

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología Celular y Molecular**

**Efecto de las nanopartículas de plata Argovit™
en la microalga *Chattonella sp.***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Marylin Gil Martínez

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Marylin Gil Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Codirector de tesis

Dra. Diana Garibo Ruiz
Codirectora de tesis

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dr. Víctor Ruíz Cortes

Dra. Yanis Toledano Magaña



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Marylin Gil Martínez © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Marylin Gil Martínez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología Celular y Molecular

Efecto de las nanopartículas de plata Argovit™ en la microalga *Chattonella sp.*

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Codirector de tesis

Dra. Diana Garibo Ruiz
Codirectora de tesis

Las nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™ son nanomateriales metálicos con propiedades fisicoquímicas que poseen un efecto biocida y antiproliferativo en diferentes microorganismos tales como virus, bacterias y hongos. A pesar de que se ha profundizado en investigaciones sobre el impacto de AgNPs en diferentes modelos de estudio, el impacto de los efectos tóxicos en microalgas marinas ocasionado por la exposición o liberación de estas AgNPs y sus mecanismos de internalización aún no se encuentra completamente descritos. El presente trabajo tiene por objetivo evaluar la respuesta fisiológica reflejadas en cambios de la morfología y actividad fotosintética reflejada en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (FSII) (F_v/F_m), por la exposición de las microalgas marinas *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.*, frente a dos formulaciones de AgNPs Argovit™ en concentraciones de 0.2, 2, 10, 200 y 200 μM . Estas microalgas fueron aisladas de la Bahía Todos Santos, en Baja California, México y se caracterizan por ser potenciales formadores de florecimientos algales nocivos por la producción de metabolitos tóxicos. Ambas microalgas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de las dos formulaciones de AgNPs Argovit™, las cuales poseen un contenido de plata metálica de 12 mg/mL. La AgNP 7 tiene un recubrimiento de polímero polivinilpirrolidona (PVP) con un tamaño promedio de 30.1 ± 9.6 nm y una morfología esférica/triangular, mientras que la AgNP 10 tiene un recubrimiento de proteína hidrolizada sintetizada, con un tamaño promedio de 33.38 ± 5.66 nm y una morfología esférica/pentagonal. Al exponer a *Chattonella sp.* a las diferentes concentraciones de AgNPs, se observó un daño severo en su morfología, causando lisis celular por la exposición a la AgNP 7, además de una disminución drástica de la eficiencia cuántica máxima del FSII (F_v/F_m) partir de la concentración de 10 μM en 30 minutos; pero con la formulación AgNP 10 no presentó ningún cambio significativo en la estructura de la célula y se observó una disminución gradual del FSII en función de la concentración administrada a partir de los 30 minutos. En el caso de *Heterocapsa sp.* solo se observaron deformidades en la estructura celular debido al estrés inducido con la formulación AgNP 7. Con respecto al FSII, la microalga presentó diferencias mínimas entre las diferentes concentraciones; mientras que con la formulación AgNP 10 se observaron ligeras deformidades estructurales sin generar cambios en el FSII dependientes del tiempo o concentración empleada. Las diferencias de los efectos de las AgNPs pueden estar asociadas con las características morfológicas entre ambas microalgas evaluadas, ya que *Heterocapsa sp.* posee una estructura rígida que la protege, mientras que *Chattonella sp.* no posee una pared celular rígida. Estas diferencias morfológicas y estructurales influyen directamente, por ser el primer sitio de interacción de las AgNPs y las células. Este trabajo representa la primera evaluación realizada sobre el efecto ocasionado por AgNPs Argovit™ en microalgas tóxicas.

Palabras clave: Argovit, nanopartículas de plata, microalgas, toxicidad, fotosistema, morfología.

Abstract of the thesis presented by **Marylin Gil Martinez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Cellular and Molecular Microbiology.

Effect of Argovit™ silver nanoparticles on the microalgae *Chattonella* sp.

Abstract approved by:

Dr. Ernesto García Mendoza
Thesis codirector

Dra. Diana Garibo Ruiz
Thesis codirector

Argovit™ silver nanoparticles (AgNPs) are metallic nanomaterials with physicochemical properties that have a biocidal and antiproliferative effect on different microorganisms such as viruses, bacteria and fungi. Although research on the impact of AgNPs in different study models has been deepened, the impact of toxic effects on marine microalgae caused by the exposure or release of these AgNPs and their internalization mechanisms is not yet fully described. Therefore, the objective of this work was established to evaluate the physiological response reflected in changes of morphology and photosynthetic activity reflected in the maximum quantum efficiency of photosystem II (FSII) (F_v/F_m), by exposure of the marine microalgae *Chattonella* sp. and *Heterocapsa* sp. to two formulations of Argovit™ AgNPs at concentrations of 0.2, 2, 10, 200 and 200 μ M. These microalgae were isolated from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico and are characterized as potential formers of harmful algal blooms by the production of toxic metabolites. Both microalgae were exposed to the different concentrations of the two formulations of Argovit™ AgNPs, which have a metallic silver content of 12 mg/mL. AgNP 7 has a polyvinylpyrrolidone polymer (PVP) coating with an average size of 30.1 ± 9.6 nm and a spheroidal/triangular morphology, while AgNP 10 has a synthesized hydrolyzed protein coating, with an average size of 33.38 ± 5.66 nm and a spheroidal/pentagonal morphology. Upon exposure of *Chattonella* sp. to the different concentrations of AgNPs, severe damage to its morphology was observed, causing cell lysis upon exposure to AgNP 7, in addition to a drastic decrease in the maximum quantum efficiency of FSII (F_v/F_m) starting from the concentration of 10 μ M within 30 min; but with the AgNP 10 formulation it did not present any significant change in the cell structure and a gradual decrease in FSII was observed as a function of the concentration administered starting from 30 min. In the case of *Heterocapsa* sp. only deformities in the cell structure were observed due to the stress induced with the AgNP 7 formulation. About to the FSII, the microalgae presented minimal differences between the different concentrations; while with the AgNP 10 formulation slight structural deformities were observed, but it did not generate changes in the FSII dependent on the time or concentration used. The differences in the effects of AgNPs may be associated with the morphological characteristics of both microalgae evaluated, since *Heterocapsa* sp. has a rigid structure that protects it, while *Chattonella* sp. does not have a rigid cell wall. These morphological and structural differences have a direct influence, since they are the first site of interaction of AgNPs and cells. This work represents the first evaluation of the effect of Argovit™ AgNPs on toxic microalgae.

Keywords: Argovit, silver nanoparticles, microalgae, toxicity, photosystem, morphology.

Dedicatoria

*A mi madre Verónica.
Gracias por tu apoyo y todo tu amor.
Por darme el ejemplo de que,
a pesar de las dificultades
siempre saldremos adelante.*

*A mi hermano Salvador.
Gracias por tu apoyo y todo tu esfuerzo.
Por darme el ejemplo de
la perseverancia y la paciencia.*

*Gracias.
Por todo lo que han hecho por mí.
Sin ustedes, no habría llegado tan lejos.
Y por ustedes, sigo aquí.
Gracias.*

En memoria de mi padre Jaime Salvador.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo brindado con la beca para realizar mis estudios de posgrado.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado dentro de su programa de Maestría en Ciencias de la Vida.

A mis codirectores de tesis: la **Dra. Diana Garibo Ruíz** y el **Dr. Ernesto García Mendoza**, por su comprensión, sus palabras de aliento y sus enseñanzas. Estoy agradecida infinitamente por todo su apoyo en este proceso.

A los miembros de mi comité de tesis, la **Dra. Elizabeth Ponce Rivas**, el **Dr. Víctor Ruiz Cortes** y la **Dra. Yanis Toledano Magaña**, por su valioso apoyo, su flexibilidad, comprensión y por todos los comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la **Dra. Nina Bogdanchikova** por su valioso apoyo al proporcionar las AgNPs para este trabajo, además de todos sus comentarios y recomendaciones.

A la **Dra. Patricia Juárez** por todo su apoyo en los contratiempos que tuve. Por sus palabras de aliento. Mil gracias por todo.

A la **M.C. Dolores Sarracino**, **L. C. E. Norma Fuentes**, **Citlali Romero** y **Adriana Mejía**, gracias por todas sus atenciones, su paciencia y su apoyo. También un especial agradecimiento al **Dr. Pedro Negrete Regagnon**. Muchísimas gracias por su apoyo, su tiempo y confianza.

Y de forma especial a la **Dra. Yanis Toledano Magaña** y al **Dr. Juan Carlos Garcia Ramos**, les agradezco infinitamente su apoyo, su paciencia y todos y cada uno de sus consejos que me han ayudado a superarme.

A todos los integrantes del laboratorio de **Biología Algal**. A todos y cada uno de ellos, en especial a Miriam, Ángeles, Valeria, Paty, Michelle, Rigel, Yaireb, Yessica, Grecia. Gracias a todos ustedes por su ayuda y sus enseñanzas.

A mi amor **José Antonio Rodríguez**. Gracias por todo tu apoyo, tus consejos, enseñanzas y correcciones. Por tu infinita paciencia y cariño. Por impulsarme a continuar y ayudarme a crecer, por acompañarme en las buenas y en las malas. Gracias por todo.

A mi amigo **Alberto Blanco**. Gracias por tu amistad y enseñarme a hacerme valer también. Por todos tus consejos y correcciones cada vez que los necesitaba. Además de tu apoyo y todas las horas de pláticas de desahogo.

A mi madre **Verónica** y mi hermano **Salvador**. A pesar de la distancia y de las dificultades, siempre han estado presentes, apoyándome. Sin ustedes no lo hubiera logrado. Gracias por todo.

A mi abuela, tías, tío, primo y primas: **Altagracia, Rosario, Luz, Judith, Mirna, Ana, Alberto, Sebastian, Kamila, Edith, Ivonne**. Siempre los tengo presentes. A pesar de la distancia, en cada llamada de ustedes, recibía todo su cariño y apoyo.

En memoria de mi abuelo **Justino**.

A mi prima **Dayana**. Gracias por toda tu paciencia, apoyo y cariño en los buenos y malos momentos. Por enseñarme a que se puede superar cualquier obstáculo y darme el ejemplo de cómo puedo sanar paso a paso. Gracias por ser mi persona.

A mis amigas de Ensenada: **Karolina Casián, Gabriela Vargas, Sandra Ivonne, Wendy Vargas**. Gracias por todos y cada uno de los divertidos momentos que pasamos dentro y fuera de CICESE. Agradezco mucho todo su tiempo, su apoyo y su cariño. Porque con ustedes Ensenada se volvió un lugar lleno de recuerdos.

A mis amigos: **Paulo Valenzuela y Humberto Manríquez**. Les agradezco su amistad, sus charlas y consejos. Por acompañarme en los buenos y malos momentos. Y por enseñarme que una buena canción y un rico té y café, siempre amenizan una charla o alivian cualquier pena.

A los **investigadores, profesores, técnicos, compañeros**, que aportaron de forma directa e indirecta en este proceso. Gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Introducción general.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.2.1 Microalgas.....	2
1.2.2 Pared celular de las microalgas.....	4
1.2.3 Fisiología fotosintética.....	5
1.2.3.1 Fotosíntesis.....	5
1.2.4 Género <i>Chattonella</i>	7
1.2.5 Género <i>Heterocapsa</i>	9
1.2.6 Nanopartículas de plata (AgNPS) Argovit™	11
1.2.7 Internalización de nanopartículas en microalgas.....	12
1.2.8 Toxicidad de nanopartículas en microalgas.....	13
1.3 Justificación	15
1.4 Hipótesis.....	16
1.5 Objetivos.....	17
1.5.1 Objetivo general.....	17
1.5.2 Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Metodología.....	18
2.1 Caracterización de las AgNPs.....	18
2.2 Microalgas de estudio.....	18
2.2.1 Obtención de las cepas.....	18
2.2.2 Condiciones de cultivo.....	19

2.3 Metodología para efecto de la exposición de dos formulaciones de AgNPs Argovit™ en microalgas marinas.....	19
2.3.1 Preparación de los tratamientos de AgNPs Argovit™	19
2.3.2 Metodología para cambios en la morfología celular por exposición a AgNPs Argovit™	20
2.3.3 Metodología para cambios en actividad fotosintética por la exposición a AgNPs Argovit™	21
2.4 Análisis estadístico.....	23
Capítulo 3. Resultados.....	24
3.1 Caracterización de las AgNPs Argovit™	24
3.2 Efecto de la exposición de dos formulaciones de AgNPs Argovit™ en microalgas marinas.....	26
3.2.1 Cambios en la morfología celular por exposición a AgNPs Argovit™	26
3.3 Cambios en la actividad fotosintética por la exposición a AgNPs Argovit™	30
3.3.1 Efecto de AgNP 7 sobre <i>Chattonella sp.</i>	31
3.3.2 Efecto de AgNP 10 sobre <i>Chattonella sp.</i>	32
3.3.3 Efecto de AgNP 7 sobre <i>Heterocapsa sp.</i>	33
3.3.4 Efecto de AgNP 10 sobre <i>Heterocapsa sp.</i>	34
3.3.5 Diferencias entre la efectividad de las AgNPs Argovit™	35
Capítulo 4. Discusión.....	37
4.1 Diferencia de efectividad entre <i>Chattonella sp.</i> y <i>Heterocapsa sp.</i> frente a AgNPs Argovit™	37
Capítulo 5. Conclusiones.....	41
Literatura citada.....	42

Lista de figuras

Figura		Página
1	Árbol filogenético simplificado con énfasis en las algas. Modificado de Hallman (2019).....	3
2	Composición de la pared celular de microalgas. Modificado de y modificada de Velazquez-Lucio et al., (2018).....	4
3	Ilustración esquemática de la conversión de luz en energía química con el flujo de electrones desde el centro de reacción al fotosistema I (PSI) y al fotosistema II (PSII) durante el proceso de fotosíntesis. Tomado de Kumar et al., (2021).....	6
4	Micrografía de la morfología de <i>Chattonella sp.</i> , aisladas de la Bahía de Todos Santos fijada con una dilución de una solución amortiguadora de Hepes (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1%. Modificada de Ahumada-Fierro (2017).....	9
5	Ilustración esquemática de la internalización de nanopartículas metálicas (NPs) dentro de la célula de una microalga. Tomado y modificado de Wang et al., (2019).....	13
6	Ilustración esquemática de los efectos tóxicos propuestos de nanopartículas metálicas (NPs) para las membranas celulares de las microalgas. Tomado y modificado de Nguyen et al., (2020).....	14
7	Ilustración esquemática de los efectos tóxicos propuestos de nanopartículas metálicas (NPs) para las microalgas. Tomado de Nguyen et al., (2020).....	15
8	Protocolo para la elaboración de soluciones de trabajo y concentraciones de AgNPs, además de las condiciones de cultivo y tiempo de incubación de cada tratamiento realizado para la evaluación de los cambios morfológicos por la exposición de las AgNPs.....	21
9	Protocolo para la elaboración de soluciones de trabajo y concentraciones de AgNPs, además de las condiciones de cultivo y tiempo de incubación de cada tratamiento realizado para la evaluación de los cambios en la actividad fotosintética por la exposición a AgNPs.....	22
10	Micrografía por microscopía electrónica e Histograma de frecuencia de la AgNP 7...	24
11	Espectro de absorbancia de formulación AgNP 7.....	25
12	Micrografía por microscopía electrónica e Histograma de frecuencia de la AgNP 10.	25
13	Espectro de absorbancia de formulación AgNP 10.	26

14	Micrografías de <i>Chattonella sp.</i> después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7, PVP (200 μ M) y AgNO ₃ (200 μ M). (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μ M AgNPs; (C) 2.0 μ M AgNPs; (D) 10 μ M AgNPs; (E) 20 μ M AgNPs; (F) 100 μ M AgNPs; (G) 200 μ M AgNPs; (H) 200 μ M PVP;(I) 200 μ M de AgNO ₃ . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.....	27
15	Micrografías de <i>Chattonella sp.</i> después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 10, al PVP 200 μ M y AgNO ₃ 200 μ M. (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μ M AgNPs; (C) 2.0 μ M AgNPs; (D) 10 μ M AgNPs; (E) 20 μ M AgNPs; (F) 100 μ M AgNPs; (G) 200 μ M AgNPs; (H) 200 μ M PVP;(I) 200 μ M de AgNO ₃ . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.	28
16	Micrografías de <i>Heterocapsa sp.</i> después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7, PVP 200 μ M y AgNO ₃ 200 μ M. (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μ M AgNPs; (C) 2.0 μ M AgNPs; (D) 10 μ M AgNPs; (E) 20 μ M AgNPs; (F) 100 μ M AgNPs;(G) 200 μ M AgNPs; (H) 200 μ M PVP;(I) 200 μ M de AgNO ₃ .Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.	29
17	Micrografías de <i>Heterocapsa sp.</i> después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 10, PVP 200 μ M y AgNO ₃ 200 μ M. (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μ M AgNPs; (C) 2.0 μ M AgNPs; (D) 10 μ M AgNPs; (E) 20 μ M AgNPs; (F) 100 μ M AgNPs;(G) 200 μ M AgNPs; (H) 200 μ M PVP;(I) 200 μ M de AgNO ₃ . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.	30
18	Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>Chattonella sp</i> después de la exposición a la formulación de AgNPs 7 por 30 (verde) y 60 minutos (rojo). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.....	31
19	Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>Chattonella sp</i> después de la exposición a la formulación de AgNPs 10 por 30 (punto color verde) y 60 minutos (cuadrado color rojo). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs. Los controles + y - son los mismos que los mostrados en la Figura 13.....	32
20	Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>Heterocapsa sp</i> después de la exposición a la formulación de AgNPs 7 por 30 (punto color azul) y 60 minutos (cuadrado color negro). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.	33
21	Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de <i>Heterocapsa sp</i> después de la exposición a la formulación de AgNPs 10 por 30 (punto color azul) y 60 minutos (cuadrado color negro). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y	

	representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.....	34
22	Cambio porcentual respecto al control de la efectividad del PSII de las microalgas tóxicas expuestas a la AgNP 7.....	35
23	Cambio porcentual respecto al control de la efectividad del PSII de las microalgas tóxicas expuestas a la AgNP 10.	36

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Propiedades fisicoquímicas de ambas formulaciones de AgNps Argovit™.....	26

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción general

La nanotecnología es una disciplina emergente enfocada en la síntesis y desarrollo de nanomateriales, los cuales poseen un tamaño menor a 100 nm en al menos una dimensión, con propiedades fisicoquímicas aprovechables para diversas aplicaciones farmacéuticas, biomédicas e industriales (Ovais et al., 2020). Entre estos nanomateriales, las nanopartículas de plata (AgNPs, por sus siglas en inglés) son un grupo de nanomateriales metálicos de amplio uso y aplicación biomédica (Chaloupka et al., 2010). Algunas propiedades fisicoquímicas han permitido relacionar un efecto biocida o antiproliferativo en diferentes microorganismos tales como hongos, bacterias, amibas y virus, volviéndose ideales para múltiples aplicaciones en el área biológica (Imai et al., 2021).

