual se realizan cultivos de aislamientos de este órgano, o mediante técnicas de cultivo independiente a través de estudios metagenómicos (Ceriani-Nakamurakare *et al.*, 2020). La metagenómica se puede definir como el estudio del metagenoma (todo el material genético de la comunidad microbiana existente en un determinado entorno ecológico) cuyo objetivo final es adquirir una visión global de la composición y función de la comunidad microbiana (Shi *et al.*, 2010). La metagenómica es una derivación de la genómica microbiana convencional, con la diferencia clave de que evita el requisito de obtener cultivos puros para la secuenciación, permitiendo revelar los genomas de la mayoría de los microorganismos que no pueden obtenerse fácilmente en cultivo no contaminado. Además, dado que las muestras se obtienen de comunidades y no de poblaciones aisladas, la metagenómica puede servir para establecer hipótesis sobre las interacciones entre los miembros de la comunidad (Kunin *et al.*, 2008).

III.3.3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se llevaron a cabo dos ensayos principales para evaluar el efecto de AgNPs en el desarrollo de larvas de *T. molitor* a través de la ingesta de soluciones coloidales de las mismas. En un primer ensayo se evaluó el efecto en larvas pequeñas, alrededor del estadio 3 según Park *et al.*, (2014), con un tamaño de 0.5 ± 0.03 cm (**Ensayo A**, larvas pequeñas). En un segundo ensayo se evaluó el efecto en larvas más grandes, alrededor del estadio 13 según Park *et al.*, (2014), con un tamaño de 2.19 ± 0.29 cm (**Ensayo B**, larvas grandes). En ambos casos se utilizó un $n=15$, con dos réplicas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Ensayo A

- AgNPs sintetizadas con *T. albida* 540 mg/L (AgNPs Bio)
- AgNPs sintetizadas por ablación láser 10 mg/L (AgNPs Fis)
- Filtrado fúngico de *T. albida*
- H₂O (control)

Ensayo B

- AgNPs sintetizadas con *T. albida* 540 mg/L (AgNPs Bio)
- AgNPs sintetizadas por ablación láser 10 mg/L (AgNPs Fis)
- H₂O (control)

La administración de los tratamientos se realizó a través de bebederos que se prepararon con pipetas que contenían 4 mL del respectivo tratamiento, con un algodón en el extremo, por donde las larvas accedían al líquido. Previamente se comprobó que las nanopartículas no se veían afectadas por el paso a través del algodón. Para ello se midieron los espectros de extinción de las NPs y se las comparó con el mismo espectro antes de pasar por el algodón, sin observarse cambios en el mismo. Los bebederos fueron rellenados cada 7 días. En la **Figura 121** se detalla el espectro de absorción de las soluciones de AgNPs utilizadas en los ensayos. Se observa que las AgNPs sintetizadas con *T. albida* presenta un pico más ancho con un máximo alrededor de los 420-430 nm, que aquellas sintetizadas por ablación láser con un máximo alrededor de los 400 nm, indicando una distribución de tamaños más amplia en el primer caso.

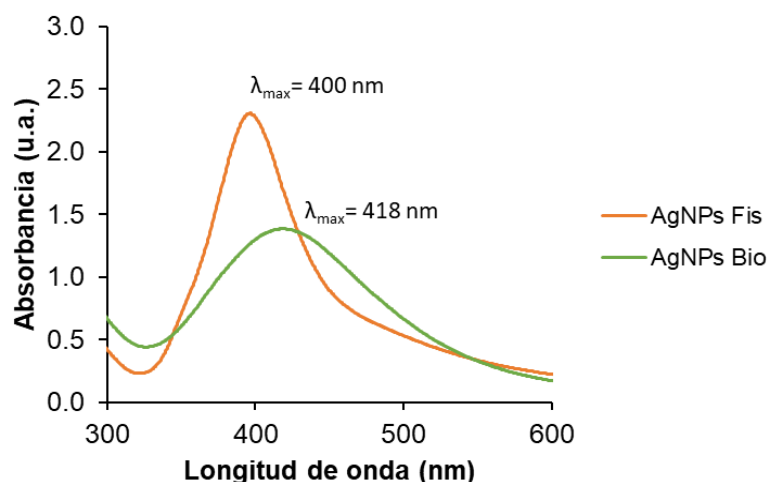


Figura 121. Espectro de absorción de las AgNPs usadas en los ensayos con larvas de *T. molitor*, en ambos casos dilución 1:8.

Ensayo A

Análisis de supervivencia

Se seleccionaron las larvas y se determinó su peso ($t=0$). Luego se colocaron las larvas en recipientes de vidrio con 50 gr de harina de maíz y permanecieron durante 5 días sin agua para adaptar a las larvas al recipiente y procurar que todas las larvas estén en iguales condiciones de sed. Al quinto día se colocaron bebederos con los respectivos tratamientos ($t=1$). A los 15 días se comenzó con el recuento de supervivencia de las larvas y fueron pesadas nuevamente ($t=2$). Los días de recuento fueron: 20, 25, 29, 34 y 39. El último día ($t=3$) las larvas fueron medidas y pesadas nuevamente. Al finalizar el ensayo, se procedió a la extracción del intestino de las larvas supervivientes para su posterior procesamiento para el análisis metagenómico. La **Figura 122** muestra un esquema del procedimiento experimental utilizado para el ensayo.

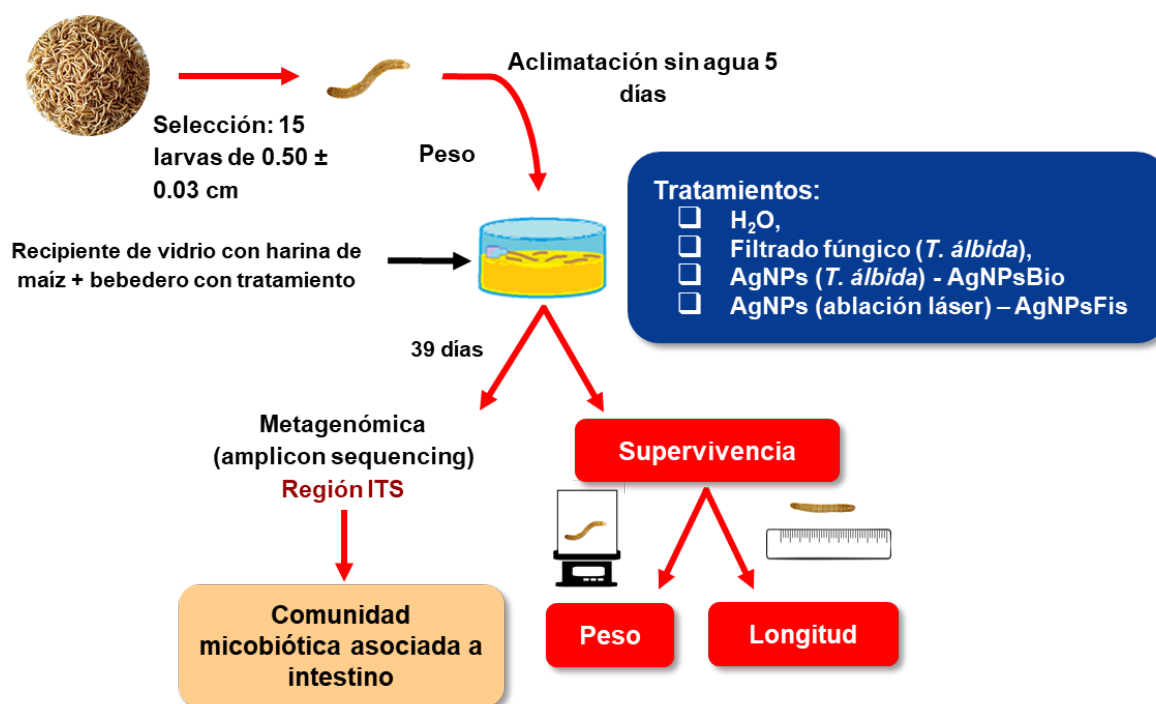


Figura 122. Esquema del procedimiento experimental utilizado para analizar el impacto de los tratamientos en el desarrollo de larvas pequeñas (*Ensayo A*) de *T. molitor*. Se seleccionaron 15 larvas por recipiente con dos repeticiones por tratamiento.

Análisis de la comunidad microbiótica asociada al intestino mediante metagenómica

Para el análisis metagenómico se utilizaron las larvas tratadas únicamente con agua, y las tratadas con AgNPsBio y AgNPsFis. No se analizaron las larvas tratadas con el filtrado fúngico debido a que no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia respecto del control. Se extrajo el ADN total del intestino de las larvas, usando el kit de aislamiento de ADN microbiano UltraClean TM (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, EE. UU.) con el paso adicional de lisis alternativa, para aumentar los rendimientos, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para documentar la presencia de ADN fúngico en cada muestra, se realizó una corrida electroforética con 1 µl de muestra y, además, se amplificó la región Espaciador Interno Transcrito del ADN nuclear (ITS) utilizando el cebador universal ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), con las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, annealing a 56 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 7 min. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 50,0 µl que contenían buffer de PCR 10 mM suministrado por el fabricante, MgCl₂ 1,5 mM, 1 mM de cada dNTP, 10 mM de cada cebador, 1 U de ADN polimerasa recombinante GoTaq (Promega Corp.) y 2 µl de ADN genómico fúngico. (Ceriani-Nakamurakare *et al.*, 2016) La amplificación se visualizó mediante electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red™ (Biotium).

Posteriormente se generaron las librerías de amplicones utilizando los primers ITS1 e ITS4 (ITS rDNA), denominados como “barcodes” fúngicos para amplificar la región espaciadora transcrita interna 2 (White *et al.*, 1990; Nilsson *et al.*, 2015). Los procedimientos posteriores

se llevaron de acuerdo a los parámetros estándares recomendados por el fabricante. Los datos fueron posteriormente analizados mediante QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019) y el paquete Vegan vía RStudio versión 2023.03.1+446. Las unidades taxonómicas operativas (OTU) se agruparon con una similitud de secuencia del 97%. Para cada OTU la lectura más abundante fue designada como la secuencia representativa. La asignación taxonómica fue realizada utilizando la clasificación naïve Bayesiana (confianza mínima establecida en 0,8) contra la base de datos UNITE. Se eliminaron las OTU que estaban respaldadas por menos de 10 secuencias (Miller *et al.*, 2016), mientras que los singleton (grupos que contienen sólo una lectura) se descartaron porque no se pueden distinguir de los errores de secuenciación (Kunin *et al.*, 2010). Se descartaron también secuencias consideradas contaminaciones como aquellas asignadas al Reino Plantae. Para cada OTU, la lectura más abundante se designó como secuencia representativa (seis muestras-conjunto de datos). Para refinar las asignaciones realizadas previamente (frente a la base de datos UNITE), se realizaron búsquedas MegaBLAST en la base de datos NCBI y la base de datos MycoBank (ubicaciones-conjunto de datos) (Ceriani-Nakamurakare *et al.*, 2020). Las secuencias de referencia utilizadas fueron aquellas publicadas por taxónomos expertos y/o correspondientes a organismos depositados en colecciones de cultivos (si estaban disponibles, se les dio preferencia a las secuencias de cepas de tipos nomenclaturales).

Ensayo B

Análisis de pasaje a pupa y a adulto

Las larvas se colocaron en recipientes de vidrio con 50 gr de harina de maíz y permanecieron durante 5 días sin agua para adaptar a las larvas al recipiente y procurar que todas las larvas estén en iguales condiciones de sed. Al quinto día se dispusieron los bebederos según los tratamientos, las larvas fueron pesadas y se comenzó el conteo de supervivencia de las mismas, el pasaje de larva a pupa, y el pasaje de pupa a adulto, cada 2 a 3 días, hasta llegar al día 49. El peso de las pupas y de los adultos fue registrado. La **Figura 123** muestra un esquema del procedimiento experimental utilizado para el ensayo.

