



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Optimización de la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con nanopartículas de oro y plata

Soria Reinoso, Joselyn Nicole

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Angulo Paredes, Yolanda del Rocío Ph.D

26 de agosto de 2022



Soria_Nicole_Tesis_FINAL_BIBLIOTECA (1).pdf

Scanned on: 20:51 July 28, 2022 UTC

Análisis copyleaks



Identical Words	89
Words with Minor Changes	7
Paraphrased Words	69
Omitted Words	0



Financiado económicamente por:
YOLANDA DEL
ROCIO ANGULO
PAREDES



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**Optimización de la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con nanopartículas de oro y plata**” fue realizado por la señorita **Soria Reinoso Joselyn Nicole**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto del 2022



Firmado electrónicamente por:

YOLANDA DEL
ROCIO ANGULO
PAREDES

.....
Firma

Angulo Paredes Yolanda del Rocio, Ph.D.

C.C: 1215032718



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Auditoría

Yo, **Soria Reinoso, Joselyn Nicole**; con CC. 1804842738, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación. **“Optimización de la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con nanopartículas de oro y plata”** es de mi auditoría y responsabilidad, cumpliendo con lo requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de julio del 2022

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea punteada horizontal.

Firma

Soria Reinoso, Joselyn Nicole

C.C: 1804842738



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Soria Reinoso, Joselyn Nicole**; con CC. 1804842738, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Optimización de la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con nanopartículas de oro y plata**” en el Repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de julio del 2022

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal punteada.

Firma

Soria Reinoso, Joselyn Nicole

C.C: 1804842738

Dedicatoria

A Jesús, María y San José, por ser los custodios de mi corazón y mis sueños; por hacer de cada momento una oportunidad para ganarme el cielo.

A mis padres, y a mi hermano Ismael, por ser el regalo más grande de Dios en mi vida, por siempre apoyarme, exigirme y amarme.

A mis abuelitos Miguel, Enma, Anita, que siempre me ha recordado de dónde vengo y a donde voy, y me hacen sentir orgullosa de la familia que tengo.

A mi abuelito Papa Pancho, que me inculcó desde pequeña las ganas de estudiar y ser mejor persona, y que desde el cielo sigue dándome motivos para soñar.

Este logro no es mío, todo se los debo a ustedes

“Totus Tuus ego sum et omnia mea tua sunt”

Agradecimientos

A Dios y a la Virgen María por haberme permitido descubrir su amor y su misericordia para culminar esta etapa de mi vida y por recordarme su gracia me basta.

A mis padres, Fabian y Lourdes, por todo el esfuerzo y trabajo diario para darme la oportunidad de estudiar; por su paciencia y cuidado; y por enseñarme que, lo más importante es hacer todas las cosas con amor y dedicación. A mi hermano, por ser mi inspiración para alcanzar los sueños, por exigirme y motivarme a pensar en grande y volar alto; y por todo su tiempo dedicado para ayudarme a desarrollar este proyecto. A mis abuelitos, Anita, Miguel y Enma, y a toda mi familia que en la sencillez de un abrazo me dieron la fuerza para alcanzar mis metas a pesar de la distancia.

A mi tutora, Yolanda Angulo, por todos sus consejos y recomendaciones; y por su exigencia para lograr un trabajo de investigación de calidad. A Andrés Izquierdo, por permitirme desarrollar este proyecto en el Laboratorio de Microbiología de suelos; por su gran confianza y apoyo en el ámbito profesional. A los miembros del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT), por todo el apoyo y tiempo compartido; en particular a la Ing. Berenice Sarmiento, quien me supo instruir y capacitar en el cultivo de cianobacterias; y a la Ing. Geovanna Arroyo, por ser una excelente guía para comprender el mundo de la nanotecnología y por su gran aporte con la síntesis de nanopartículas.

A Lazos de Amor Mariano, y todos los misioneros por sus oraciones y compañía; en particular a Francisco, quien se convirtió en mi amigo incondicional, por su infinita paciencia para cuidarme, amarme y recordarme que el cielo es nuestra meta.

A mi amiga de la infancia, Joceline, y a todos mis amigos que hicieron de esta etapa universitaria, la mejor aventura. Brandon, Dome, Gigi, Mishu, Jany, Kary, Mateo y Mario.

Índice de contenidos

Análisis copyleaks.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Auditoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras.....	12
Abreviaturas	14
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema	18
Objetivos del Proyecto	19
Objetivo General.....	19
Objetivos específicos.....	19
Hipótesis.....	19
Capítulo II: Marco Teórico	20
Organismo de estudio	20
Generalidades Cianobacterias.....	20
Cianobacteria <i>Fischerella muscicola</i>	22
Cinética de crecimiento de las cianobacterias	28

Análisis de la densidad celular de cianobacterias	29
Nanopartículas.....	31
Generalidades.....	31
Síntesis de Nanopartículas.....	32
Nanopartículas de interés	33
Interacción de las Nanopartículas con cianobacterias.....	34
Técnicas de caracterización	35
Espectroscopia UV-VIS.....	35
Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	37
Voltamperometría cíclica	39
Método de difracción con rayos X (XRD).....	42
Espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS).....	43
Capítulo III: Materiales y Métodos	45
Organismo de estudio	45
Nanopartículas.....	47
Ensayo de cultivos híbridos.....	48
Cinética de crecimiento.....	49
Caracterización de los organismos híbridos.....	50
Caracterización morfológica y eléctrica mediante AFM/EFM	50
Caracterización electroquímica con voltametría cíclica.....	51
Caracterización del medio de cultivo residual	53
Espectroscopia UV-Vis.....	53

	10
Técnica de XRD	53
Técnica de EDS.....	54
Análisis estadístico.....	55
Capítulo IV: Resultados y Discusión	57
Escalado de <i>f. Muscicola</i>	57
Caracterización de los organismos híbridos.....	64
<i>Caracterización morfológica y eléctrica mediante AFM</i>	64
<i>Caracterización electroquímica con voltametría cíclica</i>	71
Caracterización del medio de cultivo residual	73
<i>Espectroscopia UV-Vis</i>	73
<i>Técnica XRD</i>	76
<i>Técnica EDS</i>	78
Conclusiones.....	83
Recomendaciones	83
Bibliografía.....	84
Apéndice.....	93

Índice de Tablas

Tabla 1. Preparación del medio de cultivo BG11o.	46
Tabla 2. Características de nanopartículas sintetizadas con agentes reductores naturales	47
Tabla 3. Ensayo de cultivos híbridos	48
Tabla 4. Valores de <i>HOMO</i> obtenidos de los voltamogramas de cada tratamiento.....	72
Tabla 5. Análisis estadístico de comparación múltiple de los tratamientos.	81

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura celular de las cianobacterias	21
Figura 2. Filamentos vegetativos y reproductivos de <i>F. muscicola</i>	23
Figura 3. Esquema de reacciones de luz fotosintéticas y vías de transporte de electrones	24
Figura 4. Presencia de heterocistos debido a la ausencia de nitrógeno en el medio	27
Figura 5. Fases del crecimiento celular.	28
Figura 6. Conteo celular en cámara de Neubauer.	29
Figura 7. Síntesis de verde de nanopartículas metálicas.....	32
Figura 8. Nanopartículas de plata y oro caracterizadas con TEM.....	33
Figura 9. Componentes del espectrofotómetro de absorción.....	36
Figura 10. Principio del funcionamiento del AFM.....	38
Figura 11. Esquema de una celda electroquímica utilizada para voltametría cíclica.....	40
Figura 12. Relación de <i>HOMO</i> y <i>LUMO</i> en los procesos redox.....	40
Figura 13. Difracción de Rayos X.....	42
Figura 14. Principios del análisis por EDS.....	43
Figura 15. Diseño experimental y metodología del trabajo	45
Figura 16. Nanopartículas sintetizadas en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología.....	47
Figura 17. Ensayo de cultivos híbridos de <i>F. muscicola</i> con diferentes NPs	49
Figura 18. Metodología para el recuento celular de <i>F. muscicola</i>	50
Figura 19. Análisis de muestras en AFM.....	51
Figura 20. Metodología y equipo empleado para el análisis de voltametría cíclica	52
Figura 21. Caracterización del medio residual con espectroscopía UV-VIS	53
Figura 22. Preparación de muestras y caracterización del medio residual con XRD	54
Figura 23. Análisis del medio residual con la técnica de EDS.	55
Figura 24. Escalado de <i>F. muscicola</i> en medio BG11o	57
Figura 25. Células de <i>F. muscicola</i> con y sin nanopartículas	58

Figura 26. Crecimiento celular de <i>F. muscicola</i> con las diferentes NPs a concentración 0,022 mg mL ⁻¹	59
Figura 27. Crecimiento celular de <i>F. muscicola</i> con las diferentes NPs a concentración 0,044 mg mL ⁻¹	61
Figura 28. Análisis estadístico ANOVA dos vías para comparar resultados de concentraciones de AuNPs	62
Figura 29. <i>F. muscicola</i> viva y muerta	65
Figura 30. <i>F. muscicola</i> con nanopartículas de Plata en concentraciones de 0,022 mg mL ⁻¹	66
Figura 31. <i>F. muscicola</i> con nanopartículas de Oro en concentraciones de 0,022 mg mL ⁻¹	67
Figura 32. Energía obtenida de las micrografías EFM de los diferentes tratamientos.....	68
Figura 33. Voltamogramas del medio de cultivo BG110 y <i>F. muscicola</i> con los diferentes tratamientos	71
Figura 34. Espectroscopia UV/VIS de NPs y del medio residual de los tratamientos con AgNPs	74
Figura 35. Espectroscopia UV/VIS de NPs y del medio residual de los tratamientos con AuNPs	75
Figura 36. Difractogramas del medio residual de <i>F. muscicola</i> con diferentes AgNPs.....	76
Figura 37. Difractogramas del medio residual de <i>F. muscicola</i> con diferentes AuNPs.....	77
Figura 38. Análisis elemental del medio residual de <i>F. muscicola</i> con AgNPs	79
Figura 39. Análisis elemental del medio residual de <i>F. muscicola</i> con AuNPs	80
Figura 40. Análisis ANOVA de dos vías del porcentaje de Au en el medio residual.	82

Abreviaturas

NPs	Nanopartículas
AgNPs	Nanopartículas de plata
AuNPs	Nanopartículas de oro
F1	Agente reductor natural de la flor F1
F2	Agente reductor natural de la flor F2
AuNPs_Q	Nanopartículas de oro sintetizadas con un agente reductor químico
AMF	Microscopía de fuera atómica
EFM	Microscopía de fuerza electromagnética
XRD	Método de difracción con rayos X
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
UV-Vis	Espectro ultravioleta -visible
CBB	Ciclo calvin-Benson-Bassham
PSI, PSII	Fotosistema I, Fotosistema II
BG11o	Medio de cultivo con ausencia de nitrógeno en su composición
cell mL⁻¹	Concentración de células presenten es un mililitro
mg mL⁻¹	Concentración de nanopartículas expresada en miligramos por mililitros
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
pH	Potencial de hidrogeno
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayor energía
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energía
redox	Reacciones reversibles de oxidación y reducción
rmp	Revoluciones por minuto
eV	Electronvoltios: unidad tradicional de energía
ANOVA	Análisis de varianza

Resumen

La hibridación de nanopartículas (NPs) con microorganismos vivos representa un gran desafío en el ámbito de la nanotecnología y microbiología. Las múltiples propiedades de las NPs que generan toxicidad, así como los diversos mecanismos de adaptación de las cianobacterias influyen en los resultados de adherencia y cinética de crecimiento en el organismo de estudio y por lo tanto en la generación de energía sustentable. El objetivo del presente estudio fue optimizar la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con NPs de oro y plata ($0,022 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0,044 \text{ mg mL}^{-1}$), sintetizadas con agentes reductores naturales (F1 y F2) y químicos. Se analizó la cinética de crecimiento de *F. muscicola* con las NPs durante 60 días de tratamiento. Los híbridos fueron caracterizados morfológica y eléctricamente con microscopía de fuerza atómica (AFM) y voltametría cíclica y se corroboró la adherencia de NPs caracterizando el medio residual con las técnicas de espectrofotometría UV-Vis, difracción con rayos X (XRD) y dispersión de energía de rayos X (EDS). Se determinó que los híbridos con mayor viabilidad fueron los tratamientos con agentes reductores naturales (AuNPs_F2 y AgNPs_F2), con variaciones de crecimiento de 13 % y 11 % respecto al control. Por consiguiente, el mejor ensayo para la generación de energía fue con AgNPs_F2 ya que, la cianobacteria viva posee $3,14 \pm 0,94 \text{ eV}$; un HOMO de $-4,74 \text{ eV}$ y procesos de oxidación y reducción superiores a *F. muscicola* en 19 % y 29 % respectivamente. Así mismo, el medio residual de AgNPs_F2 presentó el porcentaje más bajo de Ag remanente (0.1%) en comparación con los tratamientos restantes. Esta información es relevante para posteriores estudios que pretendan generar energía eléctrica con híbridos en base a cianobacterias con NPs.

Palabras clave: *Fischerella muscicola*, nanopartículas (NPs), hibridación, energía

Abstract

The hybridization of nanoparticles (NPs) with living microorganisms represents a significant challenge in nanotechnology and microbiology. The multiple properties of NPs that generate toxicity and the various adaptation mechanisms of cyanobacteria influence the results of adherence and growth kinetics in the organism under study and, therefore, in the generation of sustainable energy. This study aimed to optimize the energy production of *Fischerella muscicola* cultures with gold and silver nanoparticles (0.022 mg mL^{-1} and 0.044 mg mL^{-1}), synthesized with natural (F1 and F2) and chemical reducing agents. The growth kinetics of *F. muscicola* with the different NPs was analyzed during 60 days of treatment. The hybrids were characterized morphologically and electrically with atomic force microscopy (AFM) and cyclic voltammetry, and the adherence of NPs was corroborated by characterizing the residual medium with UV-Vis spectrophotometry, X-ray diffraction analysis (XRD), and energy dispersive X-rays spectroscopy (EDS). The hybrids with the highest viability were the treatments with natural reducing agents (AuNPs_F2 and AgNPs_F2), with 13 % and 11 % growth variations compared to the control. Therefore, the best assay for energy generation was with AgNPs_F2 since the live cyanobacterium has $3.14 \pm 0.94 \text{ eV}$, a HOMO of -4.74 eV , and oxidation and reduction processes superior to *F. muscicola* in 19 % and 29 % respectively. Likewise, the residual medium of AgNPs_F2 presented the lowest percentage of remaining Ag (0,1%) compared to other treatments. This information is relevant for further studies that seek to generate electricity with hybrids based on cyanobacteria with NPs.

Keywords: *Fischerella muscicola*, nanoparticles (NPs), hybridization, energy

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La nanotecnología es una ciencia emergente aplicable a diferentes campos de investigación como son la industria farmacéutica, alimenticia y eléctrica. Debido a las diversas propiedades que presentan las nanopartículas y su capacidad para optimizar procesos biotecnológicos son consideradas como materiales del futuro (Nafisi & Maibach, 2017). Por otro lado, varios estudios afirman que las cianobacterias son candidatos prometedores para reemplazar a los combustibles fósiles y generar energía de manera sostenible (Rajneesh et al., 2017). Estos organismos fotosintéticos tienen un rol fundamental en la fijación global de CO₂ y N₂, y gran potencial para la producción de biocombustibles, biofertilizantes, bioplásticos, fármacos y energía (Meunier et al., 2011).

Por consiguiente, en los últimos años se ha incrementado el uso de las nanopartículas metálicas en diferentes especies de microalgas y cianobacterias, analizando su adhesión, internalización y toxicidad, con el fin de determinar la respuesta biológica, los cambios metabólicos y su capacidad eléctrica (Gil Martínez, 2022). Se ha determinado que la generación de energía renovable a partir de cianobacterias híbridas con nanopartículas (NPs) es una opción viable energéticamente debido a la gran superficie, comportamiento óptico y naturaleza catalítica de las NPs. Además, las NPs pueden almacenar y generar energía a partir de la división fotoelectroquímica y electroquímica del agua (Khan et al., 2019).

Según Abed et al. (2009), las cianobacterias heterocísticas (con células especializadas para la fijación de N₂) son más eficientes en la producción de hidrógeno que los tipos no heterocistas. Esto convierte a *F. muscicola* (heterocisto) en un candidato prometedor para la generación de H₂ y energía limpia y renovable (Yunga, 2018). Así mismo, Del Castillo et al. (2021), afirman que *Fischerella muscicola* puede absorber NPs de plata y formar un organismo híbrido ideal para el desarrollo de tecnologías energéticas.

Desafortunadamente, estos estudios no analizan la interacción de la cianobacteria con NPs sintetizadas con agentes reductores orgánicos y químicos en tiempos prolongados, ni tampoco determinan las concentraciones de NPs a las que potencialmente pueden ser tóxicas para los microorganismos. Además, no existe información previa que compare la viabilidad de crecimiento de las cianobacterias híbridas con NPs de Au y Ag al mismo tiempo.

Justificación del problema

En el Ecuador, existen una variedad de cianobacterias y microalgas, que no han sido debidamente estudiadas; desaprovechando sus propiedades y funciones metabólicas para diversas aplicaciones biotecnológicas (Del Castillo, 2019). *F. muscicola* es una cianobacteria aislada de diferentes fuentes geotermales de Ecuador (Guapan, Papallacta, Chachimbiro) que puede ser aprovechada para la producción de biomasa en la industria alimentaria (Yunga, 2018), en la generación de biocombustibles (Valencia, 2018) y biofertilizantes (Martinez, 2014) por su alta actividad heterocística para la fijación de N₂ del aire. Así mismo, fue empleada para estudios prometedores en la producción de energía realizados por Del Castillo et al. (2021).

Por otro lado, las nanopartículas sintetizadas con agentes reductores naturales son nanomateriales de menor costo y toxicidad; ya que, los metabolitos secundarios (antocioninas, terpenoides, polifenoles, alcaloides, y ácidos fenólicos) participan en la reducción de iones metálicos de oro o plata y les proporcionan estabilidad (Chávez, 2019). Además, estos compuestos pueden presentar propiedades antioxidantes cuando las NPs interactúan con diferentes microorganismos (Zhou et al., 2022).

De manera análoga, la hibridación de organismos fotosintéticos con nanopartículas metálicas, permite que las NPs interactúen con la luz y generen una mayor dispersión Raman (dispersión inelástica de los fotones) en la pared celular de los microorganismos, proporcionándoles una alta conductividad eléctrica (Kim et al., 2020).

En particular, las nanopartículas de plata pueden interactuar eficazmente con las superficies de los microorganismos por su tamaño reducido y gran superficie (Nikokherad et

al., 2022). Mientras que, las nanopartículas de oro poseen excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, debido a su tamaño nanométrico, con una excelente conductividad eléctrica (Zangeneh & Zangeneh, 2020).