Asimismo, en los últimos años, se ha profundizado en las investigaciones sobre el impacto de nanopartículas metálicas en diferentes especies de microalgas marinas y de agua dulce, debido a la importancia de estos organismos fotosintéticos como principales productores primarios en los diferentes ecosistemas acuáticos (Mahana et al., 2021). Estos organismos están rodeados por una membrana plasmática interna y una pared celular externa semipermeable, que permite mantener la integridad de la célula además de constituir un sitio vital de interacción con el medio ambiente circundante, lo que las vuelve sensibles a los cambios que sucedan en el ecosistema (Yue et al., 2017). Por lo tanto, es importante identificar los efectos tóxicos que se presentan en las células por la exposición o liberación de estos nanomateriales en los ecosistemas acuáticos, además de explicar cuáles son los mecanismos de internalización de las nanopartículas metálicas en las microalgas (Mahana et al., 2021).

Argovit™ es una de las AgNPs que más se han estudiado en cuanto a sus propiedades antibacterianas (Stephano-Hornedo et al., 2020), antifúngicas (Guerra et al., 2020), antiparasitarias (Valenzuela-Salas et al., 2021), antivirales (Ochoa-Meza et al., 2019) por mencionar algunos, y ha quedado claro que Argovit™ es de las pocas AgNPs que no muestran actividad citogenotóxica en células sanas (Ruiz-Ruiz et al., 2020). A pesar de que se ha estudiado la actividad de estas AgNPs en diversos modelos biológicos, aún es necesario profundizar en el entendimiento de los efectos de este nanomaterial, en distintas especies de microalgas marinas.

Recientemente en la Bahía de Todos Santos, importante región de producción acuícola, ubicada en el noroeste de la Península de Baja California, se presentaron eventos de florecimientos algales de las microalgas *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.*, eventos que provocaron la mortalidad masiva de peces (Ahumada-Fierro et al., 2021) y moluscos bivalvos (Paredes-Banda, 2020) respectivamente.

Estos eventos se consideraron de particular interés, debido a la importancia ecológica que tienen estas microalgas tóxicas, las cuales, aunque pertenecen a géneros distintos y presentan diferencias morfológicas remarcables entre ellas, son capaces de causar la muerte masiva de diferentes organismos. Estas características fueron seleccionadas para el presente trabajo. En este estudio se evaluaron dos formulaciones con propiedades fisicoquímicas diferentes de AgNPs Argovit™. Asimismo, para comparar el potencial efecto tóxico de cada formulación de AgNPs Argovit, se evaluó la respuesta biológica de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones de estas AgNPs con respecto a cambios en su morfología y en la actividad fotosintética de las células.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos, que se encuentran tanto en agua dulce como en agua salada y son capaces de vivir en solitario o agruparse en colonias. Existen más de 25,000 especies aisladas e identificadas que se clasifican como microorganismos eucarióticos o cianobacterias procariontas (Vale et al., 2020). Las microalgas se clasifican como organismos autótrofos, heterótrofos o mixótrofos, de acuerdo con el uso de fuentes de energía para su metabolismo energético. Las microalgas autótrofas producen materia orgánica y energía utilizando CO₂ como fuente de carbono y luz solar como fuente de energía para su crecimiento. En cambio, las heterótrofas utilizan como fuentes de energía y de carbono diferentes compuestos orgánicos, como la glucosa. Las microalgas mixotróficas poseen un metabolismo que consiste en un régimen de crecimiento en dos etapas: una etapa heterotrófica cuando el contenido de carbono orgánico es alto, y después un paso autótrofo, iniciando con la inducción de la fotosíntesis (Vale et al., 2020).

Existen diferentes tipos de algas, en esta clasificación se incluyen las verdes (Chlorophyta y Charophyta), rojas (Rhodophyta), pardas (Phaeophyta), verde amarillentas (Xanthophyta), diatomeas (Bacillariophyta),

glaucofitas, Eustigmatophyta, Euglenozoa y los dinoflagelados. En la figura 1 se presenta un árbol filogenético simplificado, en el que se observan otros grupos como animales, plantas terrestres, hongos, arqueobacterias, bacterias y se enfatiza la descripción general de las relaciones filogenéticas entre las ramas de las algas, ya que al constituir un grupo polifilético, las algas exhiben morfologías extremadamente diversas (Hallmann, 2019).

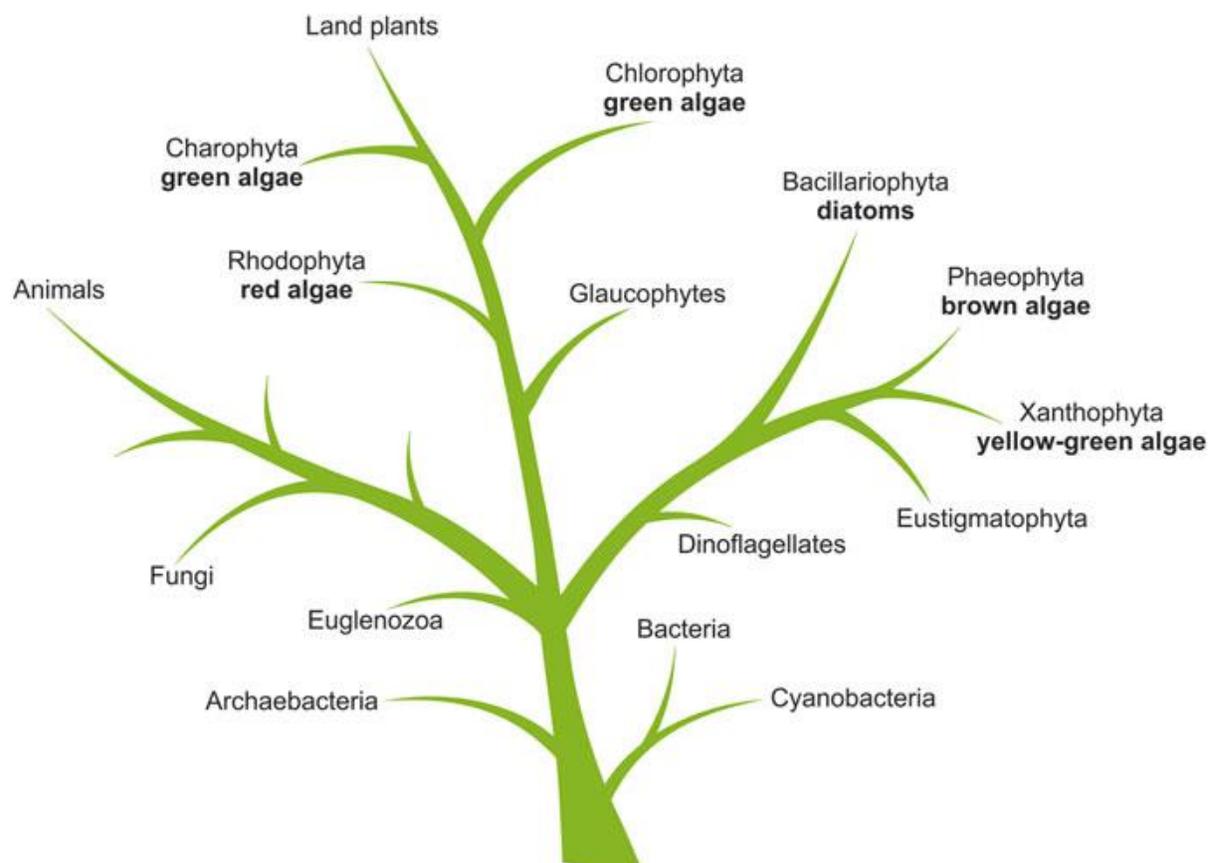


Figura 1. Árbol filogenético simplificado con énfasis en las algas. Tomada y modificada de Hallmann, (2019).

Todas las microalgas se caracterizan por tener una tasa de crecimiento exponencial y tiempos de duplicación cortos o prolongados en condiciones ambientales favorables (Vale et al., 2020). Cuando se presentan estas condiciones, las microalgas pueden proliferar en el medio acuático y acumular una alta tasa de biomasa celular, fenómeno llamado floración algal. Si la proliferación la realizan especies de microalgas que secretan metabolitos nocivos (toxinas), la biomasa celular acumulada formará una floración algal nociva que liberará compuestos que pueden ser perjudiciales en animales y humanos (Paredes-Banda, 2020).

1.2.2 Pared celular de las microalgas

Las microalgas poseen una pared celular que consiste en conjuntos de biopolímeros, principalmente polisacáridos y proteoglicanos, organizados en una estructura de fibrillas que están rodeadas e interactúan con una matriz subyacente (Domozych, 2019). Además, Carmona et al., (2013) han descrito que esta pared celular está compuesta por celulosa, pectina (ácido poligalacturónico) y polisacáridos sulfatados, que pueden impregnarse con sustancias inorgánicas como carbonato de calcio, sílice y magnesio.

Esta pared celular se compone de paredes externas e internas (figura 2). La capa externa está formada principalmente por una matriz de polisacáridos como pectina, agar, alginato y polímeros de algaenan; mientras que la capa interna, está compuesta por pectina, fucanos, hemicelulosa y glicoproteínas en una matriz de microfibrillas de celulosa con trazas de fucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa y galactosa. Dependiendo de la composición, la pared celular puede resultar en una estructura más o menos rígida y por lo tanto puede ser más difícil de romper (Velazquez-Lucio et al., 2018).

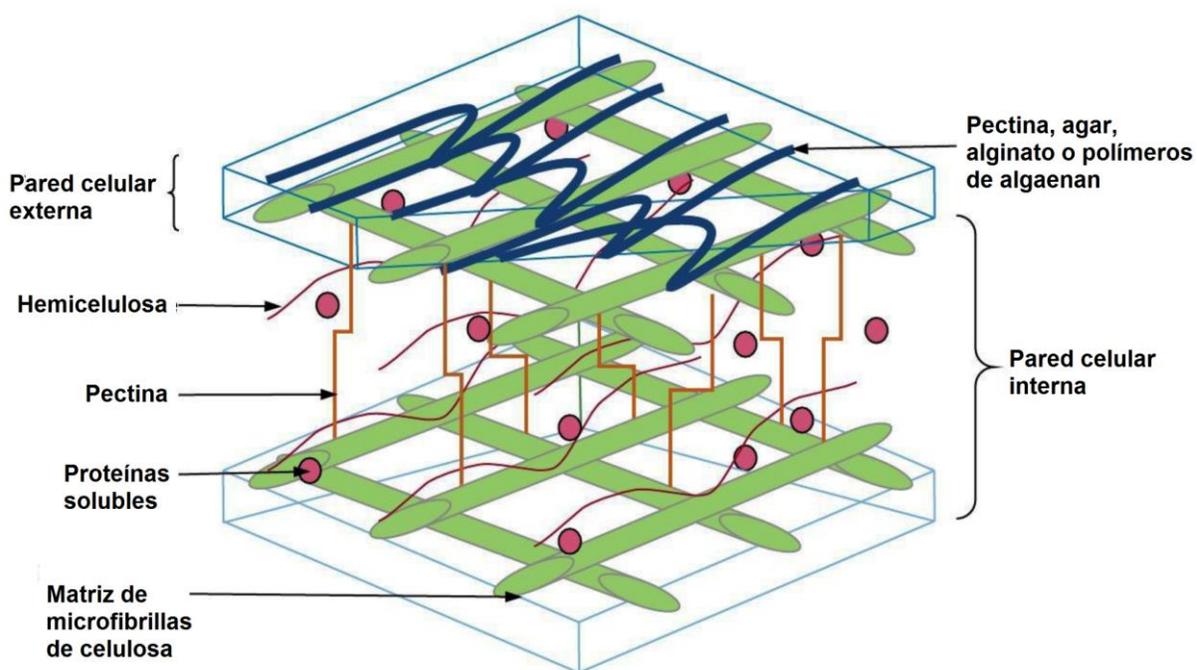


Figura 2. Composición de la pared celular de microalgas. Tomada y modificada de Velazquez-Lucio et al., (2018).

En las microalgas, la química de la pared celular reacciona de manera compleja debido a que se modula dinámicamente a lo largo del desarrollo de la célula y cambia en respuesta al estrés ambiental. La

producción de los componentes de la pared requiere grandes cantidades de carbono producido fotosintéticamente. Además, la matriz extracelular es otro elemento sumamente importante que rodea las células de las algas, sirve como conducto para la absorción de iones, agua y productos bioquímicos, funciona como una barrera para la defensa física o bioquímica, y como plataforma para la interacción con otras células y organismos (Domozych, 2019).

1.2.3 Fisiología fotosintética

1.2.3.1 Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso vital usado por plantas verdes y microorganismos fotoautótrofos que aprovechan la luz solar y pigmentos fotosintéticos como clorofila *a*, *b*, o carotenoides que absorben diferentes longitudes de onda del espectro visible (Kumar et al., 2021) para generar materia orgánica.

En la fotosíntesis se realiza la reducción de CO₂ y oxidación de H₂O en presencia de luz, para producir carbohidratos y O₂ de acuerdo con la siguiente ecuación: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2$

Al inicio de la fotosíntesis, se transfiere la energía de un fotón que es absorbido en los centros de reacción (CR) de las moléculas de clorofila (figura 3) de forma que este fotón pasa a un estado excitado (es decir, la energía transferida a los centros de reacción permite que un electrón pase del estado basal a un estado excitado).

Esta energía es convertida a una de tres tipos posibles, siendo transformada principalmente energía química redox (proceso fotoquímico) y el resto es disipado como calor (proceso no fotoquímico) y en menor grado es liberada en forma de energía radiante (fluorescencia) (Moreno et al., 2008).

De acuerdo con Johnson, (2016) el fotosistema II (figura 3) es un complejo clorofila-proteína presente en la membrana tilacoide, que usa la luz para oxidar el agua en oxígeno, en este proceso, la molécula plastoquinona actúa como agente transportador de los electrones libres resultado de la oxidación del agua. En su forma reducida, la plastoquinona transporta los electrones al complejo proteico citocromo b6f (cytb6f), que termina por oxidarlo para reducir a otra proteína, la plastocianina.

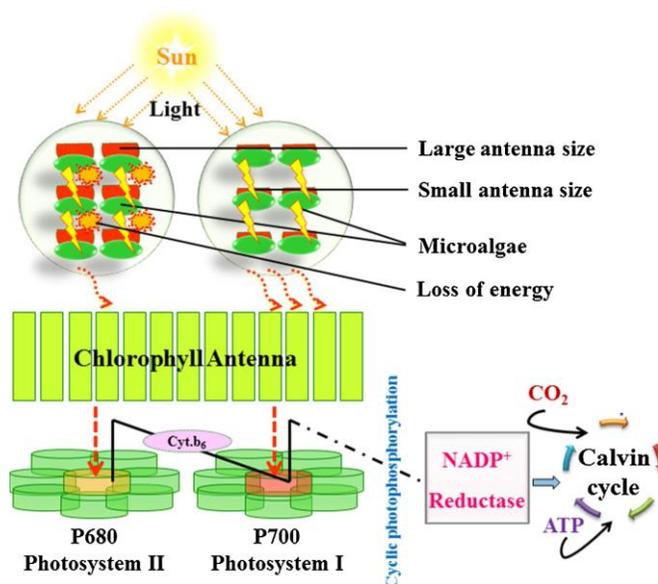


Figura 3. Ilustración esquemática de la conversión de luz en energía química con el flujo de electrones desde el centro de reacción al fotosistema I (PSI) y al fotosistema II (PSII) durante el proceso de fotosíntesis. Tomado de Kumar et al., (2021).

Un segundo complejo clorofila-proteína llamado fotosistema I (por sus siglas en inglés PSI) provoca una segunda reacción impulsada por la luz. El fotosistema I oxida la plastocianina y reduce otra a la proteína ferredoxina, que reside en el estroma. Para finalmente poder utilizar a la ferredoxina por la enzima ferredoxina- NADP^+ reductasa (FNR) para reducir NADP^+ a NADPH (Johnson, 2016).

La medición de la fluorescencia inicia en la oscuridad, cuando todos los centros de reacción están en estado “abierto” y la tasa de fotoquímica es máxima. En ese momento, el rendimiento de fluorescencia es mínima, y se designa como F_0 . Posteriormente, cuando el fotosistema II se expone a un fuerte pulso de luz, los centros de reacción sufren una separación de carga y el electrón se traslada a la quinona A (Q_A) ya que es el primer aceptor de electrones.

Después de que la quinona A se reduce, los centros de reacción están en estado “cerrado” y la tasa fotoquímica llega a cero, los rendimientos de disipación y fluorescencia aumentan proporcionalmente; y este elevado rendimiento de la fluorescencia en los centros de reacción cerrados, se describe como fluorescencia máxima (F_m). Esta diferencia entre la fluorescencia máxima F_m (cuando la quinona A está reducida) y la fluorescencia mínima F_0 (cuando la quinona A está oxidada) se denomina fluorescencia variable (F_v) (Masojídek et al., 2004).

La relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m) se ha relacionado con el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del fotosistema II (Malapascua et al., 2014). Los valores del F_v/F_m oscilan entre 0,7 y 0,8 en las microalgas verdes adaptadas a la oscuridad y esta relación se utiliza continuamente como una estimación útil del rendimiento fotoquímico del fotosistema II (Masojídék et al., 2004). Las mediciones de la emisión de la fluorescencia se han utilizado como técnica fiable, rápida y sensible, para monitorizar la actividad fotosintética, debido a que es capaz de reflejar el rendimiento de los procesos del aparato fotosintético y, en consecuencia, el estado fisiológico de las microalgas, porque proporciona información sobre el uso de la energía entre los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos (Malapascua et al., 2014).

Esta emisión de la fluorescencia se debe a las moléculas de clorofila asociadas a los fotosistemas I y II y su emisión cambia continuamente para adaptarse al ambiente cambiante en el que se encuentran los sistemas fotosintéticos en condiciones naturales; debido a que la función del fotosistema y, por consiguiente, la emisión de la fluorescencia se ve afectada de manera directa e indirecta por factores físicos o químicos de estrés.

Resultado de esto, se puede aprovechar la identificación de cambios en la emisión de la fluorescencia para cuantificar la respuesta de los organismos fotoautótrofos al estrés provocado por agentes externos contaminantes (Moreno et al., 2008).

1.2.4 Género *Chattonella*

El grupo de las rafdofitas, pertenecientes a la clase *Raphidophyceae*, del filo *Ochrophyta*, son flagelados desnudos que son parte importante de la comunidad fitoplanctónica. Estas microalgas poseen numerosos cloroplastos que están densamente empaquetados debajo de la superficie, situados en la periferia de la célula, y varían en color, de verde a verde amarillento, a marrón dorado (Klöpper et al., 2013).

La floración de este grupo puede afectar a otros organismos marinos, ya sean cultivados o de vida libre; provocando pérdidas económicas considerables en la maricultura, por las mortalidades masivas de peces ocasionadas por esta microalga (Ahumada-Fierro et al., 2021; García-Mendoza et al., 2018).

Existen cinco especies de este género: *C. antiqua*, *C. marina*, *C. minima*, *C. ovata* y *C. subsalsa* (Imai and Yamaguchi, 2012) y se ha reportado que estas especies producen brevetoxina y sus derivados, especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés “ROS”) que incluyen peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxilos, ácidos grasos altamente insaturados, hemaglutininas y hemolisinas (Band-Schmidt et al., 2012).

Se ha reportado el efecto de factores ambientales, tales como la temperatura, intensidad de luz y concentraciones de nutrientes en la formación de florecimientos de microalgas del género *Chattonella*. Estos factores son importantes en el estudio de la dinámica para predecir las floraciones de estas especies, como lo descrito por Shimasaki et al., (2021) que registraron que *C. marina* crece en una amplia gama de condiciones de temperatura (15–30 ° C) y salinidad (10–35), e informan que su tasa de crecimiento se satura a intensidades de luz de 110 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Asimismo, Qiu et al., (2013) demuestran que *C. marina* es capaz de crecer en condiciones ambientales severas, incluida una irradiancia tan alta como $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y que se compara a la irradiancia promedio en el agua de mar superficial, en un día soleado de verano, en zonas costeras.

En los últimos años se han realizado estudios de floraciones algales del género *Chattonella* ocurridas en México. Ahumada-Fierro (2017) reportó que las células de *Chattonella sp.*, aisladas de la bahía de Todos Santos (Baja California, México), producen metabolitos secundarios tóxicos que ocasionan la muerte de diferentes organismos marinos; además, describió que las células de *Chattonella sp.*, son móviles e independientes, con una longitud de 20 a 30 μm de largo, con forma ovoide, alargada o piriforme (figura 4), asimismo, presentan un gran número de cloroplastos con tonalidades amarillo, dorado y verde, y los pigmentos que presentan son clorofila a y c.



Figura 4. Micrografía de la morfología de *Chattonella sp.*, aisladas de la Bahía de Todos Santos fijada con una dilución de una solución amortiguadora de HEPES (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1%. Tomada de Ahumada-Fierro (2017).

Posteriormente, Ahumada-Fierro (2020) describió que, por la afinidad a irradiancias altas de *Chatonella*, su producción de metabolitos tóxicos está relacionado con la regulación de la cantidad de luz que reciben, además reportó la importancia de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Fv/Fm) de tres cepas de *Chatonella* aisladas de la Bahía Todos Santos, ya que estas fueron aclimatadas a dos condiciones contrastantes de luz (luz alta y luz baja) y mediante la detección de la fluorescencia de la clorofila a reportó que el Fv/Fm disminuyó hasta un 80% del valor inicial al exponer a las células a luz saturante (1400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 30 minutos, provocando un efecto de estrés por luz saturante, el cual ocasionó peroxidación lipídica por daño oxidativo.

1.2.5 Género *Heterocapsa*

El segundo grupo de microalgas en importancia como productores primarios después de las diatomeas son los dinoflagelados, y se ha reportado que especies de dinoflagelados que son fotosintéticos y mixotrofos al mismo tiempo (Burkholder et al., 2008). Esta característica los permite adaptarse a una amplia gama de entornos, que se refleja en una enorme diversidad morfológica (Taylor, 1987).

Los dinoflagelados poseen una cubierta externa que consiste en una membrana plasmática (membrana externa), seguida de otra membrana en la placa externa y una vesícula con una sola membrana debajo de la membrana plasmática, que contiene numerosas placas tecales de celulosa, las cuales permiten distinguirlos distintos taxones mediante su morfología (poros, espinas, crestas) y posición; además, estas microalgas pueden entrar en una fase de quiste y forman una pared celular muy resistente constituida por celulosa, mucílago y dinosporina (Domozych, 2019).

Heterocapsa es un género de dinoflagelados cosmopolita, compuesto por especies de tamaño relativamente pequeño (por ejemplo 7.4 μm para *H. minima* y 30 μm para *H. pacifica*) y características morfológicas similares que dificulta su identificación; además se ha documentado que *H. rotundata* y *H. triquetra* son especies formadoras de mareas rojas, mientras que un florecimiento de *H. circularisquama* puede provocar efectos tóxicos en la fauna marina (Iwataki, 2008).

En Japón se reportó una mortalidad masiva en cultivos de bivalvos, ocasionado por la floración de *H. circularisquama*, especie que produce una potente toxina hemolítica dependiente de la luz, denominada *H2-a*, este evento ocasionó pérdidas económicas que ascienden a más de 93 millones de dólares,

afectando de manera considerable en la maricultura (Miyazaki et al., 2005). Esta toxina, derivada de la porfirina, se acumula en la membrana plasmática de la célula y se ha propuesto que actúa mediante un mecanismo que provoca la necrosis (Kim et al., 2008).

En los últimos años se han realizado estudios de floraciones algales del género *Heterocapsa* ocurridas en México. Paredes-Banda (2020) describió a las células de *Heterocapsa sp.*, aisladas de la bahía de Todos Santos (Baja California, México). Estas microalgas son rígidas, tecadas y elipsoides, de forma ligeramente alargada y apenas comprimida dorsoventralmente, además las células miden entre 17,1 μm de largo y 12,7 μm de ancho. Paredes-Banda (2020) también reportó que los principales pigmentos presentes en las células son la peridininina, la dinoxantina y la Chl c2. Adicionalmente, la tasa de crecimiento fue mayor que la de otros dinoflagelados reportados, sugiriendo un alto potencial de formación de floraciones en la región, debido a que aún no se tiene ampliamente documentado cual es el potencial tóxico que pueda generar sus floraciones.

1.2.6 Nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™.

La nanotecnología es una disciplina emergente enfocada en la síntesis, desarrollo y aplicación de nanomateriales, los cuales poseen un tamaño menor a 100 nm en al menos una dimensión, con propiedades fisicoquímicas aprovechables para diversas aplicaciones farmacéuticas, biomédicas o industriales (Ovais et al., 2020).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™ son nanomateriales que han sido empleados en el área biológica en múltiples esfuerzos enfocados en aprovechar las propiedades antibacterianas (Stephano-Hornedo et al., 2020), antiparasitarias (Fuentes-Valencia et al., 2020; Pimentel-Acosta et al., 2019; Valenzuela-Salas et al., 2021), antifúngicas (Guerra et al., 2020), antivirales (Ochoa-Meza et al., 2019), como respuestas a problemáticas de los campos de la agricultura (Andújar et al., 2020; Casillas-Figueroa et al., 2020; Stephano-Hornedo et al., 2020), la ganadería (Perfileva et al., 2019) y aplicaciones de carácter biomédico como son tratamientos antitumorales (Juarez-Moreno et al., 2017; Valenzuela-Salas et al., 2020; Valenzuela-Salas et al., 2021), tecnológicos (Álvarez-Suárez et al., 2020; Kalmantaeva et al., 2014; Popov et al., 2019; Weng et al., 2017), mejora de efectos antimicrobianos, antivirales y en aplicaciones como el tratamiento de úlceras de pie diabético (Almonaci-Hernandez et al., 2020). En muchas ocasiones, con efectos selectivos para tipos particulares de organismos biológicos.

De igual forma, dentro del sector acuícola el uso de AgNPs Argovit™ mostró efectividad como tratamiento del virus de la mancha blanca en camarón (Romo-Quiñonez et al., 2020). Por otro lado, se han realizado estudios en ostras para protegerlas contra el parásito *Perkinsus marinus*, reconocido por la organización mundial para el cuidado de animales como parásito notable, que ataca a varias especies de ostras y se ha demostrado que las AgNPs Argovit™ son altamente letales contra hiposporas de *P. marinus* (Bravo-Guerra et al., 2020), para proteger peces contra ectoparásitos ciliados patógenos (Fuentes-Valencia et al., 2020). Al presentar una baja actividad tóxica este tipo particular de AgNPs sobre peces, camarones y moluscos, y considerando que las microalgas son identificadas como modelos más sensibles a cambios en el medio.

Vazquez-Muñoz et al., (2017) utilizó las AgNPs Argovit™ para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las microalgas *Rhodomonas sp.* El valor reportado fue de 4 µg/mL, proporcionando un panorama del valor de las concentraciones de AgNPs que pueden afectar a microalgas. Sin embargo, cabe destacar que ninguna otra respuesta biológica adicional, fue evaluada. Por estas razones, se perfila el uso de estas AgNPs para evaluar el efecto biológico que provoca su exposición en dos diferentes especies de microalgas marinas: *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.*

1.2.7 Internalización de nanopartículas en microalgas

Se han realizado diversos trabajos sobre la ruta de internalización de nanopartículas metálicas en distintas especies de microalgas (Mahana et al., 2021; Wang et al., 2019; Sendra et al., 2018; Yue et al., 2017). Sin embargo, el mecanismo de captación/absorción intracelular aún no se encuentra completamente documentado. Aun así, se han propuesto mecanismos de internalización de nanopartículas en microalgas, de manera activa y pasiva, pero estos mecanismos son teóricos y no están probados completamente en todas las especies de microalgas (Nguyen et al., 2020).

El primer sitio de interacción de las nanopartículas en las células de las algas es la cubierta extracelular (Mahana et al., 2021). Posteriormente, la superficie de las microalgas tiene un papel fundamental ya que actúa como barrera de protección contra la entrada de nanopartículas dentro de las células, pero se ha observado que, en la pared celular, la limitación más importante es el tamaño de los poros (Yue et al., 2017).

Estudios recientes muestran que algunas especies de microalgas excretan sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Estas sustancias pueden dividirse en SPE disueltas, que permanecen en el medio circundante, y los SPE ligados, que permanecen en la superficie de las células. Además, estas sustancias están compuestas principalmente de exopolisacáridos, proteínas, glicolípidos, sustancias húmicas y ácidos nucleicos (L. Xu et al., 2021). Asimismo, en la pared celular de las microalgas se ha encontrado que los polisacáridos y las proteínas aportan grupos funcionales cargados negativamente como hidroxilos, carboxilos, sulfhidrilos, aminas, amidas, imidazoles, etc (Mahana et al., 2021). Conjuntamente, se ha descrito que las sustancias poliméricas extracelulares funcionan como autodefensa de forma extracelular contra iones y nanopartículas metálicas, mediante el intercambio de iones (L. Xu et al., 2021).

Las nanopartículas pueden internalizarse en la célula, a través de procesos endocíticos, por medio de los canales iónicos o incluso las nanopartículas pueden utilizar las proteínas transportadoras presentes en la célula, como vía de entrada (Mahana et al., 2021; Nguyen et al., 2020). Al mismo tiempo, las nanopartículas son capaces de transitar por los poros de la pared celular y alcanzar la membrana plasmática y otros organelos de la célula, tales como los cloroplastos, mitocondria, núcleo, etc., y provocar daños en las estructuras (figura 5) (Wang et al., 2019). Adicionalmente, se ha descrito otros mecanismos de internalización de las nanopartículas, el primero mediante la interacción física con la pared celular, que provoca la creación de nuevos poros de diferentes tamaños, y el segundo mediante la reproducción celular, que debido a este proceso, se altera la permeabilidad de la pared celular, que facilita y aumenta la eficiencia en la internalización de las nanopartículas (Romero et al., 2021).

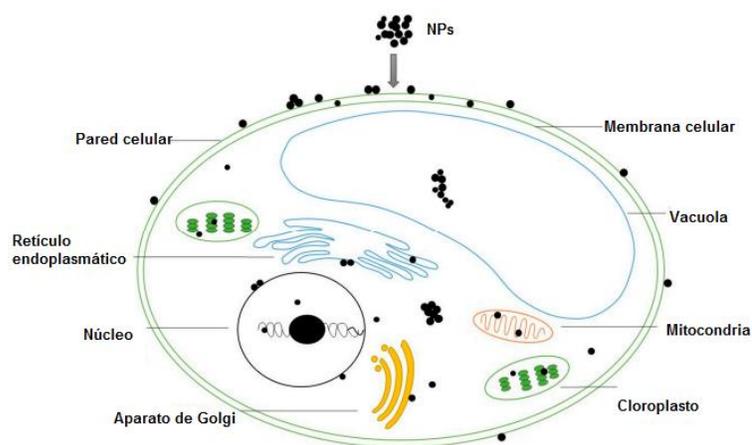


Figura 5. Ilustración esquemática de la internalización de nanopartículas metálicas (NPs) dentro de la célula de una microalga. Tomado y modificado de Wang et al., (2019).

1.2.8 Toxicidad de nanopartículas en microalgas

Se han realizado numerosos estudios para investigar los efectos tóxicos de las nanopartículas metálicas, debido a que es un reto identificar cuáles de las propiedades de las nanopartículas pueden provocar toxicidad en las algas, ya que las propiedades inherentes a las nanopartículas, como el tamaño, recubrimiento, el estado de agregación/dispersión, la capacidad de liberación de iones, la concentración, la química de la superficie y las propiedades fotoquímicas, modifican considerablemente la actividad de las nanopartículas, por lo tanto, estas propiedades, son capaces de provocar toxicidad en las microalgas debido a su exposición (Nguyen et al., 2020). Por lo tanto, se vuelve necesario el conocer las vías de internalización y mecanismos de defensa de las microalgas (L. Xu et al., 2021).

La pared celular de las microalgas es la primera estructura importante que interacciona con las nanopartículas, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, estas pueden provocar un daño físico en la pared o membrana celular, modificando o aumentando la permeabilidad de la membrana (Sendra et al., 2018). Además las nanopartículas pueden interactuar y liberar especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) afectando la integridad de la membrana e incluso, estimular la acumulación excesiva de ROS intracelulares, causando estrés oxidativo en las células (figura 6) (Nguyen et al., 2020).

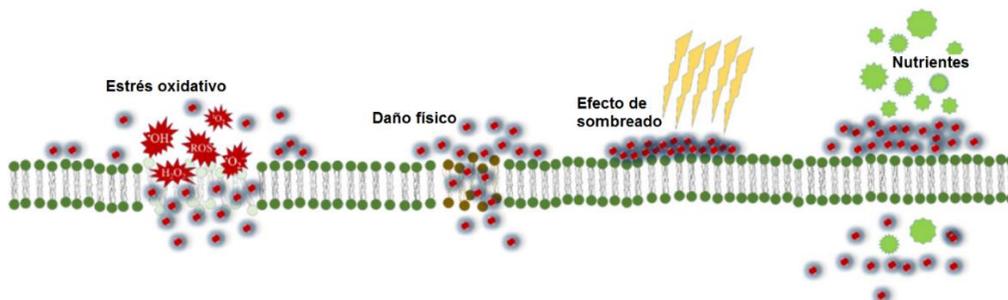


Figura 6. Ilustración esquemática de los efectos tóxicos propuestos de nanopartículas metálicas (NPs) para las membranas celulares de las microalgas. Tomado y modificado de Nguyen et al., (2020).

Se ha reportado que alteraciones en la morfología de las células, son consecuencia de la modificación de la composición de la pared celular, por la interacción de las nanopartículas, provocando una alteración en la superficie de la célula, lo que ocasiona su contracción o deformidad (Mahana et al., 2021).

De la misma forma, las nanopartículas pueden aglomerarse y limitar la capacidad de absorción de las células de los nutrientes presentes en el medio, o incluso provocar un efecto de sombreado, restringiendo el paso de la luz necesaria para la fotosíntesis e inhibir el crecimiento de las microalgas (Wang et al., 2019); además de ocasionar la reducción del contenido pigmentario, impedir la síntesis o degradarlos (Mahana et al., 2021; Yue et al., 2017).

Estudios recientes muestran que debido a la exposición al nanopartículas, existe una disminución del contenido de clorofila *a* y *b* y en consecuencia, el fotosistema II (FSII) también se ve afectado (Yue et al., 2017); esta disminución del contenido de clorofila es probablemente debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en los cloroplastos y esto conduce a un cambio en la proteína del pigmento (Li et al., 2015; Nguyen et al., 2020).