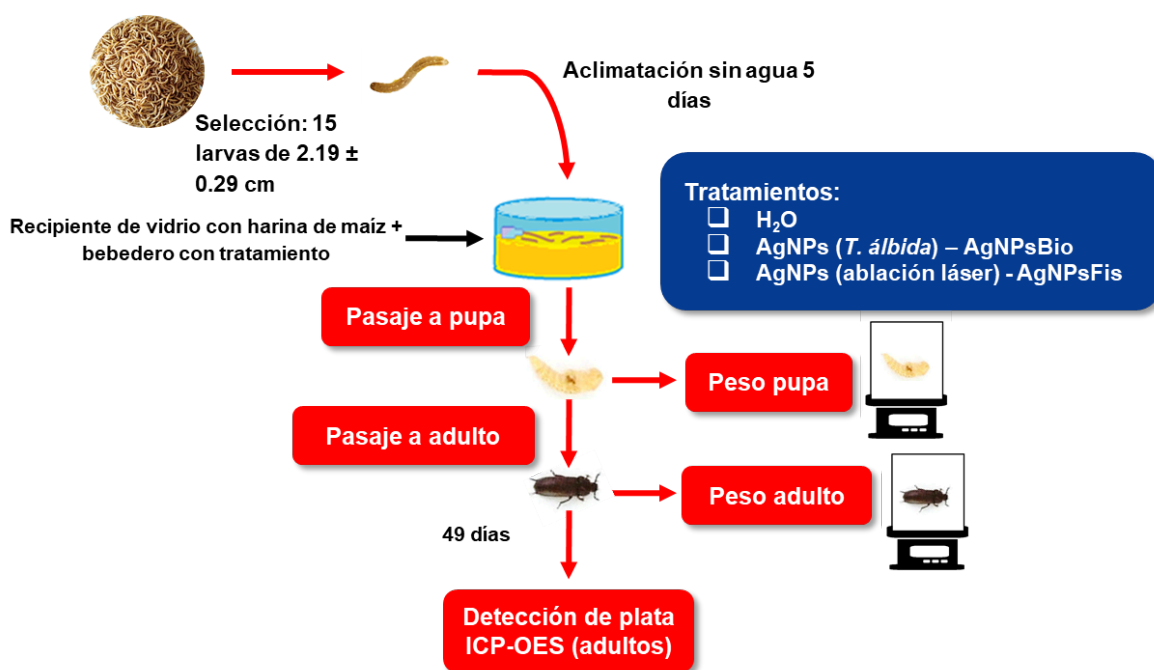


Figura 123. Esquema del procedimiento experimental utilizado para analizar el impacto de los tratamientos en el desarrollo de larvas grandes (*Ensayo B*) de *T. molitor*. Se seleccionaron 15 larvas por recipiente con dos repeticiones por tratamiento.

Análisis de las concentraciones de Ag mediante ICP-OES

A fin de evaluar si las AgNPs eran asimiladas en la biomasa de los insectos o, por el contrario, eran excretadas en las heces, se analizó la concentración de Ag⁰ en adultos mediante ICP-OES. Las digestiones de los escarabajos se hicieron por digestión ácida (1 escarabajo en 0,5ml de HNO₃) utilizando un microondas marca Milestone modelo ULTRAWAVE. Las mediciones se hicieron utilizando un Espectrofotómetro de Emisión Óptica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), marca Perkin Elmer modelo Dual View 7300, a una longitud de onda de 324.8nm. Todas las soluciones (curvas de calibración y soluciones de muestra) fueron preparadas gravimétricamente. Las soluciones de calibración se prepararon gravimétricamente utilizando el material de referencia certificado NIST 3151.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando RStudio Versión 2023.03.1+446. Se utilizó el modelo de regresión de Cox para examinar la supervivencia de larvas pequeñas (tiempo hasta la muerte desde el inicio del experimento) en relación con los diferentes tratamientos comprobando el riesgo proporcional. Se utilizaron las librerías geepack, survival y survminer. Se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) para analizar el pasaje a pupa y a adulto en el tiempo. Se aplicó una distribución de error binomial y una función de enlace logit en un modelo condicional con estructura de correlación "exchangeable". Se comprobó la sobredispersión. Las diferencias en longitud y peso de larvas, pupas y adultos se analizaron mediante ANOVA y las medias se compararon entre tratamientos mediante la prueba de Tukey ($p=0,05$).

Se calcularon los índices de biodiversidad de Riqueza (S), Shannon (H) y Equidad (J) de la microbiota aislada del intestino de las larvas de *T. molitor* sometidas a los distintos tratamientos. Para cuantificar las diferencias en las comunidades fúngicas entre las muestras, se generó una matriz de diferencias por pares de Bray-Curtis y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para visualizar las similitudes de las muestras con el efecto de los tratamientos y se utilizó una escala multidimensional no métrica (NMDS) para visualizar la distancia filogenética (similitud de Bray-Curtis) entre las comunidades micobióticas de las diferentes muestras utilizando la librería Vegan.

III.3.3.2 RESULTADOS

Ensayo A

En esta sección del trabajo se analizó el impacto de las AgNPs sintetizadas utilizando el hongo *T. albida* (BAFCCult 4711) en la supervivencia de larvas en el estadio 3 durante 44 días y de la comunidad microbiótica asociada al intestino de las mismas al finalizar el experimento.

Análisis de supervivencia

El análisis de supervivencia de Cox muestra que los coeficientes de regresión para los tratamientos con NPs son positivos y superiores al control con H₂O, aunque no son estadísticamente significativos (**Tabla 22**). Sin embargo, en el gráfico de probabilidad de supervivencia (**Fig. 124**) se puede observar esta tendencia.

	coef	exp(coef)	z	p
Filtrado	0.107	1.11	0.437	0.810
AgNPsBio	0.689	1.99	0.404	0.088
AgNPsFis	0.591	1.81	0.399	0.140

Tabla 22. Resultados del análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox sobre la supervivencia de larvas con base en diferentes tratamientos. La tabla muestra para cada tratamiento el coeficiente j (coef) estimado, el riesgo relativo $\exp(j)$ ($\exp(\text{coef})$), el error estándar, el valor z y el valor p correspondiente, en comparación con Control H₂O.

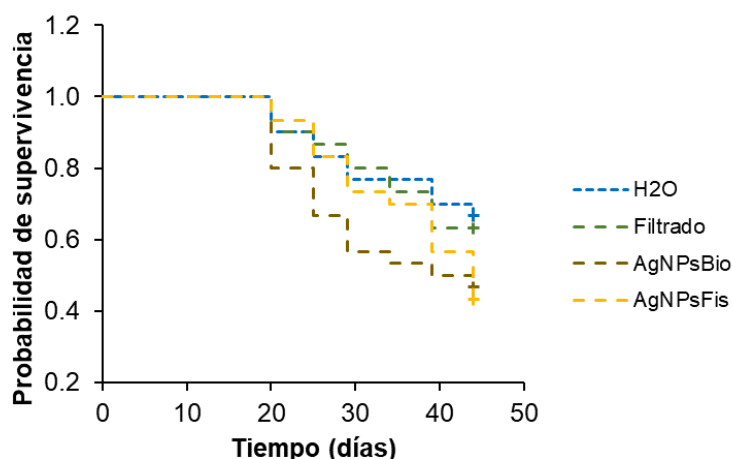


Figura 124. Comparación de la supervivencia acumulada entre tratamientos a lo largo del tiempo. Hasta el día 44 desde el inicio del ensayo, la probabilidad de supervivencia de las larvas expuestas a NPs de síntesis biológica tiende a ser menor

El análisis de ANOVA para la comparación de medias de peso y longitud de larvas mostró que las larvas tratadas con nanopartículas de síntesis biológica son más cortas y tienen menor peso (**Fig. 125** y **Fig. 126**). En la **Figura 127** se observa que la ralentización de ganancia de peso debido a los tratamientos con AgNPs ya es evidente en t_2 .

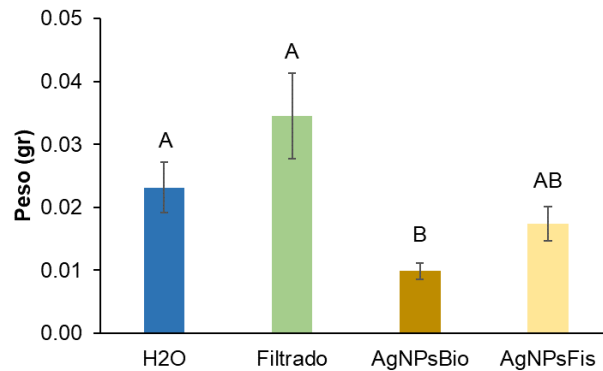


Figura 125. Comparación de peso de larvas pequeñas al final del ensayo. Las barras de error representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.

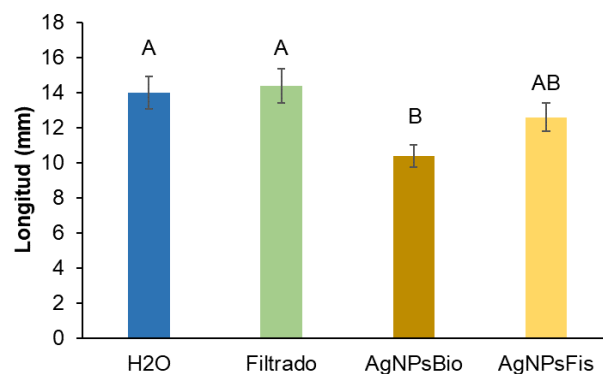


Figura 126. Comparación de longitud de larvas pequeñas al final del ensayo. Las barras representan el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas.

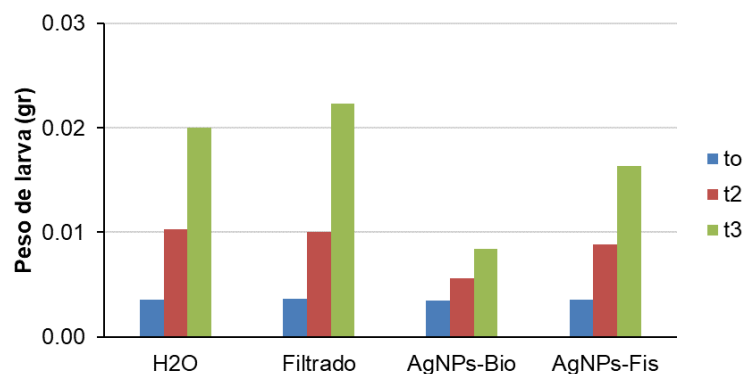


Figura 127. Cambio del peso de las larvas pequeñas a lo largo del tiempo.

Análisis de la comunidad micobiota intestinal mediante metagenómica

Se caracterizó la micobiota asociada al intestino de *T. molitor* sometido a distintos tratamientos. El resultado de los análisis alcanzó un total de 31.734 lecturas. Después del segundo filtrado de calidad, se eliminaron 7.077 (22.3%), dejando 24.657 (77.7%) secuencias para su análisis.

Se obtuvieron 123 OTU totales de los cuales un 50,4% se mantuvieron y un 49,6% se

descartaron. Las secuencias ensambladas representaron un total de 68 OTU (97% de similitud) agrupadas en 23 taxones de hongos. Del total de OTU el 76,5% era filamentosos, mientras que el 23,5% era levaduriforme, manteniéndose una relación similar en los tratamientos (**Tabla 23**). En la **Figura 128** se representa la diversidad de OTU según cada tratamiento.

El Phylum Ascomycota representó el 60,3% del total de lecturas, mientras que el Phylum Basidiomycota representó el 39,7% del total de lecturas. Un análisis más detallado mostró que, dentro de estos Phyla, los taxones predominantes fueron: Eurotiales (16,2%), Pleosporales (14,7%), Hypocreales (7,4%), Malasseziales (7,4%), Tremellales (7,4%) y Agaricales (7,4%). La **Tabla 24** detalla los datos generales de clasificación por tratamiento. En la **Figura 130** se representa la abundancia relativa de los géneros fúngicos registrados sin discriminar por tratamiento. El género más representado es *Tetrapyrgos*, seguido por *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Malassezia* y *Fusarium*.

	Total	H ₂ O	AgNPsBio	AgNPsFis
Filamentoso	52	27	15	23
Levaduriforme	16	8	6	8

Tabla 23. Representación de número de OTUs correspondientes a hongos filamentosos y levaduriformes en los distintos tratamientos.

	OTU TOTALES	Basidiomycota	Ascomycota	Lev/Mic	Clase	Orden	Género
H ₂ O	35	14	21	0,30	11	20	24
AgNPsBio	21	9	12	0,4	8	16	16
AgNPsFis	31	11	20	0,35	10	21	23
Total	68	27	41	0,31	9	23	42

Tabla 24. Datos generales de clasificación por tratamiento.