Por tales razones, la hibridación de *F. muscicola* con nanopartículas de oro y plata en diferentes concentraciones y sintetizadas con agentes reductores orgánicos y químicos; es prometedor para la generación de energía debido a que la cianobacteria puede presentar un metabolismo energético óptimo, capaz de producir mayor cantidad de energía metabólica (Hamida et al., 2020). Además, se puede monitorear las concentraciones de toxicidad y la influencia de los agentes reductores en la viabilidad celular.

Esta investigación aportará nuevos enfoques asociados al uso, crecimiento, adaptación y producción energética del cultivo híbrido de *F. muscicola* con nanopartículas de oro y plata, por lo que representa un paso fundamental para establecer organismos ideales para la producción de energía autosustentable.

Objetivos del Proyecto

Objetivo General

Optimizar la producción de energía de los cultivos de *Fischerella muscicola* mediante la hibridación con nanopartículas de oro y plata.

Objetivos específicos

- Escalar el cultivo de *F. muscicola* en el medio de cultivo BG110 y obtener híbridos con nanopartículas de oro y plata para determinar su viabilidad de crecimiento y toxicidad.
- Caracterizar morfológica y eléctricamente las cianobacterias híbridas *F. muscicola* mediante AFM y voltamperometría cíclica.
- Caracterizar el medio de cultivo residual con espectrofotometría UV-Vis, XRD y EDS para verificar la adherencia de las nanopartículas a la cianobacteria.

Hipótesis

La hibridación de *F. muscicola* con nanopartículas de oro y plata optimiza la producción de energía con relación a cultivos de *F. muscicola* sin nanopartículas.

Capítulo II: Marco Teórico

Organismo de estudio

Generalidades Cianobacterias

Las cianobacterias, oxifotobacterias o algas verdeazuladas son organismos fotótrofos oxigénicos procariotas que se originaron hace aproximadamente 3000 a 3500 millones de años. Se desarrollan como células individuales, suspendidas, bentónicas o formando agregados; aunque también presentan formas filamentosas que pueden ser delgadas o gruesas, tricomas simples o haces con o sin vaina (Abed et al., 2009).

Su forma de reproducción es asexual (fisión binaria, fisión múltiple, gemación, fragmentación) o por esporas (acinetos, endosporas, exosporas), y tienen una alta tasa de crecimiento en ambientes acuáticos, pero también pueden crecer en sistemas terrestres con cierta humedad (Gómez & Quesada de Corral, 2011). Otro rasgo importante de estos organismos, es su alta capacidad de desarrollarse en ambientes extremos (lagos hipersalinos, aguas termales de hasta 80°C y ambientes polares con temperaturas bajo cero) y establecer relaciones simbióticas con helechos, protistas, bacterias y hongos (Aguilera & Echenique, 2015).

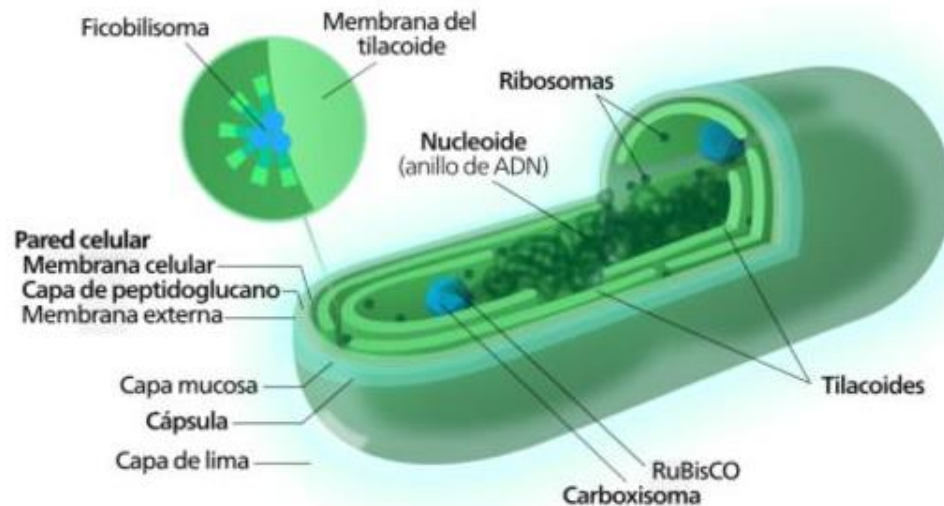
Las cianobacterias pueden formar colonias trímeras, con células altamente especializadas como los heterocistos para la fijación del nitrógeno atmosférico (N₂), acinetos (esporas que almacenan almidón cianofíceo para sobrevivir a condiciones adversas) (UNP, 2009), baeocistos encargados de la ramificación celular y nedridios que hacen apoptosis para la propagación de colonias (Alvarez, 2022).

Con respecto a su estructura celular (Figura 1), se caracterizan por contener carboxisomas para la fijación del CO₂, así como vesículas de gas que regulan la capacidad de flotación, gránulos de cianoficina y glucógeno para almacenar energía (Alvarez, 2022). Cabe mencionar que poseen el mismo aparato fotosintético de las algas eucariotas y de las plantas superiores (tilacoides), incluyendo los dos fotosistemas y la presencia de clorofila y ficobilinas (Baker, 2017). Así mismo, presentan un ADN circular (gen 16s - bacterias), pared

celular, membrana celular y una capa mucosa o mucilaginososa que les da una ventaja adaptativa (Dennisse Del Castillo, 2019).

Figura 1.

Estructura celular de las cianobacterias



Nota: Orgánulos de las cianobacterias. Adaptado de Ecología verde por Alvarez, (2022).

<https://www.ecologiaverde.com/cianobacterias-que-son-caracteristicas-y-ejemplos-3546.html>

Al ser productores primarios y fijadores de nitrógeno, las algas verdeazuladas, tienen un papel fundamental en la red trófica, en la generación de oxígeno disuelto y en la regulación de los flujos de CO₂ atmosférico. A su vez, se utilizan en diversas aplicaciones industriales y farmacéuticas por sus propiedades antibióticas, antimicrobianas, antivirales, anticancerígenos, nutricionales, y de biofertilizantes debido a la producción de varios metabolitos secundarios, incluidas toxinas, vitaminas y enzimas (Abed et al., 2009).

Del mismo modo, estos microorganismos han sido empleados en la producción de biodiesel ya que las cianobacterias heterocísticas producen H₂ como un subproducto de la fijación de nitrógeno (Aguilera & Echenique, 2015). Este gas biológico constituye una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles, por su naturaleza, eficiencia, renovabilidad y la ausencia de emisiones de CO₂ (Peleato & Gómez-Moreno, 2011).

Cianobacteria *Fischerella muscicola*

Clasificación taxonómica de *F. muscicola*

F. muscicola es una cianobacteria fotótrofa, heterocística (fijadora de nitrógeno) y filamentosa. Contiene alta actividad nitrogenasa en comparación con otras cianobacterias, como *Anabaena*, *Scytonema bohneri*, y *Calothrix elenkinii* (Wutthithien et al., 2019; Yunga, 2018).

Según el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2022) su clasificación es la siguiente:

- Reino: Bacteria
- Subreino: Negibacteria
- Phylum: Cyanobacteria
- Clase: Cyanophyceae
- Orden: Stigonematales
- Familia: Stigonemataceae
- Género: *Fischerella* (Bornet and Flahault) Gomont, 1985
- Especie: *Fischerella muscicola* (Thuret) Gomont.

Morfología *F. muscicola*

La morfología de *F. muscicola* consiste en filamentos que forman ramas por división de células perpendiculares al eje del filamento principal. Se diferencia de otras cianobacterias que ocupan los mismos hábitats, como *Stigonema*, de ramificación verdadera y multiseriada, porque los filamentos ramificados de *Fischerella* son uniseriados y diversos morfológicamente (Alvarez, 2022; Martínez et al., 2020).

Como se muestra en la Figura 2, los filamentos basales a menudo son multiseriados y las ramas son uniseriadas. La parte principal del tricoma tiene vainas gruesas de color, mientras que el mucílago que rodea las células cilíndricas de las ramas es incoloro. El contenido de las células es ligeramente granular con tilacoides distribuidos irregularmente (Parra, 2008).

Figura 2.

Filamentos vegetativos y reproductivos de F. muscicola



Nota: *F. muscicola* TISTR 8215 cultivada en **a)** y **d)** medio BG11 **b)** BG11o y **c)** medio AA modificado. Se puede observar el acineto (A) y el heterocisto (H). Adaptado de “Improvement of photobiological hydrogen production by suspended and immobilized cells of the N₂-fixing cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR 8215” (p. 3), por Wutthithien et al., (2019), *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01881-y>.

Poseen dos estructuras fundamentales: i) acinetos con la pared exterior engrosada y de gran tamaño que les permite permanecer latentes en condiciones ambientales desfavorables como sequía, oscuridad, congelación (UNP, 2009); y ii) heterocistos intercalares que varían de forma, desde esféricos en las porciones basales de los tricomas hasta más cilíndricos en las ramas (Figura 2). Los heterocistos están rodeados de una pared glucolipídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno y en conjunto con la enzima nitrogenasa, llevan a cabo la fijación de N₂ (Peleato & Gómez-Moreno, 2011).

Igualmente, tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas contiguas, generando el traspaso de los productos formados por la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis.

No obstante, la presencia de estas células especializadas varía en relación a las condiciones ambientales y la disposición de nutrientes en las que se desarrolle la cianobacteria (Mishra et al., 2018).

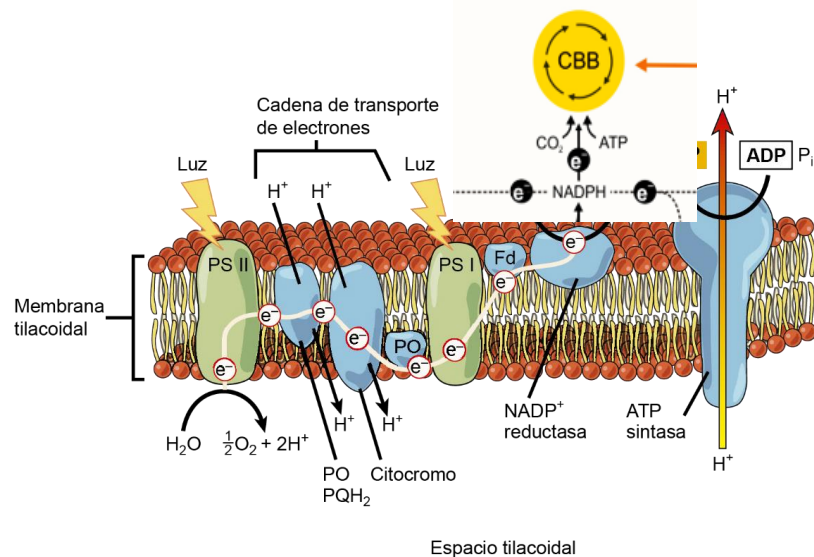
Por otro lado, las células de *F. muscicola* que están en su etapa de crecimiento tienen una morfología circular con una coloración intensa y verdeazulada, mientras que las células que están finalizando su ciclo de vida presentan formas alargadas, finas y con coloraciones opacas (Martínez et al., 2020). Esto significa que, cuando una célula muere pierde totalmente su coloración por la ausencia de clorofila-a (pigmento fotosintético primario) y ficobiliproteínas (pigmentos auxiliares) (Wutthithien et al., 2019).

Bioquímica metabólica de *F. muscicola*

Las células de *F. muscicola*, mientras realizan los procesos de fotosíntesis y fijación del carbono en la membrana tilacoidal y citoplasmática, permiten la generación de energía (moléculas de ATP) y la liberación de electrones (Lea-Smith et al., 2016) (Figura 3).

Figura 3.

Esquema de reacciones de luz fotosintéticas y vías de transporte de electrones



Nota: Diagrama esquemático del transporte de electrones en la fotosíntesis. Adaptado de “Regulatory electron transport pathways of photosynthesis in cyanobacteria and microalgae: Recent advances and biotechnological prospects” por Nikkanen et al. (2021), *Physiologia Plantarum*.

En el proceso de fotosíntesis oxigénica, los fotones de luz, capturados por los ficobilisomas (PBS), excitan los pigmentos de clorofila P700 y P680 en los centros de reacción del fotosistema (PS) I y II, permitiendo la liberación de oxígeno como subproducto.

Al mismo tiempo, se produce la extracción de electrones del agua que son transportados por los componentes de la membrana tilacoidal (PSI, PSII, citocromo b6f, plastocianina) al centro de distribución de electrones (ferredoxina-NADP+-reductasa), para usarlos principalmente en la fijación de carbono en el ciclo calvin-Benson-Bassham (CBB) (Nikkanen et al., 2021).

Si el sumidero de CBB está saturado, la cadena de transferencia de electrones fotosintética, que también genera una diferencia en el potencial electroquímico sobre la membrana tilacoidal, puede reducirse excesivamente, y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañen el sistema fotosintético. Razón por la cual, las cianobacterias han desarrollado mecanismos fotoprotectores y vías de transporte auxiliar para liberar electrones y evitar daños en su metabolismo o estructura celular; en especial, cuando hay fluctuaciones en la intensidad de la luz o la disponibilidad de nutrientes (Lea-Smith et al., 2016; Nikkanen et al., 2021).

Condiciones de crecimiento de *F. muscicola*

F. muscicola crece principalmente en rocas o suelos húmedos y en zonas acuáticas como epífitas o macrófitas. Es el simbiote principal de ciertos líquenes y puede encontrarse en aguas termales de Argelia e India y fuentes geotermales de Ecuador (Chachimbiro, Papallacta) a temperaturas de 53 ± 2 °C (Baker, 2017; Naranjo, 2017).

Al ser aisladas de su ambiente natural, existen varios factores que afectan al crecimiento de *F. muscicola* a nivel de laboratorio, como la intensidad de la luz, disponibilidad de nutrientes, agitación, temperatura, pH, entre otros. De modo que, se ha determinado que *F. muscicola*, se desarrolla mejor bajo las siguientes condiciones:

Temperatura

Yunga, (2018), determinó que la temperatura óptima a la cual crece *F. muscicola* es de 35°C en condiciones de laboratorio; sin embargo, Rastogi & Incharoensakdi, (2015) afirman que una temperatura de 23 ± 2 °C, también es ideal.

Fotoperiodo e intensidad de la luz

Este parámetro indica la variación de luz y oscuridad en un determinado tiempo. Rastogi & Incharoensakdi, (2015) realizaron cultivos de la cianobacteria con luz blanca fluorescente continua a 10 ± 2 W m⁻²; mientras que Mishra et al., (2018), recomiendan una iluminación de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 10 h al día. Recientemente, Martínez et al., (2020) establecieron 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Rango de pH

Mishra et al., (2018) identificaron que a pH ligeramente alcalino (7,5 - 9) existió una germinación significativa de la cianobacteria y Martínez et al., (2020) afirman que *F. muscicola* se desarrolló en un rango de pH entre 7.3 y 8.6.

Agitación

Wutthithien et al., (2019), utilizaron 160 rpm para mantener *F. muscicola* en agitación; a diferencia de Mishra et al., (2018), quienes realizaron agitaciones manuales dos veces al día y Martínez et al., (2020) quienes aplicaron una aireación constante. Del Castillo (2019), aplicó agitación manual debido a la importancia de este proceso para favorecer el intercambio de CO₂ y O₂, así como disponer los nutrientes del medio de cultivo y homogenizar la cianobacteria para mejorar su metabolismo.

Medio de cultivo

Según Peleato & Gómez-Moreno, (2011) *F. muscicola*, es capaz de obtener carbono y nitrógeno del ambiente en presencia de luz; por lo tanto, sus requerimientos nutricionales son muy bajos.

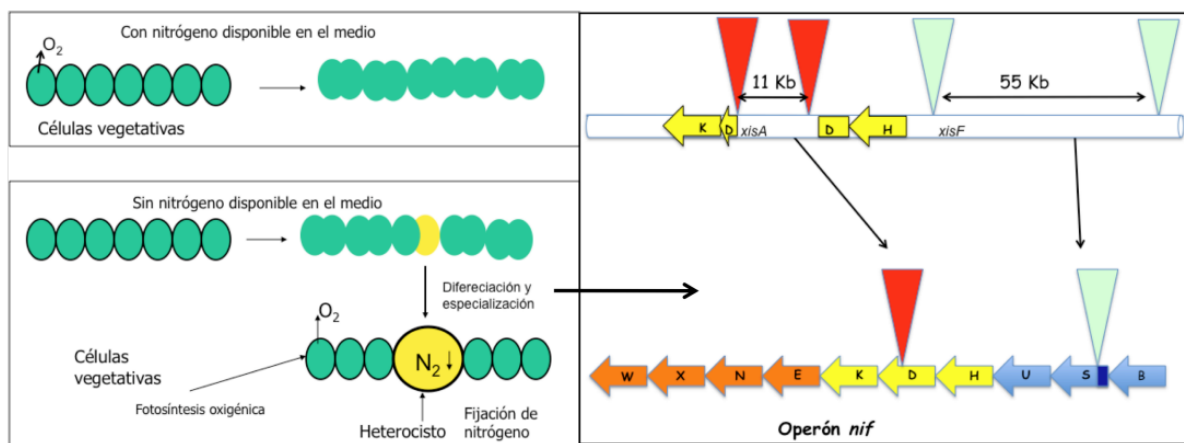
Normalmente *F. muscicola* ha sido cultivada en un medio con nitrógeno (N) denominado BG11, dando resultados positivos como lo afirman Del Castillo (2019); Fernández et al., (2020) y Al-Yousef & Amina, (2021). No obstante, Martínez et al., (2020)

obtuvieron un crecimiento y metabolismo óptimo de *F. muscicola* en medio BG11o (ausencia de N) al igual que Wutthithien et al., (2019), quienes alcanzaron una producción mayor de H₂ (biohidrogeno) en medio BG11o que en medio BG11.

En el medio BG11o se desarrollan mayor cantidad de heterocistos, esto se debe a que las cianobacterias filamentosas en ausencia de N responden con un complejo sistema de señales como la reorganización génica en el operón *nif*. Al mismo tiempo, ciertas células que se originan por división celular, se diferencian a heterocistos con un determinado patrón de distribución en el filamento como se muestra en la Figura 4.

Figura 4.

Presencia de heterocistos debido a la ausencia de nitrógeno en el medio



Nota: Para la formación de heterocistos, ocurre la escisión de varias regiones del genoma, y se expresan genes que codifican las subunidades del complejo de la nitrogenasa (*nifH*, *nifD* y *nifK*). Adaptado de “Las cianobacterias: cooperación vs competencia” de Peleato & Gómez-Moreno, (2011).

En consecuencia, las células vegetativas adyacentes a los heterocistos, al intercambiar moléculas producen gran cantidad de oxígeno en la fotosíntesis. Además, al poseer las vésiculas de gas, pueden adherirse a la superficie del agua y capturar mayor cantidad de luz, CO₂ y N₂, acelerando su crecimiento celular (Mishra et al., 2018; Peleato & Gómez-Moreno, 2011).