Esto implica que, con la disminución de la clorofila inducida por las nanopartículas, el metabolismo y la transferencia de energía de las reacciones fotoquímicas se ven obstaculizados, lo que conduce a una reducción de la capacidad fotosintética (figura 7) (Nguyen et al., 2020). Por lo tanto, la cantidad de células en la población crece lentamente y la densidad celular también disminuye; ya que el contenido de clorofila depende de las especies de algas e irremediablemente se verá afectado de forma específica por los parámetros de las nanopartículas como el tipo, dosis, forma y concentraciones (Mahana et al., 2021).

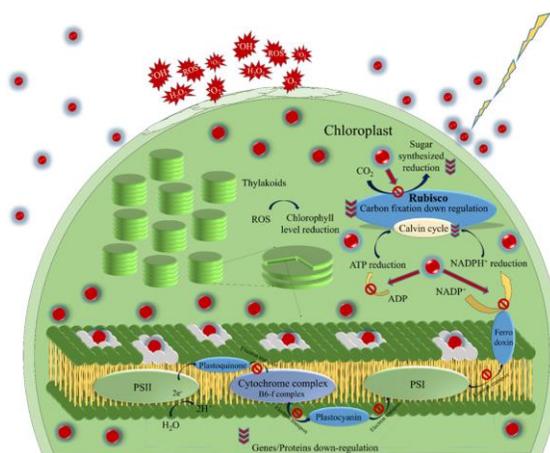


Figura 7. Ilustración esquemática de los daños en los cloroplastos de las microalgas, ocasionados por la exposición de nanopartículas metálicas (NPs). Tomado de Nguyen et al., (2020).

Nguyen et al., (2020) explican que durante la síntesis fotoquímica, si existe una disminución de la conversión de energía luminosa, existirá una reducción de la tasa de transferencia de electrones, por lo

tanto, también existe una reducción de la tasa de síntesis de los compuestos portadores de energía (como el adenosín trifosfato (ATP por sus siglas en inglés) y en consecuencia, el proceso de fijación del carbono, en el cual interviene la enzima llamada ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo por sus siglas en inglés), o la actividad de las enzimas de la anhidrasa carbónica, también serán limitados por la falta de energía, lo que conduce a la inhibición del ciclo de Calvin (figura 7). Todos estos cambios limitan el crecimiento o la división celular.

1.3 Justificación

En la última década, múltiples trabajos dedicados a estudiar el efecto biológico de AgNPs en organismos vivos han sido reportados y en varios se reporta un efecto biocida. Se han identificado trabajos que estudian los efectos sinérgicos de algunos tipos de AgNPs contra microalgas debido a la sensibilidad relativa que poseen las microalgas frente a factores externos bióticos, abióticos y contaminantes que influyan o afecten en su crecimiento (Chen et al., 2019; Mahana et al., 2021). En este sentido, las AgNPs Argovit™ son un tipo de AgNPs cuya aplicación se ha estudiado como potencial biocida para la disminución, inhibición o erradicación de bacterias, hongos y virus, con resultados favorables en diferentes modelos de estudio (Stephano-Hornedo *et al.*, 2020; Guerra et al., 2020; Ochoa-Meza et al., 2019). Sin embargo, la actividad biológica y efecto de las AgNPs Argovit™ frente a fitoplancton marino tóxico no ha sido entendido completamente.

La Bahía de Todos Santos (TSB), ubicada en el noroeste de la Península de Baja California, México, es considerada como una importante zona de cultivo de mariscos y piscicultura en México. Pero en los últimos años, se han reportado diferentes floraciones algales nocivas, y su presencia ha impactado directamente, por ejemplo, provocando mortalidades masivas de atunes criados en jaulas, que fue causado por especies rafitófitas del género *Chattonella* (García-Mendoza et al., 2018), así como la acumulación de toxinas asociadas a otra especie de dinoflagelados en mejillones cultivados (Paredes-Banda et al., 2018) y adicionalmente de que se ha reportado la presencia de *Heterocapsa sp.* su potencial tóxico aún es desconocido (Paredes-Banda, 2020).

Debido a todo lo anterior, se propone realizar el primer acercamiento de la identificación de las interacciones fisiológicas y efectos provocados por la exposición de dos diferentes formulaciones de AgNPs Argovit™ frente a dos especímenes fotosintéticos tóxicos pertenecientes a dos géneros de microalgas

marinas aisladas de la Bahía de Todos Santos, en Baja California, México; con la intención de observar la respuesta biológica específica de cada género de microalgas identificando el potencial efecto antiproliferativo causado por el uso de AgNPs Argovit™.

1.4 Hipótesis

Las propiedades fisicoquímicas de dos formulaciones diferentes de AgNPs Argovit™ ocasionarán un efecto de estrés por exposición y daño en los fotosistemas de las microalgas marinas *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.*, debido a las diferencias en las características que presentan estos géneros de microalgas y a las características de cada una de las formulaciones de AgNPs Argovit™.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta fisiológica a la exposición de las microalgas marinas *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.* frente a dos formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™.

1.5.2. Objetivos específicos

- Evaluar los cambios inducidos en el fotosistema II de *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.*, debido a su interacción con las formulaciones de AgNPs Argovit™.
- Describir los cambios morfológicos ocasionados en *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.* por el efecto de distintas concentraciones y tiempo de exposición de cada una de las formulaciones AgNPs Argovit™.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Caracterización de las AgNPs

Las formulaciones de AgNPs Argovit™ utilizadas en este trabajo fueron amablemente donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM), en colaboración con el Dr. Vasily Burmistrov del Centro de Investigación y desarrollo Vector-Vita LLC (Rusia).

Los datos de caracterización de las nanopartículas utilizadas fueron obtenidos por medio de un microscopio electrónico de transmisión TEM (JEOL 2010), para obtener la morfología, tamaño y distribución de las AgNPs. Las NPs fueron analizadas colocando una pequeña muestra de las AgNPs en rejillas recubiertas de carbono.

La caracterización de la distribución de tamaños se realizó midiendo 150 NPs de la muestra evaluada por medio del software libre ImageJ, a partir de microfotografías obtenidas por el TEM.

El perfil de absorbancia de las NPs fue obtenido por medio de un análisis UV-Vis (Jenway 6405). Así mismo, se realizó la medición del pasmón de resonancia principal y potencial zeta mediante análisis DLS (Malvern Instruments Zetasizer Nano NS modelo DTS 1060, $\lambda = 532$ nm).

2.2 Microalgas de estudio

2.2.1 Obtención de las cepas

Se trabajó con dos diferentes especies de microalgas aisladas de diferentes puntos de la Bahía de Todos Santos y Salsipuedes. La cepa llamada CBTSB de *Chattonella sp.*, fue aislada de la Bahía de Todos Santos, Baja California en 2016 y descrita por Ahumada-Fierro, (2017, 2020). La cepa llamada G8 de *Heterocapsa calafianiensis sp.nov* fue aislada en la Bahía Salsipuedes en 2016 y descrita por (Paredes-Banda, 2020)

Las cepas fueron donadas para este trabajo por los autores anteriormente mencionados y forman parte de la colección de microalgas del laboratorio Biología Algal (BA) del Posgrado de Ecología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

2.2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos de las dos cepas mencionadas en la sección anterior 2.2.1, fueron aclimatados gradualmente y cultivados en medio enriquecido y agua de mar proveniente de la Bahía de Todos Santos, filtrada y esterilizada a 121 °C y 1.05 kg cm⁻³ durante 20 minutos en autoclave. Los cultivos permanecieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 17.5 ± 1 °C; permaneciendo en un ciclo de luz y oscuridad (12:12 horas) e iluminación suministrada por lámparas fluorescentes de luz blanca, a una irradiancia de 150 quanta m⁻²s⁻¹.

2.3 Metodología para efecto de la exposición de dos formulaciones de AgNPs Argovit™ en microalgas marinas.

2.3.1 Preparación de los tratamientos de AgNPs Argovit™.

Se prepararon 5 mL de tres soluciones de trabajo a una concentración de 20,000 μM, 2,000 μM y 200 μM con respecto al contenido de plata metálica (Ag) de la solución principal de AgNPs (12 mg/mL = 0.11 M) de dos formulaciones de AgNPs (se nombraron a las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10). Las soluciones de trabajo se prepararon con medio enriquecido L1 y se mantuvieron en oscuridad y en refrigeración, hasta su uso.

Posteriormente, utilizando el medio enriquecido L1, se prepararon soluciones de trabajo para los dos controles de referencia, uno de nitrato de plata (AgNO₃, Sigma-Aldrich) con una concentración a 2,000 μM, usado como control positivo, ya que esta solución provocaría un daño fisiológico a las microalgas. Como control negativo se preparó una disolución de Polivinilpirrolidona (PVP) a la misma concentración

de 2,000 μM . Esta solución se incluyó en la evaluación porque es el agente estabilizador utilizado como recubrimiento en ambas formulaciones de las AgNPs usadas.

Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes hasta alcanzar a las concentraciones 200, 100, 20, 10, 2 y 0.2 μM de las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10 Argovit™.

Este intervalo de concentraciones utilizadas en este trabajo se estimó con base en el estudio realizado por He *et al.*, (2012), quienes realizaron estudios en la microalga *Chattonella marina* sobre el efecto de toxicidad utilizando las mismas concentraciones de AgNPs, que fueron sintetizadas y estabilizadas con citrato.

2.3.2 Metodología para cambios en la morfología celular por exposición a AgNPs Argovit™.

Para evaluar el efecto de la exposición a las formulaciones AgNPs 7 y AgNPs 10 en las microalgas, se utilizaron 10 mL de cultivo en fase exponencial de las microalgas aisladas, en las siguientes densidades celulares:

- *Chattonella sp.*: 3×10^3 Cel/mL.
- *Heterocapsa sp.*: 10×10^3 Cel/mL.

Por cada concentración, control positivo, control negativo, se inoculó el cultivo por triplicado en tubos de vidrio de 15 mL. Se añadió un triplicado extra, denominado control sin tratamiento (estos tubos solamente contenían cultivo a la densidad celular marcada y medio enriquecido L1). Una vez inoculados los cultivos, se agregó suficiente solución de trabajo para alcanzar las concentraciones 200, 100, 20, 10, 2 y 0.2 μM de plata metálica (figura 8).

Utilizando una pipeta se homogeneizó suavemente el contenido de cada tubo y se colocaron en incubación por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se observó la apariencia de la morfología de las células después de la exposición y se realizó un registro fotográfico utilizando un microscopio de luz invertido LEICA DM13000B 10x (Leica Microsystems, Alemania).

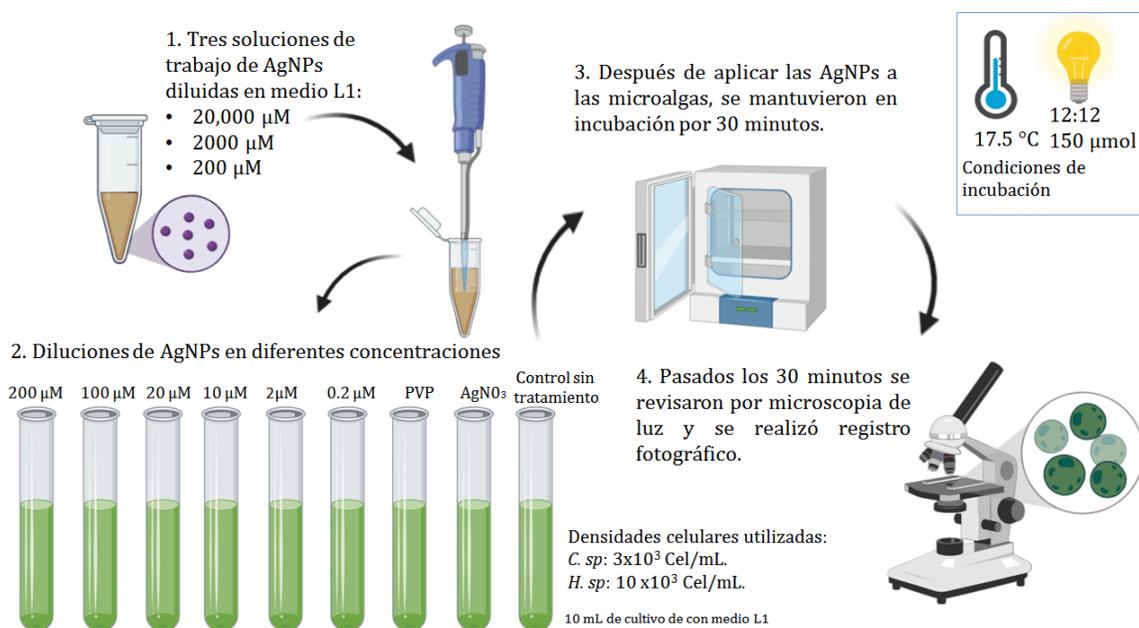


Figura 8. Protocolo para la elaboración de soluciones de trabajo y concentraciones de AgNPs, además de las condiciones de cultivo y tiempo de incubación de cada tratamiento realizado para la evaluación de los cambios morfológicos por la exposición de las AgNPs.

2.3.3 Metodología para cambios en actividad fotosintética por la exposición a AgNPs Argovit™

Para la estimación de la máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II (F_v/F_m) se utilizó un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Alemania). El fluorómetro cuenta con una fuente de luz de excitación con una emisión a 428 nm (LED azul) que mide y almacena los valores de la fluorescencia emitida únicamente por la clorofila del fotosistema II. Dicha estimación de fluorescencia máxima se obtiene a partir de la ecuación: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, siendo F_v la diferencia entre el máximo de fluorescencia (F_m) y la intensidad de fluorescencia del estado inicial (F_0).

Para cada evaluación, se utilizaron las concentraciones de AgNPs y densidades celulares de microalgas descritas en el apartado 2.3.2.

Para el protocolo se inocularon 10 mL de cultivo por triplicado en tubos de vidrio de 15 mL. Se añadió un triplicado extra, denominado control sin tratamiento (estos tubos solamente contenían cultivo a la densidad celular marcada y medio enriquecido L1).

Se establecieron dos tiempos de exposición a las formulaciones de AgNPs: 30 y 60 minutos. La medición de este tiempo inició después de inocular las diferentes concentraciones de AgNPs, PVP y AgNO_3 añadidas a las microalgas.

Después de inocular las diferentes concentraciones de AgNPs en los cultivos de microalgas (figura 9), estos fueron colocados en la incubadora en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas en el apartado 2.2.2. Al terminar los 30 minutos, los cultivos fueron retirados de la incubadora y se mantuvieron en una hielera, para adaptarse a la oscuridad por 15 minutos y después, se tomaron alícuotas de 3 mL de cada tubo y se colocó el contenido en celdas de plástico para leer en el espectrofotómetro. Como primer paso, la fluorescencia del estado inicial (F_0) se midió exponiendo en oscuridad las muestras a la luz de medición, y el máximo de fluorescencia (F_m) se midió al dar un pulso de luz saturante ($3,000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con una duración de 0.8 segundos. En seguida de tomar la muestra en las celdas, los tubos fueron devueltos a la incubadora por 30 minutos más (obteniendo así un total de 60 minutos de incubación), por último, se procedió a repetir el primer paso para obtener la lectura final transcurridos los 30 minutos.

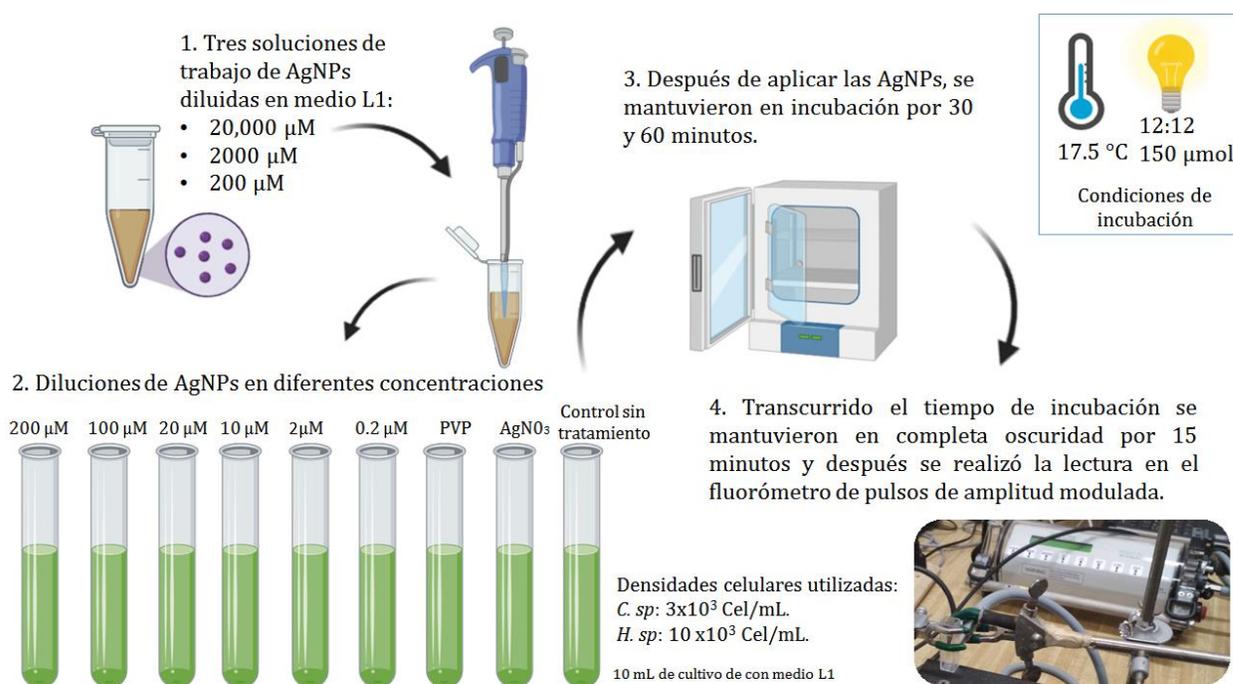


Figura 9. Protocolo para la elaboración de soluciones de trabajo y concentraciones de AgNPs, además de las condiciones de cultivo y tiempo de incubación de cada tratamiento realizado para la evaluación de los cambios en la actividad fotosintética por la exposición a AgNPs

2.4 Análisis estadístico

La significancia estadística de la cuantificación de la estimación máxima del PSII fue analizado mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías ($p < 0.05$) seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Todos los datos fueron analizados usando Graphpad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de las AgNPs Argovit™

La a caracterización provista por el Dr. Vasily Burmistrov indica que las formulaciones etiquetadas como AgNP 7 y AgNP 10 consisten en NPs con 1.2% (peso/peso) de plata metálica estabilizada con 18.8% (peso/peso) del polímero polivinilpirrolidona (PVP) suspendida en un medio acuoso (80% peso/peso).