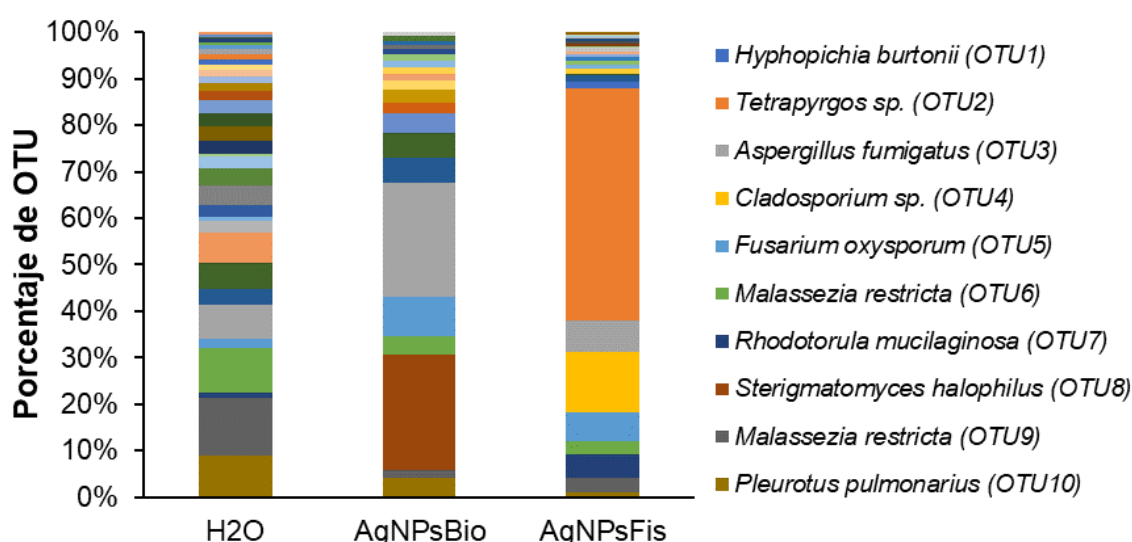


Figura 128. Representación de la diversidad de OTU según cada tratamiento (cada color representa una OTU). En la leyenda se aprecian los primeros 10 OTU presentes en todo el estudio.

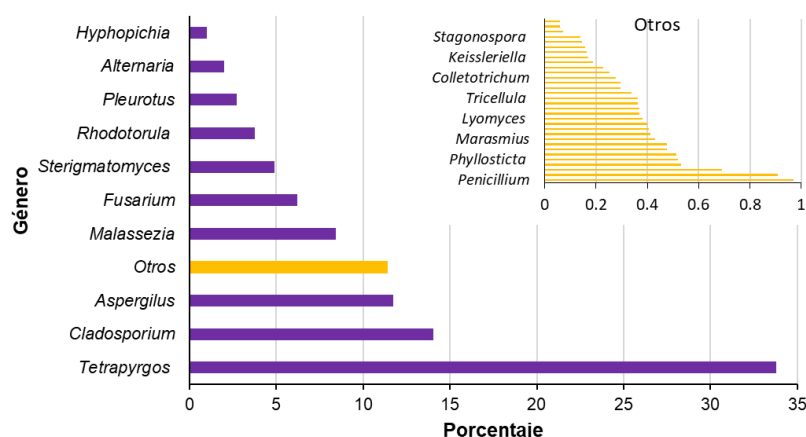


Figura 129. Abundancia relativa de los géneros fúngicos registrados (sin discriminar por tratamiento).

De las especies identificadas, el 33,82% sólo se encontraron en el tratamiento con H₂O, el 20,6% sólo se encontraron en el tratamiento con AgNPsBio y el 27,9% sólo se encontraron en el tratamiento con AgNPsFis. El 10,29% de las especies se encontraron en los tres tratamientos. Las especies comunes a los tres tratamientos fueron: *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Malassezia restricta*, *Pleurotus pulmonarius*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium inversicolor* (Fig. 130).

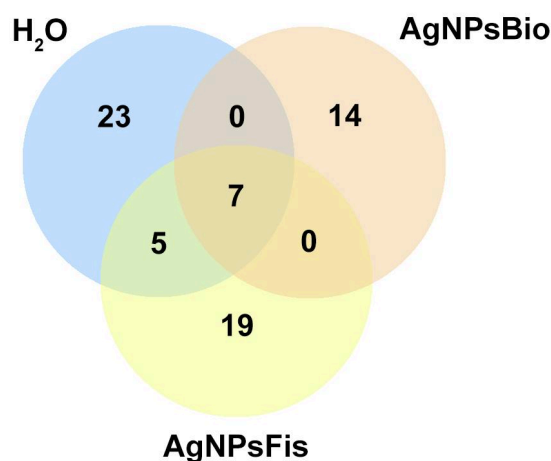


Figura 130. Diagrama de Venn de las especies encontradas en los tratamientos. Especies comunes a los tres tratamientos: *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Malassezia restricta*, *Pleurotus pulmonarius*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium inversicolor*.

Para determinar cómo se asociaron las diferentes comunidades de hongos con los distintos tratamientos, se realizó un análisis de coordenadas principales (Fig. 131). Los ejes 1 y 2 explicaron el 56,87% de la variabilidad observada entre los intestinos muestreados de los distintos tratamientos. El análisis PCoA no muestra agrupamientos entre las muestras de los distintos tratamientos.

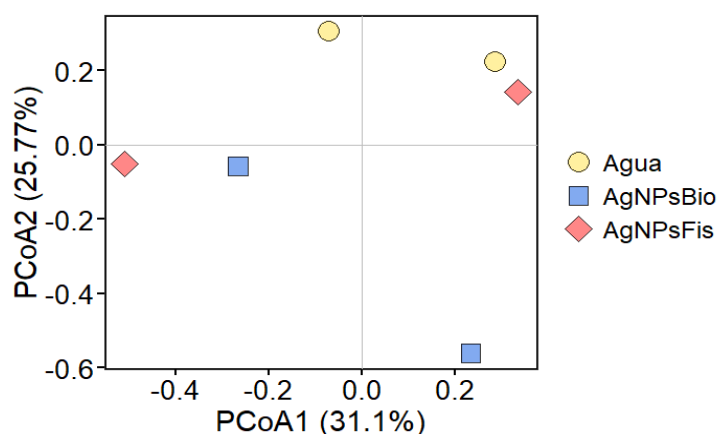
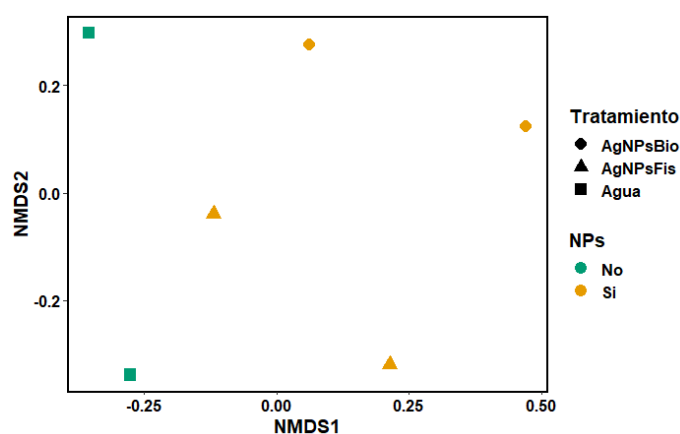


Figura 131. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray-Curtis, que muestra el patrón de distribución general de la microbiota del intestino de *T. molitor* entre los diferentes tratamientos. Los porcentajes del eje representan el porcentaje de variación explicado utilizando ese eje.

En el análisis NMDS se puede observar que el tratamiento control (sin AgNPs) se agrupan hacia la izquierda del eje X, mientras que el resto de los tratamientos se acomodan hacia la derecha del mismo (**Fig. 132**). El estrés es menor a 0.2 por lo que se supondría una buena representación de la estructura de la comunidad.



Stress: 0.052

Figura 132. Gráfico de escalamiento dimensional no métrico (NMDS) que muestra la ordenación de muestras a nivel de OTU. Distintos símbolos indican los tratamientos aplicados y los colores la presencia o ausencia de AgNPs en los tratamientos.

Se calcularon los índices de Riqueza, Diversidad (Shannon) y equidad para los distintos tratamientos, siendo mayor los tres índices en el tratamiento con H₂O. El tratamiento con AgNPsBio mostró menor riqueza respecto del tratamiento con AgNPsFis, aunque mayor diversidad y equidad (**Tabla 25**).

	Riqueza, <i>S</i>	Shannon, <i>H</i>	Equidad, <i>J</i>
H ₂ O	35	3,14	0,88
AgNPsBio	21	2,40	0,79
AgNPsFis	31	1,98	0,58

Tabla 25. Índices de biodiversidad para los tratamientos.

Ensayo B

En esta sección del trabajo se analizó el impacto de las AgNPs sintetizadas utilizando el hongo *T. albida* (BAFCcult 4711) en la supervivencia de larvas en el estadio 13 y la concentración de Ag total en escarabajos.

Análisis de pasaje a pupa y a adulto

La **Figura 133** muestra la probabilidad de pasar de larva a pupa y de pupa a adulto según el modelo binomial (pupa) y quasibinomial (adulto). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos pero sí una clara tendencia a retrasar el pasaje tanto de larva a pupa como de pupa a adulto de en los tratamientos con AgNPsFis en mayor medida y en los tratamientos con AgNPsBio en menor medida.

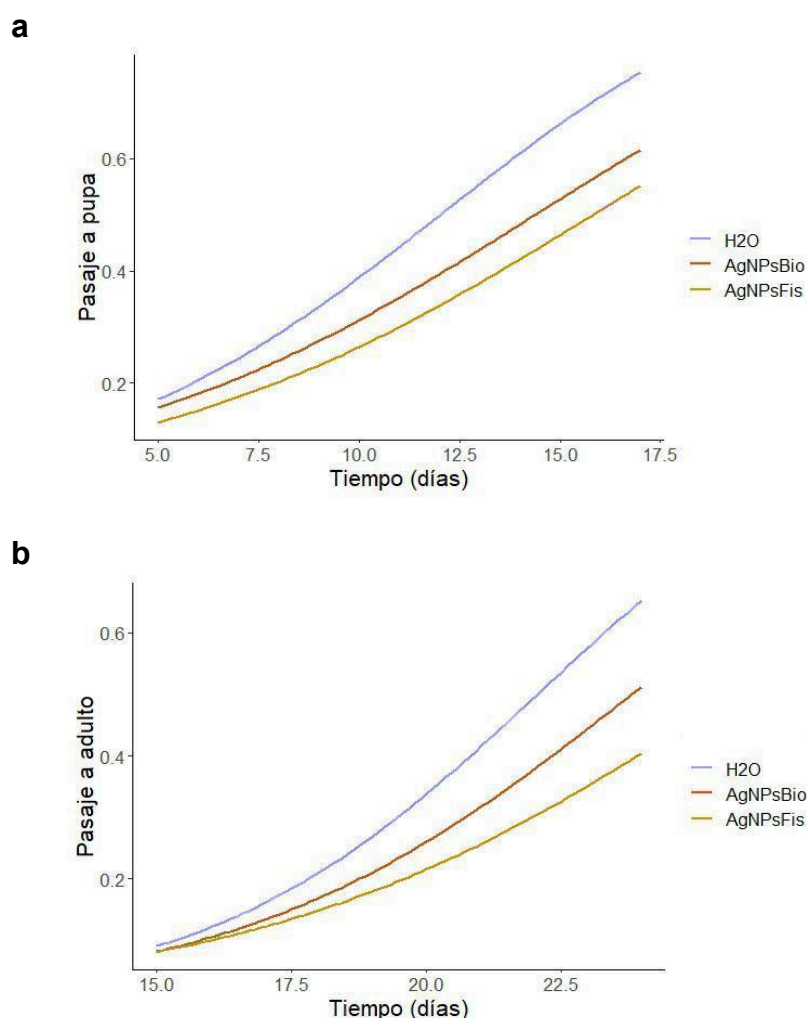


Figura 133. Probabilidad de pasar: **(a)** de larva a pupa, modelo binomial y **(b)** de pupa a adulto, modelo quasibinomial.

No se observaron diferencias tampoco en el peso de pupas ni de adultos (**Fig. 134**).

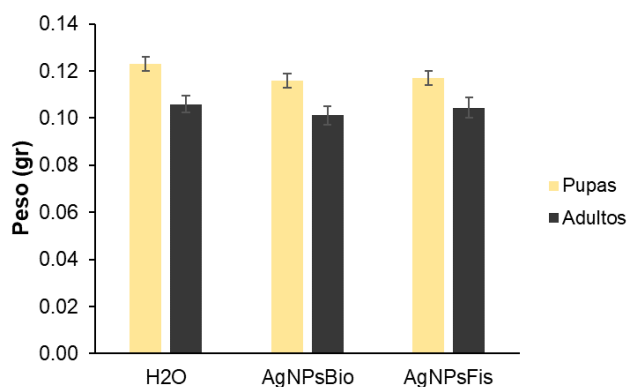


Figura 134. Peso de pupas y adultos según los distintos tratamientos.