Cinética de crecimiento de las cianobacterias

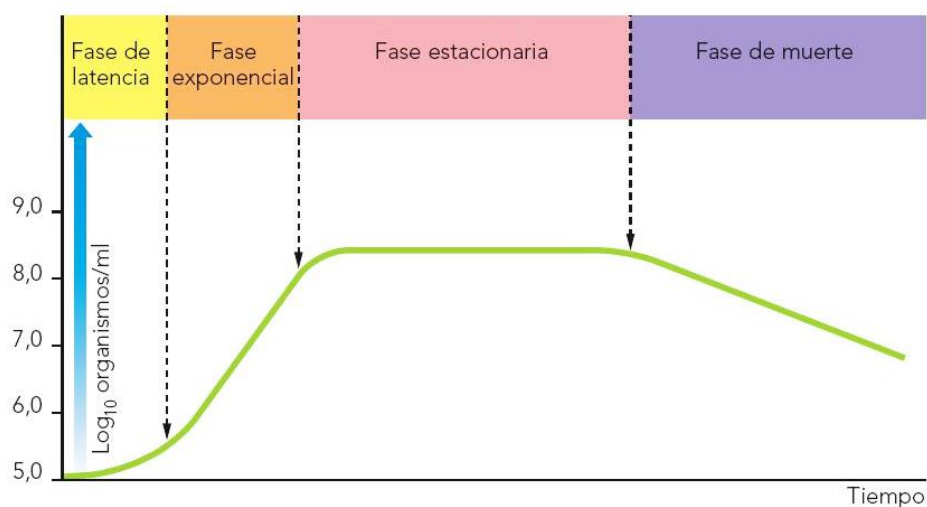
En un cultivo discontinuo o batch, el crecimiento de las cianobacterias se acopla a la Figura 5, donde se reflejan cambios en la biomasa y en su entorno. En cultivos de microalgas, la fase de latencia señala un retraso del crecimiento como resultado de la presencia de células no viables o esporas en el inóculo. También puede ser causado por el periodo de ajuste fisiológico debido a cambios en las condiciones de los nutrientes o del cultivo.

Posteriormente, se genera la fase exponencial donde las células ya están aclimatadas y comienzan a crecer y a multiplicarse de forma acelerada con respecto al tiempo, siempre y cuando los sustratos minerales (N, P, Fe) y la energía luminosa estén disponibles (Fernández et al., 2020).

La concentración celular de un cultivo fotosintético seguirá aumentando exponencialmente hasta que se absorban todos los fotones fotosintéticamente disponibles que inciden sobre la superficie del cultivo. A continuación, el crecimiento celular pasa a la fase estacionaria, caracterizada por una estabilidad en el crecimiento debido al exceso de biomasa o a la disminución de nutrientes disponibles; y finalmente ocurre la muerte celular (Figura 5) (Richmond, 2003).

Figura 5.

Fases del crecimiento celular.



Nota: Adaptado de *Microbiología* [Diapositiva] por Zúñiga, (2018)

<https://docplayer.es/82628045-T-microbiologia.html>

Análisis de la densidad celular de cianobacterias

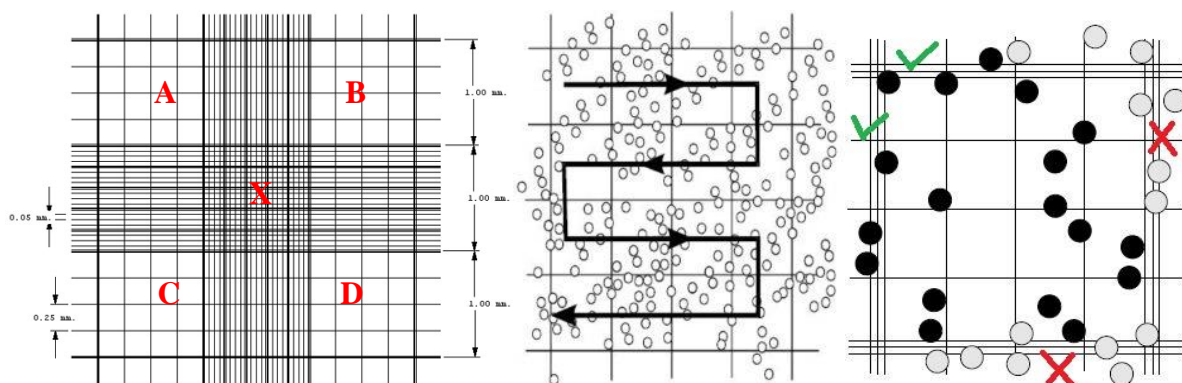
El desarrollo de las cianobacterias se expresa como el incremento de la biomasa definida como número o volumen de células (cel mL^{-1}), carbono celular total, cantidad de proteínas o pigmentos, peso seco, orgánico o total, y densidad óptica. Sin embargo, el conteo celular es el método más sencillo y barato para visualizar las fases de crecimiento en un periodo corto de tiempo (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Además, es una forma fiable de uniformizar la densidad de siembra para cultivos recién inoculados (Nedbal, 2020).

Para el recuento celular se puede emplear diferentes cámaras (Neubauer, Petroff Hauser, Speirs Levy) dependiendo del volumen y del tamaño de las células. En la mayoría de los laboratorios se utiliza la cámara de Neubauer de $0,9 \mu\text{L}$ de volumen, $0,1 \text{ mm}$ de profundidad y $0,9 \text{ mm}^2$ de superficie. Estas características son ideales para células entre 2 y $30 \mu\text{m}$ y cultivos con concentraciones de 10^4 - $10^7 \text{ cell mL}^{-1}$, con un enfoque del microscopio en el lente objetivo de 10X o 40X (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

En el conteo celular realizado en forma de zigzag (Figura 6), no se toma en cuenta a las células que tocan los límites inferior y derecho; no obstante, las células que tocan los límites superior e izquierdo sí deben contarse. (EMS, 2021).

Figura 6.

Conteo celular en cámara de Neubauer.



Nota: Dimensiones, técnica de conteo zigzag y consideraciones para el conteo de células.

Adaptado de Manual Cell Counting With Neubauer Chamber por LaboratoryInfo, (2022)

<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

Según Arredondo-Vega & Voltolina, (2007) para células con un tamaño mayor a 6 μm y cultivos con poca biomasa, el recuento se realiza en los 4 cuadrantes, y la concentración celular (C) en cell mL^{-1} se calcula de acuerdo a la Ecuación 1.

$$C = N * 10^4 * dil \quad (1)$$

N = Promedio de células presentes en 1 mm^2 ($0,1 \mu\text{L}$).

10^4 = factor de conversión de $0,1 \mu\text{L}$ a 1 mL .

dil = factor de dilución.

Dependiendo del tipo de muestra se debe preparar la dilución con una concentración adecuada ($250\,000 \text{ células mL}^{-1}$ hasta $2.5 \text{ millones de células mL}^{-1}$) (LaboratoryInfo, 2022).

Por otro lado, cuando las células son pequeñas y la biomasa es escasa, se utiliza el cuadro central (25 cuadros) y se consideran solamente los 5 cuadros menores. La concentración celular (C) se calcula de acuerdo a la Ecuación 2 (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

$$C = [N/4 \times 10^6] * dil \quad (2)$$

N = Promedio de células presentes en los 5 cuadros pequeños del cuadro central.

4×10^{-6} = Volumen de la muestra expresado en cm^3 (mL) sobre al área de los cuadros pequeños la cual equivale a $0,004 \text{ mm}^3$ ($0,004 \mu\text{L}$) ($0,2 \times 0,2 \times 0,1$).

dil = factor de dilución: si se diluye 1:10 (1 mL de muestra en 9 mL de medio), el factor de dilución es 10.

Del Castillo, (2019) determinó que los cultivos de *F. muscicola* (tamaño de $4\text{-}6 \mu\text{m}$) pueden contabilizarse con las 2 fórmulas descritas anteriormente, Sin embargo, es necesario realizar una dilución previa y agitación vigorosa de los cultivos celulares, debido a que la cianobacteria forma agrupaciones que impiden que las células tengan una distribución homogénea.

Nanopartículas

Generalidades

Las nanopartículas (NPs) son materiales naturales, secundarios o fabricados que contienen partículas aisladas o en aglomerados con tamaños inferiores a 100 nm ($1\text{ nm} = 10^{-7}\text{ m}$) (Comisión Europea, 2012).

Las NPs se componen de tres capas (a) la capa superficial, que puede fusionarse con una variedad de moléculas pequeñas, iones metálicos, tensioactivos y polímeros; (b) la capa del caparazón, que es un material químicamente diferente del núcleo, y (c) el núcleo (Joudeh & Linke, 2022). Estas estructuras incluyen sustancias de diferente forma, estado de aglomeración, área, carga superficial y tamaño, lo que les permite ser más solubles, así como tener una mejor difusión, absorción y disponibilidad (del Rocío et al., 2017).

Existe una clasificación muy diversa dependiendo de la forma y dimensión, composición, naturaleza del material, origen, fuente y cristalinidad (Hamida et al., 2020). Hay que mencionar que el tamaño de las NPs puede influir en las propiedades fisicoquímicas y ópticas de una sustancia, Así mismo, la variación en las formas (esféricas, cúbicas, agujas, triangulares) les permiten ser utilizadas en diversas áreas como fabricación de dispositivos, electrónica, óptica y celdas de biocombustible (Ahmad et al., 2019). En particular, las NPs metálicas poseen propiedades optoelectrónicas únicas, debido a que los metales alcalinos y nobles, como el Cu, Ag y Au, tienen una amplia banda de absorción en la zona visible del espectro solar electromagnético (Ahmad et al., 2019; Joudeh & Linke, 2022).

Se debe agregar que la caracterización de las nanopartículas y el análisis de las propiedades fisicoquímicas se realiza utilizando diferentes técnicas como espectroscopia UV-Vis, difracción de rayos X (XRD), espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS), infrarrojo (IR), y equipos especializados como el microscopio electrónico de barrido (SEM), y el microscopio electrónico de transmisión (TEM) entre otros (Chamé, 2013).

Síntesis de Nanopartículas

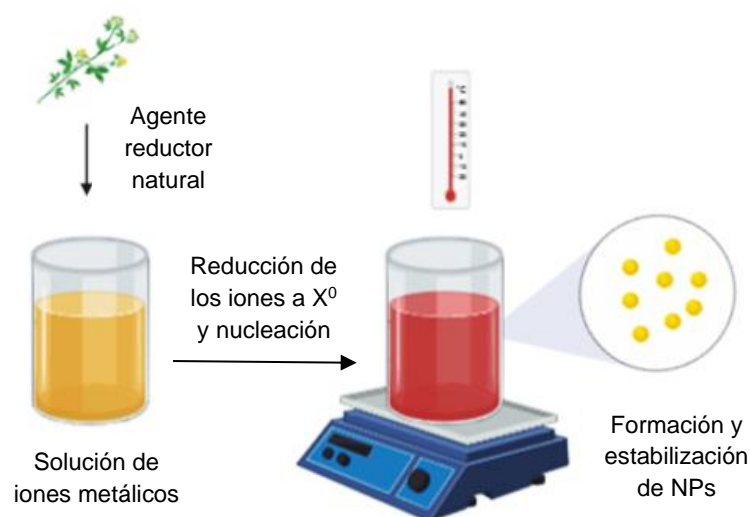
Las NPs se pueden sintetizar por métodos físicos “top-down” (evaporación térmica, molienda) o químicos “bottom-up” (método coloidal - oxido reducción, sol-gel, síntesis solvotermal) en los que intervienen precursores moleculares (Chávez, 2019).

Para la síntesis de nanopartículas metálicas, Chávez, (2019) empleó el método coloidal: óxido-reducción, donde los electrones (e^-) son transferidos del agente reductor (pierde e^-) al agente oxidante (gana e^-) (Chamé, 2013). Simultáneamente, Del Castillo (2019), indica que se requiere un precursor metálico como nitrato de plata (AgNO_3) o trihidrato de ácido tetracloro áurico (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y agentes reductores químicos como borohidruro de sodio (NaBH_4) y citrato (altamente tóxicos).

También se pueden utilizar como agentes reductores extractos orgánicos de plantas o microorganismos, que debido a la presencia de pigmentos naturales o metabolitos secundarios pueden reducir la carga de $\text{Au}^{+1}/\text{Ag}^{+1}$ a Au^0/Ag^0 y formar NPs aplicables en organismos. Este proceso es menos costoso y tiene un menor impacto ambiental durante y después de la síntesis (Arroyo et al., 2020; Dennisse Del Castillo, 2019) (Figura 7).

Figura 7.

Síntesis de verde de nanopartículas metálicas



Nota: Adaptado de “Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir de extracto de damiana (*Turnera diffusa*)” por Ruvalcada et al., (2020), *PCTI* 179.

Nanopartículas de interés

Nanopartículas de plata

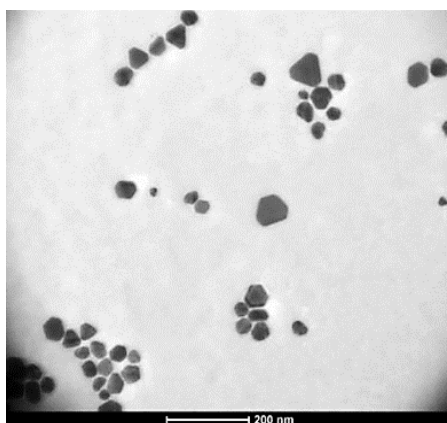
Las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden ser circulares, triangulares, hexagonales y polidispersos a 70°C. El tamaño oscila entre 1 y 100 nm. La absorbancia de las AgNPs en solución varía entre 400 y 445 nm dependiendo de la naturaleza del agente reductor utilizado para su fabricación (Siddiqi et al., 2018). Estas nanopartículas tienen propiedades de conductividad eléctrica, térmica y ópticas, por lo cual son cotizadas en la industria de fotónica, microelectrónica y catálisis (Yaqoob et al., 2020).

Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) exhiben diferentes tamaños (30 - 300 nm) y pueden ser esféricas, hexagonales, multiformes, octaédricas, entre otras (Nafisi & Maibach, 2017). Poseen propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño y la forma, como la baja toxicidad y biocompatibilidad. Presentan una gama de colores (marrón, naranja, rojo y violeta) en solución acuosa a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 1 a 100 nm. El pico de absorción oscila entre 500 y 550 nm, el cual es relativo al tamaño y agentes reductores (Yeh et al., 2012).

Figura 8.

Nanopartículas de plata caracterizadas con TEM



Nota: Síntesis verde de nanopartículas de AgNPs. Adaptado de “Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics” por Arroyo et al. (2020), *Journal of Environmental Science and Health*.

Interacción de las Nanopartículas con cianobacterias

Según Huang et al., (2017) y Gil Martínez (2022), las propiedades fisicoquímicas de las NPs como el tamaño, la forma, la composición química, la carga superficial y estado de oxidación de los componentes; influyen en su interacción con las células y, por lo tanto, en su potencial de toxicidad global.

Arroyo et al. (2020), afirman que el tamaño y el área superficial específica (ASE) influyen en la citotoxicidad. Así, a una misma masa, las NPs más pequeñas tienen un ASE mayor, lo que influye en la disponibilidad para interactuar con componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos y carbohidratos, causando probablemente daños celulares.

Además, la carga superficial afecta la absorción celular y la interacción con orgánulos y biomoléculas; es decir, se producirán mayores interacciones electrostáticas con la célula y mayor capacidad endocítica, cuando es mayor la carga positiva de las NPs (Huang et al., 2017; Khan et al., 2019).

De manera análoga, los efectos de las NPs sobre los microorganismos dependen de la dosis, el tiempo de contacto, las propiedades fisicoquímicas y las condiciones en las que se desarrollan, ya que en ocasiones las NPs pueden hacer sinergia con el medio de cultivo y dañar o lisis las células microbianas (Palencia et al., 2013).

Varios estudios afirman que las NPs se acumulan en la pared celular de las cianobacterias y son adsorbidas por la interacción electrostática; sin embargo, la aglomeración excesiva puede evitar el paso de luz y limitar la capacidad de absorción de nutrientes (Gil Martínez, 2022). Posteriormente, las NPs pueden internalizarse en las cianobacterias de manera activa y pasiva; donde la membrana celular y el tamaño de los poros influye en el transporte bidireccional de las NPs (Gil Martínez, 2022; Nguyen et al., 2020).

Una vez que las NPs entran en contacto con la membrana celular, se internalizan en las cianobacterias mediante: i) la interacción con moléculas lipídicas, alternan el metabolismo de los fosfolípidos perforando la membrana y formando poros nanométricos; ii)

endocitosis; iii) difusión simple; iv) transporte acoplado a proteínas y v) canales iónicos (Mahana et al., 2021).

Si existe una perforación excesiva de la membrana celular, las NPs pueden causar deformación de la estructura o muerte celular. Además, cuando ingresan en los microorganismos, pueden interactuar y liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) disminuyendo el contenido de clorofila y causando estrés oxidativo en las células (Nguyen et al., 2020; Nikokherad et al., 2022).

Las NPs de plata con tamaños menores a 100 nm son partículas nanométricas que fácilmente se pueden internalizar en *F. muscicola* por los mecanismos mencionados por Mahana et al. (2021), sin causar daños en la membrana celular; sin embargo pueden interactuar con mayor facilidad con proteínas, ADN o enzimas, afectando procesos metabólicos vitales (Nguyen et al., 2020)

Por otro lado, las NPs de oro con tamaños entre 30 y 100 nm (AuNPs_F2 y AuNPs_Q) y mayores a 100 nm (AuNPs_F1) son altamente dispersas y micrométricas, respectivamente (Mahana et al., 2021). Es decir, en su mayoría, estas se acumularán en la pared celular o ingresarán por mecanismos como la endocitosis o el rompimiento de la membrana, causando lisis celular.

Técnicas de caracterización

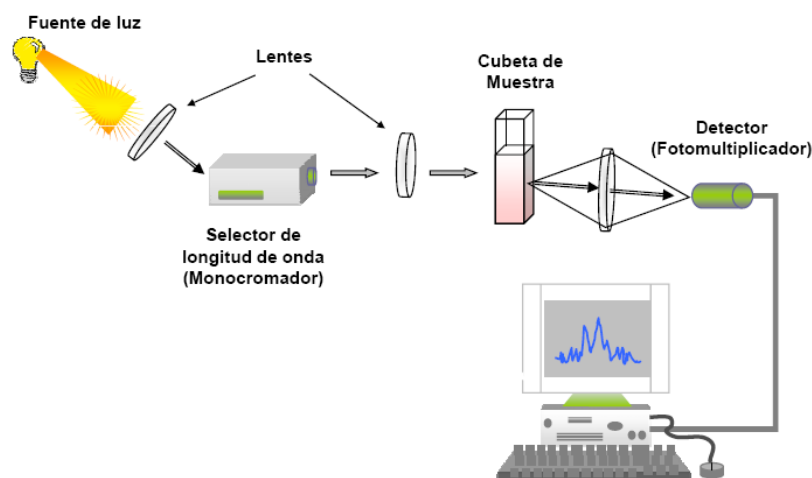
Espectroscopia UV-VIS

La espectroscopía o espectrofotometría ultravioleta-visible se basa en la medición de la energía radiante (luz) que absorbe una sustancia en el espectro visible (390 a 780 nm), ultravioleta y una parte de la región infrarroja inferior. La absorción de la luz se puede utilizar para la caracterización y determinación cuantitativa de moléculas orgánicas, iones inorgánicos o complejos en soluciones. (Abril et al., 2017; Joudeh & Linke, 2022).