La caracterización morfológica de la AgNP 7 se reporta a continuación. La figura 10 muestra el histograma de distribución de frecuencia de tamaños de AgNP 7, donde se observa una distribución de 5-70 nm con un tamaño promedio de 30.1 ± 9.6 nm. Las morfologías identificadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) son esferoides, casi- esferoidal y triangular. La figura 11 muestra el espectro de absorbancia de la AgNP 7 en diferentes concentraciones. Esta formulación presenta 3 picos de absorción a 407, 439 y 528 nm, siendo el pico a 439 el pico máximo de absorbancia en una concentración de 12 mg/mL. Los diferentes máximos de absorción identificados en la figura 11 corresponden a las diferentes geometrías de las NP observadas en la imagen de TEM (Sánchez-Navarro et al., 2018). La carga superficial de AgNP 7 (potencial ζ) presenta un valor de -15 mV (tabla 1). Estas mediciones experimentales fueron tomadas con apoyo del Dr. Juan Carlos García Ramos, miembro activo del grupo de investigación de la *Red Internacional de Bionanotecnología*.

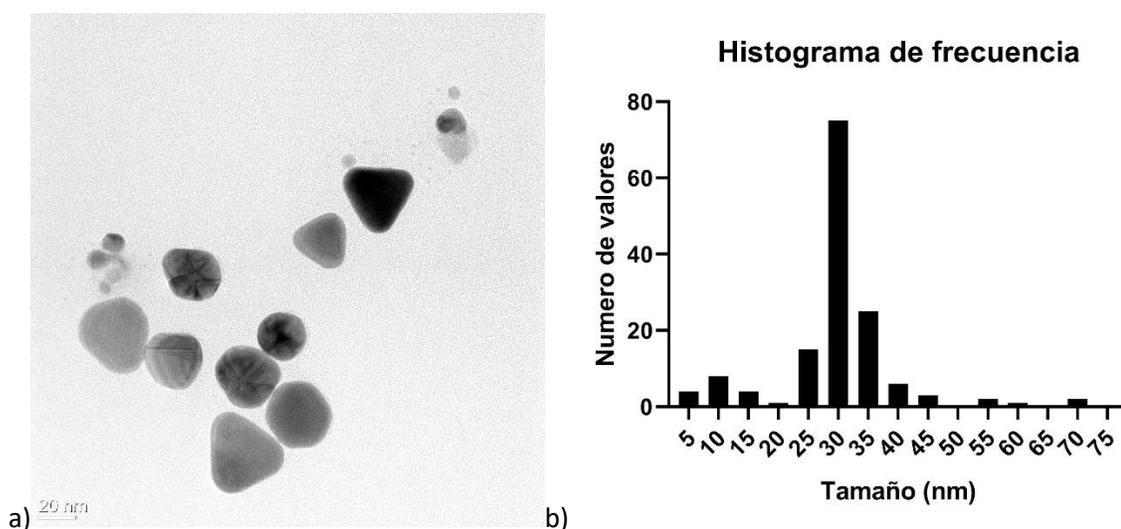


Figura 10. a) Micrografía por microscopía electrónica. b) Histograma de frecuencia de la AgNP 7.

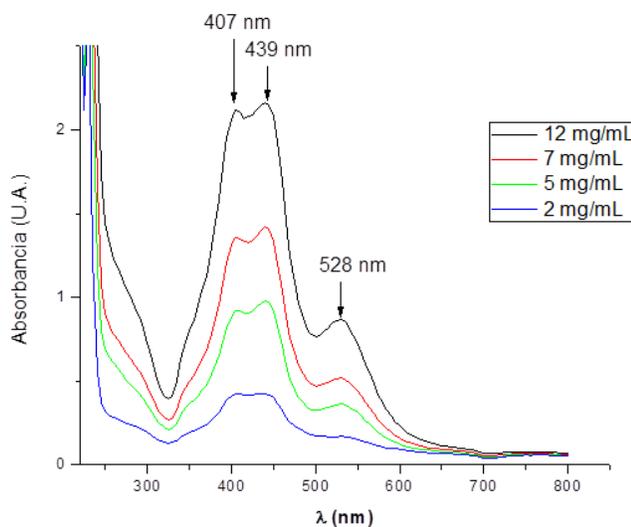


Figura 11. Espectro de absorbancia de formulación AgNP 7.

Las características morfológicas de la formulación AgNP 10 presenta formas esféricas y pentagonales de acuerdo con la imagen de TEM mostrada en la figura 12. El histograma de la figura 12 muestra una distribución de tamaños entre 22-50 nm y un tamaño promedio de 33.38 ± 5.66 nm. El plasmón de resonancia presenta dos máximos, uno a 260 nm y el otro a 410 nm, siendo el segundo el de mayor absorbancia (figura 13). El potencial ζ de esta formulación presenta un valor de -2.3 ± 4.7 mV (tabla 1). La formulación AgNP 10 son nanopartículas de plata recubiertas de proteína hidrolizada sintetizada como se describe en la patente rusa RU2646105C1. La caracterización completa de esta formulación se encuentra publicada por Valenzuela-Salas et al., (2021).

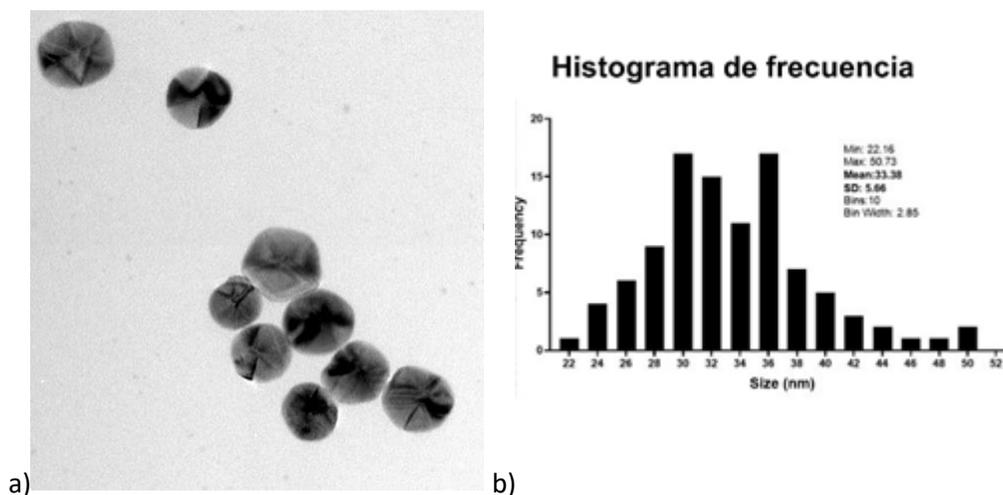


Figura 12. a) Micrografía por microscopía electrónica. b) Histograma de frecuencia de la AgNP 10.

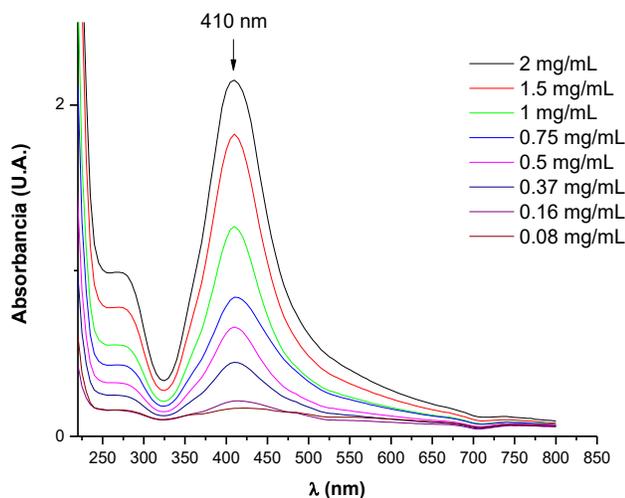


Figura 13. Espectro de absorción de formulación AgNP 10.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de ambas formulaciones de AgNPs Argovit™.

Características fisicoquímicas de las AgNPs		
Propiedades	AgNP 7	AgNP10
Concentración en AgNPs	200 mg/mL	200 mg/mL
Contenido de plata metálica	12 mg/mL	12 mg/mL
Contenido del recubrimiento	188 mg/mL	188 mg/mL
Tipo de recubrimiento	Polímero polivinilpirrolidona (PVP)	Proteína hidrolizada sintetizada
Promedio de tamaño	30.1 ± 9.6	33.38 ± 5.66
Distribución de tamaño (nm)	5-70	22-50
Morfología	Esferoidal/ triangular	Esferoidal/pentagonal
Resonancia de plasmón superficial (λ nm)	439	409
Potencial Z	-15 mV	-2.3 ± 4.7

3.2 Efecto de la exposición de dos formulaciones de AgNPs Argovit™ en microalgas marinas.

3.2.1. Cambios en la morfología celular por exposición a AgNPs Argovit™.

Se evaluó el efecto de la exposición de las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10 con respecto a la morfología de las microalgas *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.* después de 30 minutos de incubación, se observó un

cambio en la morfología celular, relacionada con el tipo de formulación y las diferentes dosis utilizadas de AgNPS (0.2-200 μM).

Las micrografías de las células de *Chattonella sp.* (figura 14) expuestas a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7 revelaron un cambio en la morfología celular asociado al estrés inducido por la formulación AgNP 7. Las células se deforman de una forma ovoide (figura 14A) a una circular (figura 14C-I). A partir de la concentración de 10 μM (figura 14D flecha negra) se comienza a observar un daño en la membrana celular. En la concentración 20 μM (figura 14E flecha amarilla) los plastos comienzan a ser expulsados al medio de cultivo induciendo posiblemente la muerte celular.

En concentraciones de 100 μM y 200 μM (figuras 14F y 14G flecha naranja) es aún más notorio la expulsión de plastos, lisis y muerte celular. En el control de PVP (figura 14H) se observan células sin daño, tales como las observadas en el control sin AgNP 7 (figura 14A). Por último, en el control con AgNO_3 (200 μM) (figura 14I) se observó un daño muy notorio y deformidad en la membrana celular, y aunque algunas células mostraban expulsión de plastos, el daño no se apreciaba tan severo como en la concentración de 200 μM .

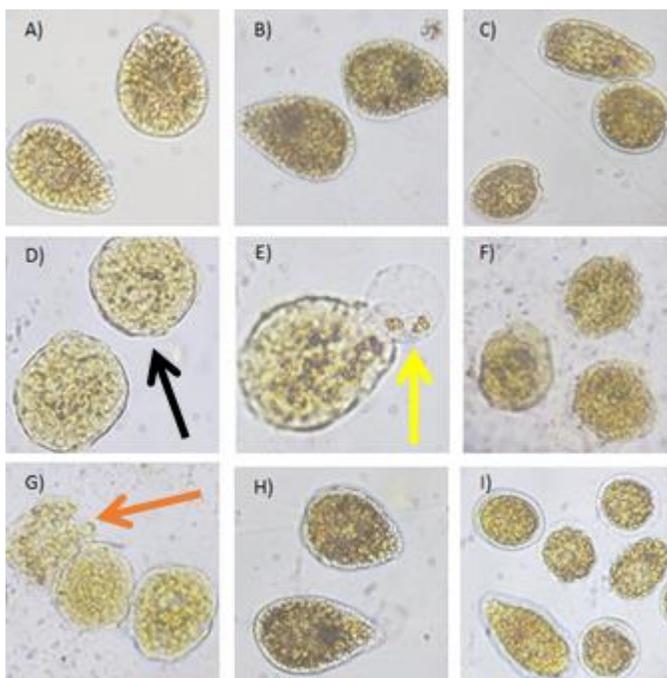


Figura 14. Micrografías de *Chattonella sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7, PVP (200 μM) y AgNO_3 (200 μM). (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μM AgNPs; (C) 2.0 μM AgNPs; (D) 10 μM AgNPs; (E) 20 μM AgNPs; (F) 100 μM AgNPs; (G) 200 μM AgNPs; (H) 200 μM PVP; (I) 200 μM de AgNO_3 . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.

Los resultados de las micrografías de las células de *Chattonella sp.* (figura 15) expuestas a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 10 revelaron que no hay cambios significativos en la morfología comparados con el grupo control. Se puede observar que las células se mantienen intactas sin efecto negativos evidentes sobre ellas, desde la concentración 0.2 a 100 μM (figura 15A-F, flecha negra). En la concentración 100 y 200 μM (figura 15F-G, flecha amarilla) se comienza a observar un ligero daño en la membrana celular. Lo anterior sugiere un menor estrés inducido por AgNP 10 comparado con el observado con las mismas concentraciones de AgNP 7 (Figuras 14B-G). Las microalgas expuestas a PVP (figura 15H) no presentan daño al compararlas con el control sin AgNPs (figura 15A). Por último, en el control con AgNO_3 (figura 15I, flecha naranja) se observó un daño en membrana celular y posible expulsión de plastos.

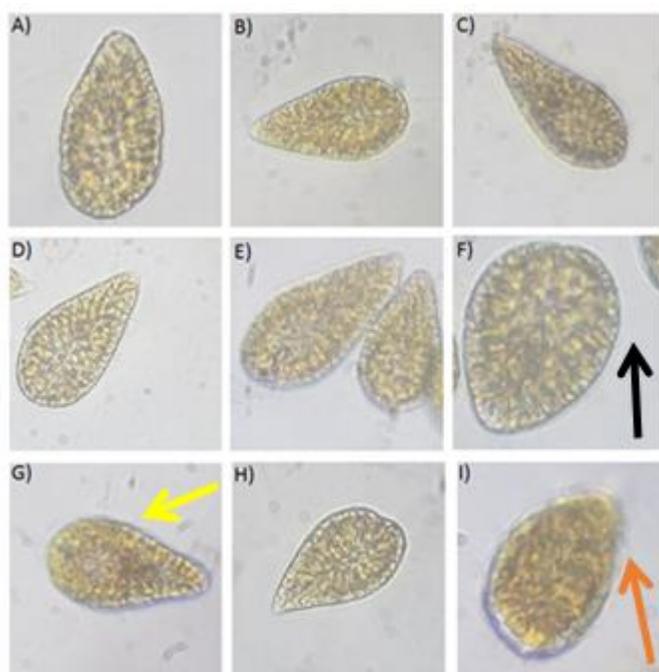


Figura 15. Micrografías de *Chattonella sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 10, al PVP 200 μM y AgNO_3 200 μM . (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μM AgNPs; (C) 2.0 μM AgNPs; (D) 10 μM AgNPs; (E) 20 μM AgNPs; (F) 100 μM AgNPs; (G) 200 μM AgNPs; (H) 200 μM PVP; (I) 200 μM de AgNO_3 . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.

Los efectos generales observados por la exposición de *Heterocapsa sp.* a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7 se muestran en las micrografías de la Figura 16. Las imágenes muestran deformidades en la estructura celular debido, muy probablemente, al estrés inducido. Se puede observar que las células se mantienen sin efecto negativo evidente al ser expuestas a la concentración de 0.2 μM (figura 16B). A

partir de la concentración 2 a 20 μM de AgNP 7 (figura 16C-E, flecha negra) se comienza a identificar un ligero daño en membrana celular y desprendimiento de materia orgánica en el medio de cultivo. En las concentraciones de 100 y 200 μM se aprecian aglomerados de AgNPs y AgNPs-materia orgánica además de deformidad en la célula (figura 16F-G, flecha amarilla). En el control de PVP (figura 16H) se observan células sin daño, comparadas con el control sin AgNPs (figura 16A). Por último, en el control con AgNO_3 (figura 16I, flecha naranja) se observó un daño en membrana celular. Sin embargo, el daño producido por los iones es mucho menor o menos evidente que el observado con la formulación AgNP 7.

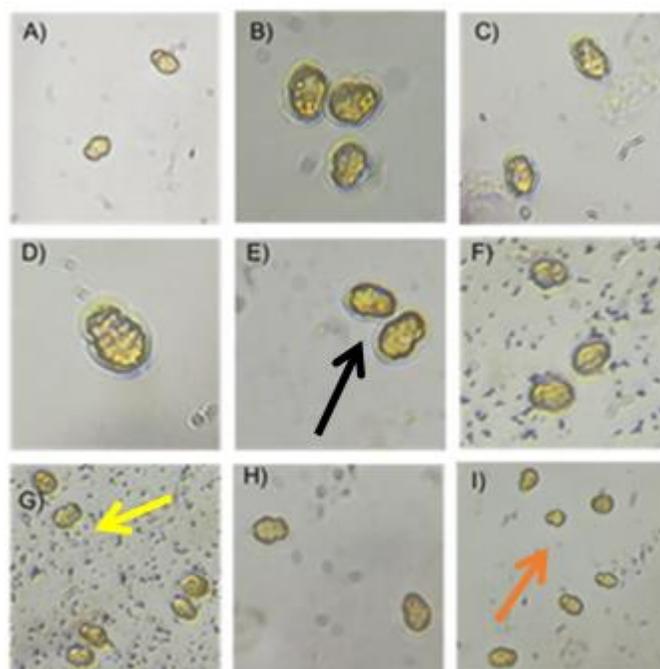


Figura 16. Micrografías de *Heterocapsa sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7, PVP 200 μM y AgNO_3 200 μM . (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μM AgNPs; (C) 2.0 μM AgNPs; (D) 10 μM AgNPs; (E) 20 μM AgNPs; (F) 100 μM AgNPs; (G) 200 μM AgNPs; (H) 200 μM PVP; (I) 200 μM de AgNO_3 . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.