Análisis de las concentraciones de Ag mediante ICP-OES

En el análisis de las concentraciones de Ag mediante ICP-OES (**Tabla 26**) se puede observar que el componente está presente en mayor medida en los escarabajos que fueron expuestos a los tratamientos con AgNPs, siendo mayor en los expuestos AgNPsBio, que en los expuestos a AgNPsFis.

<i>Tratamiento</i>	<i>[Ag] (µg/kg) Promedio</i>	<i>%RSD</i>
<i>H₂O</i>	80	49
	47	3
<i>AgNPsBio</i>	774	28
	3703	28
<i>AgNPsFis</i>	383	63
	229	51

Tabla 26. Concentración de Ag^o en adultos medidas mediante ICP-OES.

III.4 DISCUSIÓN

La **Tabla 27**, resume información acerca de las AgNPs utilizadas para los ensayos, mientras que la **Tabla 28** resume los resultados de esta sección de la tesis brindando una evaluación cualitativa comparativa del efecto de las AgNPs sobre el parámetro analizado en cada caso.

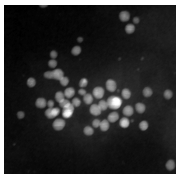
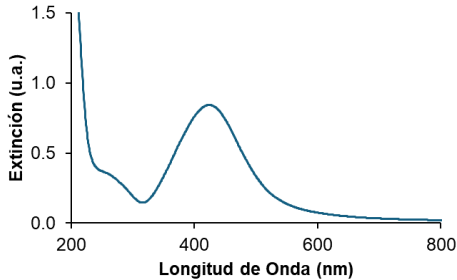
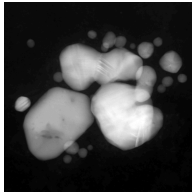
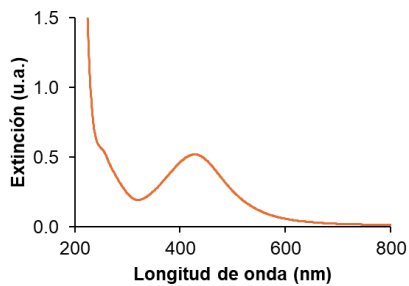
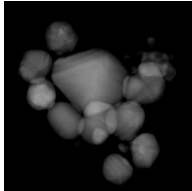
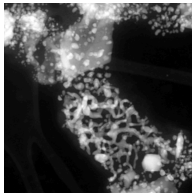
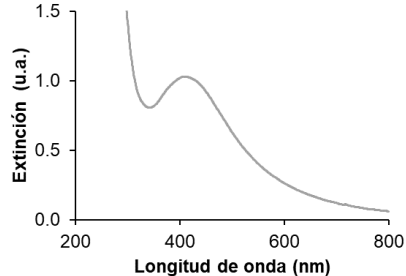
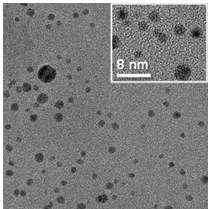
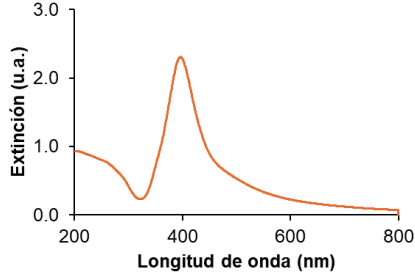
Origen de las AgNPs	Morfología	TEM	Espectro de extinción
<i>T. albida</i>	Esféricas, núcleo-coraza	 20 nm	
<i>C. luteoalbus</i>	Mayoría esféricas, algunos hexágonos y cuadrados	 20 nm	
<i>T. assiutensis</i>	Mayoría esféricas, algunas placas y algunos filamentos	 20 nm  100 nm	
NPs de Ag generadas por Ablación láser	Sólo esféricas	 15 nm	

Tabla 27. Resumen de las AgNPs utilizadas para los ensayos.

Organismo	Parámetro evaluado	Origen de AgNPs	Efectos observados	Representación cualitativa de efecto
Phaseolus radiatus 	Germinación de semilla	<i>T. albida</i>	No se observaron efectos en la germinación pero sí en el desarrollo de la plántula	↓↓↓
	Largo de vástago	<i>T. albida</i>	Menor crecimiento	↓
		<i>C. luteoalbus</i>	No se observan efectos	-
		<i>T. assiutensis</i>	Menor crecimiento	↓↓
	Largo de raíz	<i>T. albida</i>	Menor crecimiento	↓↓↓
		<i>C. luteoalbus</i>	Menor crecimiento	↓↓
		<i>T. assiutensis</i>	Menor crecimiento	↓↓
	Peso seco	<i>T. albida</i>	Menor peso	↓
		<i>C. luteoalbus</i>	No se observan efectos	-
		<i>T. assiutensis</i>	No se observan efectos	↓↓
	Peso fresco	<i>T. albida</i>	Menor peso	↓
		<i>C. luteoalbus</i>	No se observan efectos	-
		<i>T. assiutensis</i>	No se observan efectos	-
	Comunidad endofítica	<i>T. albida</i>	Disminución de la riqueza, riqueza estimada y diversidad	↓
Alternaria sp. 	Crecimiento de la colonia	<i>T. albida</i>	Disminución de tasa de crecimiento	↓
Stemphylium sp. 	Crecimiento de la colonia	<i>T. albida</i>	Disminución de tasa de crecimiento	↓↓
Tenebrio molitor 	Supervivencia	<i>T. albida</i>	No se observan efectos, solo tendencia negativa	↓
		Ablación láser	No se observan efectos	-
	Comunidad micobiótica asociada al intestino	<i>T. albida</i>	Disminución de la riqueza	↓
		Ablación láser	Disminución de la diversidad	↓
	Pasaje a pupa/adulto	<i>T. albida</i>	Tendencia a retrasar el pasaje a pupa y a adulto	↓
		Ablación láser	Tendencia a retrasar el pasaje a pupa y a adulto	↓
	Concentración de Ag	<i>T. albida</i>	Presencia de Ag ^o en las muestras analizadas	NC
		Ablación	Presencia de Ag ^o en las muestras analizadas	NC

Tabla 28. Resumen de resultados y estimación de efecto de las AgNPs en los distintos parámetros analizados. La flecha ↓ indica un estimado cualitativo del efecto negativo sobre el parámetro y la cantidad de flechas refleja la intensidad de dicho efecto. (-) = ausencia de efecto. NC = no corresponde.

Efecto en plantas

Los análisis llevados adelante a partir de los datos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo sugieren un impacto negativo en el desarrollo de las plántulas tratadas con los distintos tipos de AgNPs sintetizadas con organismos fúngicos, dando como resultado plantas anormales, mostrando principalmente síntomas como raíces cortas y necróticas, así como brotes cortos y elásticos, como lo observado por Khaldari *et al.*, 2021. Adicionalmente los resultados muestran que las AgNPs producidas con *T. albida* resultaron ser más tóxicas que las sintetizadas con *C. luteoalbus* y *T. assiutensis*, probablemente debido a su pequeño tamaño y morfología esférica, comparada con las morfologías poliédricas de las otras muestras de AgNPs. También es posible que la presencia de AgNPs sea mayor en el coloide obtenido con *T. albida*, como lo observado en el capítulo anterior, y por eso el efecto haya sido más pronunciado en este caso.

Por su parte, la exposición de las plántulas de *P. radiatus* a una concentración de AgNO₃ de 0,5 mg/L (0,003 mM) no mostró diferencias en los parámetros medidos respecto del control. Sin embargo, una concentración mayor (0,5 mM) impidió la germinación y el desarrollo de la plántula, mostrando mayor toxicidad que las AgNPs en la misma concentración (asumiendo que todo el AgNO₃ se convirtió en Ag^o durante la síntesis con los respectivos filtrados fúngicos).

En bibliografía se han encontrado diversos trabajos que analizan el impacto de AgNPs en *P. radiatus* (sinónimo: *Vigna radiata*) aunque ninguno utilizando AgNPs provenientes de síntesis biológica utilizando hongos. En la **Tabla 29** se exponen trabajos encontrados que analizan el impacto de AgNPs en semillas y plántulas de esta especie, así como otros trabajos que analizan el impacto de Ag⁺ y AgNPs con distintas morfologías en otras especies de plantas. Se observa que los trabajos citados coinciden con los resultados de esta tesis.

Diversas investigaciones analizando el efecto de AgNPs (de variados orígenes de síntesis) en plantas, han demostrado efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. La interacción entre las plantas y las AgNPs no sólo depende de las propiedades intrínsecas de las AgNPs, sino que también está influenciada por las especies a las que pertenecen las plantas bajo estudio, las etapas de desarrollo, los diferentes tejidos y metodologías de preparación de muestras (Yan & Chen, 2019). Para una planta determinada, no todas las concentraciones de AgNPs son benéficas ya que cualquier exceso puede bloquear el paso de nutrientes esenciales, pero un tratamiento regulado puede mejorar su crecimiento y desarrollo general. Las NPs interactúan con proteínas, enzimas y carbohidratos que influyen en la biomasa total, el crecimiento de raíces y brotes de las plantas. El tamaño y la concentración son los dos principales factores responsables del aumento o la disminución del crecimiento vegetal y la biomasa (Siddiqi & Husen, 2022). Concentraciones adecuadas de AgNPs podrían mejorar la producción de plantas, crecimiento/germinación de semillas, el contenido de clorofila, la eficiencia fotosintética y un aumento de la eficiencia de fertilizantes y del agua (Khan *et al.*, 2023). Por otro lado, se sabe que concentraciones altas de AgNO₃ promueven la producción de etileno, que altera la translocación de auxina, induce hiperhidricidad, reduce el contenido de clorofila y causa mortalidad tisular (Qin *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente el tamaño de las NPs influye en su nivel de toxicidad, así como también su morfología (Zoroddu *et al.*, 2014). Muchos investigadores han proporcionado evidencia de que AgNPs más pequeñas causan más toxicidad que AgNPs de mayor tamaño (Domingo *et al.*, 2019). Esto se debe a que AgNPs de menor tamaño tienen una mayor relación superficie-masa, otorgándoles mayor capacidad de irrumpir en la membrana celular, mientras que una mayor proporción de átomos en la superficie disminuye la capacidad de atravesar barreras fisiológicas. Por otro lado, se demostró que AgNPs más pequeñas podrían acumularse en niveles más altos en las plantas y ser más tóxicas que sus partículas en tamaño a granel (Yan & Chen, 2019). Los resultados obtenidos en esta tesis coincidirían con los registrados en la bibliografía.

En su conjunto los análisis llevados adelante en esta sección indicarían que un uso indiscriminado de estos nanomateriales puede afectar de manera negativa en modelos vegetales, tanto a nivel germinativo como a nivel de desarrollo de la plántula.

<i>Especie estudiada</i>	<i>Tipo de NP</i>	<i>Método de aplicación</i>	<i>Efectos observados</i>	<i>Referencia</i>
<i>Phaseolus radiatus</i>	AgNPs recubiertas con citrato	Exposición de plántulas en agar y suelo	Inhibición del crecimiento dependiente de la concentración en agar. La tasa de crecimiento no se vio afectada en los estudios del suelo.	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Phaseolus radiatus</i>	AgNPs esféricas de 20nm	Exposición de plántulas en agar MS	La longitud y el peso de los brotes se redujeron significativamente tras la exposición a 50 mg/L de AgNPs, una reducción significativa en el alargamiento y el peso de las raíces tras la exposición a 20 y 50 mg/L de AgNPs	Nair & Chung, 2015
<i>Vigna radiata</i>	NPs de Ag ₂ O e iones de plata	Exposición de semillas en soluciones de NPs	La longitud de la raíz y de los brotes, y el peso seco de las plántulas disminuyeron debido a la exposición a NPs de Ag ₂ O e iones de plata, siendo los iones de plata más tóxicos que las NPs de Ag ₂ O.	Singh & Kumar, 2015
<i>Lolium multiflorum</i>	AgNPs cúbicas y esféricas	Exposición de semillas en soluciones de NPs	NPs cúbicas son menos tóxicas que NPs esféricas al comparar desarrollo de raíz y vástago	Gorka <i>et al.</i> , 2015
<i>Arabidopsis</i>	AgNP con formas esféricas, decaédricas y triangulares	Exposición de plántulas en medio MS con AgNPs	AgNPs octaédricas y triangulares inducían un mayor grado de promoción del crecimiento de las raíces, pero las primeras producían los niveles más bajos de acumulación de superóxido dismutasa de Cu/Zn (CSD2). AgNPs esféricas no mostraron promoción del crecimiento de las raíces, e indujeron los niveles más altos de acumulación de antocianinas y CSD2	Syu <i>et al.</i> , 2014
<i>Glycine max</i> y <i>Oryza sativa</i> L	AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) y AgNO ₃	Exposición en raíz y hoja por aspersión	Tanto en la exposición con AgNPs como con AgNO ₃ , se registró la presencia de NPs en la planta, asumiendo que una parte del Ag absorbido por las plantas parece haberse convertido en NPs dentro de la planta. La exposición a AgNO ₃ tuvo mayor efecto fitotóxico en las plantas de <i>Oryza Sativa</i> L mientras que en las plantas de <i>Glycine max</i> no se observaron efectos	Li <i>et al.</i> , 2017
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AgNPs y Ag ⁺ (AgNO ₃)	Exposición de plántulas en medio MS con AgNPs	AgNPs inhibieron tanto el crecimiento vegetativo como el alargamiento de las raíces dependiente de la concentración, siendo más tóxicas en la concentración alta que en la baja. El efecto inhibitorio de Ag ⁺ sobre la biomasa vegetal fue menor que el de las AgNP, y en altas concentraciones.	Qian <i>et al.</i> 2013

Tabla 29. Bibliografía hallada sobre el impacto de AgNPs y Ag⁺ en especies vegetales.