El equipo que se encarga de hacer la medición es el espectrofotómetro, cuyos componentes principales son: fuente de luz, portamuestras, dispositivo dispersivo (monocromador) y un detector (MED, 2015) como se observa en la Figura 9.

Figura 9.

Componentes del espectrofotómetro de absorción



Nota: Adaptado de Componentes del Espectrofotómetro de uv-visible por MED, (2015), <https://med.se-todo.com/himiya/9030/index.html?page=6>

Según De Caro & Haller, (2015) el detector en un espectrofotómetro UV-VIS mide la intensidad de la luz de la muestra; donde, la fracción recogida por el detector es la intensidad transmitida (I), la cual es inferior a la intensidad original (I_0) de la luz. La relación entre ambas intensidades es la transmitancia (T) que se representa con la Ecuación 3.

$$T = I/I_0 \quad (3)$$

A partir de este valor se puede calcular la absorbancia (A), que es adimensional, como se muestra en la Ecuación 4. La absorbancia indica la cantidad de luz absorbida por la sustancia, la misma que depende de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste (Abril et al., 2017).

$$A = -\log(T) \quad (4)$$

No obstante, el cálculo de la absorbancia a partir de la Ley de Lambert-Beer (ecuación 5) es indispensable cuando se requiere determinar la concentración de la muestra, porque A y T son directamente proporcionales (De Caro & Haller, 2015).

$$A = \log(I/I_0) = \varepsilon * C * d \longrightarrow C = A/(\varepsilon * d) \quad (5)$$

Donde: ε es el coeficiente de extinción (constante específica que describe cuanto absorbe la muestra a una longitud de onda [L/cm· mol]), d es la longitud de la trayectoria de la cubeta [cm] y C es la concentración de la muestra [mol L⁻¹] (De Caro & Haller, 2015).

Según Jill (2022), la espectroscopía UV-Vis es una técnica poco sensible debido a que, en una longitud de onda corta, la luz emitida no es absorbida en su totalidad. Además, si la muestra está muy concentrada superando el rango de absorbancia máxima del espectrofotómetro, o muy diluida (solución incolora) los resultados son poco contundentes. Por otro lado, factores como el pH, la concentración de sales y el disolvente modifican la carga de las moléculas y los espectros UV se desplazan (Abril et al., 2017).

En la presente investigación se analizó las NPs y los medios residuales de las cianobacterias híbridas con espectroscopía UV-Vis, que mide la transición de los electrones del estado fundamental al estado excitado (Joudeh & Linke, 2022) para determinar la adherencia de las nanopartículas a *F. muscicola* y la presencia o ausencia de éstas en el medio remanente.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

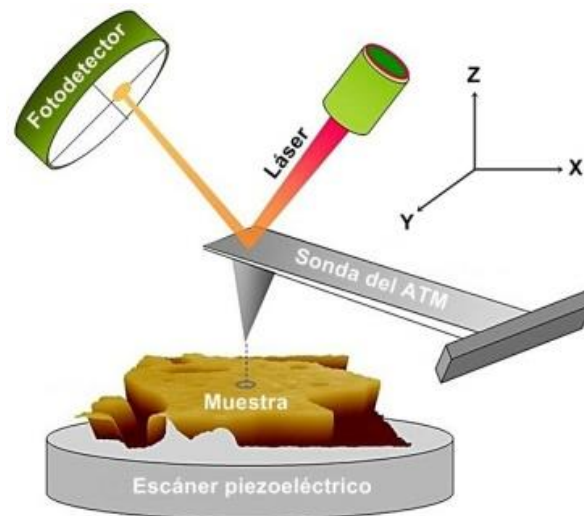
El microscopio de fuerza atómica (AFM) es un tipo de microscopio de sonda de barrido (SPM), que usa una sonda fina o punta afilada para barrer la superficie de la muestra en lugar de usar electrones o un haz de luz (Vahabi et al., 2013).

Se puede aplicar para mediciones directas de fuerzas intermoleculares con caracterización de resolución atómica en electrónica, materiales semiconductores, polímeros, biología y biomateriales; así como para la caracterización de propiedades mecánicas, eléctricas, la detección de contaminación y la verificación de los cambios en la composición de un material (Jalili & Laxminarayana, 2004).

A diferencia de la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), AFM requiere una preparación mínima de la muestra pero permite obtener imágenes en 3D, y proporciona una visión única de la estructura y el comportamiento funcional de los materiales (Liu & Wang, 2011) (Figura 10).

Figura 10.

Principio del funcionamiento del AFM



Nota: Adaptado de “A Review of the Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in Food Science and Technology” por Liu & Wang, (2011), *Advances in Food and Nutrition Research*.

AFM es una herramienta para obtener detalles nanoestructurales y propiedades biomecánicas de muestras biológicas, incluidas biomoléculas y células. Además, mide los cambios en las propiedades mecánicas de la membrana celular, la rigidez, adhesión y viscoelasticidad celular. La ventaja de esta técnica es permitir el estudio de muestras biológicas en su entorno natural (*in vitro*, *in situ* e *in vivo*) (Vahabi et al., 2013).

La microscopía de fuerza eléctrica (EFM) y las imágenes de potencial de superficie (SP) son dos técnicas de AFM que caracterizan los materiales por sus propiedades electromagnéticas. Una punta de AFM conductora interactúa con la muestra a través de fuerzas de Coulomb de largo alcance, cambiando la amplitud de oscilación y creando imágenes EFM o SP, debido a que la frecuencia o amplitud está relacionada con el gradiente del campo eléctrico entre la punta y la muestra (Jalili & Laxminarayana, 2004).

Con esta técnica, es posible determinar la Energía de la luz (E) empleando la Ecuación 5, donde h es la constante de Planck ($h= 6.62607015 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$), C es la velocidad de la luz ($C= 2.998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) y λ es la longitud de onda (μm) (Honsberg & Bowden, 2022).

$$E = h * C / \lambda \quad (6)$$

Así mismo, varios estudios afirman que las NPs se acumulan en la pared celular de los microorganismos, haciendo que las micrografías reflejen una intensidad alta y en modo EFM formen ondas definidas; debido a la carga energética de las NPs (Vahabi et al., 2013).

Por lo tanto, en el proyecto se analizará mediante el uso del microscopio de fuerza atómica (AFM) las imágenes EFM de la cianobacteria con y sin nanopartículas para la caracterización eléctrica y morfológica.

Voltamperometría cíclica

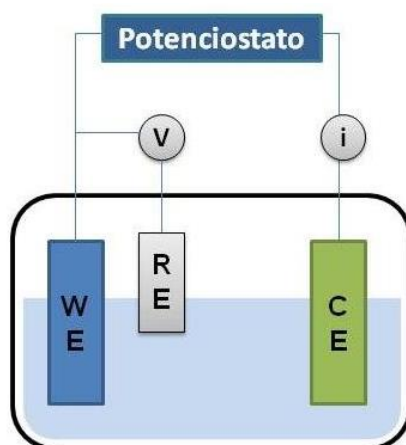
La voltamperometría o voltametría cíclica (CV) es una técnica empleada para un análisis inmediato de los sistemas electroquímicos de la forma, posición y tiempo-comportamiento de los voltamogramas experimentales. Los análisis de CV proporcionan información sobre la naturaleza difusiva o adsorptiva del proceso del electrodo, sus parámetros cinéticos y termodinámicos, así como la existencia y características de reacciones químicas homogéneas acopladas, de especies y superficies electroactivas y ciertos mecanismos de reacción y constantes de velocidad (Compton et al., 2014).

Según Joudeh & Linke (2022), esta técnica mide la respuesta de las soluciones redox a un barrido de potencial cíclico entre dos valores establecidos, y junto con técnicas de aplicación de un potencial constante (cronoamperometría) y el análisis de la intensidad de corriente eléctrica y carga (cronoculombimetría) es posible determinar el número de electrones involucrados, el área electroquímicamente activa, los coeficientes de difusión de especies electroactivas o elementos de la reacción redox (Huamán Aguirre, 2016; Inel et al., 2014; Rojas, 2017).

La voltametría cíclica requiere 3 electrodos: de trabajo (WE), referencia (RE) y contraelectrodo (CE), que se introducen en una celda electroquímica con una solución electrolítica; donde, el electrodo de trabajo, al experimentar un voltaje excesivo, cicla su potencial y permite medir la corriente resultante (Joudeh & Linke, 2022) como se muestra en la Figura 11.

Figura 11.

Esquema de una celda electroquímica utilizada para las mediciones de voltametría cíclica.

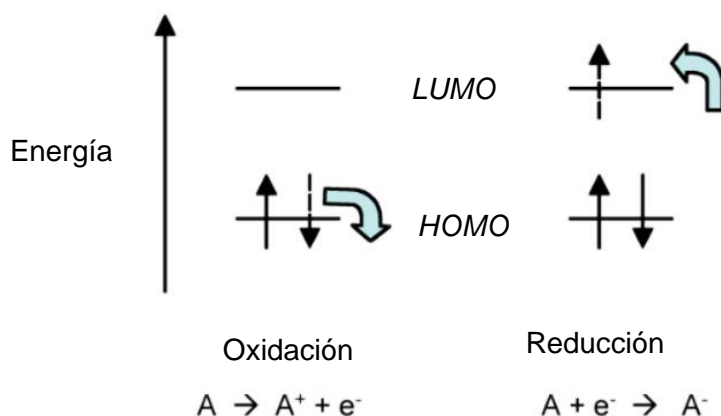


Nota: Adaptado de “Electrodos nanoestructurados de TiO₂/MgO aplicados a celdas solares sensibilizadas con colorante” por (Huamán Aguirre, 2016)

Cabe recalcar que, esta técnica permite evaluar los potenciales en los que ocurre un proceso redox (cambio de energía), y con ello, las propiedades fotovoltaicas del compuesto, analizando el *band gap* (diferencia de energía entre dos orbitales moleculares) y los valores energéticos *HOMO* (Highest Occupied Molecular Orbital) y *LUMO* (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) (Galindo, 2014) como se observa en la Figura 12.

Figura 12.

Relación de *HOMO* y *LUMO* en los procesos redox



Nota: Adaptado de “Determinación de los niveles *HOMO-LUMO* mediante voltamperometría cíclica” por Galindo, (2014).

HOMO es el orbital molecular ocupado de mayor energía que se obtiene por los potenciales de oxidación y el *LUMO* es el orbital molecular desocupado de menor energía que se determina por el potencial de reducción con la técnica de voltametría cíclica (Galindo, 2014; Huamán Aguirre, 2016). En un proceso redox, los electrones de las sustancias donadoras llenan los orbitales moleculares *LUMO*; mientras que, los aceptores de electrones, al retirar las cargas de los orbitales *HOMO* producen huecos libres en la red (de León Santillán, 2010). Este mecanismo otorga alta conductividad en las moléculas orgánicas, por lo cual, es posible cuantificar las propiedades electrónicas y comprender la reactividad de la molécula. Sin embargo, si el proceso no es reversible, el valor de *HUMO* no se puede calcular con esta técnica de caracterización electroquímica (de León Santillán, 2010; Galindo, 2014; Huamán Aguirre, 2016).

La Ecuación 6 describe la relación entre *HOMO*, *HUMO* y la energía de *gap* (E_g); donde, I_p representa el potencial de ionización, E_a la afinidad del electrón y E_{ox}/E_{red} , el potencial de oxidación (ox) o reducción (red) (Galindo, 2014).

$$HOMO = I_p = -(E_{ox} + 4,4) \text{ eV}$$

$$LUMO = E_a = -(E_{red} + 4,4) \text{ eV}$$

$$E_g = I_p - E_a \quad (7)$$

Así mismo, Galindo (2014), sugiere que, a mayor energía en el orbital *HOMO*, mayor tendencia de la molécula a donar electrones; sin embargo, para que el transporte de huecos sea factible termodinámicamente, la distancia entre el *HOMO* (donador) y el *HOMO* (aceptor) no debe ser menor que 0,4 eV. Este valor corresponde a la energía de enlace “binding” del excitón, energía mínima necesaria para que el hueco evite la atracción coulombiana y la celda electroquímica tenga una buena conductividad (de León Santillán, 2010).

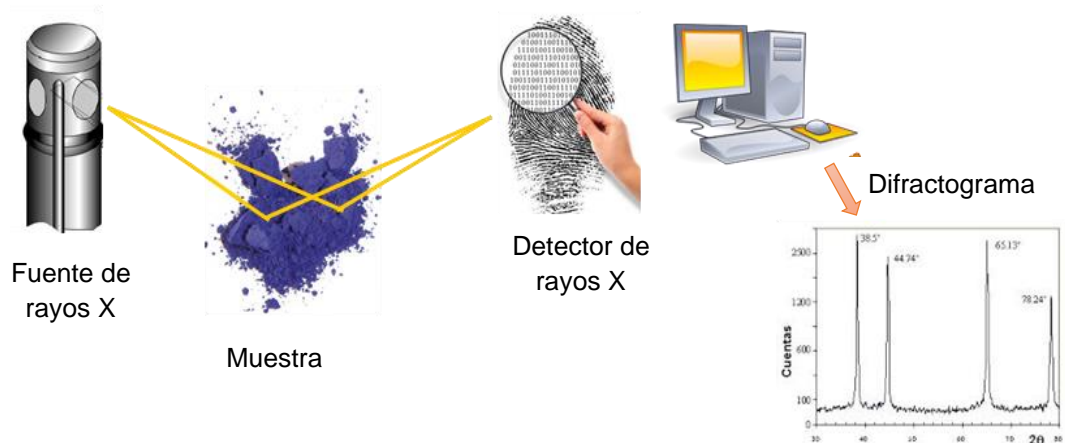
En la presente investigación, se utilizará voltametría cíclica para analizar los procesos redox de las cianobacterias sin nanopartículas y las cianobacterias híbridas, determinando la capacidad electroquímica (oxidativa o reductiva) del cultivo celular con un potencial anódico y catódico y estableciendo la intensidad de la corriente generada con la liberación de electrones.

Método de difracción con rayos X (XRD)

La difracción con rayos X (XRD) es una técnica de caracterización para materiales a nanoescala, basada en irradiar un material con rayos X incidentes generados por un tubo de rayos catódicos. Con XRD se puede detectar materiales que incluyen líquidos, metales, minerales, polímeros, catalizadores, plásticos, productos farmacéuticos, cerámica y semiconductores (Bunaciu et al., 2015). En este proceso se liberan electrones que son dirigidos hacia la muestra, y luego se miden los ángulos de dispersión y las intensidades de los rayos X (Joudeh & Linke, 2022). Se debe agregar que, la interacción de los rayos incidentes con la muestra produce interferencia (rayo difractado) (Bunaciu et al., 2015) como se observa en la Figura 13.

Figura 13.

Difracción de Rayos X



Nota: Adaptado de Difracción de rayos X por García et al., (2020), *X-Ray Data Service*

La difracción de rayos X ocurre si existe una disposición adecuada de los átomos y las condiciones expresadas por la Ley de Bragg (Ecuación 7) que relaciona la longitud de onda y la distancia interatómica con el ángulo de incidencia del haz difractado. En consecuencia, la interferencia es de naturaleza constructiva y se generan los difractogramas con la información de los componentes del material de estudio (García et al., 2020)

$$n * \lambda = 2d * \text{sen}\theta \quad (8)$$

Esta técnica proporciona información complementaria a varios métodos microscópicos y espectroscópicos, como la identificación de las fases, la pureza de la muestra, el tamaño del cristalito, y en algunos casos la morfología (Holder & Schaak, 2019). No obstante, la técnica XRD es limitante en ciertos casos porque el material objetivo debe ser convertido a polvo.

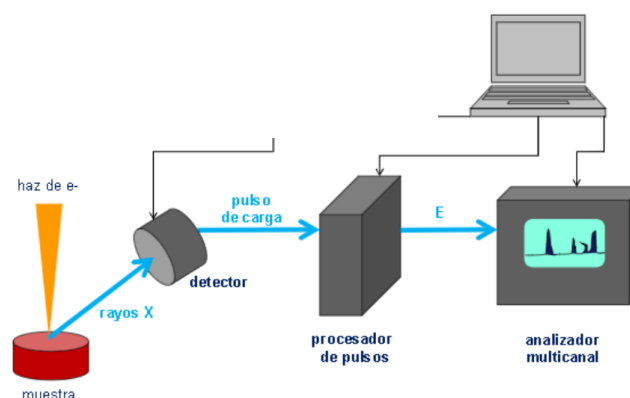
Es así que, en el caso de muestras con características muy amorfas, con distancias interatómicas variadas o cuando las NPs son más pequeñas que varios cientos de átomos, la resolución y precisión de los difractogramas se ve afectada (Joudeh & Linke, 2022). Además, si no se cumple la ley de Bragg, la interferencia es no constructiva y el campo del haz difractado es de muy baja intensidad (García et al., 2020).

Espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS)

La espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS/EDX) es una técnica de análisis asociada a la microscopía electrónica basada en la irradiación de la muestra con un haz de e^- , que inciden en la superficie del material y expulsan e^- de la capa interna. Esto genera una transición de e^- de la capa externa hacia la interna para suplir el vacío, generando así rayos X (fotones altamente energéticos) que revelan la presencia de elementos en la muestra (Joudeh & Linke, 2022) (Figura 14).

Figura 14.

Principios del análisis por EDS



Nota: Adaptado de “Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) - Espectrometría de dispersión de longitud de onda de rayos X (WDS)” por Franco, (2012).

La técnica EDS/EDX se puede utilizar en la determinación de elementos endógenos o exógenos, ya sea a nivel tisular o celular e inclusive en estudios de contaminación ambiental, de fármacos y en la caracterización de minerales (Scimeca et al., 2018).

El espectro EDS contiene información cualitativa y semicuantitativa ya que predice los elementos químicos de la muestra, y, dependiendo de la intensidad de los picos, da una estimación relativa de la abundancia de cada elemento (Joudeh & Linke, 2022).

No obstante, en esta técnica, todas las muestras deben ser analizadas al vacío, deshidratadas y criofijadas; además, no es posible distinguir entre especies iónicas y no iónicas, y la superposición de picos (interferencia entre elementos) causa problemas en el análisis (Girão et al., 2017).