Finalmente, la evaluación del efecto de exposición a la formulación AgNP 10 en células de *Heterocapsa sp* se muestra en la figura 17. En las micrografías de la figura 17 se observan ligeras deformidades en la estructura celular, muy probablemente por el estrés inducido por AgNP 10. Se puede observar que las células se mantienen intactas sin efecto negativo sobre ellas con la concentración 0.2 μM (figura 17B). A partir de la concentración 2 μM (figura 17C, flecha negra) se comienza a observar un ligero daño en membrana celular y desprendimiento de materia orgánica en el medio de cultivo. En las concentraciones

de 100 y 200 μM no se aprecian los aglomerados de AgNPs y AgNPs-materia orgánica observados con la exposición a AgNP 7, pero si se observa deformidad en la célula (figura 17E-G, flecha amarilla). En el control de PVP (figura 17H) se observan células sin daño. Por último, en el control con AgNO_3 (figura 17I, flecha naranja) se observó un daño en membrana celular, pero menor al observado que cuando las células son expuestas a AgNPs.

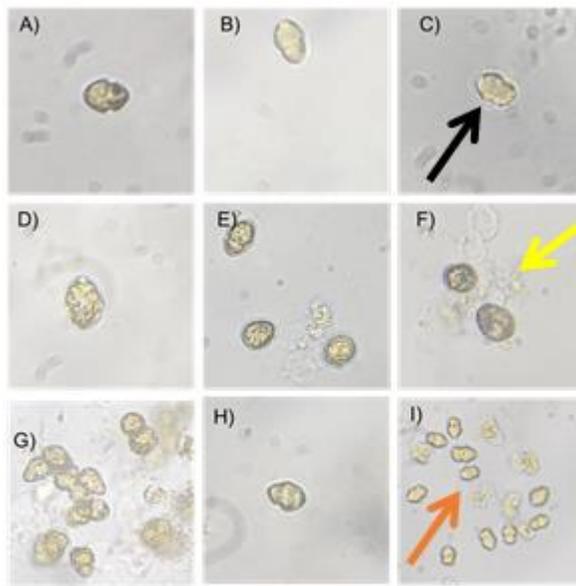


Figura 17. Micrografías de *Heterocapsa sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 10, PVP 200 μM y AgNO_3 200 μM . (A) Control (cultivo sin AgNPs); (B) 0.2 μM AgNPs; (C) 2.0 μM AgNPs; (D) 10 μM AgNPs; (E) 20 μM AgNPs; (F) 100 μM AgNPs; (G) 200 μM AgNPs; (H) 200 μM PVP; (I) 200 μM de AgNO_3 . Condición experimental: 30 minutos de exposición a los agentes estudiados. Objetivo 40X.

3.3. Cambios en la actividad fotosintética por la exposición a AgNPs Argovit™

Se evaluó el cambio de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) durante la exposición por 30 y 60 minutos de diferentes concentraciones de las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10. Se cuantificó la variación de la emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II como respuesta a la exposición a las dos formulaciones de AgNPs. La cuantificación de fluorescencia del fotosistema II sirve como un indicador de estrés en el estado fisiológico de *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.* inducido por los agentes evaluados.

3.3.1 Efecto de AgNP 7 sobre *Chattonella sp.*

La Figura 18 muestra la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) en *Chattonella sp.* que fueron expuestas a la formulación AgNP 7 durante 30 y 60 minutos. La eficiencia cuántica no presenta una dependencia con el tiempo de exposición en los tiempos evaluados. La exposición a concentraciones 0.2 y 2 μM de la formulación AgNP 7 no presenta cambios en la eficiencia cuántica del fotosistema II comparado con el control. En la figura 18 se identifica una disminución drástica con una diferencia máxima mayor a 0.4 unidades del F_v/F_m a partir de la concentración de 10 μM . Concentraciones de 20, 100 y 200 μM producen una mayor disminución en la eficiencia cuántica, asociado a un daño más severo en las microalgas, consistente con los daños estructurales observados en las micrografías de la figura 14. El análisis ANOVA de 2 vías indica que existe una diferencia estadísticamente significativa para concentraciones igual o mayor a 10 μM para ambos tiempos respecto al control. El PVP no produce cambios estadísticamente significativos en la eficiencia del fotosistema II comparados con el control. Por el contrario, el nitrato de plata muestra una afectación estadísticamente significativa en la eficiencia cuántica del fotosistema que depende del tiempo de exposición; a mayor tiempo de exposición, mayor afectación del fotosistema II.

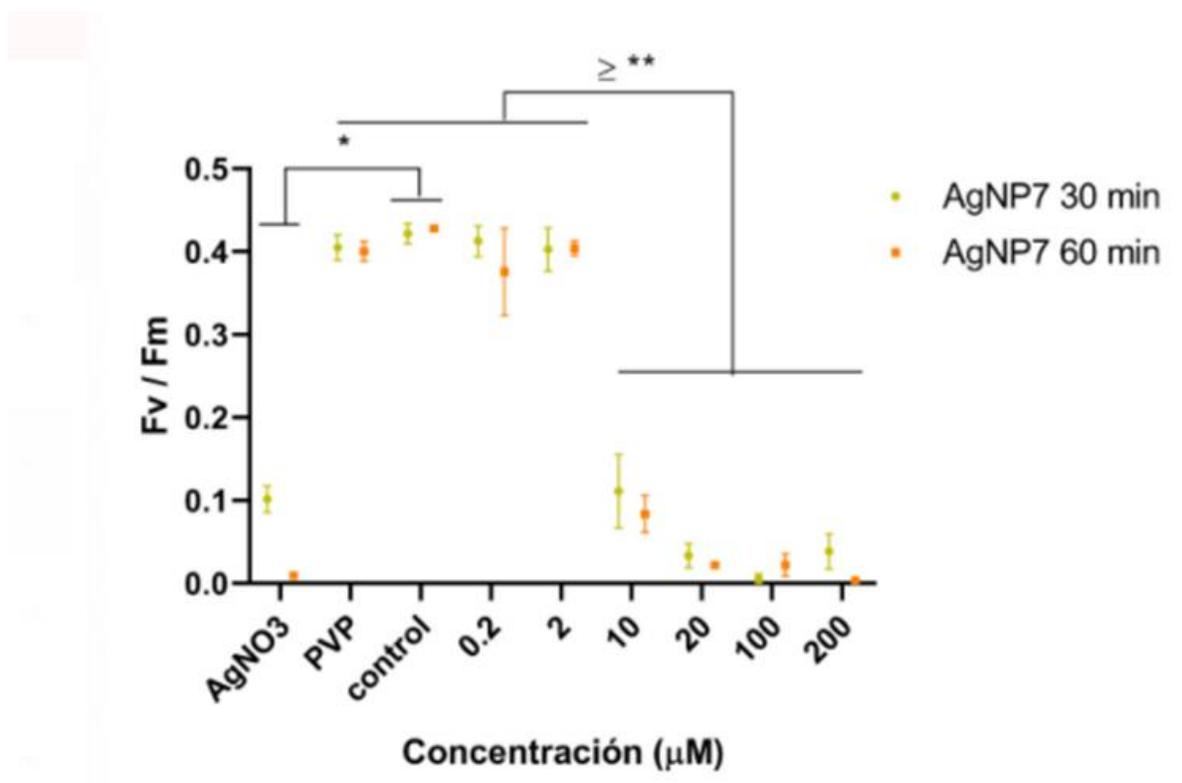


Figura 18. Cambio en la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) de *Chattonella sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7, PVP (200 μM) y AgNO₃ (200 μM) por 30 (verde) y 60 minutos (rojo). Cada punto representa el cambio relativo del valor del F_v/F_m detectado antes de la exposición a las AgNPs. Los valores graficados son el promedio de tres repeticiones.

3.3.2 Efecto de AgNP 10 sobre *Chattonella sp.*

La figura 19 muestra la eficiencia cuántica efectiva del FSII en *Chattonella sp.* expuestas por 30 y 60 minutos a la formulación AgNP 10. A diferencia de la formulación AgNP 7, la formulación AgNP 10 si presenta una afectación de FSII dependiente del tiempo. El Fv/Fm inicial fue en promedio de 0.495 ± 0.003 para la exposición en 30 minutos y 0.511 ± 0.03 en 60 minutos. El análisis estadístico mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre diferentes concentraciones y entre diferentes tiempos. Respecto a las evaluaciones a 30 minutos, se encuentra diferencia significativa respecto al control a partir de la concentración de 2 μM respecto al control. Mientras que, para las evaluaciones a 60 minutos, no existe diferencia significativa respecto al control. Se observó una disminución gradual del FSII en función de la concentración administrada en el tiempo de exposición de 30 minutos, el valor mínimo de fluorescencia alcanzando es de 0.44. El tiempo de exposición de 60 minutos no presenta cambios estadísticamente significativos con la concentración empleada al comparar con el control. Finalmente, existe diferencia significativa para la misma concentración a diferentes tiempos para las concentraciones de 10, 100 y 200 μM . La disminución en FSII es consistente con el daño estructural observado en la figura 15.

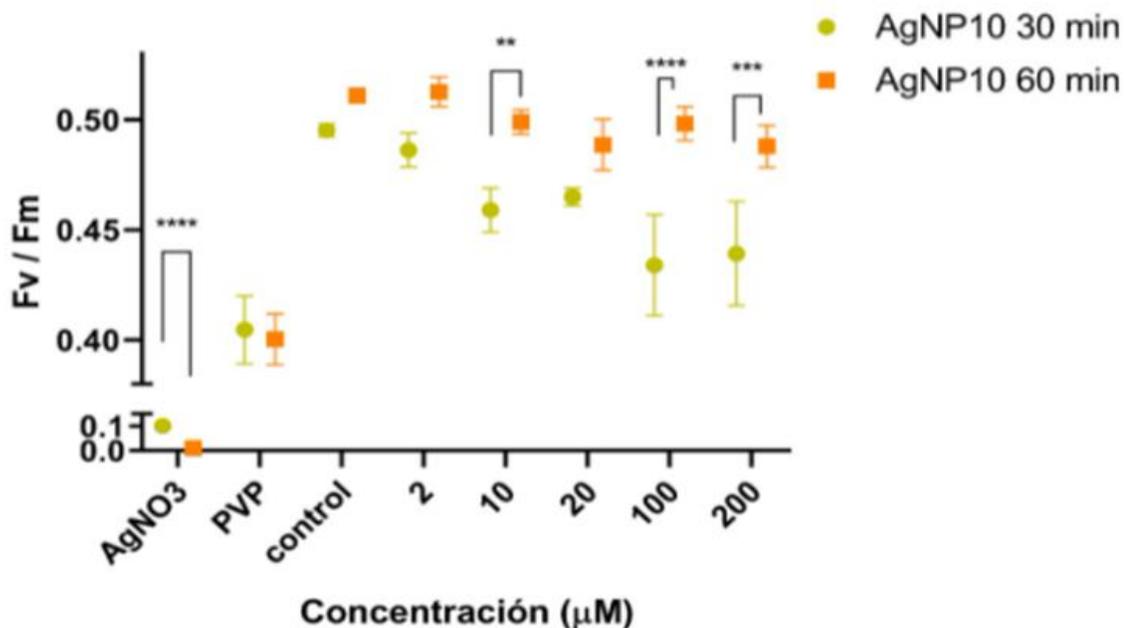


Figura 19. Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de *Chattonella sp.* después de la exposición a la formulación de AgNPs 10 por 30 (punto color verde) y 60 minutos (cuadrado color rojo). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.

3.3.3 Efecto de AgNP 7 sobre *Heterocapsa sp.*

La Figura 20 muestra la eficiencia cuántica efectiva del FSII en *Heterocapsa sp.* que fueron expuestas a AgNP 7 durante 30 y 60 minutos. El Fv/Fm inicial fue en promedio de 0.553 ± 0.076 para la exposición a 30 minutos y 0.569 ± 0.084 en 60 minutos. Se observó una disminución de la eficiencia cuántica del fotosistema II menor a 0.05 unidades en todas las concentraciones para ambos tiempos de exposición. Alcanzando un valor máximo de 0.575 y mínimo de 0.525 para las concentraciones evaluadas.

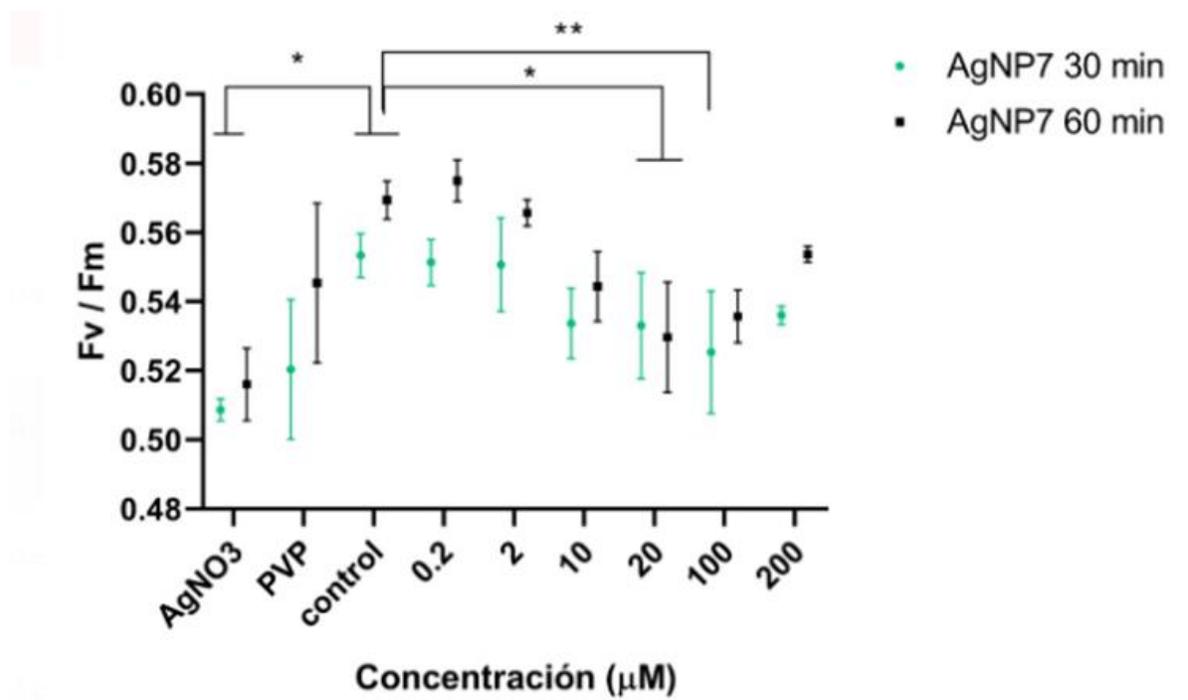


Figura 20. Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de *Heterocapsa sp.* después de la exposición a diferentes concentraciones de la formulación AgNP 7 por 30 (punto color azul) y 60 minutos (cuadrado color negro). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.

El intervalo de diferencias en el fotosistema II es el mínimo de entre todas las evaluaciones de actividad de AgNPs en microalgas realizadas, resultados acordes con el ligero cambio morfológico observado solo a altas concentraciones de AgNP 7. La prueba comparativa indicó que las diferencias se encuentran entre diferentes tiempos únicamente a la concentración de 200 μM. Por otro lado, existen diferencias significativas a concentraciones mayores a 10 μM con el tiempo de exposición de 30 min y entre concentraciones respecto al control a tiempo de 60 min con concentraciones de 20 y 100 μM. El valor

máximo alcanzado (0.575 a concentración de 0.2 μM en 60 min) presenta diferencia estadísticamente significativa respecto a todas las concentraciones excepto para 200 μM a 60 min y el valor obtenido para la concentración de 2 μM a 60 min presenta significancia estadística frente a las concentraciones de 20 y 100 μM de 30 min y 20 μM a 60 min. Es importante identificar que una concentración de 200 μM de nitrato de plata genera una disminución de la eficiencia de FSII mucho menor en *Heterocapsa sp.* que en *Chattonella sp.*

3.3.4 Efecto de AgNP 10 sobre *Heterocapsa sp.*

La figura 21 muestra la eficiencia cuántica efectiva del FSII en *Heterocapsa sp.* que fueron expuestas a la formulación AgNP 10 durante 30 y 60 minutos. La respuesta observada para ambos tiempos se encuentra en los intervalos de 0.50 a 0.60 unidades.

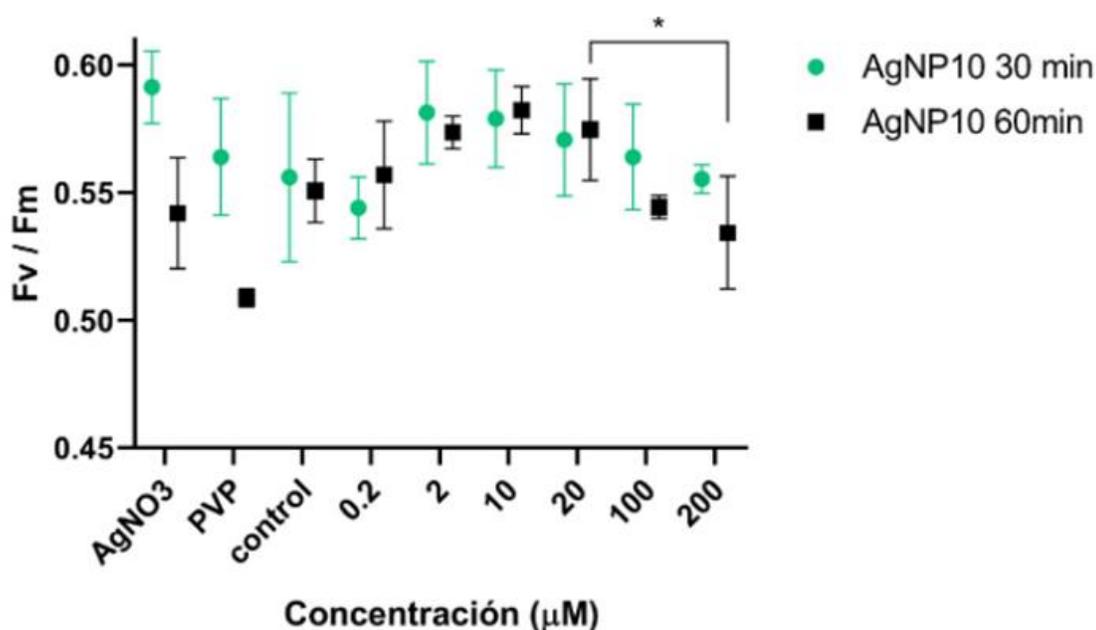


Figura 21. Cambio en la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) de *Heterocapsa sp.* después de la exposición a la formulación de AgNPs 10 por 30 (punto color azul) y 60 minutos (cuadrado color negro). Cada punto representa el promedio de tres réplicas, y representa el cambio relativo del valor del Fv/Fm detectado antes de la exposición a las AgNPs.