Efecto en comunidades endofíticas fúngicas y cepas de hongos seleccionadas

Existe una extensa bibliografía que da cuenta de la importancia de las comunidades endofíticas tanto para los organismos como para las relaciones y procesos ecosistémicos (Agrawal & Bhatt, 2023). A pesar de ello, pocos trabajos hasta la fecha han estudiado el impacto de nanomateriales en la composición endofítica de plantas. Entre ellos se encuentran los de Hao *et al.*, (2020), Shang *et al.*, (2023) y Xu *et al.*, (2023), pero ninguno de estos trabaja con AgNPs. Estos trabajos exponen en sus resultados una alteración de la comunidad endofítica asociada a las respectivas especies de plantas estudiadas al ser tratadas con diferentes NPs.

Los análisis llevados adelante durante este trabajo han demostrado que la comunidad endofítica fúngica foliar se ve afectada en su composición por la aplicación de AgNPs registrándose un descenso en la riqueza, riqueza estimada y diversidad. Sin embargo, también se observó un aumento de estos índices con la aplicación del filtrado fúngico. La aplicación de AgNO₃ por su parte generó un menor impacto que la aplicación de AgNPs. Adicionalmente, los datos obtenidos en esta tesis señalan que en todos los tratamientos, el género más abundante fue *Alternaria*. Se sabe que los hongos endofíticos colonizan internamente los tejidos vegetales y tienen el potencial de actuar como agentes de control biológico, participando en el proceso de resistencia inducida y en la atenuación del estrés abiótico (Fontana *et al.*, 2021) y que especies de *Alternaria* se destacan por su arsenal de metabolitos, los cuales tienen roles como moléculas antimicrobianas y antioxidantes (Eram *et al.*, 2018). Probablemente la alta melanización de las estructuras (esporas y micelio) de este género le brinde una mayor capacidad de resiliencia frente al estrés provocado por las NPs, lo cual explicaría la mayor abundancia encontrada. Esta capacidad ha sido previamente reportada en varios géneros (Ramachandra *et al.*, 2023).

Los resultados de esta sección señalan que el uso de estos componentes (AgNPs) en el ambiente no solo afecta de forma individual a los organismos sino que altera la composición de las comunidades naturales, generando cambios que pueden alterar los equilibrios naturales y producir impacto negativos en el complejo entramado de las comunidades microbianas y sus hospedantes. El único trabajo previo que estudió el efecto de las AgNPs sobre la comunidad endofítica fúngica foliar en un modelo biológico es el de Cermesoni (2021), una tesis de licenciatura llevada adelante en nuestros laboratorios, que evaluó el efecto AgNPs (provisas por esta autora) sintetizadas con un organismo fúngico, sobre las comunidades de endófitos foliares en *Brassica napus* mediante la aplicación por pulverización en las hojas. La aplicación de AgNPs afectó negativamente la abundancia y modificó la composición de la comunidad de endófitos fúngicos foliares, pudiéndose observar además un efecto diferencial sobre distintas especies fúngicas

El impacto de las AgNPs fue también estudiado directamente sobre especies endofíticas fúngicas. En el presente trabajo se evaluó el impacto de las AgNPs sobre el crecimiento de la colonia de dos hongos endofíticos haciendo una analogía de la colonización del organismo sobre la planta, considerando el día 1 como el inicio de la colonización y el día 4 cuando el organismo ya se estableció sobre la misma. En ambos casos se observa que la aplicación al

día 1 genera un mayor impacto sobre el crecimiento de la colonia, aunque el organismo logra sobrevivir y luego de varios días alcanza el crecimiento del tratamiento control. La aplicación al día 4 sólo genera una ralentización del crecimiento de la colonia. Sin embargo, cabe destacar que el crecimiento de la colonia de los hongos tratados con AgNPs se observa desperejo. Probablemente las AgNPs afecten una parte del micelio pero el resto del organismo que no fue susceptible siga creciendo de manera normal.

El impacto de AgNPs en miembros de los géneros *Alternaria* y *Stemphylium* ha sido estudiado por varios investigadores (**Tabla 30**). En todos los trabajos citados se estudió el impacto de las AgNPs mezcladas directamente en el medio de cultivo, a diferencia del presente trabajo en el que las AgNPs fueron aplicadas por aspersión sobre el inóculo. El diferencial de esta técnica es que al ser aplicadas por aspersión no se corre el riesgo de alterar las características de las AgNPs. Ninguno de estos trabajos además menciona deformaciones o defectos en los crecimientos de las colonias. En todos los casos reportados se observa que concentraciones bajas de AgNPs son tóxicas, afectando el crecimiento del hongo estudiado. En este trabajo, sólo se estudió una concentración de AgNPs pero podría ser que en menores concentraciones también se observen inhibiciones de crecimiento. El porcentaje de inhibición registrado no supera nunca el 50% para ninguno de los dos organismos estudiados, sin embargo, se observa que la tasa de inhibición es mayor durante los primeros días y luego va disminuyendo. Otra observación interesante de este trabajo es el diferente efecto que producen las AgNPs al ser aplicadas al día 1 y al día 4 cuando el inóculo ya está establecido y puede hacerle frente al estrés provocado por las NPs. Es claro, sin embargo, que los resultados aquí obtenidos soportan las conclusiones previas de otros autores acerca del impacto negativo sobre *Alternaria* y *Stemphylium*, sugiriendo también un posible impacto negativo en especies con potenciales roles positivos para las plantas.

<i>Especie</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Concentración de AgNPs estudiada</i>	<i>Efectos observados</i>	<i>Referencia</i>
<i>Alternaria brassicicola</i>	PDA	10, 25, 50, 100 y 110 ppm	Observaron una inhibición del crecimiento al 7mo día de 12,8%, 34,6%, 70,8%, 92,2% y 92,2% en cada concentración.	Gupta & Chan, 2016
<i>Alternaria solani</i>	dato no brindado	20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL	Encontraron la máxima reducción en el crecimiento micelial luego de 5 días, a 100 µg/mL	Mostafa <i>et al.</i> , 2021
<i>Alternaria porri</i>	PDA	0, 10, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 ppm	Observaron porcentajes de inhibición mayores al 50% luego de 8 días con concentraciones a partir de 50 ppm.	Das <i>et al.</i> , 2022
<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Alternaria solani</i> y <i>Stemphylium lycopersici</i>	PDA, MEA y CMA ("corn meal agar")	10 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm	Observaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% en todos los casos menos con <i>A. alternata</i> con una concentración de 10 ppm.	Kim <i>et al.</i> , 2012

Tabla 30. Trabajos que estudian el impacto de AgNPs en cepas de *Alternaria* y *Stemphylium*

Efecto en insectos y su comunidad microbiótica asociada al intestino

Como fue mencionado oportunamente la elección en este trabajo de *T. molitor* como modelo biológico para la evaluación del efecto de NPs, estuvo basada en su fácil manipulación, su impacto agrícola y su potencial uso como fuente proteica en la alimentación. A pesar de estas características el impacto de NPs en este insecto ha sido poco estudiado. En la **Tabla 31** se presenta un resumen de los reportes previos.

Los análisis llevados adelante en el marco de esta tesis indican que el consumo de AgNPs en soluciones coloidales influiría en la supervivencia de las larvas así como además en el pasaje a pupa y a adulto. El gráfico de probabilidad de supervivencia (**Fig. 125**) sugiere que el tratamiento con AgNPs de síntesis biológica tendrían un mayor efecto sobre la mortalidad larvaria que las AgNPs de síntesis por ablación láser. El peso y el largo de las larvas pequeñas sometidas a las AgNPs de síntesis biológica también se vio afectado, aunque el mismo tratamiento en larvas grandes no afectó el peso de las pupas y adultos. Resulta interesante que las AgNPs sintetizadas por ablación láser sin recubrimiento retrasaron en mayor medida el pasaje de estadio de los insectos, aún teniendo menor concentración que las AgNPs sintetizadas por el método biológico. Por otro lado, la presencia de Ag⁰ en el cuerpo del adulto fue demostrada mediante la técnica ICP-OES. Los diferentes valores registrados probablemente se deban a que las larvas no fueron expuestas directamente a los tratamientos, sino que eran libres de consumir líquido pudiendo ingerir mayor o menor cantidad de AgNPs.

Los reportes previos que estudiaron el efecto de AgNPs en *T. molitor* sólo se abocaron al estudio en larvas, encontrando que las AgNPs pueden ser absorbidas por el insecto, ya sea por ingestión o por contacto físico, afectando la supervivencia de las mismas, soportando los resultados aquí obtenidos. La variación en las concentraciones letales de AgNPs informada por diversos autores puede ocurrir debido a las diferentes características fisicoquímicas de las NPs y también a las moléculas involucradas en la síntesis y protección de las NPs (Santos *et al.*, 2022). Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de información sobre la toxicidad contra plagas y vectores seleccionados, la información precisa sobre el posible modo de acción de las nanopartículas contra insectos es aún limitada (Benelli, 2018). Se sabe que la exposición a las NPs puede estar dada por inhalación, ingestión o contacto físico, actuando principalmente mediante la producción de ROS, alterando las funciones corporales y estimulando el sistema inmunológico (Shahzad & Manzoor, 2021).

<i>Tipo de NPs</i>	<i>Forma de aplicación</i>	<i>Resultados relevantes</i>	<i>Referencia</i>
AgNPs recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP)	Exposición en suelo	Mediante la técnica ICP-OES encontraron que la concentración de Ag ⁺ en los insectos aumentaba con la dosis aplicada en los distintos tratamientos	Pappas <i>et al.</i> , 2017 y 2018
AgNPs de 50 nm recubiertas con citrato AgNPs de 3 a 8 nm recubiertas con parafina AgNPs de 60 nm estabilizadas con PVP Ag ₂ S NPs de 20 nm recubiertas con PVP Ag iónica	Alimentación, exposición en suelo	Tras la exposición a los alimentos, las constantes de la tasa de absorción fueron similares para las AgNPs de 50 nm y AgNO ₃ , mientras que las de las AgNPs de 60 nm y 3–8 nm y las de Ag ₂ S fueron similares. La exposición a AgNPs en el suelo fue más difícil de caracterizar, con diferentes patrones obtenidos para las diferentes NPs	Khodaparast <i>et al.</i> , 2021
ZnO MPs SiO ₂ MPs Ag NPs	Rocío	Las AgNP y las SiO ₂ MP dieron como resultado una mortalidad larvaria de más del 70% en comparación con la de las ZnO MP, en las que la tasa de mortalidad fue de aproximadamente el 33%.	Rankic <i>et al.</i> , 2021

Tabla 31. Bibliografía hallada que analiza el impacto de AgNPs en *T. molitor*.