Finalmente, se emplearán las técnicas de XRD y EDS para caracterizar los medios residuales de las cianobacterias con y sin nanopartículas; con lo cual se busca determinar la abundancia relativa de los elementos químicos (Au, Ag) presentes en los ensayos mencionados.

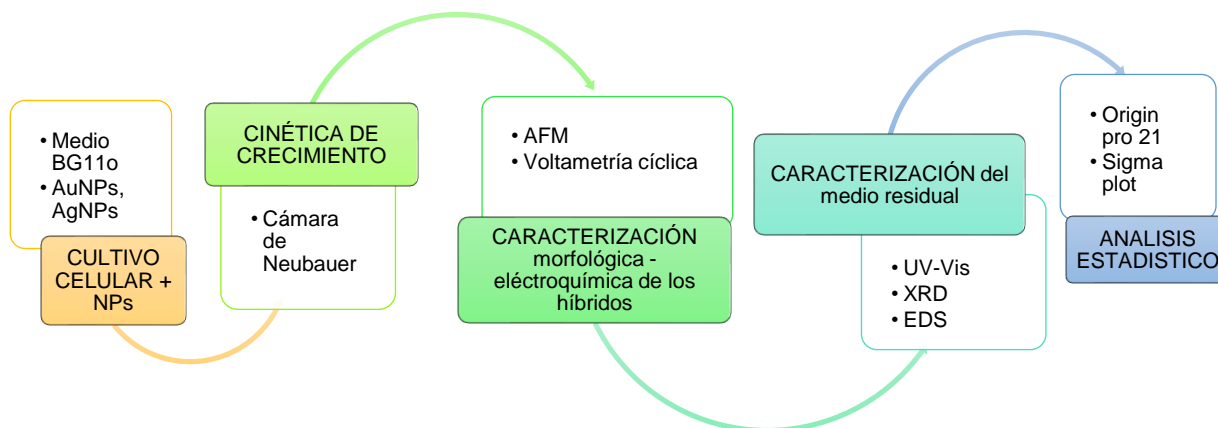
Capítulo III: Materiales y Métodos

En esta investigación, se realizó el siguiente plan de trabajo (Figura 15): Se escaló el cultivo celular de *F. muscicola* en condiciones adecuadas y se hibridó la cianobacteria con AgNPs y AuNPs. Se analizó la cinética de crecimiento realizando conteo celular de los tratamientos.

Posteriormente, se caracterizó morfológica y eléctricamente los cultivos híbridos con las técnicas de AFM y voltametría cíclica para determinar la interacción de las NPs con de *F. muscicola* y comprender la optimización de la producción de energía. Así mismo, se caracterizó lo medios residuales con las técnicas de UV-Vis, XRD y EDS para verificar la adherencia de las NPs a las cianobacterias. Finalmente, se realizó el análisis estadístico de los resultados con los softwares OriginPro 2021b y SigmaPot 14.0.

Figura 15.

Diseño experimental y metodología del trabajo



Nota: (Soria, 2022).

Organismo de estudio

El organismo de estudio fue *F. muscicola*, una cianobacteria previamente aislada de la fuente geotermal de Papallacta en el laboratorio de Microbiología Ambiental (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por Naranjo, (2017).

Inicialmente se tomó una alícuota de 2 mL del cultivo madre y se colocó en 30 mL de medio fresco BG110, preparado como se describe en la Tabla 1. Se estandarizaron las

condiciones de crecimiento de *F. muscicola*, con una agitación manual de dos veces al día en matraces cerrados a temperatura ambiente (18 - 26 °C), con un fotoperiodo de 12 h luz - 12 h oscuridad y con una renovación del medio cada 14 días. Posteriormente se escaló el cultivo de la cianobacteria hasta obtener un volumen de biomasa de 2 L para los ensayos posteriores.

Tabla 1.

Preparación del medio de cultivo BG11o.

No	Reactivo	Stocks	Unidades
1	K ₂ HPO ₄	2	g 500 mL ⁻¹
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,75	g 500 mL ⁻¹
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8	g 500 mL ⁻¹
4	C ₆ H ₈ O ₇	0,3	g 500 mL ⁻¹
5	C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,3	g 500 mL ⁻¹
6	EDTANa ₂	0,05	g 500 mL ⁻¹
7	Na ₂ CO ₃	1	g 500 mL ⁻¹
	H ₃ BO ₃	2,86	
Solución	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	
de	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	
metales	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	gL ⁻¹
traza	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05	

Nota: Para preparar 1000 mL, se colocan 10 mL de los stocks 1-7, y 1 mL, de la solución de metales traza. Se esteriliza con vapor húmedo a 15 psi y 121°C durante 20 minutos.

Adaptado de “Análisis de la absorción de nanopartículas de plata por la cianobacteria *F. muscicola* en diferentes medios de cultivo para su aplicación en energía” por Del Castillo, (2019).

Nanopartículas

Se emplearon nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs), sintetizadas con agentes reductores naturales de dos flores denominadas en este trabajo F1 y F2; y nanopartículas de oro sintetizadas con un agente reductor químico (citrato(Q)). Las NPs fueron estabilizadas y caracterizadas en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT- ESPE) por la Ing. Geovanna Arroyo. Las NPs presentan las características descritas en la Tabla 2 y en la Figura 16.

Tabla 2.

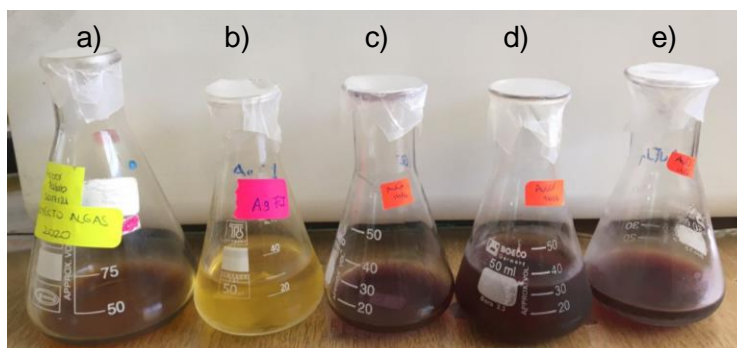
Características de nanopartículas sintetizadas con agentes reductores naturales

No	Nanopartículas	Concentración (mg mL ⁻¹)	Tamaño (nm)
a	AgNPs_F1	0,9	8-70
b	AgNPs_F2	0,3	5-30
c	AuNPs_F1	0,25	30-300
d	AuNPs_F2	0,75	20-150
e	AuNPs_Q	0,2	30-115

Nota: Información proporcionada por la Ing. Geovana Arroyo, (Soria, 2022)

Figura 16.

Nanopartículas sintetizadas en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT)



Nota: Síntesis verde de nanopartículas de: **a)** AgNPs_F1; **b)** AgNPs_F2; **c)** AuNPs_F1; **d)** AuNPs_F2; **e)** Síntesis química de AuNPs_Q. (Soria, 2022).

Ensayo de cultivos híbridos

Una vez obtenida la biomasa suficiente de *F. muscicola*, se realizaron los ensayos de los cultivos híbridos. Se establecieron 8 tratamientos por duplicado (Figura 17), con la biomasa de *F. muscicola* en medio de cultivo BG11o + NPs de plata en concentraciones de 0.022 mg mL⁻¹ y oro a concentraciones de 0,022 y 0,044 mg mL⁻¹ como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3.

Ensayo de cultivos híbridos

Concentración de NPs	Tipos de NPs					Control
	AgNPs		AuNPs			
0,022 mg mL ⁻¹	Agente reductor	Agente reductor	Agente reductor	Agente reductor	Agente reductor	<i>F.</i> <i>muscicola</i> sin NPs
	F1	F2	F1	F2	citrato	
0,044 mg mL ⁻¹	-	-	Agente reductor	Agente reductor	Agente reductor	sin NPs
			F1	F2	citrato	

Nota: Se incluyeron 4 repeticiones de *F. muscicola* sin nanopartículas (control) para mejorar los resultados obtenidos (Soria, 2022).

Cabe mencionar que no se realizó el ensayo de AgNPs a 0,044 mg mL⁻¹ (Tabla 3). Según Del Castillo (2019) *F. muscicola* se adapta favorablemente a diferentes concentraciones de AgNPs; en cambio, Arroyo et al. (2020), sugieren que las NPs de oro presentan menos toxicidad, motivo por lo cual es de interés analizar la adaptación de la cianobacteria a diferentes concentraciones de AuNPs.

Las condiciones de crecimiento se mantuvieron como se indicó en el apartado de organismo de estudio durante 60 días (Figura 17).

Durante el desarrollo del ensayo, se realizó la renovación del medio de cultivo BG11o suplementado con nanopartículas cada 14 días y se monitoreó el estado celular de

la cianobacteria con las diferentes NPs en el microscopio óptico OLYMPUS CX-21FS1 utilizando el lente objetivo 100x.

Figura 17.

Ensayo de cultivos híbridos de F. muscicola con diferentes NPs



Nota: Se observa 8 tratamientos con NPs, y 4 controles de *F. muscicola* (Soria, 2022).

Cinética de crecimiento

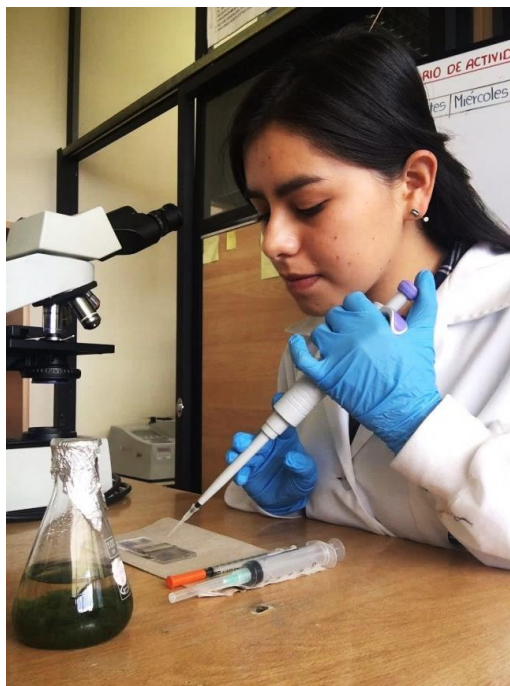
Varias investigaciones han analizado el impacto de las NPs en las cianobacterias; tanto en su crecimiento como en su metabolismo celular (Mahana et al., 2021); por lo cual, se analizó la cinética de crecimiento durante 60 días. Se realizó el recuento celular con la Cámara de Neubauer marca MARIENFELD.

Debido a que las cianobacterias tienden a agregarse (Dennisse Del Castillo, 2019), previo al recuento celular, se homogenizaron los cultivos hasta disgregar completamente las células y se tomó una alícuota para el análisis del cultivo celular. En ciertos periodos del ensayo, existió un aumento excesivo de biomasa en relación con la cantidad de medio BG110; por lo que fue necesario hacer diluciones 1:2, 1:5, y 1:10. De la alícuota, se tomó el volumen adecuado de muestra, se diluyó en agua desionizada estéril y se homogenizó nuevamente. Posteriormente se depositó 10 μ L en cada lado de la cámara de Neubauer para visualizar las células en el microscopio óptico OLYMPUS CX-21FS1 utilizando el lente objetivo 40x (Figura 18). Se contabilizó el número de células presentes en los 4 cuadrantes

y se calculó la concentración de células por mililitro de medio (cell mL^{-1}) utilizando la Ecuación 1.

Figura 18.

*Metodología para el recuento celular de *F. muscicola**



Nota: (Soria, 2022).

Caracterización de los organismos híbridos

Para la caracterización de los organismos híbridos, tanto con AFM, como con voltametría cíclica (CV), se seleccionaron los tratamientos con los mejores resultados de crecimiento celular (ver Figura 26 y 27). En este sentido, se analizaron únicamente los ensayos con concentraciones de $0,022 \text{ mg mL}^{-1}$ de NPs.

Caracterización morfológica y eléctrica mediante AFM/EFM

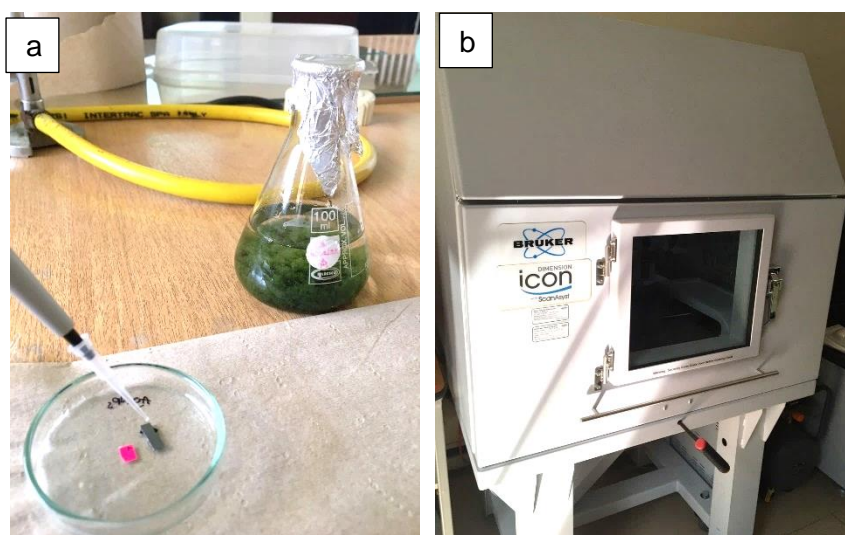
Para la caracterización morfológica y eléctrica, se preparó la muestra el mismo día para observar células vivas y muertas. Previamente, se limpió los sustratos (obleas de silicio) siguiendo el protocolo utilizado en el CENCINAT, que implica un lavado con detergente, agua desionizada, cetona y alcohol isopropílico y sonicaciones durante 7

minutos con pulsaciones de 10 segundos. Se almacenaron los sustratos en agua desionizada a 4°C.

Para colocar las muestras en las obleas de silicio, se siguió el protocolo de homogenización y dilución descrito para el recuento celular. Se añadió 10 μL de la muestra en los sustratos (Figura 19a) y se secó con nitrógeno. Se realizó el análisis utilizando el Microscopio de Fuerza Atómica Dimension icon with ScanAsyst de marca *Bruker* (Figura 19b), en modo EFM sin la aplicación de potencial, con una punta de silicio (Si) dopado de antimonio (n) (0,01- 0,025 Ωcm) con las siguientes especificaciones: frecuencia (75 kHz), radio del cantiléver (28 μm), fuerza 2,8 N m^{-1} .

Figura 19.

Análisis de muestras en AFM



Nota: a) Preparación de las muestras para AFM; b) Microscopio de Fuerza Atómica Bruker, (Soria, 2022).

Además, se obtuvo 3 micrografías EFM de cada tratamiento, y con el software Overlay (MIRO), se tomó datos de la longitud de onda (μm) del medio de cultivo BG11o y de la cianobacteria viva y muerta, para analizarlos posteriormente.

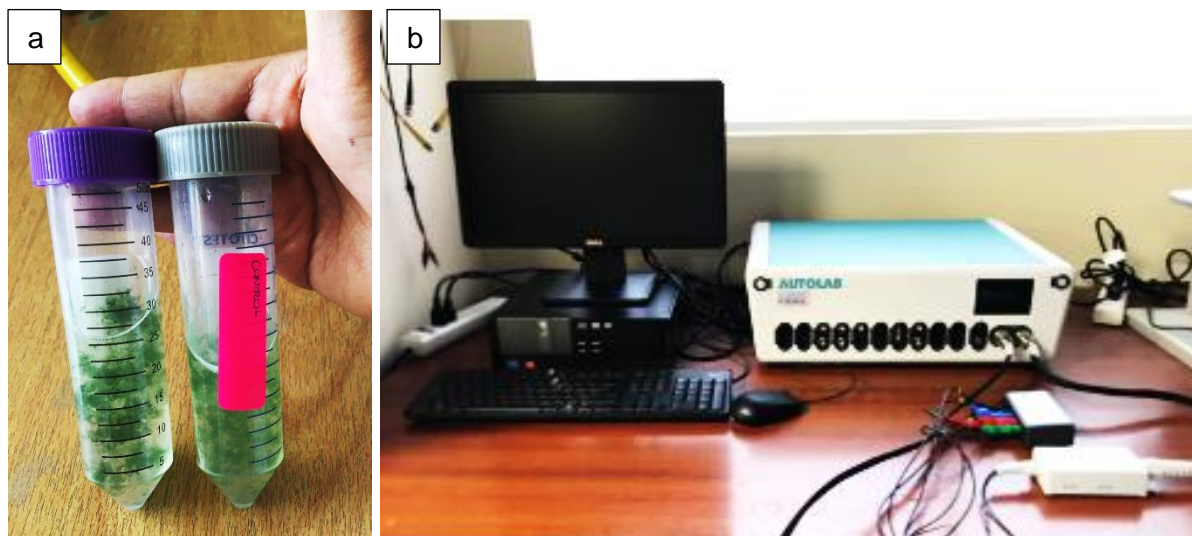
Caracterización electroquímica con voltametría cíclica

La caracterización electroquímica con la técnica de voltametría cíclica se realizó en colaboración con la Escuela Politécnica Nacional (EPN) en el Laboratorio de Materia

Condensada (Departamento de Física - Facultad de Ciencias) con el Potenciostato marca Metrohm -Autolab AUT87919 equipado con un sistema de tres electrodos: el de referencia (Ag/AgCl), el contraelectrodo (Platino) y el electrodo de trabajo (Carbono vítreo); y el software NOVA 2.1.5 (Figura 20)

Figura 20.

Metodología y equipo empleado para el análisis de voltametría cíclica



Nota: **a)** Alícuota con 1×10^6 cell mL^{-1} de *F. muscicola* con y sin NPs; **b)** Potenciostato disponible en el Laboratorio de Materia Condensada - Escuela Politécnica Nacional (EPN). (Soria, 2022).

Inicialmente, se colocó 50 mL de KCl a 0,1 mM; una vez que se obtuvo la línea base adecuada en un rango de detección de -0.8 V a 0.8 V, con un potencial eléctrico de $0,1 \text{ V s}^{-1}$; se añadieron 100 μL , 200 μL , 400 μL , 800 μL , 1600 μL y 3200 μL del medio de cultivo BG11o para obtener los voltamogramas en cada volumen añadido.

Así mismo, para el análisis de *F. muscicola* con los diferentes tratamientos y sin NPs, se tomó una alícuota con 1×10^6 cell mL^{-1} en 30 mL de medio BG11o; se homogenizó las muestras y se corrió a los diferentes volúmenes mencionados.