El Fv/Fm inicial promedio fue de 0.556 ± 0.026 para la exposición en 30 minutos y 0.546 ± 0.016 en 60 minutos. Esta formulación no genera cambios en el FSII dependientes del tiempo o concentración empleada. Al incrementar la concentración de las AgNPs, el valor del FV/FM no disminuyó significativamente. El análisis estadístico indica diferencia significativa entre concentraciones únicamente para la evaluación a 60 minutos. Siendo entre 2 y 100 μM , y entre 20 y 200 μM .

3.3.5 Diferencias entre la efectividad de las AgNPs Argovit™

Una comparación directa entre el efecto de las formulaciones de AgNPs en las microalgas tóxicas realizado en función del porcentaje de disminución respecto a los valores del control, se presenta en la figura 22. La cual muestra la diferencia entre el cambio de la eficiencia máxima del PSII frente a la formulación AgNP 7, en 30 y 60 minutos.

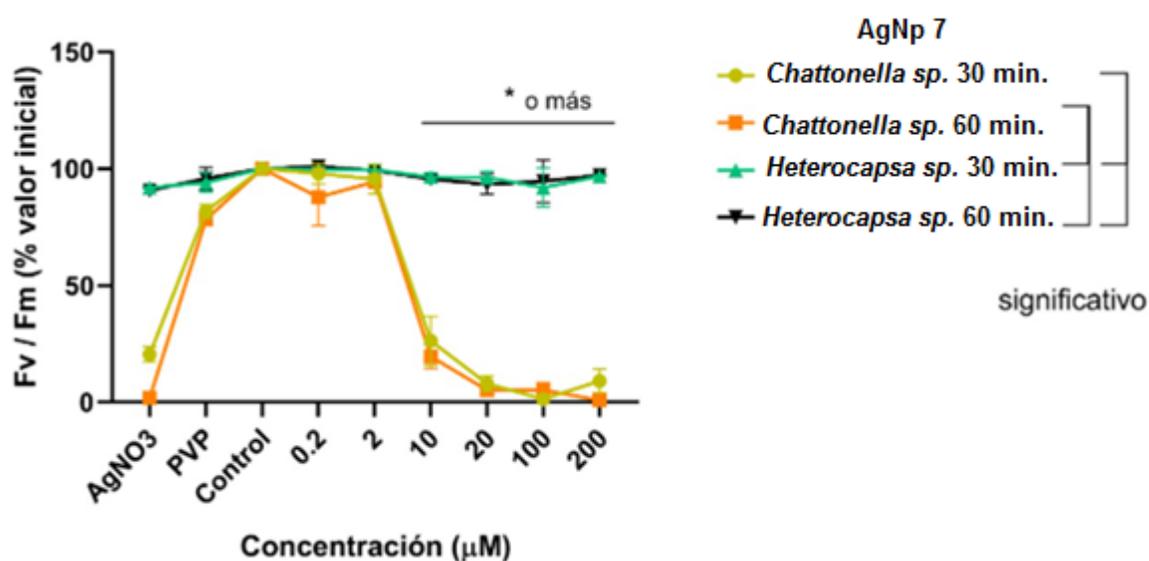


Figura 22. Cambio porcentual respecto al control de la efectividad del PSII de las microalgas tóxicas expuestas a la AgNP 7 de *Chattonella sp* y *Heterocapsa sp*.

Al comparar los resultados de los valores porcentuales obtenidos del Fv/Fm de las microalgas, se observó que *Chattonella sp.* presento una disminución de más del 90% a partir de la concentración de 10 μM en

30 y 60 minutos. Mientras que *Heterocapsa sp.* no presentó una disminución porcentual significativa en las mismas concentraciones.

Los resultados de la exposición de la formulación AgNP 10 en ambas microalgas, se presenta en la figura 23, y se muestra el valor porcentual del cambio de la eficiencia máxima del fotosistema II respecto al control.

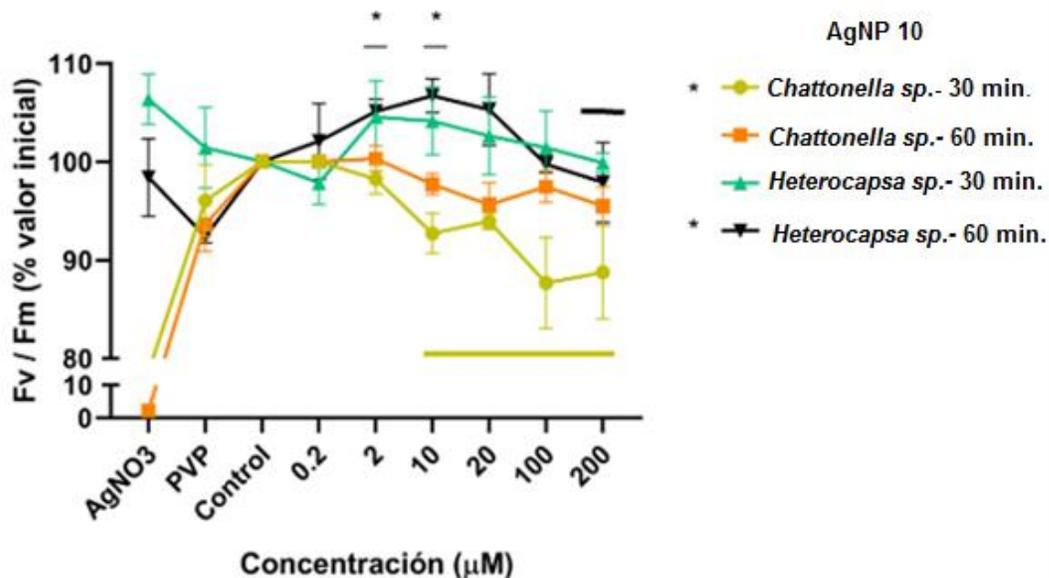


Figura 23. Cambio porcentual respecto al control de la efectividad del PSII de las microalgas tóxicas expuestas a la AgNP 10.

Al comparar los resultados de los valores porcentuales obtenidos del Fv/Fm de las microalgas, se observó que *Chattonella sp.* presentó diferencias significativas a partir de la concentración 10 μM para casi todas las concentraciones, para 60 minutos de exposición como entre microalgas. No obstante, *Heterocapsa sp.* presentó diferencias significativas a los 30 y 60 minutos a concentraciones de 2 y 10 μM con respecto a *Chattonella sp.* en ambos tiempos.

Capítulo 4. Discusión

Los resultados de este estudio mostraron que las dos algas tóxicas presentan respuestas diferentes a la exposición de dos formulaciones de AgNPs. La microalga *Chattonella sp.* presentó una reducción más drástica de la eficiencia de su fotosistema (figura 18-21) y mayores daños morfológicos en su estructura. Los daños morfológicos fueron más evidentes al aumentar la concentración de AgNP 7. Con esta misma formulación se observó una afectación del FSII independiente del tiempo de exposición. Este tipo de comportamiento observado para ambas formulaciones frente a *Chattonella sp.* parece concordar con lo reportado en la literatura para nanopartículas metálicas debido a mostrar un daño entre moderado y grave. La literatura reporta que las nanopartículas metálicas afectan los fotosistemas de microalgas secuestrando electrones (Wang et al., 2019c) reduciendo así la capacidad del fotosistema en la conversión de energía luminosa. Sin embargo, no parece ser el caso para *Heterocapsa sp.*

En los últimos años, el impacto de las nanopartículas metálicas ha sido objeto de estudio en la estructura y función de los fotosistemas y enzimas de las vías de fijación de carbono de las microalgas. Estos estudios han confirmado que las nanopartículas metálicas disminuyen la tasa de crecimiento y la producción de biomasa en algas y cianobacterias (Mahana et al., 2021), por lo que, un comportamiento reflejado en estrés fisiológico, como el observado para *Chattonella sp.* era esperado. No obstante, los mecanismos intrínsecos de acumulación y toxicidad de AgNPs en microalgas aún se encuentran bajo estudio. Si bien, se asocia el comportamiento observado en *Chattonella sp.* a estos mecanismos, es necesario profundizar para elucidar las causas del comportamiento observado en *Heterocapsa sp.* en respuesta a la exposición de AgNPs.

4.1 Diferencia de efectividad entre *Chattonella sp.* y *Heterocapsa sp.* frente a AgNPs Argovit™

Las propiedades de las nanopartículas metálicas asociadas con el efecto y la magnitud de su toxicidad que provocan los efectos antiproliferativos se encuentran relacionados por la dependencia del tamaño, la forma, la composición química, la carga superficial y estado de oxidación de los componentes, la estructura y el recubrimiento de la superficie, la fase cristalina, el área superficial, la solubilidad y el estado de

agregación (Hou et al., 2019) así como la relación entre recubrimiento-nanopartícula (Mahana et al., 2021; Valenzuela-Salas et al., 2021).

De las razones que podrían afectar la eficiencia del fotosistema relacionadas con el efecto de nanopartículas son: inhibición de fotosíntesis debido a un efecto de sombreado provocado por la adsorción de nanopartículas en la superficie de las algas, provocando la disminución de absorción de luz necesaria para la fotosíntesis; daño físico en la membrana; alteración metabólica debido a cambios en la tasa fotosintética y respiratoria (Wang et al., 2019). Las micrografías de la figura 14 muestran un daño muy significativo de la membrana celular cuando *Chattonella sp.* es expuesta a concentraciones iguales o mayores a 10 μM , consistente con una disminución significativa de la funcionalidad del FSII independientemente del tiempo de exposición. Por otro lado, la formulación AgNP 10 presenta cambios estructurales más moderados (figura 15) y una afectación mucho menor del fotosistema II, haciendo notorio que el recubrimiento de la formulación AgNP 10 juega un papel muy importante en la citotoxicidad de esta formulación comparada con AgNP 7. La caracterización de la Tabla 1 muestra que la diferencia más grande entre ambas AgNPs reside en el tipo de recubrimiento, pues el contenido de plata metálica y el contenido del recubrimiento, es el mismo en ambas formulaciones.

Se ha demostrado la reducción del contenido de pigmento en las células de las algas y la reducción de la actividad del fotosistema I y II, en respuesta a la exposición a las NPs metálicas debido a tener la capacidad de impedir la síntesis de pigmentos y/o favorecer su degradación (Mahana et al., 2021). Por su parte, respecto a las posibles causas asociadas directamente con el género *Chattonella* identificadas recae en el hecho que el género *Chattonella* carece de pared celular y tiene 0-20 cloroplastos, cada uno de los cuales está rodeado por cuatro membranas (Marshall et al., 2003).

Adicionalmente, se sabe que la interacción de las nanopartículas metálicas puede modificar la composición de la pared celular y en consecuencia su morfología. Las nanopartículas metálicas pueden alterar la superficie celular resultando en la contracción de las células (Mahana et al., 2021). Esta es una cualidad observada en las imágenes de *Chattonella sp.* a altas concentraciones, quien presentó una sensibilidad significativa, efecto que fue observado por los cambios en la pared celular, debido a la exposición de la formulación AgNPs 7. La carencia de pared celular de la *Chattonella sp.* podría favorecer la alteración de la superficie celular de la microalga, lo cual podría explicar el cambio en la morfología observado en las micrografías.

Los resultados obtenidos para *Chattonella sp.* en este trabajo parecen concordar con el estudio realizado por He *et al.*, (2012) quienes demostraron que la interacción de AgNPs estabilizadas con citrato, con *C. marina*, ocasiona toxicidad que afecta la viabilidad celular y modifica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta exposición de las células de *C. marina* a AgNP y Ag (I) condujo a reducciones significativas en la viabilidad de las algas, según el tipo de plata, la dosis y el tiempo de exposición. Observando que a 60 min de incubación deterioros en la viabilidad celular para dosis entre 0.02-50.0 μM de AgNP, con una reducción del 18-96% en relación con los controles y Ag (I) (5-85% en relación con sus controles), según lo indicado por una reducción significativa de la actividad metabólica.

Un trabajo efectivo del fotosistema II está relacionado con la supervivencia de las microalgas. La disminución de la efectividad del fotosistema II observado en el presente trabajo a concentraciones mayores a 10 μM , concuerda con la existencia de una disminución significativa de la viabilidad celular de la microalga del mismo género probada por He *et al.*, observada de manera dosis-dependiente a sus concentraciones probadas de AgNPs estabilizadas con citrato. Lo cual sugiere que esta formulación de AgNPs Argovit™ probada, puede causar un aumento en la permeabilidad de la membrana celular de *Chattonella sp.*, provocando muerte celular (He *et al.*, 2012).

En general, se ha observado una respuesta dosis-dependiente de especies del género *Chattonella* en diversos estudios (He *et al.*, 2012; Sendra *et al.*, 2018). Sin embargo, este comportamiento parece discrepar de lo observado en *Chattonella sp.* expuesta a la formulación AgNP 10, puesto que se observa una disminución de hasta el 10% respecto al control a altas concentraciones, que es menos drástica que la observada para la formulación AgNP 7. Una característica importante del género *Chattonella* es la citotoxicidad asociada con el efecto sinérgico de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los ácidos grasos poliinsaturados libres producidos por estas microalgas (Ahumada-Fierro *et al.*, 2021). Además, se ha documentado que el metabolismo de estas microalgas cambia bajo estrés o la variación de factores externos, como el pH, la temperatura y el metal disuelto en el medio (C. Xu *et al.*, 2020). Hasta donde se sabe, no hay datos disponibles en la literatura de evaluaciones del efecto biológico provocado por AgNPs frente en el género *Heterocapsa*. Por lo que éste es el primer acercamiento del efecto de AgNPs frente a cualquier especie del género *Heterocapsa*.

Se ha identificado una posible sobreproducción de especies reactivas de oxígeno por parte de las AgNPs con recubrimiento dado principalmente en las mitocondrias. La existencia de una pared celular en la *Heterocapsa sp* podría explicar la diferencia de la respuesta a la formulación AgNP 7 respecto al efecto

observado en *Chattonella sp.* Respecto a *Heterocapsa sp.* debido a que este efecto se vea disminuido por la presencia de la pared celular rígida característica de la especie, lo cual, podría impedir la internalización de las AgNPs. y, por consiguiente, impedir o dilatar el tiempo requerido para que se genere una sobreproducción de ROS mitocondriales lo suficientemente efectiva para ver una disminución drástica. Por otro lado, la diferencia de la respuesta frente a AgNPs 10 no parece ser lo suficientemente drástica para considerar esta propuesta como la principal causa.

Las diferencias observadas se encuentran asociadas a las diferencias de interacción entre las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10. Una posible causa de esta diferencia pudiera ser el efecto genotóxico que puedan presentar las AgNPs. Sin embargo, (Casillas-Figueroa et al., 2020) comprobó el potencial daño genotóxico de AgNPs Argovit™ con características similares en tamaño, formulación y concentraciones probadas en el presente trabajo, mediante la técnica de conteo de micronúcleos en células de *Allium cepa*, uno de los mejores modelos biológicos para identificar daño genotóxico. Obteniendo resultados que permiten sugerir una interacción no genotóxica ni citotóxica dañina puesto que no se encontró alteración del índice mitótico en la mayoría de las concentraciones evaluadas. Por esta razón, la reducción en la eficiencia de los PSII observada selectivamente en *Chattonella sp.* provocada por daño genotóxico o citotóxico es poco probable. Adicionalmente, se ha identificado que el efecto dañino provocado por AgNPs Argovit™ para formulaciones con y sin el recubrimiento proteico no está asociado con la liberación de iones plata sino con las AgNPs completas (Casillas-Figueroa et al., 2020; Valenzuela-Salas et al., 2021), lo cual permite sugerir que el efecto observado en ambas microalgas no se ve inducido por la liberación o descomposición de las formulaciones de AgNPs en el medio.

Capítulo 5. Conclusiones

Se estandarizó un protocolo para evaluar los efectos de la exposición de dos formulaciones diferentes de AgNPs Argovit™ reflejado en la morfología y en la fluorescencia de microalgas tóxicas aisladas de la Bahía Todos Santos, en Baja California, México.

De acuerdo con las caracterizaciones fisicoquímicas de las formulaciones AgNP 7 y AgNP 10 de las AgNPs Argovit™, no se reportan diferencias en la concentración de AgNPs, ni en el contenido de plata metálica ni en el contenido del recubrimiento, sin embargo, el tipo de recubrimiento es distinto entre cada formulación (PVP-AgNP 7; Proteína hidrolizada-AgNP 10). Por lo tanto, se atribuye la diferencia de los efectos inducidos en las microalgas, por el diferente tipo de recubrimiento utilizado en ambas formulaciones

Se identificó que la microalga que presenta mayor sensibilidad a las formulaciones de AgNPs Argovit™ probadas en este trabajo es la especie *Chattonella sp.*, presentando daño severo y daño moderado en la estructura de la célula y en la efectividad máxima del FSII, frente a las formulaciones AgNPs 7 y 10, respectivamente, mostrando una sensibilidad a concentraciones $\geq 10 \mu\text{M}$.