Las diversas investigaciones que están surgiendo en el último tiempo sobre el impacto de nanomateriales en la microbiota intestinal, emplean una variedad de métodos y enfoques, y parecen arrojar resultados contradictorios para el mismo tipo de componente (Utembe *et al.*, 2022). En el presente trabajo la microbiota intestinal de *T. molitor* fue estudiada por primera vez. Aunque se observa una importante disminución de la riqueza de la comunidad de los intestinos de las larvas tratadas con AgNPsBio, no se observa un descenso tan marcado en aquellas comunidades correspondientes a larvas tratadas con AgNPsFis. Sin embargo, en este último caso, sí se observa un notable descenso de la equidad, debido a la fuerte disminución de la diversidad como consecuencia de la predominancia de algunos géneros. Empero, cabe destacar que sólo 7 OTU fueron encontrados en común entre los tres tratamientos y 5 fueron encontrados en común entre el control y las tratadas con AgNPsFis, sugiriendo que las NPs poseen un fuerte impacto sobre la composición de la comunidad más allá de los parámetros cuantitativos estudiados. En todos los tratamientos se mantiene una mayor representación del Phylum Ascomycota frente a Basidiomycota así como de hongos filamentosos frente a levaduriformes. Por su parte, los resultados de NMDS, sugieren una mayor similitud entre las comunidades expuestas a tratamientos con NPs (sin importar el método de síntesis de éstas) que con aquellas comunidades no expuestas a estos componentes. Es interesante señalar que los cambios en la composición, muestran particularmente una alta predominancia de *Tetrapyrgos* sp., *Sterigmatomyces halophilus* y *Aspergillus fumigatus*. Cepas de *S. halophilus* son consideradas como halotolerantes y han sido aisladas de muestras marinas y muestras de suelo de diferentes regiones geográficas, y también han sido aisladas de los simbiontes intestinales de una especie de termita xilófila (Al-Tohamy *et al.*, 2020). Además, *S. halophilus* mostró adsorción de metales pesados como cadmio, cobre, hierro, manganeso, plomo y zinc a partir de medios de crecimiento suplementados con estas sales metálicas (Sajid *et al.*, 2022) Es probable que por esta cualidad la cepa haya proliferado más que otras de las especies presentes en el intestino de *T. molitor* expuestos a las AgNPs. Por su lado, *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito, cuyo hábitat principal es el suelo, adaptado a proliferar en ambientes hostiles, y es responsable de una de las infecciones pulmonares más relevantes en los humanos (aspergilosis) (Latgé & Chamilos, 2019). Por otro lado

Tetrapyrgos sp. es un basidiomycota con basidioma estipitado (orden Agaricales) de la familia Marasmiaceae, xilófago, saprofítico, que se encuentra comúnmente en hojas muertas y restos leñosos en el suelo de los bosques tropicales y subtropicales (Komura *et al.*, 2020). A nuestro conocimiento este es el primer reporte de esta especie como componente de la microbiota intestinal de animales. Dada su alta predominancia y que, a diferencia de los otros hongos mencionados anteriormente, no ha sido señalado como patógeno humano, este organismo podría considerarse de interés biotecnológico debido a su capacidad de resiliencia en hábitats inhóspitos para la supervivencia como lo es el intestino de *T. molitor* tratado con AgNPs. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para confirmar esta hipótesis. Estos datos sugieren que el efecto de las nanopartículas en la microbiota intestinal de animales podría promover la abundancia de especies resilientes como *H. halophilus*.

Debido a la capacidad de *T. molitor* de degradar poliestireno, la microbiota bacteriana intestinal ha sido estudiada por varios autores (Przemieniecki *et al.*, 2020; Bae *et al.*, 2021; Mamtimin *et al.*, 2023). Sin embargo, no se han registrado hasta el momento estudios sobre la microbiota intestinal del insecto ni el efecto de las AgNPs en la misma. En particular, el impacto de las AgNPs sobre el microbioma intestinal en insectos ha sido estudiado por Han *et al.*, (2014) en *Drosophila melanogaster*, observando una sorprendente reducción en la diversidad de la microbiota intestinal de las larvas tratadas con AgNPs en comparación con los grupos de control. Otro trabajo es el de Bharani & Namasivayam (2017) que analiza el impacto de AgNPs sintetizadas por un método biológico en la microbiota intestinal de *Spodoptera litura*, observando una disminución de la composición de especies de la misma. Estos reportes coincidirían con los resultados obtenidos en esta tesis para evaluar el impacto de las AgNPs en la microbiota intestinal de *T. molitor*.

Discusión general y conclusiones

Este capítulo realiza un análisis integral del posible impacto de AgNPs de síntesis biológica mediada por hongos en distintos modelos biológicos abarcando organismos de distintos reinos (plantas, hongos y animales). Se estudiaron 4 especies evaluando, cuando fue posible, tanto el efecto de NPs biológicas obtenidas durante este estudio como NPs sintetizadas por ablación láser. Los estudios incluyeron análisis cuantitativos y cualitativos de dos comunidades microbianas asociadas a plantas e insectos, siendo los primeros reportes de evaluación de efectos de AgNPs sobre la comunidad fúngica endofítica de *P. radiatus* y la asociada al intestino de *T. molitor*.

En todos los ensayos realizados se observa un efecto negativo en el desarrollo de los organismos en al menos uno de los parámetros analizados. De forma similar, los análisis en las comunidades establecidas naturalmente, mostraron un gran impacto no solamente en cuanto a la composición de especies, sino en los parámetros cuantitativos que describen estas comunidades, sugiriendo que existen efectos negativos indirectos sobre los organismos hospedantes. En particular se observó un efecto mayor de las AgNPs en las comunidades asociadas al intestino de *T. molitor* que a la comunidad endofítica foliar de *P. radiatus* en cuanto a la riqueza y la diversidad registradas.

En comparación con los métodos convencionales de síntesis de NPs que se basan en el uso de agentes químicos de protección como tensioactivos, polímeros y tioles (Ngcongco *et al.*, 2023), pero que son difíciles de eliminar y no se degradan fácilmente (Sharma *et al.*, 2019), las NPs sintetizadas por métodos biológicos se consideran más estables y biocompatibles debido a que están cubiertas por agentes de protección derivados de organismos biológicos (Wypij *et al.*, 2020). El tamaño y recubrimiento de las NPs son factores que afectarían la toxicidad de las mismas en los diferentes organismos, variando además según el sistema estudiado (Iswarya *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2023). Esto puede observarse en los trabajos de Guilger-Casagrande *et al.*, (2021) que, comparando los efectos de AgNPs biogénicas recubiertas y sin recubrimiento contra el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, y la citotoxicidad y genotoxicidad en diferentes líneas celulares y sus efectos sobre microorganismos no objetivo, observaron que las NPs cubiertas fueron en general menos tóxicas que aquellas sin recubrimiento; y el de Spagnoletti *et al.*, (2021) que, comparando la actividad antimicrobiana contra *E. coli* y la toxicidad en el nematode *Caenorhabditis elegans* de AgNPs biogénicas con AgNPs sintetizadas y estabilizadas con borohidruro de sodio (NaBH₄), mostraron una actividad bactericida similar, pero menor toxicidad de las NPs biogénicas en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. En cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis, éstos señalan también un nivel de toxicidad de las AgNPs sintetizadas por un método biológico en cada uno de los modelos estudiados. Esto indicaría que, aunque el medio de síntesis de las AgNPs sea amigable con el medio ambiente, las propiedades intrínsecas de las NPs hacen de su uso indiscriminado, un potencial peligro para el ecosistema, refutando nuestra hipótesis de baja toxicidad.

Aunque se ha avanzado mucho en el desarrollo e implementación de protocolos basados en investigaciones sobre medio ambiente, salud y seguridad para abordar cuestiones de nanoseguridad, aún persisten desafíos para investigar adecuadamente los efectos tóxicos de las NPs: 1) la cantidad de tipos diferentes de nanomateriales, 2) la variedad de rutas potenciales de exposición, 3) problemas en la caracterización de nanomateriales, 4) limitaciones en las metodologías de investigación, como cuestiones de curso temporal y dosis-respuesta, y 5) metodologías *in vitro* inadecuadas para las pruebas de toxicidad de referencia estandarizadas *in vivo* (Warheit, 2018). Queda un largo camino por recorrer para comprender cuál puede ser el efecto del uso de la nanotecnología en el ambiente y sus organismos. Este trabajo aporta resultados que ayudan a complementar la labor de otros investigadores para determinar los beneficios y cuidados que se deben tener con el uso de estas nuevas tecnologías.

III.5. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal, S. & Bhatt, A. (2023). Microbial endophytes: emerging trends and biotechnological applications. *Current Microbiology*, 80(8), 249.

Al-Tohamy, R., Kenawy, E. R., Sun, J. & Ali, S. S. (2020). Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for azo dye decolorization and detoxification. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1163.

Ameen, F., Alsamhary, K., Alabdullatif, J. A. & ALNadhari, S. (2021). A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112027.

Bae, J., Cho, H. W., Jung, H., Park, J., Yun, S., Ha, S., Lee, Y. & Kim, T. J. (2021). Changes in intestinal microbiota due to the expanded polystyrene diet of mealworms (*Tenebrio molitor*). *Indian Journal of Microbiology*, 61, 130-136.

Benelli, G. (2018). Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), 12329-12341.

Bharani, R. A. & Namasivayam, S. K. R. (2017). Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.)(Lepidoptera: Noctuidae)—An eco-friendly approach of insect pest control. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 453-467.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y. X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J., Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A., Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse, E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J. J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R. & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37: 852–857.

- Brai, A., Poggialini, F., Vagaggini, C., Pasqualini, C., Simoni, S., Francardi, V. & Dreassi, E. (2023). *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2296.
- Brandon, A. M., Gao, S. H., Tian, R., Ning, D., Yang, S. S., Zhou, J., Wu, W. M. & Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6526-6533.
- Budhani, S., Egboluche, N. P., Arslan, Z., Yu, H. & Deng, H. (2019). Phytotoxic effect of silver nanoparticles on seed germination and growth of terrestrial plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 37(4), 330-355.
- Burketová, L., Martinec, J., Siegel, J., Macůrková, A., Maryška, L. & Valentová, O. (2022). Noble metal nanoparticles in agriculture: impacts on plants, associated microorganisms, and biotechnological practices. *Biotechnology Advances*, 58, 107929.
- Canteri de Souza, P., Custódio Caloni, C., Wilson, D. & Sergio Almeida, R. (2018). An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. *Journal of Fungi*, 4(4), 125.
- Ceriani-Nakamurakare, E., Slodowicz, M., Gonzalez-Audino, P., Dolinko, A. & Carmaran, C. (2016). Mycobiota associated with the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus*: threat to poplar plantations. *Forestry*, 89(2), 191-200.
- Ceriani-Nakamurakare, E., Mc Cargo, P., Gonzalez-Audino, P., Ramos, S. & Carmarán, C. (2020). New insights into fungal diversity associated with *Megaplatypus mutatus*: gut mycobiota. *Symbiosis*, 81, 127-137.
- Cermesoni, C. (2021). Efecto de la aplicación de nanopartículas de plata de origen fúngico sobre la comunidad endofítica de hojas de *Brassica napus* (colza). *Tesis de licenciatura*. Universidad de Buenos Aires.
- Colwell, R.K. (2013). EstimateS, Version 9.1: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. URL: purl.oclc.org/estimates.
- Das, R., Deb, P., Pandey, H., Shyam, P. & Singh, D. (2022). Botanical synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) and its antifungal effect against *Alternaria porri* causing purple blotch of onion: an in vitro and natural epiphytic study. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100390.
- Dell'Orto T. & Arias, V. (1985). Insectos que dañan granos y productos almacenados. *Serie Tecnología Postcosecha (FAO/RLAC)*. no. 4.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

- D’Jonsiles, M. F., Carmarán, C. C., Robles, C. A., Ceriani-Nakamurakare, E. D. & Novas, M. V. (2019). Mycorrhizal colonization and soil parameters affected by foliar endophytes in *Jatropha curcas* L. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19, 332-341.
- Domingo, G., Bracale, M. & Vannini, C. (2019). Phytotoxicity of silver nanoparticles to aquatic plants, algae, and microorganisms. In *Nanomaterials in plants, algae and microorganisms. Academic Press*, 143-168.
- Elkhateeb, W. A. & Daba, G. M. (2021). *Stemphylium* and *Ulocladium* between Benefit and Harmful. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*, 2766, 2276.
- Eram, D., Arthikala, M. K., Melappa, G. & Santoyo, G. (2018). *Alternaria* species: endophytic fungi as alternative sources of bioactive compounds. *Italian Journal of Mycology*, 47, 40-54.
- Fontana, D. C., de Paula, S., Torres, A. G., de Souza, V. H. M., Pascholati, S. F., Schmidt, D. & Dourado Neto, D. (2021). Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. *Pathogens*, 10(5), 570.
- Gaiser, R. F. (2023). Identificación de interacciones fúngicas de valor agronómico en *Brassica napus* L. (colza). *Tesis de doctorado*. Universidad de Buenos Aires.
- Gorka, D. E., Osterberg, J. S., Gwin, C. A., Colman, B. P., Meyer, J. N., Bernhardt, E. S., Gunsch, C. K., Di Gulio, R. T. & Liu, J. (2015). Reducing environmental toxicity of silver nanoparticles through shape control. *Environmental Science & Technology*, 49(16), 10093-10098.
- Guilger-Casagrande, M., Germano-Costa, T., Bilesky-José, N., Pasquoto-Stigliani, T., Carvalho, L., Fraceto, L. F. & de Lima, R. (2021). Influence of the capping of biogenic silver nanoparticles on their toxicity and mechanism of action towards *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 1-18.
- Gupta, D. & Chauhan, P. (2016). Fungicidal activity of silver nanoparticles against *Alternaria brassicicola*. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1724, No. 1). AIP Publishing.
- Han, X., Geller, B., Moniz, K., Das, P., Chippindale, A. K. & Walker, V. K. (2014). Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in *Drosophila* and their microbiomes. *Science of the Total Environment*, 487, 822-829.
- Hao, Y., Ma, C., White, J. C., Adeel, M., Jiang, R., Zhao, Z., Rao, Y., Chen, G., Rui, Y. & Xing, B. (2020). Carbon-based nanomaterials alter the composition of the fungal endophyte community in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science: Nano*, 7(7), 2047-2060.
- Hazarika, A., Yadav, M., Yadav, D. K. & Yadav, H. S. (2022). An overview of the role of nanoparticles in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102399.