Caracterización del medio de cultivo residual

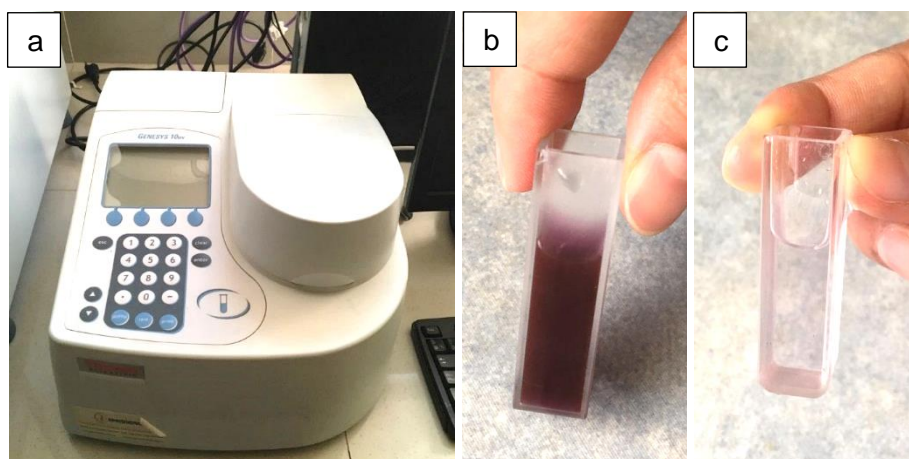
El medio residual desechado cada 14 días fue almacenado en frascos de 100 mL a 4°C. Este medio remanente se empleó para verificar si existen nanopartículas, células de la cianobacteria *F. muscicola* o el híbrido muerto.

Espectroscopia UV-Vis

Se utilizó el Espectrofotómetro marca Thermo GENESYS 10 VUV/VIS 2L3L261002 y el Software VISIONlite Scan Version 2.2 (Figura 21a).

Figura 21.

Caracterización del medio residual con espectroscopia UV-VIS



Nota: **a)** Espectrofotómetro Thermo GENESYS 10; **b)** Muestra de AgNPs_Q; **c)** Medio residual de *F. muscicola* con AuNPs_Q analizado a los 35 días (Soria, 2022).

Se empleó agua desionizada como blanco y en cada análisis, se tomaron 3 mL del medio residual acumulado a los 35 días, se colocó en una celda de cuarzo y se midió la absorción en una longitud de onda de 200 a 750 nm. Además, se realizaron lecturas de los espectros de las NPs de Au y Ag antes de ser depositadas en los cultivos de *F. muscicola*, para comparar los resultados del medio residual y las NPs.

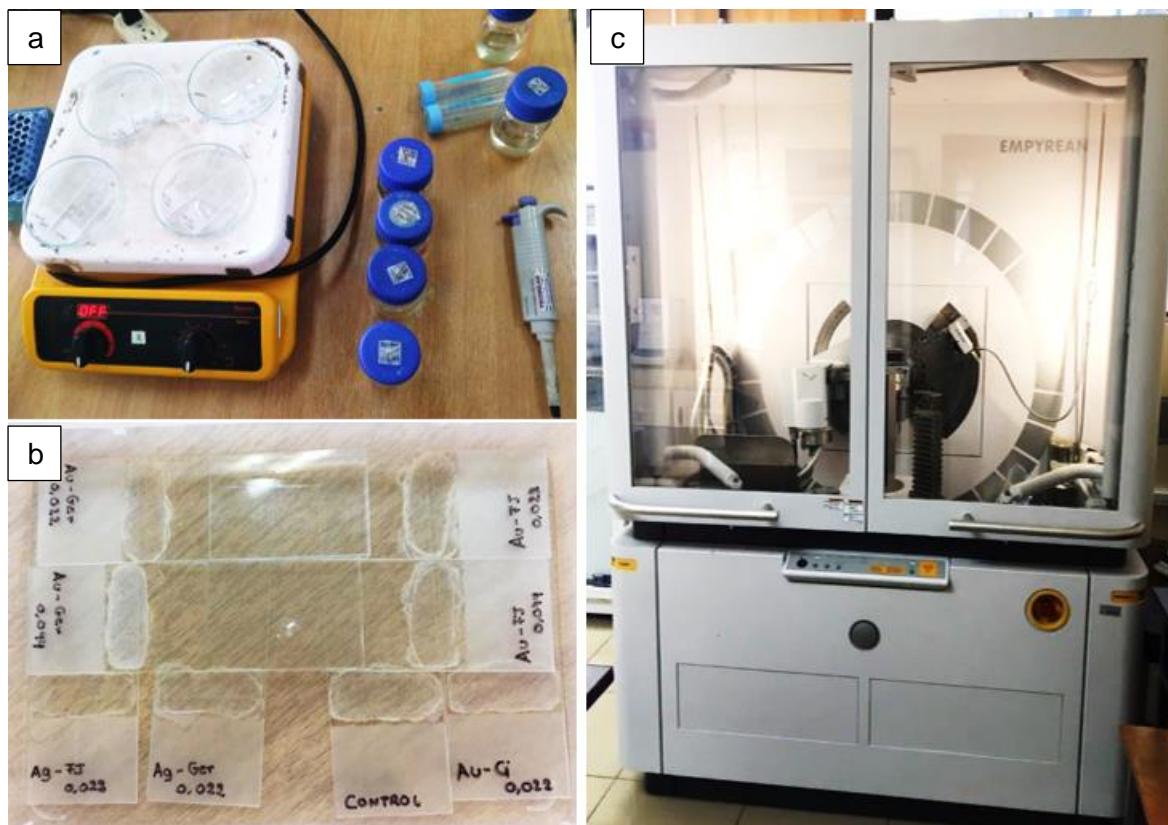
Técnica de XRD

En la preparación de las muestras se colocaron 300 μ L de cada medio residual en placas de vidrio y se secaron en planchas de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos

(Figura 22a); se redujo la temperatura a 5 °C, para evitar que se calcine la muestra y se añadió más medio remanente hasta formar una película blanquecina (Figura 22b).

Figura 22.

Preparación de muestras y caracterización del medio residual con XRD



Nota: **a)** y **b)** Preparación de muestras para XRD; **c)** Equipo PANalytical EMPYREAN, (Soria, 2022).

Posteriormente, se analizó las muestras con el equipo PANalytical EMPYREAN (Figura 22c), que opera en una configuración θ -2 θ , con un tubo de rayos X de cobre (radiación $K\alpha_1=1,54056 \text{ \AA}$) a 45 kV y 40 mA (Arroyo, 2018) y el software HighScore Plus para comprobar si los difractogramas reflejan los picos característicos de las NPs de oro o plata.

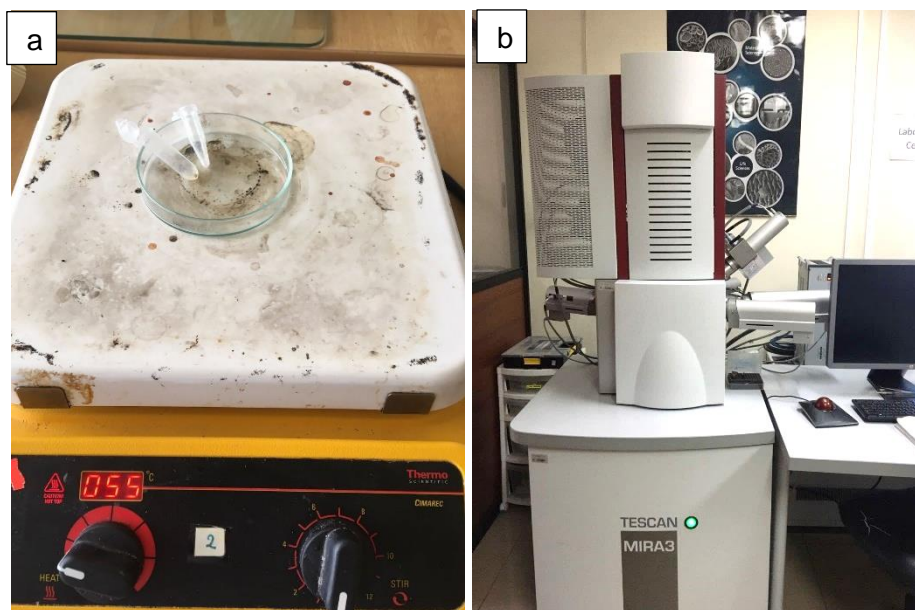
Técnica de EDS

Para el análisis de la composición fisicoquímica del medio de cultivo remanente se preparó las muestras centrifugando 30 mL de cada tratamiento a 3500 rpm durante 20 minutos; posteriormente, se tomó el precipitado y se centrifugó nuevamente en tubos

ependorf; repitiendo el procedimiento hasta obtener un precipitado de al menos 1 mL. Consecutivamente, se desechó el sobrenadante y se dejó secar en planchas de calentamiento regulando la temperatura entre 45 y 75 °C para evitar el daño de la muestra por exceso de temperatura (Figura 23a).

Figura 23.

Análisis del medio residual con la técnica de EDS.



Nota: a) Preparación de muestras EDS; b) Equipo FEG-SEM TECAN MIRA 3. (Soria, 2022).

Se adhirió las muestras a cintas de carbono recubriéndolas con una película fina de oro para realizar el análisis bajo vacío en 5 regiones puntuales a 100X con el microscopio electrónico de barrido FEG-SEM TECAN MIRA 3 con detector EDS y el software Quantax 200 Espirit, versión 1.9.9.3488.

Análisis estadístico

Se procesó los resultados obtenidos del crecimiento celular, AFM, Voltametría cíclica, espectrofotometría UV-VIS, XRD y EDS en el software estadístico Origin Pro 2021b.

En el caso particular del crecimiento celular de los cultivos híbridos de *F. muscicola* con nanopartículas de oro y plata, se establecieron las curvas de crecimiento con respecto al tiempo. Se realizó un ANOVA de una vía (método *Kruskal -Wallis*) con un nivel de significancia de $p < 0,05$ y un tratamiento post-hoc para comparaciones múltiples de las

concentraciones de $0,022 \text{ mg mL}^{-1}$ y 0.44 mg mL^{-1} con respecto al control (Método de Dunn), utilizando el software SigmaPot 14.0. En complemento, para comparar los tratamientos de Au (F1, F2 y químico) de cada concentración, se ejecutó un ANOVA de dos vías (factor A: tratamiento de NPs de Au; factor B: concentración) y un análisis post-hoc con el método Holm-Sidak (nivel de significancia $p < 0,05$). Para verificar los supuestos de Normalidad y Homocedasticidad, se empleó el test Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe, respectivamente.

Utilizando las longitudes de onda (μm) de las micrografías EFM, se calculó la energía con la Ecuación 6. Del mismo modo, se realizó un ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) con un nivel de significancia de 0,05, tanto para la cianobacteria viva, muerta, y del medio de cultivo; y se comparó los tratamientos con el test Tukey en el software SigmaPot 14.0 para identificar los híbridos con mayor energía.

Los datos obtenidos con EDS de las 5 regiones puntuales se promediaron, y se graficaron en Origin Pro 2021b. Mientras tanto, los porcentajes de los elementos presentes en el medio remanente se compararon estadísticamente en el software SigmaPot 14.0.

Con respecto a los porcentajes de plata, se efectuó un análisis ANOVA de una vía con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Por otro lado, los porcentajes de oro fueron normalizados logarítmicamente y se realizó un análisis ANOVA de dos vías cumpliendo los supuestos de normalidad (Test Shapiro-Wilk; $p = 0,109$) y homocedasticidad (Test Brown-Forsythe; $p = 0,363$), incluyendo un post-hoc (Método Holm-Sidak) con un nivel de significancia de 0,05 para comparar los tratamientos vs la concentración.

Cabe recalcar que para los resultados de voltametría, espectrofotometría UV-VIS y XRD no se realizó ningún análisis estadístico; sin embargo, en los voltamogramas se obtuvo los valores de *HOMO* con el software Origin Pro 2021b y la ecuación 7. Para analizar los valores de *HOMO*, se tomó como referencia el electrodo de Óxido de indio-estaño (ITO) de gran interés para futuras investigaciones (Cahya et al., 2015).

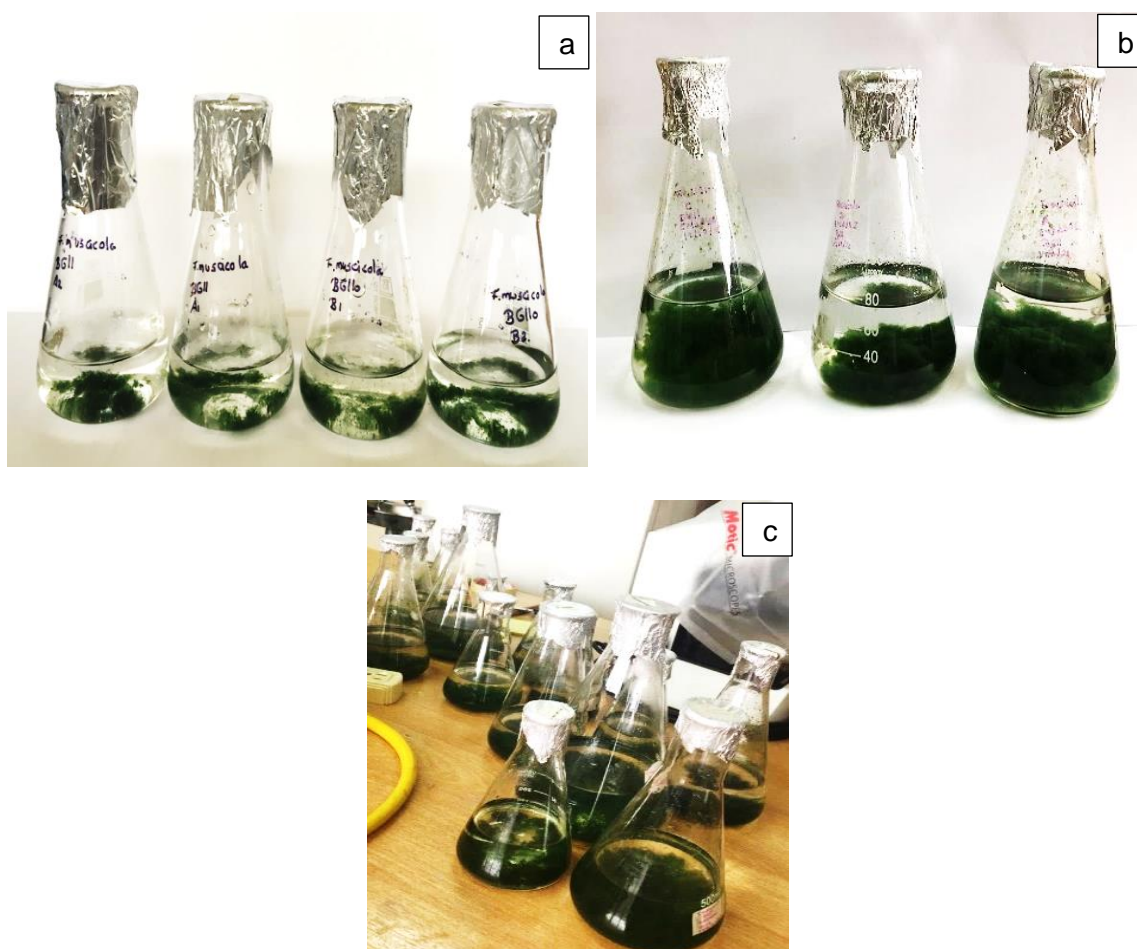
Capítulo IV: Resultados y Discusión

Escalado de *F. Muscicola*

Se escaló *F. muscicola* con un volumen inicial de 2 mL, alcanzando mil veces el volumen de biomasa inicial al cabo de 3 meses y medio aproximadamente, como se indica en la Figura 24.

Figura 24.

Escalado de *F. muscicola* en medio BG11o



Nota: Biomasa obtenida en el transcurso del tiempo: **a)** día 0, V= 2 mL; **b)** 30 días, V=30 mL; **c)** 112 días, V=2000 mL (Soria, 2022).

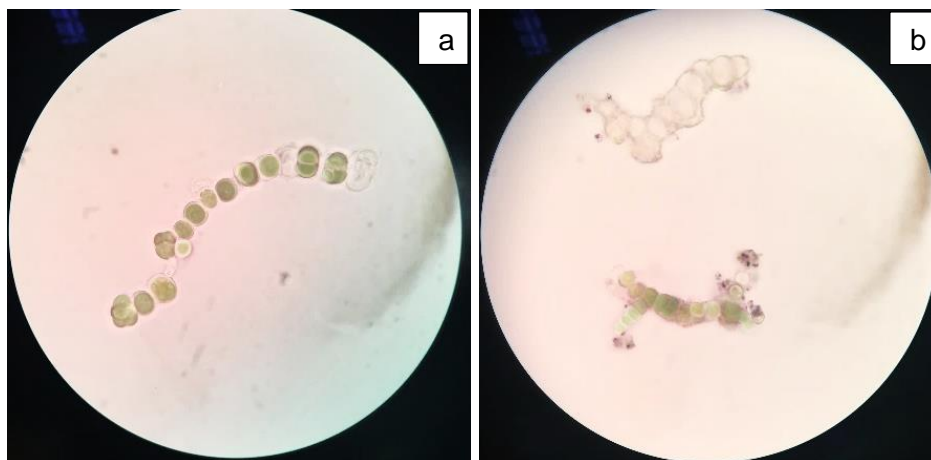
Se obtuvo 25% más de biomasa de *F. muscicola* en BG11o en comparación con los resultados obtenidos por Del Castillo, (2019), quien alcanzó un crecimiento celular de hasta 1500 mL en medio BG11.

Cinética de crecimiento de los organismos híbridos

Se observó que, *F. muscicola* sin nanopartículas mantuvo su estructura y coloración normal (Figura 25a). Mientras tanto, en los cultivos híbridos se distingue la adhesión de NPs por la presencia de una coloración (pigmentación violácea) en la pared de la cianobacteria y se puede diferenciar la muerte celular ocasionada posiblemente por la toxicidad de las NPs (Figura 25b).

Figura 25.