Por otro lado, se identificó que la efectividad máxima del FSII de la microalga tóxica *Heterocapsa sp.* no se ve afectada por la exposición de alguna de las formulaciones de AgNPs utilizadas, lo que indica mayor resistencia a sus efectos, además de no presentar cambios significativos en su morfología.

Se puede sugerir con base en la literatura y en los resultados obtenidos, que la efectividad de las AgNPs Argovit™ depende tanto de la presencia o ausencia de la pared celular en las microalgas tóxicas, así como de la presencia del recubrimiento proteico en las formulaciones de AgNPs Argovit™.

Finalmente, este trabajo es una primera evaluación de la susceptibilidad de dos especies de microalgas tóxicas a la exposición de AgNPs Argovit™. Con esta perspectiva, se sugiere continuar con la evaluación de estas formulaciones de AgNPs Argovit™, en diferentes especies de microalgas marinas, que presenten distintas características en la composición de su pared celular, debido a que es el primer sitio de interacción de las AgNPs en estas células. Y con el resultado de estas evaluaciones, se complementarían la identificación de los efectos inducidos por diferentes formulaciones de AgNPs Argovit™.

Literatura citada

- Ahumada-Fierro, N.V. 2020. Fisiología fotosintética y potencial tóxico de especies de *Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y el Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. xiv, 85 hojas.
- Ahumada-Fierro, Norma Valeria. 2017. Caracterización de aislados de *Chattonella* spp. de la Bahía de Todos Santos, y evaluación de su efecto sobre estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas*. Universidad Autónoma de Baja California, pp. 59 .
- Ahumada-Fierro, Norma Valeria, García-Mendoza, E., Sandoval-Gil, J. M. and Band-Schmidt, C. J. 2021. Photosynthesis and photoprotection characteristics related to ROS production in three *Chattonella* (Raphidophyceae) species. *Journal of Phycology*, 57(3), pp. 941–954. doi:10.1111/jpy.13138
- Álvarez-Suárez, A. S., Dastager, S. G., Bogdanchikova, N., Grande, D., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C., Pérez-González, G. L., Juárez-Moreno, K., Toledano-Magaña, Y., Smolentseva, E., Paz-González, J. A., Popova, T., Rachkovskaya, L., Nimaev, V., Kotlyarova, A., Korolev, M., Letyagin, A. and Villarreal-Gómez, L. J. 2020. Electrospun fibers and sorbents as a possible basis for effective composite wound dressings. *Micromachines*, MDPI AG, 11(4). doi:10.3390/MI11040441
- Andújar, I., González, N., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Escalona, M. and Concepción, O. 2020. Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the in vitro culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. *SN Applied Sciences*, Springer Nature, 2(12). doi:10.1007/s42452-020-03948-9
- Band-Schmidt, C. J., Martínez-López, A., Bustillos-Guzmán, J. J., Carreón-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N. O., Zenteno-Savín, T., Mendoza-Flores, A., González-Acosta, B., raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia*, 693(1), pp. 81–97. doi:10.1007/s10750-012-1088-y
- Almonaci-Hernández, CA; Vázquez-Gómez, R; Vázquez-Gómez, RA; Valenciano-Vega, JI; Carriquirri-Cheque, NI; Rembao-Hernandez A; Gomez-Zendejas, ML; Almanza-Reyes, H; Garibo-Ruiz, D; Pestriakov A; and Bogdanchikova, N. 2020. Journal of Clinical and Medical Images Nanomedicine Approach for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers with Silver Nanoparticles. *Journal of Clinical and Medical Images*, 3(2), pp. 1–7.
- Bravo-Guerra, C., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Pestryakov, A. and Bogdanchikova, N. 2020. Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, Academic Press Inc., 169. doi:10.1016/j.jip.2019.107304

- Carmona, M., Rendón-Castrillón, L. and Vélez-Salazar, Y. 2013. Microalgas para la industria alimenticia. Universidad Pontificia Bolivariana. 72 hojas. ISBN: 978-958-764-030-4.
- Casillas-figueroa, F., Arellano-garcía, M. E., Leyva-aguilera, C., Ruíz-ruíz, B., Vázquez-gómez, R. L., Radilla-chávez, P., Chávez-santoscoy, R. A., Pestryakov, A., Toledano-magaña, Y., García-ramos, J. C. and Bogdanchikova, N. 2020. ArgovitTM silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials*, 10(7), pp. 1–20. doi:10.3390/nano10071386
- Chaloupka, K., Malam, Y. and Seifalian, A. M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, Elsevier Ltd, 28(11), pp. 580–588. doi:10.1016/j.tibtech.2010.07.006
- Chen, F., Xiao, Z., Yue, L., Wang, J., Feng, Y., Zhu, X., Wang, Z. and Xing, B. 2019. Algae response to engineered nanoparticles: Current understanding, mechanisms and implications. *Environmental Science: Nano*, 6(4), pp. 1026–1042. doi:10.1039/c8en01368c
- Domozych, D. 2019. Algal Cell Walls. *ELS*, pp. 1–11. doi:10.1002/9780470015902.a0000315.pub4
- Fuentes-Valencia, M. A., Fajer-Ávila, E. J., Chávez-Sánchez, M. C., Martínez-Palacios, C. A., Martínez-Chávez, C. C., Junqueira-Machado, G., Lara, H. H., Raggi, L., Gómez-Gil, B., Pestryakov, A. A. and Bogdanchikova, N. 2020. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Experimental Parasitology*, Academic Press Inc., 209. doi:10.1016/j.exppara.2019.107825
- García-Mendoza, E., Cáceres-Martínez, J., Rivas, D., Fimbres-Martínez, M., Sánchez-Bravo, Y., Vásquez-Yeomans, R. and Medina-Elizalde, J. 2018. Mass mortality of cultivated northern bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis* associated with *Chattonella* species in Baja California, Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 5(DEC), pp. 1–16. doi:10.3389/fmars.2018.00454
- Guerra, J. D., Sandoval, G., Patron, A., Avalos-Borja, M., Pestryakov, A., Garibo, D., Susarrey-Arce, A. and Bogdanchikova, N. 2020. Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloids and Interface Science Communications*, Elsevier B.V., 37. doi:10.1016/j.colcom.2020.100280
- Hallmann, A. 2019. Advances in Genetic Engineering of Microalgae. A. Hallmann and P. H. Rampelotto (Eds.), *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 159–221. doi:10.1007/978-3-030-25233-5_5
- He, D., Dorantes-Aranda, J. J. and Waite, T. D. 2012. Silver nanoparticle-algae interactions: Oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environmental Science and Technology*, 46(16), pp. 8731–8738. doi:10.1021/es300588a

- Hou, J., Li, T., Miao, L., You, G., Xu, Y. and Liu, S. 2019. Effects of titanium dioxide nanoparticles on algal and bacterial communities in periphytic biofilms. *Environmental Pollution*, 251, pp. 407–414. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.136>
- Imai, I. and Yamaguchi, M. 2012. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae*, Elsevier B.V., 14, pp. 46–70. doi:[10.1016/j.hal.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.014)
- Iwataki, M. 2008. Taxonomy and identification of the armored dinoflagellate genus *Heterocapsa* (Peridinales, Dinophyceae). *Plankton and Benthos Research*, 3(3), pp. 135–142. doi:[10.3800/pbr.3.135](https://doi.org/10.3800/pbr.3.135)
- Johnson, M. P. 2016. Photosynthesis. *Essays In Biochemistry*, 60, pp. 255–273. doi:[10.1042/EBC20160016](https://doi.org/10.1042/EBC20160016)
- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., Garcia-Garcia, M. R., Pestryakov, A. and Bogdanchikova, N. 2017. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human and Experimental Toxicology*, SAGE Publications Ltd, 36(9), pp. 931–948. doi:[10.1177/0960327116675206](https://doi.org/10.1177/0960327116675206)
- Kalmantaeva, O. V., Firstova, V. V., Potapov, V. D., Zyrina, E. V., Gerasimov, V. N., Ganina, E. A., Burmistrov, V. A. and Borisov, A. V. 2014. Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration. *Nanotechnologies in Russia*, Maik Nauka-Interperiodica Publishing, 9(9–10), pp. 571–576. doi:[10.1134/S1995078014050061](https://doi.org/10.1134/S1995078014050061)
- Kim, D., Miyazaki, Y., Nakashima, T., Izvashita, T., Fujita, T., Yamaguchi, K., Choi, K. S. and Oda, T. 2008. Cytotoxic action mode of a novel porphyrin derivative isolated from harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(3), pp. 158–165. doi:[10.1002/jbt.20216](https://doi.org/10.1002/jbt.20216)
- Klöpper, S., John, U., Zingone, A., Mangoni, O., Kooistra, W. H. C. F. and Cembella, A. D. 2013. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: What is *C. subsalsa*? *European Journal of Phycology*, 48(1), pp. 79–92. doi:[10.1080/09670262.2013.771412](https://doi.org/10.1080/09670262.2013.771412)
- Kumar, V., Sharma, N., Jaiswal, K. K., Vlaskin, M. S., Nanda, M., Tripathi, M. K. and Kumar, S. 2021. Microalgae with a truncated light-harvesting antenna to maximize photosynthetic efficiency and biomass productivity: Recent advances and current challenges. *Process Biochemistry*, Elsevier Ltd, 104(September 2020), pp. 83–91. doi:[10.1016/j.procbio.2021.03.006](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.03.006)

- Li, F., Liang, Z., Zheng, X., Zhao, W., Wu, M. and Wang, Z. 2015. Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*, Elsevier B.V., 158, pp. 1–13. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.014
- Mahana, A., Guliy, O. I. and Mehta, S. K. 2021a. Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier Inc., 208, p. 111662. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111662
- Mahana, A., Guliy, O. I. and Mehta, S. K. 2021b. Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier Inc., 208, p. 111662. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111662
- Malapascua, J. R. F., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L. and Masojídek, J. 2014. Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: Application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic Biology*, 22, pp. 123–140. doi:10.3354/ab00597
- Marshall, J. A., Nichols, P. D., Hamilton, B., Lewis, R. J. and Hallegraeff, G. M. 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): The synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, 2(4), pp. 273–281. doi:10.1016/S1568-9883(03)00046-5
- Masojídek, J., Koblížek, M. and Torzillo, G. 2004. Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 20–39.
- Miyazaki, Y., Nakashima, T., Iwashita, T., Fujita, T., Yamaguchi, K. and Oda, T. 2005. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Toxicology*, 73(4), pp. 382–393. doi:10.1016/j.aquatox.2005.04.005
- Moreno, S. G., Perales Vela, H. and Salcedo Alvarez, M. O. 2008. LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA a COMO HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE PLANTAS Y ALGAS* (Vol. 27. Issue 4). pp. 119–129 .
- Nguyen, M. K., Moon, J. Y. and Lee, Y. C. 2020. Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201(January). doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110781

- Ochoa-Meza, A. R., Álvarez-Sánchez, A. R., Romo-Quiñonez, C. R., Barraza, A., Magallón-Barajas, F. J., Chávez-Sánchez, A., García-Ramos, J. C., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A. and Mejía-Ruiz, C. H. 2019. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish and Shellfish Immunology*, Academic Press, 84, pp. 1083–1089. doi:10.1016/j.fsi.2018.10.007
- Ovais, M., Khalil, A. T., Ayaz, M. and Ahmad, I. 2020. Metal oxide nanoparticles and plants. *Phytonanotechnology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/b978-0-12-822348-2.00007-3
- Paredes-Banda, P. E. 2020. Identification and characterization of potentially harmful dinoflagellates in Todos Santos Bay. p. 118.
- Paredes-Banda, P., García-Mendoza, E., Ponce-Rivas, E., Blanco, J., Almazán-Becerril, A., Galindo-Sánchez, C. and Cembella, A. 2018. Association of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide accumulation in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Northwest Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 5(DEC), pp. 1–14. doi:10.3389/fmars.2018.00491
- Perfileva, A. I., Graskova, I. A., Nozhkina, O. A., Zabanova, N. S., Sukhov, B. G., Shkil, N. N. and Nefyodova, E. V. 2019. The Current Aspects of Using Chemically Synthesized Compounds of Silver Nanoparticles in Animal Husbandry and Agrochemistry. *Nanotechnologies in Russia*, Pleiades Publishing, 14(9–10), pp. 489–496. doi:10.1134/S1995078019050112
- Pimentel-Acosta, C. A., Morales-Serna, F. N., Chávez-Sánchez, M. C., Lara, H. H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. and Fajer-Ávila, E. J. 2019. Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitology Research*, Springer Verlag, 118(6), pp. 1741–1749. doi:10.1007/s00436-019-06315-9
- Popov, K., Oshchepkov, M., Afanas'eva, E., Koltinova, E., Dikareva, Y. and Rönkkömäki, H. 2019. A new insight into the mechanism of the scale inhibition: DLS study of gypsum nucleation in presence of phosphonates using nanosilver dispersion as an internal light scattering intensity reference. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier B.V., 560, pp. 122–129. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.10.015
- Qiu, X., Shimasaki, Y., Tsuyama, M., Yamada, T., Kuwahara, R., Kawaguchi, M., Honda, M., Gunjikake, H., Tasmin, R., Shimizu, M., Sato, Y., Kato-Unoki, Y., Nakashima, T., Matsubara, T., Yamasaki, Y., Ichinose, H., Wariishi, H., Honjo, T. and Oshima, Y. 2013. Growth-phase dependent variation in photosynthetic activity and cellular protein expression profile in the harmful raphidophyte *Chattonella antiqua*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(1), pp. 46–52. doi:10.1271/bbb.120543
- Romero, N., Castro, G. and Gagneten, A. M. 2021. Ecotoxicologic effects of silver nanoparticles on freshwater nontarget species. doi:10.1016/B978-0-12-822965-1.00028-3

- Romo-Quiñonez, C. R., Álvarez-Sánchez, A. R., Álvarez-Ruiz, P., Chávez-Sánchez, M. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A. and Mejia-Ruiz, C. H. 2020. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ*, PeerJ Inc., 2020(2). doi:10.7717/peerj.8446
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C. and Bogdanchikova, N. 2020. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, 5(21), pp. 12005–12015. doi:10.1021/acsomega.0c00149
- Sendra, M., Blasco, J. and Araújo, C. V. M. 2018. Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles. *Ecological Indicators*, Elsevier, 95(January), pp. 1053–1067. doi:10.1016/j.ecolind.2017.08.050
- Shimasaki, Y., Mukai, K., Takai, Y., Qiu, X. and Oshima, Y. 2021. Recent progress in the study of peroxiredoxin in the harmful algal bloom species *Chattonella marina*. *Antioxidants*, 10(2), pp. 1–22. doi:10.3390/antiox10020162
- Stephano-Hornedo, J. L., Torres-Gutiérrez, O., Toledano-Magaña, Y., Gradilla-Martínez, I., Pestryakov, A., Sánchez-González, A., García-Ramos, J. C. and Bogdanchikova, N. 2020. Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, 10(11), pp. 6146–6155. doi:10.1039/c9ra09018e
- Vale, M. A., Ferreira, A., Pires, J. C. M. and Gonçalves, A. L. 2020. CO₂ capture using microalgae. *Advances in Carbon Capture*, pp. 381–405. doi:10.1016/b978-0-12-819657-1.00017-7
- Valenzuela-Salas, Lucía M., Girón-Vázquez, N. G., García-Ramos, J. C., Torres-Bugarín, O., Gómez, C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L. J., Toledano-Magaña, Y. and Bogdanchikova, N. 2020. Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Hindawi Limited, 2019. doi:10.1155/2019/4528241
- Valenzuela-Salas, Lucía Margarita, Blanco-Salazar, A., Perrusquía-Hernández, J. D., Nequiz-Avendaño, M., Mier-Maldonado, P. A., Ruiz-Ruiz, B., Campos-Gallegos, V., Arellano-García, M. E., García-Ramos, J. C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L. J., Toledano-Magaña, Y. and Bogdanchikova, N. 2021. New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics*, MDPI AG, 13(1), pp. 1–17. doi:10.3390/pharmaceutics13010065

- Vazquez-Muñoz, R., Borrego, B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Mota Morales, J. D., Bogdanchikova, N. and Huerta-Saquero, A. 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicology Letters*, Elsevier, 276(December 2016), pp. 11–20. doi:10.1016/j.toxlet.2017.05.007
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., Fernandes, B. D. and Ruiz, H. A. 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. *Biofuel Research Journal*, 5(1), pp. 780–791. doi:10.18331/BRJ2018.5.1.5
- Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A. and Terry, N. 2019a. Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(8). doi:10.3390/app9081534
- Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A. and Terry, N. 2019b. Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(8), pp. 1–14. doi:10.3390/app9081534
- Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A. and Terry, N. 2019c. Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences (Switzerland)*. MDPI AG, Vol. 9. Issue 8 . doi:10.3390/app9081534
- Weng, R., Chen, L., Lin, S., Zhang, H., Wu, H., Liu, K., Cao, S. and Huang, L. 2017. Preparation and characterization of antibacterial cellulose/chitosan nanofiltration membranes. *Polymers*, MDPI AG, 9(4). doi:10.3390/polym9040116
- Xu, C., Huang, S., Huang, Y., Effiong, K., Yu, S., Hu, J. and Xiao, X. 2020. New insights into the harmful algae inhibition by *Spartina alterniflora*: Cellular physiology and metabolism of extracellular secretion. *Science of the Total Environment*, 714. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136737
- Xu, L., Zhao, Z., Yan, Z., Zhou, G., Zhang, W., Wang, Y. and Li, X. 2021. Defense pathways of *Chlamydomonas reinhardtii* under silver nanoparticle stress: Extracellular biosorption, internalization and antioxidant genes. *Chemosphere*, p. 132764. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132764
- Yue, Y., Li, X., Sigg, L., Suter, M. J. F., Pillai, S., Behra, R. and Schirmer, K. 2017. Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. *Journal of Nanobiotechnology*, BioMed Central, 15(1), pp. 1–11. doi:10.1186/s12951-017-0254-9