- Hu, D., Jing, J., Snowdon, R. J., Mason, A. S., Shen, J., Meng, J. & Zou, J. (2021). Exploring the gene pool of *Brassica napus* by genomics-based approaches. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1693-1712.
- Iswarya, V., Manivannan, J., De, A., Paul, S., Roy, R., Johnson, J. B., Kudu, R., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. & Mukherjee, A. (2016). Surface capping and size-dependent toxicity of gold nanoparticles on different trophic levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 4844-4858.
- Jung, J., Heo, A., Park, Y. W., Kim, Y. J., Koh, H. & Park, W. (2014). Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 888-897.
- Khaldari, I., Naghavi, M. R. & Motamedi, E. (2021). Synthesis of green and pure copper oxide nanoparticles using two plant resources via solid-state route and their phytotoxicity assessment. *RSC Advances*, 11(6), 3346-3353.
- Khan, S., Zahoor, M., Khan, R. S., Ikram, M. & Islam, N. U. (2023). The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications. *Heliyon*, 9(6).
- Khodaparast, Z., van Gestel, C. A., Papadiamantis, A. G., Gonçalves, S. F., Lynch, I. & Loureiro, S. (2021). Toxicokinetics of silver nanoparticles in the mealworm *Tenebrio molitor* exposed via soil or food. *Science of the Total Environment*, 777, 146071.
- Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S. & Lee, Y. S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53-58.
- Komura, D. L., de Oliveira, J. J. S., Moncalvo, J. M., Margaritescu, S. & Zartman, C. E. (2020). Six new species of *Tetrapyrgos* (Basidiomycota, Agaricales, Marasmiaceae) from the Brazilian Amazon. *Phytotaxa*, 440(3), 193-214.
- Kookana, R. S., Boxall, A. B., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T. F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K. & Van den Brink, P. J. (2014). Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4227-4240.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K. & Hugenholtz, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 557-578.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H. & Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12(1), 118-123.
- Latgé, J. P. & Chamilos, G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), 10-1128.

- Lee, W. M., Kwak, J. I. & 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.
- Li, C. C., Dang, F., Li, M., Zhu, M., Zhong, H., Hintelmann, H. & Zhou, D. M. (2017). Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. *Nanotoxicology*, 11(5), 699-709.
- Mamtimin, T., Han, H., Khan, A., Feng, P., Zhang, Q., Ma, X., Fang, Y., Liu, P., Kulshrestha, S., Shigaki, T. & Li, X. (2023). Gut microbiome of mealworms (*Tenebrio molitor* Larvae) show similar responses to polystyrene and corn straw diets. *Microbiome*, 11(1), 1-20.
- Miller, K. E., Hopkins, K., Inward, D. J. & Vogler, A. P. (2016). Metabarcoding of fungal communities associated with bark beetles. *Ecology and Evolution*, 6(6), 1590-1600.
- Mondal, A., Chowdhury, S., Mondal, N. K., Shaikh, W. A., Debnath, P. & Chakraborty, S. (2022). Insecticidal and fungicidal performance of bio-fabricated silver and gold nanoparticles. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-20.
- Mostafa, Y. S., Alamri, S. A., Alrumman, S. A., Hashem, M. & Baka, Z. A. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using pomegranate and orange peel extracts and their antifungal activity against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight disease of tomato. *Plants*, 10(11), 2363.
- Muhammad, A., He, J., Yu, T., Sun, C., Shi, D., Jiang, Y., Xianyu, Y. & Shao, Y. (2022). Dietary exposure of copper and zinc oxides nanoparticles affect the fitness, enzyme activity, and microbial community of the model insect, silkworm *Bombyx mori*. *Science of the Total Environment*, 813, 152608.
- Nair, P. M. G. & Chung, I. M. (2015). Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-11.
- Ngcongco, K., Krishna, S. B. N. & Pillay, K. (2023). Biogenic metallic nanoparticles as enzyme mimicking agents. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1107619.
- Nie, P., Zhao, Y. & Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114636.
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., Porter, T. M., Bengtsson-Palme, J., Walker, D. M., de Sousa, F., Gamper, H. A., Larsson, E., Larsson, K., Kõljalg, U., Edgar, R. C. & Abarenkov, K. (2015). A comprehensive, automatically updated fungal ITS sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes and Environments*, 30(2), 145-150.
- Ong, S. Y., Zainab-L, I., Pyary, S. & Sudesh, K. (2018). A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2117-2127.

- Pappas, S. A., Turaga, U., Kumar, N., Ramkumar, S. & Kendall, R. J. (2017). Uptake of silver from polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in a terrestrial system. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 3, 104-114.
- Pappas, S. A., Kumar, N., Turaga, U., Ramkumar, S. & Kendall, R. J. (2018). The Influence of Soil pH on the Uptake of Silver Nanoparticles in a Terrestrial System. *J Environ Anal Toxicol*, 8(545), 2161-0525.
- Park, J. B., Choi, W. H., Kim, S. H., Jin, H. J., Han, Y. S. & Kim, N. J. (2014). Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 28(1), 5-9.
- Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Ciesielski, S. & Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 256, 113265.
- 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*, 25(9), 1947-1956.
- Qin, Y., Zhang, S., Zhang, L., Zhu, D. & Syed, A. (2005). Response of in vitro strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *HortScience*, 40(3), 747-751.
- Rajan, R., Huo, P., Chandran, K., Dakshinamoorthi, B. M., Yun, S. I. & Liu, B. (2022). A review on the toxicity of silver nanoparticles against different biosystems. *Chemosphere*, 292, 133397.
- Ramachandra, S. K., Kaushik, S., Austin, H., Kumar, R. & Parthiban, M. (2023). The Role of melanin in plant pathogenic fungi: insights into structure, biosynthesis, and function. *Plant Biol Crop Res*, 6, 1090.
- Rana, A., Yadav, K. & Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122880.
- Rankic, I., Zelinka, R., Ridoskova, A., Gagic, M., Pelcova, P. & Huska, D. (2021). Nano/microparticles in conjunction with microalgae extract as novel insecticides against Mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, 11(1), 17125.
- Rouhani, M., Samih, M. A. & Kalantari, S. (2013). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F.(Col.: Bruchidae). *Journal of Entomological Research*, 4(4), 297-305.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E. & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330.

- Rosa, L. H., Vaz, A. B., Caligiore, R. B., Campolina, S. & Rosa, C. A. (2009). Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biology*, 32, 161-167.
- Sajid, M., Srivastava, S., Yadav, R. K., Singh, H., Singh, S. & Bharadwaj, M. (2022). Composition and ecological functionality of fungal communities associated with smokeless tobacco products mainly consumed in India. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e02273-21.
- Sallam, M. N. (2013). Insect damage: damage on post-harvest. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Diaponible online en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Pests-Insects.pdf.
- Santos, T. S., de Souza Varize, C., Sanchez-Lopez, E., Jain, S. A., Souto, E. B., Severino, P. & Mendonça, M. D. C. (2022). Entomopathogenic fungi-mediated AgNPs: synthesis and insecticidal effect against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Materials*, 15(21), 7596.
- Shahzad, K. & Manzoor, F. (2021). Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(1), 1-11.
- Shang, H., Ma, C., Li, C., Cai, Z., Shen, Y., Han, L., Wang, C., Tran, J., Elmer, W. H., White, J. C. & Xing, B. (2023). Aloe Vera Extract Gel-Biosynthesized Selenium Nanoparticles Enhance Disease Resistance in Lettuce by Modulating the Metabolite Profile and Bacterial Endophytes Composition. *ACS Nano*, 17(14), 13672-13684.
- Sharma, D., Kanchi, S. & Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3576-3600.
- Shi, W., Syrenne, R., Sun, J. Z. & Yuan, J. S. (2010). Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age. *Insect Science*, 17(3), 199-219.
- Siddiqi, K. S. & Husen, A. (2022). Plant response to silver nanoparticles: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(7), 973-990.
- Simon, E., Baranyai, E., Braun, M., Fábíán, I. & Tóthmérész, B. (2013). Elemental concentration in mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) during metamorphosis. *Biological Trace Element Research*, 154(1), 81-87.
- Singh, D. & Kumar, A. (2015). Effects of nano silver oxide and silver ions on growth of *Vigna radiata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95, 379-384.
- Smith, E. P. & van Belle, G. (1984). Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics*, 119-129.
- Soleimani, P., Mehrvar, A., Michaud, J. P. & Vaez, N. (2022). Optimization of silver nanoparticle biosynthesis by entomopathogenic fungi and assays of their antimicrobial and antifungal properties. *Journal of Invertebrate Pathology*, 190, 107749.

- Spagnoletti, F. N., Kronberg, F., Spedalieri, C., Munarriz, E. & Giacometti, R. (2021). Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 297, 113434.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R. & Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23(1-2), 9-19.
- Syu, Y. Y., Hung, J. H., Chen, J. C. & Chuang, H. W. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57-64.
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Durán, N., Diez, M. C., Martínez, M., Parada, J. & Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 121974.
- Utembe, W., Tlotleng, N. & Kamng'ona, A. W. (2022). A systematic review on the effects of nanomaterials on gut microbiota. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100118.
- Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T. & Moret, Y. (2019). Immune defenses of a beneficial pest: the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in Physiology*, 10, 138.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T. & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2955-2965.
- Warheit, D. B. (2018). Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: how far have we come in the past 10 years?. *Fl1000Research*, 7.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.
- Wypij, M., Jędrzejewski, T., Ostrowski, M., Trzcińska, J., Rai, M. & Golińska, P. (2020). Biogenic silver nanoparticles: assessment of their cytotoxicity, genotoxicity and study of capping proteins. *Molecules*, 25(13), 3022.
- Xu, X., Liang, A., Li, H., Shang, H., Qian, K., Jia, W., White, J. C., Ma, C. & Xing, B. (2023). Foliar Applied ZnO Quantum Dots Boost Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) Growth and Positively Alter Endophytic and Rhizosphere Microbial Communities. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(23), 8503-8516.
- Yan, A. & Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1003.

Zaid, I. U., Khalil, I. H. & Khan, S. (2012). Genetic variability and correlation analysis for yield components in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *J. Agri. Biol. Sci*, 7(11), 1990-1997.

Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D., Chen, W. & Li, G. (2014). Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological control*, 72, 98-108.

Zhang, X., Zhang, F. & Lu, X. (2022). Diversity and functional roles of the gut microbiota in Lepidopteran insects. *Microorganisms*, 10(6), 1234.

Zoroddu, M. A., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I. & Peana, M. (2014). Toxicity of nanoparticles. *Curr. Med. Chem*, 21(33), 3837-3853.

RESULTADOS RELEVANTES

De forma breve se vuelcan aquí los resultados y conclusiones más destacados alcanzados durante esta tesis.