Células de F. muscicola con y sin nanopartículas



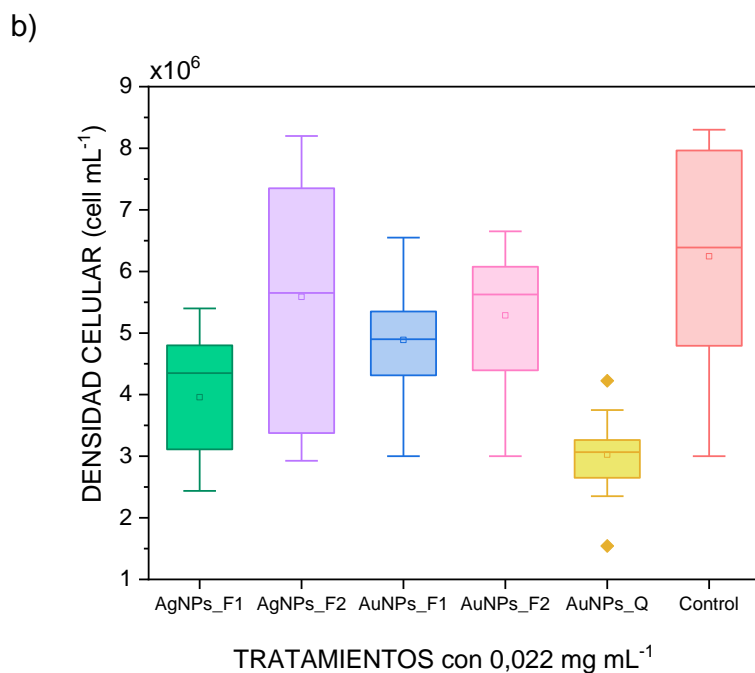
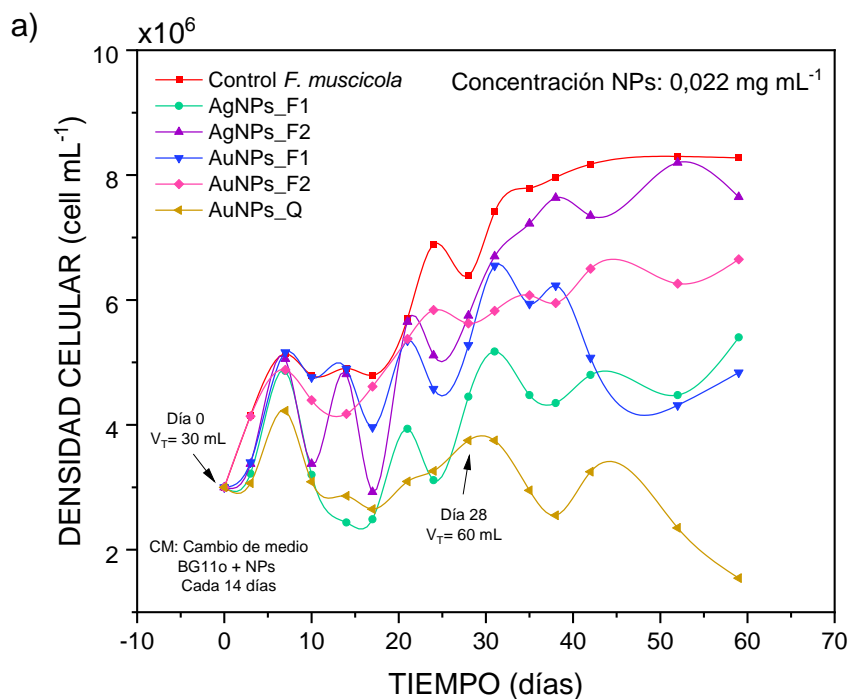
Nota: a) F. muscicola sin nanopartículas. b) F. muscicola con AuNPs_Q (0,044 mg mL⁻¹)
Microscopio electrónico, lente 100X. (Soria, 2022).

También se visualizaron agrupaciones de células rodeadas de la membrana mucilaginosa (Figura 25), semejante a lo registrado por Del Castillo (2019), quien observó con microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de barrido en modo de transmisión (STEM) la adhesión de NPs de plata a la superficie externa de *F. muscicola*.

En la Figura 26, se muestra la cinética de crecimiento de *F. muscicola* con las diferentes NPs a una concentración de 0,022 mg mL⁻¹.

Figura 26.

Crecimiento celular de *F. muscicola* con las diferentes NPs a concentración 0,022 mg mL⁻¹



Nota: **a)** Crecimiento celular de *F. muscicola* con NPs (0,022 mg mL⁻¹); **b)** Diagrama de cajas del ANOVA de una vía: Hay diferencias significativas de AgNPs_F1 ($q=3,508$; $p=0,002$), AuNPs_Q ($q=5,248$; $p<0,001$) con respecto al control. AgNPs_F2, AuNPs_F1 y AuNPs_F2 no presentaron diferencias ($p>0,05$); (Soria, 2022).

Se observa un incremento constante de la densidad celular en los tratamientos con AgNPs_F2, AuNPs_F2, AuNPs_F1 y AgNPs_F1 hasta los 38 días; siendo este último el más bajo con respecto al control. Sin embargo, a los 60 días, el ensayo con AuNPs_F1, presentó una disminución celular del 6%; mientras que AgNPs_F1 aumento en un 2%.

De acuerdo con el ANOVA de una vía ($H=38,023$; $p<0,001$) y la comparación de los tratamientos con el control (*método de Dunn*), se corroboró que los ensayos con AgNPs_F2, AuNPs_F1 y AuNPs_F2 no presentaron diferencias significativas con respecto a los cultivos de *F. muscicola* sin NPs ($p>0,05$). Además, tienen porcentajes de crecimiento de apenas 11,2 %, 18,5 % y 13,3 % menores que el control, respectivamente.

Por este motivo, se puede considerar que las cianobacterias presentaron gran adaptación a los tratamientos con el agente reductor natural F2, tanto con Au y Ag, siendo el híbrido con AgNPs_F2 el mejor ensayo de este estudio (Figura 26b).

Por el contrario, los cultivos con AuNPs_Q, a pesar de que, en los primeros 38 días denotaron una adaptación de *F. muscicola* a la presencia de NPs, al final del ensayo su muerte celular fue evidente. El ANOVA mostró que los ensayos con AgNPs_F1 y AuNPs_Q, son significativamente menores al control ($p<0,05$), al presentar tasas de crecimiento celular de 34,4 % y 46,6 % inferiores, respectivamente.

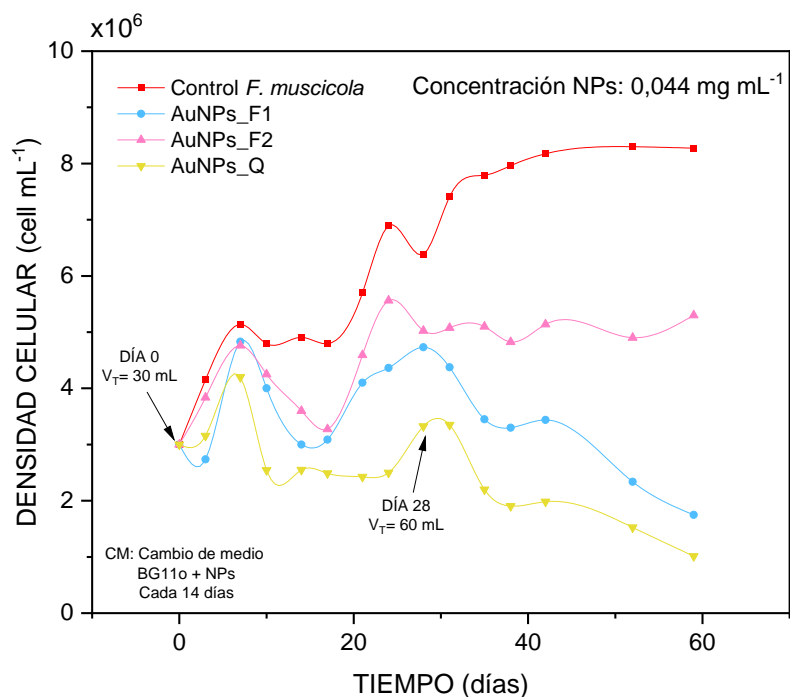
Por otro lado, en la Figura 27a se indica la cinética de crecimiento de *F. muscicola* con las diferentes NPs de Au a una concentración de $0,044 \text{ mg mL}^{-1}$. En este ensayo, únicamente el cultivo con AuNPs_F2 fue viable, mientras que las cianobacterias con AuNPs_F1 y AuNPs_Q, tuvieron muerte celular, con una tasa de supervivencia de 60 % y 46 % a los 60 días de cultivo, respectivamente.

De manera análoga, el análisis ANOVA de una vía ($H=36,9$; $p<0,001$) y la comparación de los híbridos con el control (*método de Dunn*) (Figura 27b), mostró que el crecimiento de *F. muscicola* con AuNPs_F2 ($0,044 \text{ mg mL}^{-1}$) es ligeramente menor (24,3 %) que el control ($p>0,05$). Mientras que, los tratamientos de AuNPs_F1 y AuNPs_Q fueron significativamente menores ($p<0,05$) que *F. muscicola* sin NPs, en 39 % y 53,5 % respectivamente.

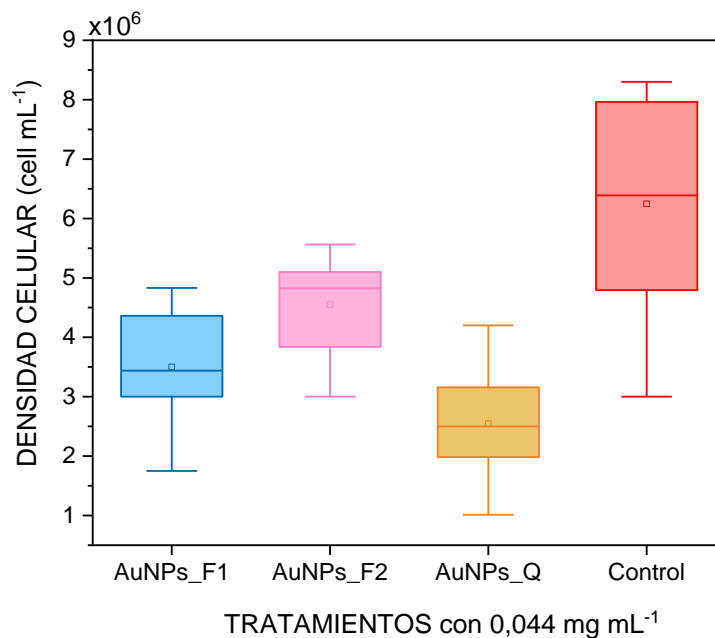
Figura 27.

Crecimiento celular de *F. muscicola* con las diferentes NPs a concentración $0,044 \text{ mg mL}^{-1}$

a)



b)



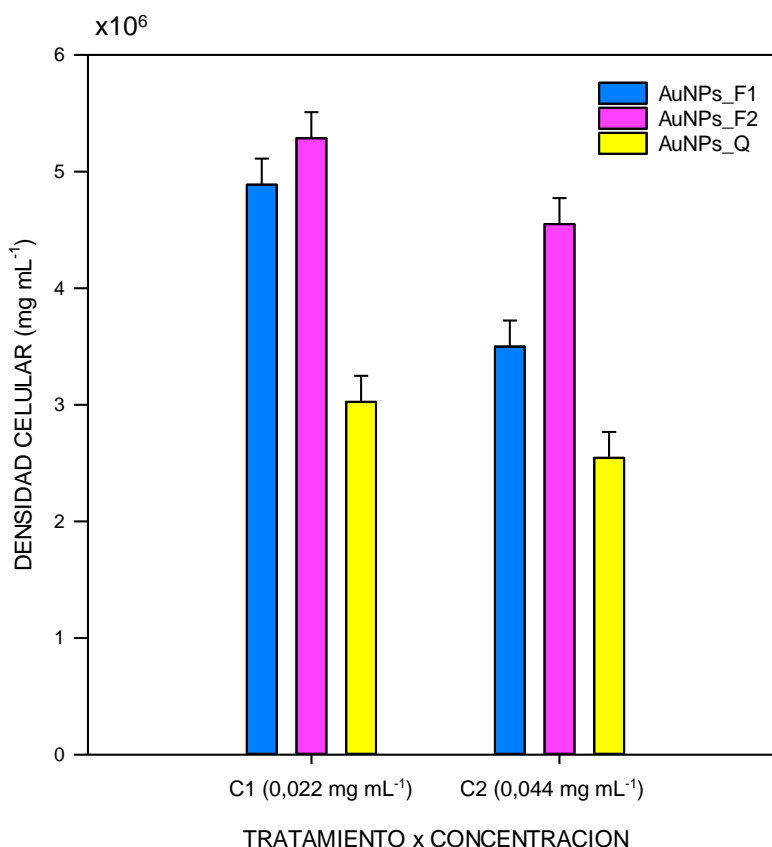
Nota: **a)** Crecimiento celular de *F. muscicola* con NPs ($0,044 \text{ mg mL}^{-1}$); **b)** Diagrama de cajas del ANOVA de una vía. Se observa que AuNPs_F1 ($q= 3,852$; $p<0,001$) y AuNPs_Q ($q= 5,640$; $p<0,001$) son significativamente menores al control. AuNPs_F2 no presentó diferencias ($p>0,05$) con respecto al control; (Soria, 2022).

Hay que mencionar, además, que los híbridos con AuNPs_F1 y AuNPs_Q en ambas concentraciones, a los 38 días empezaron a tener una disminución celular notoria, debido a que *F. muscicola* rechazaba la adhesión y absorción de NPs en su estructura, y el medio de cultivo se vio saturado por NPs, generando más muerte celular.

En cuanto al ANOVA de dos vías (factor tratamiento con NPs de Au a diferente concentración), se demostró diferencias significativas entre tratamientos ($F=47,4$; $p<0,001$) y entre concentraciones ($F=22,8$; $p<0,001$), mas no en la interacción entre ambos factores ($p>0,05$) (Figura 28).

Figura 28.

Análisis estadístico ANOVA dos vías para comparar resultados de concentraciones de AuNPs



Nota: Diagrama de barras: ANOVA de dos vías / método post-hoc *Holm-Sidak* indican que hay diferencias significativas entre concentraciones de AuNPs_F1 ($t=4,405$; $p<0,001$) y AuNPs_F2 ($t=2,338$; $p=0,022$); sin embargo, no hay diferencia significativa en AuNPs_Q ($t=1,529$; $p=0,130$), (Soria, 2022).

En consonancia con lo anterior, el método post-hoc *Holm-Sidak*, reflejó que hay diferencias significativas entre concentraciones en los cultivos con AuNPs_F1 ($p > 0,05$) y AuNPs_F2 ($p = 0,022$); mientras que, los híbridos con AuNPs_Q, no presentaron diferencias significativas entre 0,022 y 0,044 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Es decir, el crecimiento de *F. muscicola* no dependió de la concentración de las AuNPs_Q porque en ambos casos se observó mortalidad. Además, se determinó que a 0,022 mg mL⁻¹ de NPs de Au, los tratamientos con AuNPs_F1 y AuNPs_F2 fueron similares ($t = 1,263$; $p = 0,210$). Mientras tanto, a la concentración de 0,044 mg mL⁻¹, todos los ensayos fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados son semejantes a lo que obtuvieron Del Castillo et al. (2021), donde *F. muscicola* se adaptó a las NPs de plata sintetizadas con el agente reductor de carrasquilla a los 63 días de crecimiento. Lo que sugiere que, las NPs sintetizadas con el extracto de flor F2, pueden poseer compuestos fenólicos similares a los de carrasquilla (antocianinas, glucósidos de cianidina y catequina) (Arroyo et al., 2021), permitiéndoles ser asimiladas de mejor manera por las cianobacterias.

Además, en los híbridos con AgNPs_F2, debido a que la plata es menos conductiva, el crecimiento celular presenta mejores resultados que los tratamientos con AuNPs_F1 y AuNPs_F2 en concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹ (Figuras 26a).

Por otro lado, a pesar de que las cianobacterias presentaron un crecimiento celular adecuado hasta los 38 días, el recubrimiento realizado por el agente reductor F1, no fue suficiente para reducir la alta conductividad y toxicidad de las NPs de Au (Yeh et al., 2012); y al parecer, los compuestos fenólicos que posee, en lugar de ser asimilados por *F. muscicola* causan una inhibición del crecimiento celular en ambas concentraciones de NPs (Figura 26a y 27a). Sin embargo, el tratamiento menos efectivo fue con el agente reductor químico de citrato debido a que este compuesto, en pH alcalinos, puede estar desprotonado ($pH > pK_a$) e interactuar con grupos cargados positivamente; afectando así, estructuras secundarias de las proteínas y generando daños irreversibles en las funciones metabólicas de los microorganismos (Palencia et al., 2013).

Así mismo, Del Castillo et al. (2021), probaron diferentes volúmenes de AgNPs, aunque no registraron las concentraciones específicas de NPs administradas a *F. muscicola*. A pesar de desconocer la concentración, se evidenció que las cianobacterias se adaptaron a las NPs en volúmenes bajos (0,2 y 0,5 mL) en 63 días de estudio. De manera análoga, en el presente estudio se obtuvieron mejores resultados en concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹ tras 60 días de análisis.

No obstante, con volúmenes de 0,8 y 1,2 mL, Del Castillo et al. (2021), afirman que las cianobacterias mostraron una reducción significativa de las células viables y una fase estacionaria prolongada, a partir del día 35; al igual que los resultados obtenidos a concentraciones de 0,044 mg mL⁻¹, donde los tratamientos con AuNPs_F1 y AuNPs_Q, disminuyeron su densidad celular paulatinamente, desde el día 38 hasta finalizar el ensayo y presentar muerte celular. Es decir, al aumentar la concentración o el volumen de NPs, hay mayores daños en la estructura celular por la sobredosis de NPs y la toxicidad de los iones metálicos o los agentes reductores.

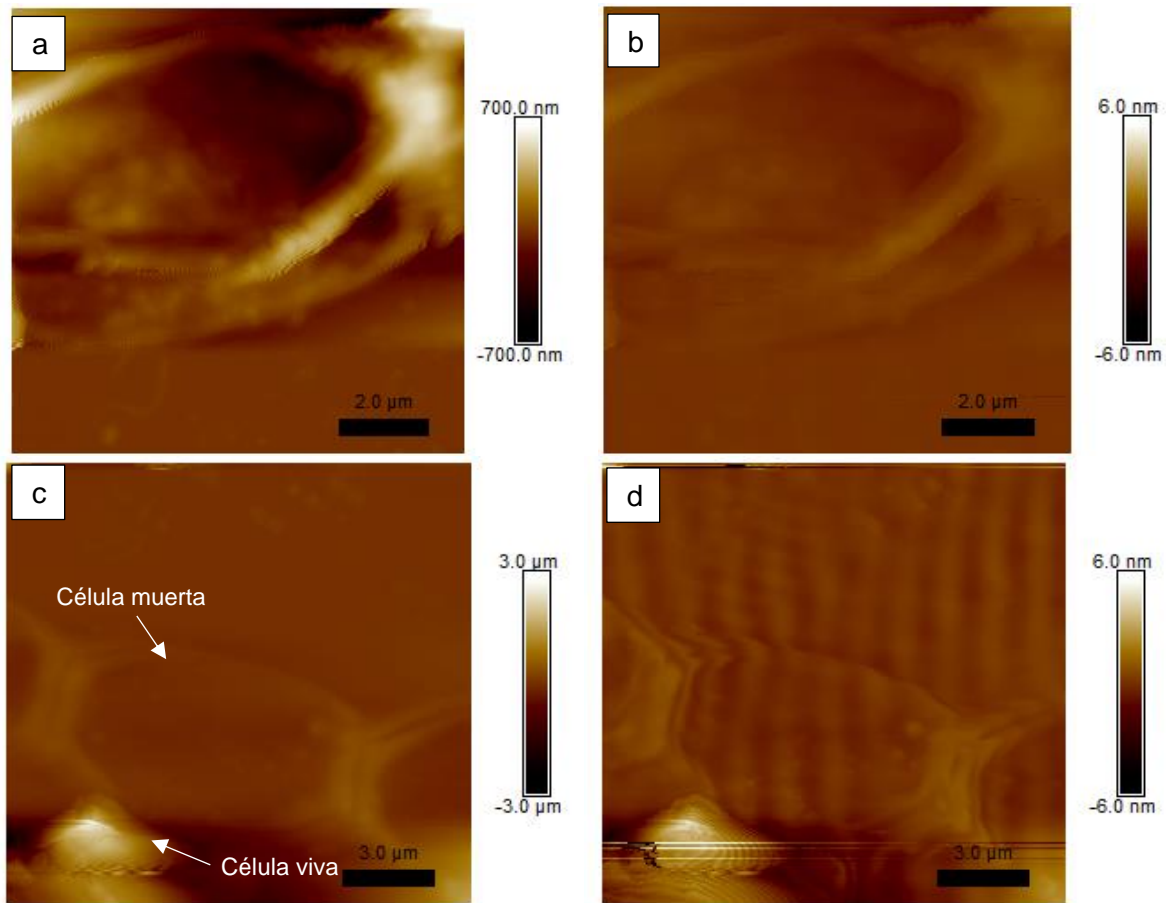
Por consiguiente, se seleccionó únicamente los tratamientos con diferentes NPs a concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹, para la caracterización morfológica y eléctrica de los organismos híbridos.