- Se logró sintetizar AgNPs utilizando por primera vez los organismos *T. albida* (BAFCcult 4710, 4711, 4712, 4713), *C. luteoalbus* y *T. assiutensis*.
- Se logró sintetizar AuNPs utilizando por primera vez los organismos *T. albida* (BAFCcult 4711), *C. luteoalbus*, *T. assiutensis* y *T. trogii*.
- Se estableció que la variación en la síntesis de NPs mediada por diferentes cepas de *T. albida* es muy baja.
- Se determinó que, mientras la síntesis de AgNPs ocurre predominantemente a pH 9, la síntesis de AuNPs parece darse tanto a pH alcalinos como ácidos, variando su efecto en cada cepa estudiada.
- En el caso de *T. albida* los datos indicarían que en la síntesis de AuNPs un mayor valor de pH produce NPs de menor tamaño. Sin embargo, el tipo de cepa fúngica, así como las variaciones de pH, parecen tener un alto impacto en la morfología de las NPs.
- Se logró la síntesis de AgNPs a 6°C utilizando al hongo psicotolerante *T. albida* (BAFCcult 4711).
- Se demostró que las NPs sintetizadas están rodeadas de material orgánico.
- Se demostró el impacto negativo en al menos uno de los parámetros analizados en *P. radiatus* al ser tratadas con las AgNPs sintetizadas en este trabajo.
- Se demostró una alteración de la comunidad endofítica foliar de *P. radiatus* al ser tratadas con AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711).
- Se demostró un impacto negativo en el desarrollo del crecimiento de la colonia *in vitro* de los hongos *Alternaria* sp. y *Stemphylium* sp., al ser tratadas con AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711).
- Se registró una tendencia negativa en la supervivencia de larvas y pasaje a pupa y adulto de *T. molitor* al ser tratadas con AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711).
- Se determinó una alteración en la comunidad micobiótica asociada al intestino de larvas de *T. molitor* al ser tratadas con AgNPs sintetizadas con *T. albida* (BAFCcult 4711), observándose una disminución de la riqueza.
- Las modificaciones producidas en las comunidades fúngicas estudiadas parecen ser más importantes tanto cuantitativamente como cualitativamente en las comunidades intestinales (*T. molitor*) que en las comunidades foliares (*P. radiatus*)

- Los análisis aquí realizados parecen sugerir que las NPs esféricas de menor tamaño con un capping orgánico promoverían mayores efectos negativos

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conjunto los resultados de esta tesis logran demostrar que la síntesis de AgNPs y AuNPs utilizando organismos fúngicos es posible y que ésta puede ser modulada mediante la manipulación de alguno de sus parámetros como el pH o la temperatura, así como también, que los productos de la síntesis dependen fuertemente de la cepa que se esté utilizando. Por otro lado se demuestra que las AgNPs ya sean síntesis biológica pueden afectar el desarrollo de organismos de diferente naturaleza, así como también alteran la composición y característica de las comunidades microbianas, por lo que el uso de este tipo de materiales debe ser realizado con precaución.

Si bien se ha demostrado que los mecanismos varían según el tipo de NP y el organismo utilizado, quedan aún por dilucidar el mecanismo exacto de cada una de las síntesis con el fin de poder modular de manera más precisa la formación de las NPs con características deseadas. Asimismo, si bien el estudio del impacto de las AgNPs en distintos modelos biológicos resulta interesante de manera integral, dando cuenta que la liberación de estos productos al medio ambiente de manera descontrolada puede traer consecuencias en todos los niveles tróficos estudiados (y probablemente en los no estudiados también), quedaría por dilucidar los mecanismos mediante los cuales las NPs interfieren en el desarrollo de estos organismos.



Kobashigawa, Jesica M.



Carmarán, Cecilia C.



Scaffardi, Lucía B.

ANEXO

Medios de cultivo

Extracto de malta agarizado (MEA)

Agar-agar: 20 gr

Extracto de malta: 20 gr

Agua destilada: 1000 ml

Extracto de malta agarizado (MEAc)

Agar-agar: 20 gr

Extracto de malta: 20 gr

Cloranfenicol: 100 mg

Agua destilada: 1000 ml

Medio con ácido tánico/gálico

Ácido tánico/gálico: 5 gr

Agar-agar: 20 gr

Extracto de malta: 15 gr

Agua destilada: 1000 ml

Los ácidos y el agar se esterilizan por separado para evitar la hidrólisis. Se mezclan luego de retirar del autoclave.

Medio con tirosina

Agar-agar: 15 gr

Tirosina: 2 gr

Agua destilada: 1000 ml

La tirosina y el agar se esterilizan por separado. Se mezclan luego de retirar del autoclave.

NBRIP

Glucosa: 10 g

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5 g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g

KCl: 0.2 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.1 g

Agua destilada: 1000 ml

Especie	Número de acceso al GenBank	Origen	Sustrato	Referencia
<i>Tulasnella violea</i>	AY373303	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Tulasnella violea</i>	DQ457643	-	-	Matheny et al. 2006
<i>Tulasnella sp.</i>	KC514909	Antártida	Madera en estado de descomposición	Held & Blanchette 2017
<i>Tulasnella albida</i>	MW370511	Antártida	Madera en estado de descomposición	Gaiser et al. 2021
<i>Tulasnella cf. albida</i>	KC152378	Ecuador	Madera en estado de descomposición	Cruz et al. 2014
<i>Tulasnella albida</i>	KC152379	Ecuador	Madera en estado de descomposición	Cruz et al. 2014
<i>Tulasnella albida</i>	AY373294	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Tulasnella pruinosa</i>	DQ457642	-	-	Matheny et al. 2006
<i>Tulasnella pruinosa</i>	AY373295	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Tulasnella asymmetrica</i>	DQ388047	Ecuador	Orquídeas terrestres	Suárez et al. 2006
<i>Tulasnella asymmetrica</i>	MH134543	Australia	Orquídeas terrestres	Reiter et al. 2018
<i>Tulasnella korungensis</i>	NR_184927	Australia	Orquídeas terrestres	Arifin et al 2022
<i>Tulasnella korungensis</i>	MT981409	Australia	Orquídeas terrestres	Arifin et al 2022
<i>Tulasnella kiataensis</i>	MH134533	Australia	Orquídeas terrestres	Reiter et al. 2018
<i>Tulasnella irregularis</i>	NR_160166	-	-	Vu et al. 2019
<i>Tulasnella danica</i>	AY373297	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Tulasnella dendritica</i>	NR_160569	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella dendritica</i>	LC175307	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella cumulopuntioides</i>	NR_160570	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella cumulopuntioides</i>	LC175325	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella ellipsoidea</i>	LC175316	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella calospora</i>	JN253513	China	Orquídeas terrestres	Tan et al. 2012
<i>Tulasnella calospora</i>	DQ388044	Ecuador	Orquídeas terrestres	Suárez et al. 2006
<i>Tulasnella deliquescens</i>	LC175330	Japón	Orquídeas terrestres	Fujimori et al. 2018
<i>Tulasnella deliquescens</i>	AY373291	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Tulasnella sphagneti</i>	KY445923	Australia	Orquídeas terrestres	Linde et al. 2017
<i>Tulasnella eichleriana</i>	AY373292	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004

<i>Tulasnella tomaculum</i>	AY373296	EE.UU.	Orquídeas terrestres	McCormick et al. 2004
<i>Pleurotus ostreatus</i>	MW457626	Irak	Tronco de árbol	Hasan & Abdulhadi 2022

Tabla 1’. Nombre de la cepa, número de acceso al GenBank, origen y sustrato de las secuencias comparadas con la secuencia correspondiente a la cepa *T. albida* BAFCCult 4711.

<i>Especie</i>	<i>Número de acceso al GenBank</i>	<i>Origen</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Referencia</i>
<i>Talaromyces bacillisporus</i>	JN899329	EE.UU.	Hoja de begonia	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces unicus</i>	JN899336	Taiwan	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces emodensis</i>	JN899337	Nepal	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces mimosinus</i>	JN899338	Australia	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces wortmanii</i>	JN899352	-	-	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces subinflatus</i>	JN899397	Japón	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces derxii</i>	JN899326	Japón	Suelo cultivado	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces derxii</i>	JN899327	Japón	Suelo cultivado	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces macrosporus</i>	JN899333	Sudáfrica	Jugo de manzana	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces flavus</i>	JN899360	Nueva Zelanda	-	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces galapagensis</i>	JN899358	Ecuador	Suelo sombreado	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces intermedius</i>	JN899332	Inglaterra	Pastos aluviales y suelos pantanosos	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces cyanescens</i>	JN899391	España	-	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces barcinensis</i>	JN899349	España	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces muroii</i>	JN899351	Taiwan	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces purpureus</i>	JN899328	Francia	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces convolutus</i>	JN899330	Nepal	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces austrocalifornicus</i>	JN899357	EE.UU.	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces udagawae</i>	JN899350	Japón	Suelo	Samson et al. 2011

<i>Talaromyces ohiensis</i>	JN899355	Alemania	Suelo tratado con cianamida	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces gossypii</i>	JN899334	India	<i>Gossypium</i>	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces assiutensis</i>	JN899320	Marruecos	Suelo	Samson et al. 2011
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	MT316373	Italia	Suelo compostado	Di Piazza et al. 2020
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	MZ423057	Taiwan	Talga algal	Cha et al. 2021
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	MH857353	-	-	Vu et al. 2019
<i>Talaromyces assiutensis</i>	MW798752	Italia	<i>Crocus sativus</i>	Belfiori et al. 2021
<i>Aspergillus niger</i>	NR_111348	-	-	Schoch et al. 2014

Tabla 2'. Nombre de la cepa, número de acceso al GenBank, origen y sustrato de las secuencias comparadas con la secuencia correspondiente a la cepa de *Talaromyces assiutensis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Arifin, A. R., Reiter, N. H., May, T. W. & Linde, C. C. (2022). New species of *Tulasnella* associated with Australian terrestrial orchids in the subtribes Megastylidinae and Thelymitrinae. *Mycologia*, 114(2), 388-412.
- Belfiori, B., Rubini, A. & Riccioni, C. (2021). Diversity of endophytic and pathogenic fungi of saffron (*Crocus sativus*) plants from cultivation sites in Italy. *Diversity*, 13(11), 535.
- Cha, H. J., Chiang, M. W., Guo, S. Y., Lin, S. M. & Pang, K. L. (2021). Culturable fungal community of *Pterocladia capillacea* in Keelung, Taiwan: Effects of surface sterilization method and isolation medium. *Journal of Fungi*, 7(8), 651.
- Cruz, D., Suárez, J. P., Kottke, I. & Piepenbring, M. (2014). Cryptic species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia*, 106(4), 708-722.
- Di Piazza, S., Houbraken, J., Meijer, M., Cecchi, G., Kraak, B., Rosa, E. & Zotti, M. (2020). Thermotolerant and thermophilic mycobiota in different steps of compost maturation. *Microorganisms*, 8(6), 880.
- Fujimori, S., Abe, J. P., Okane, I. & Yamaoka, Y. (2018). Three new species in the genus *Tulasnella* isolated from orchid mycorrhiza of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* (Orchidaceae). *Mycoscience*, 60(1), 71-81.

Gaiser, R. F., Robles, C. A., Kobashigawa, J. M., Pereira, S., Skronski, N. & Carmaran, C. C. (2021). Mycobiota associated to Casa Moneta Museum wood, South Orkney Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 44, 1817-1831.

Hasan, Ghazwan Q. Ph.D. and Abdulhadi, Shimal Y. Ph.D. (2022) "Molecular characterization of wild *Pleurotus ostreatus* (MW457626) and evaluation of β -glucans polysaccharide activities," *Karbala International Journal of Modern Science*: Vol. 8 : Iss. 1 , Article 6.

Held, B. W. & Blanchette, R. A. (2017). Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. *Fungal Biology*, 121(2), 145-157.

Linde, C. C., May, T. W., Phillips, R. D., Ruibal, M., Smith, L. M. & Peakall, R. (2017). New species of *Tulasnella* associated with terrestrial orchids in Australia. *IMA Fungus*, 8(1), 28-47.

Matheny, P. B., Curtis, J. M., Hofstetter, V., Aime, M. C., Moncalvo, J. M., Ge, Z. W., ... & Hibbett, D. S. (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia*, 98(6), 982-995.

McCormick, M. K., Whigham, D. F. & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425-438.

Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J. & Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70(1), 159-183.

Schoch, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., ... & Federhen, S. (2014). Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database, 2014, bau061.

Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F. & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257-1270.

Reiter, N., Lawrie, A. C. & Linde, C. C. (2018). Matching symbiotic associations of an endangered orchid to habitat to improve conservation outcomes. *Annals of Botany*, 122(6), 947-959.

Tan, X. M., Chen, X. M., Wang, C. L., Jin, X. H., Cui, J. L., Chen, J., Gao, S. X. & Zhao, L. F. (2012). Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology*, 64, 140-147.

Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V. & Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92(1), 135-154.