Caracterización de los organismos híbridos

Caracterización morfológica y eléctrica mediante AFM

En la Figura 29a, se muestra la cianobacteria viva, con una coloración predominante y sin ningún daño a su estructura. De manera análoga, en la Figura 29b de la cianobacteria viva sin NPs, se observan ondas y se refleja una intensidad alta.

En contraste, la cianobacteria híbrida (AgNPs_F2) muerta no presenta coloración y tiene daños en su pared celular como se detalla en la Figura 29c; posiblemente causada por la internalización de las NPs que causaron lisis celular y la pérdida de clorofila (Nguyen et al., 2020). Además, las ondas de la cianobacteria muerta son similares a las del medio de cultivo (baja intensidad) (Figura 29d).

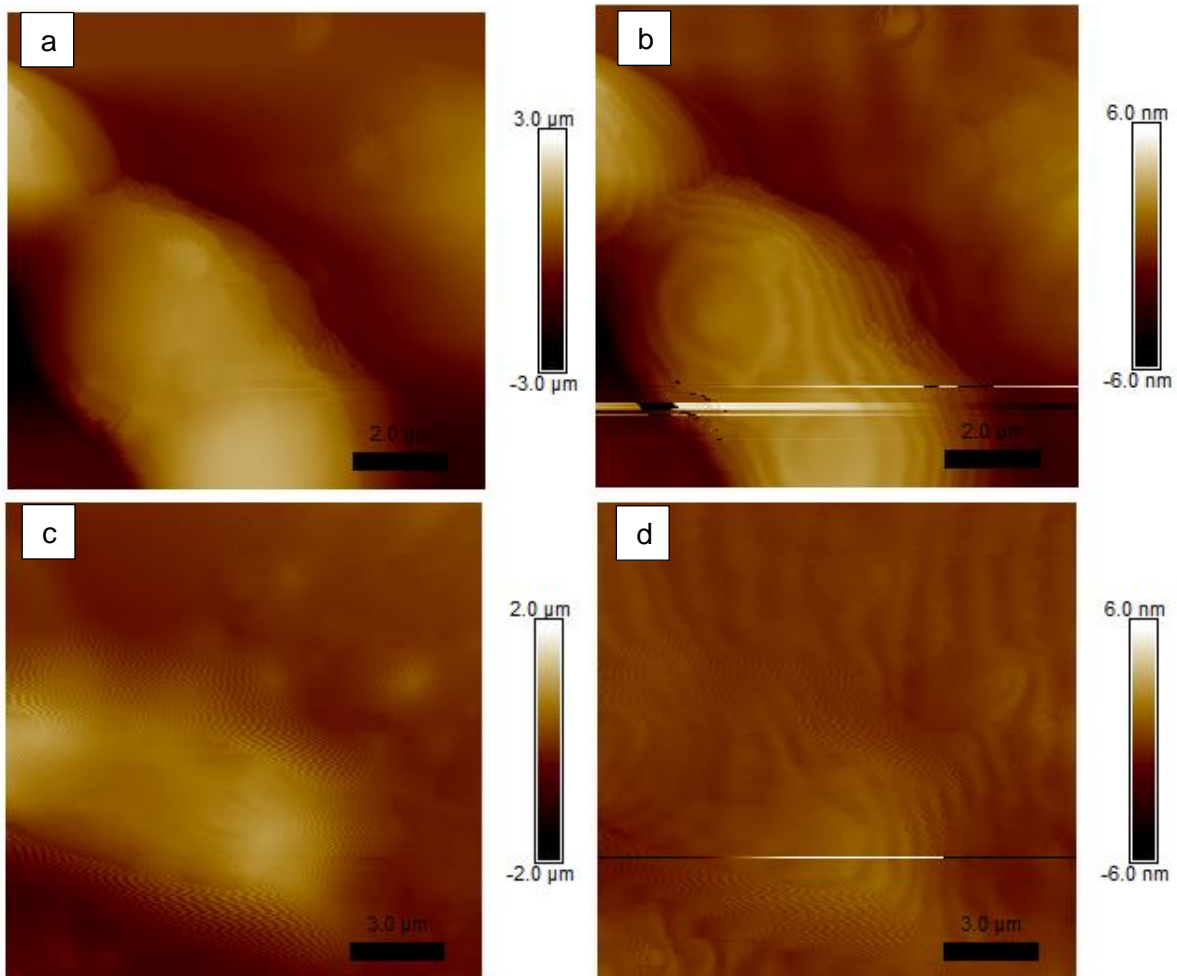
Figura 29.*F. muscicola* viva y muerta

Nota: Micrografías de la morfología – AFM (Height sensor - lado izquierdo) y de la fuerza eléctrica -EFM (longitud de onda - lado derecho) **a)** y **b)** *F. muscicola* sin NPs; **c)** y **d)** *F. muscicola* muerta con AgNPs_F2 ($0,022 \text{ mg mL}^{-1}$), (Soria, 2022).

En los tratamientos con AgNPs, los híbridos vivos, no muestran ningún daño en su estructura celular (Figura 30a, 30c), pero si reflejan ondas muy definidas y con mayor intensidad (Figura 30b, 30d), en particular las cianobacterias con AgNPs_F2; es decir, las NPs se adhirieron o se internalizaron en *F. muscicola* sin causar daños en su estructura o en su metabolismo.

Figura 30.

F. muscicola con nanopartículas de Plata en concentraciones de $0,022 \text{ mg mL}^{-1}$



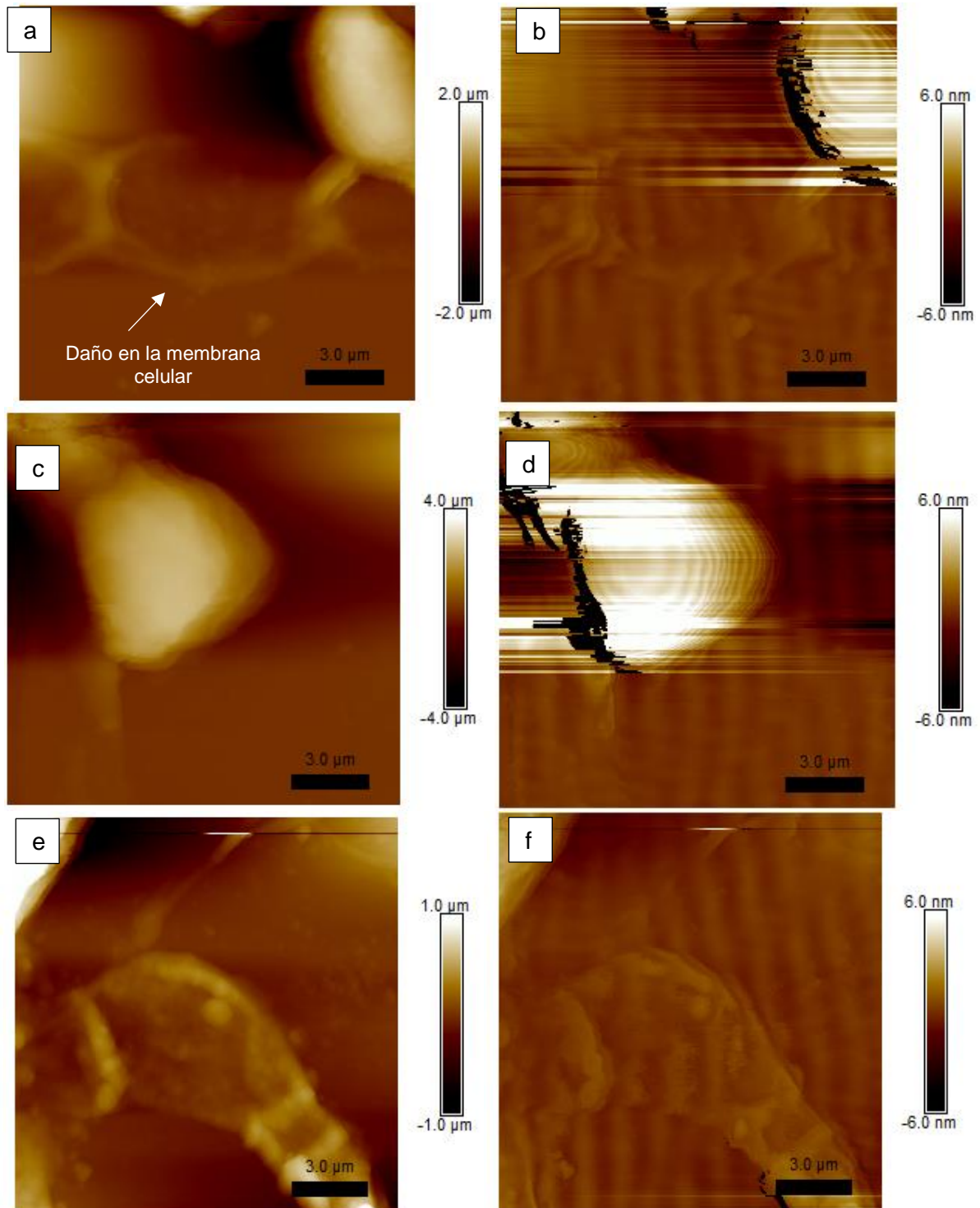
Nota: Micrografías de la morfología – AFM (Height sensor - lado izquierdo) y de la fuerza eléctrica -EFM (longitud de onda - lado derecho) **a)** y **b)** *F. muscicola* con AgNPs_F1; **c)** y **d)** *F. muscicola* con AgNPs_F2, (Soria, 2022).

En contraste con lo anterior, en la Figura 31 se observa los híbridos con NPs de oro, que generan mayor intensidad de luz que las cianobacterias con AgNPs.

En la Figura 31a, se observa a la cianobacteria con AuNPs_F1 viva y muerta; así mismo, en la micrografía EFM (Figura 31b) no sólo se divisa la luminosidad de las ondas que refleja el híbrido vivo, sino también las ondas opacas y de baja intensidad del medio BG11o y la cianobacteria muerta.

Figura 31.

F. muscicola con nanopartículas de Oro en concentraciones de $0,022 \text{ mg mL}^{-1}$



Nota: Micrografías de la morfología – AFM (Height sensor - lado izquierdo) y de la fuerza eléctrica -EFM (Longitud de onda - lado derecho) **a)** y **b)** *F. muscicola* con AuNPs_F1; **c)** y **d)** *F. muscicola* con AuNPs_F2; **e)** y **f)** *F. muscicola* con AuNPs_Q, (Soria, 2022).

De manera análoga, en la Figura 31c muestra la *F. muscicola* con AuNPs_F2 viva, con su estructura normal, en consonancia con la micrografía EFM (Figura 31d) donde las ondas son muy definidas y luminosas.

Por el contrario, en el híbrido con AuNPs_Q (Figura 31e), la estructura de *F. muscicola* es característica de una célula en declive, lo que se corrobora con la micrografía en EFM (Figura 31f), donde las ondas son opacas, de baja intensidad y similares a las del medio de cultivo, debido a la disminución de la producción de clorofila por la presencia de las NPs.

Todas estas observaciones cualitativas, se corroboraron calculando la energía con las longitudes de onda de las diferentes micrografías en modo EFM, consiguiendo los resultados de la Figura 32:

Figura 32.

Energía obtenida de las micrografías EFM de los diferentes tratamientos

a)

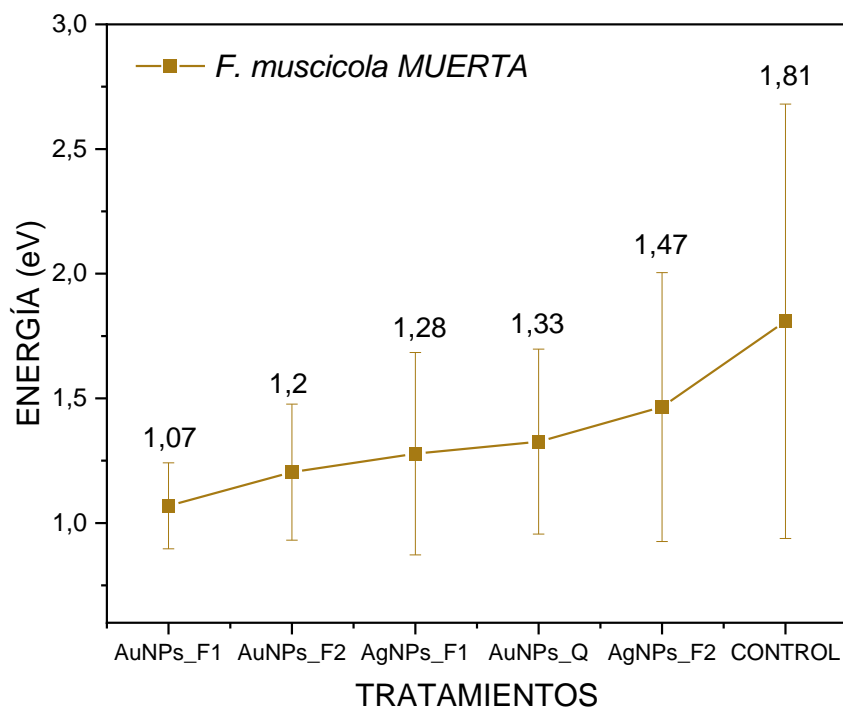
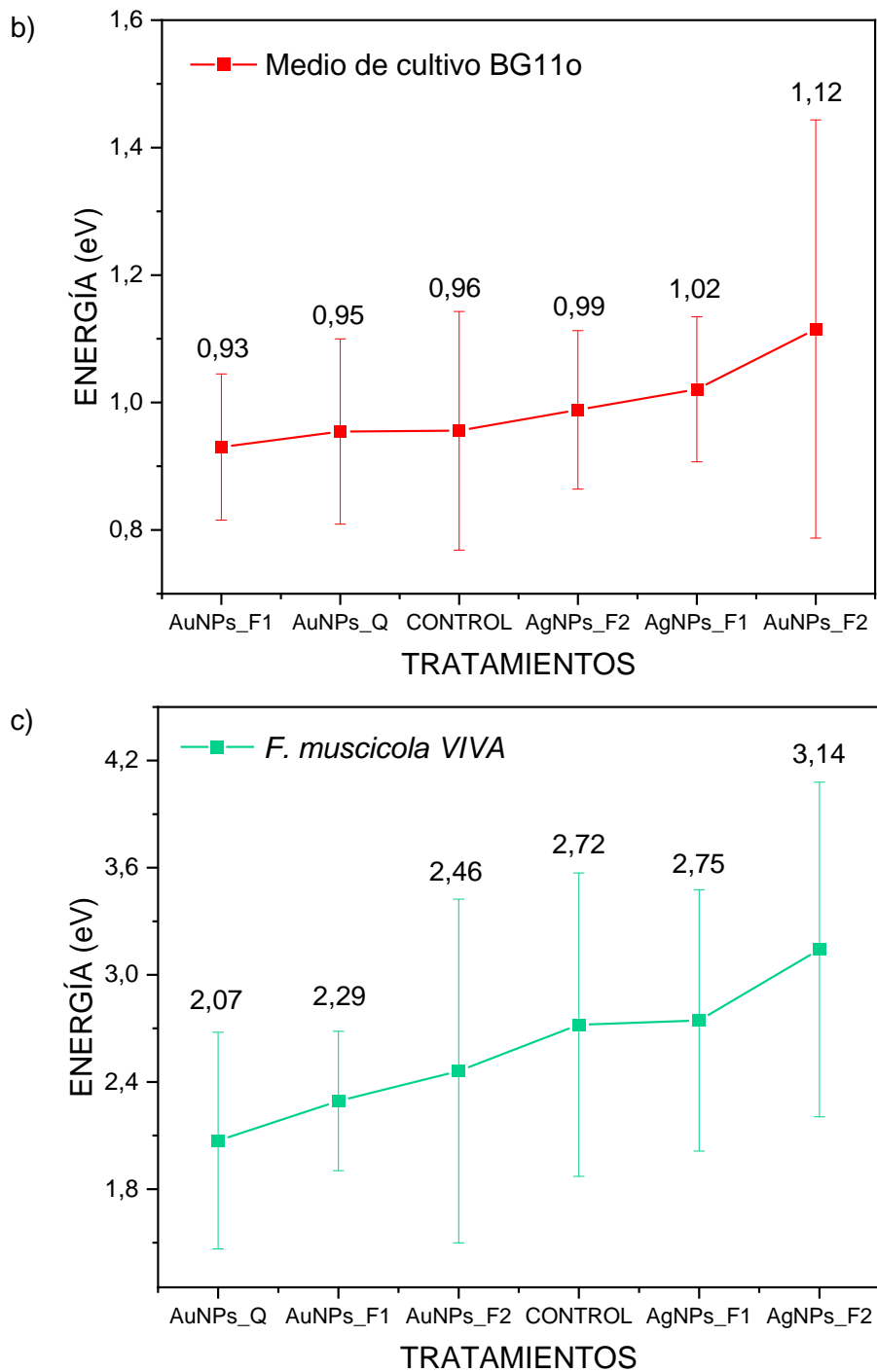


Figura 32.

Continuación



Nota: Energía obtenida de la longitud de onda en las micrografías de fuerza eléctrica -EFM

a) Energía de *F. muscicola* MUERTA; **b)** Energía del medio de cultivo BG11o; **c)** Energía de *F. muscicola* VIVA. (Soria, 2022)

En la Figura 32a se muestra la energía generada por la cianobacteria muerta, donde los híbridos con AuNPs_F1 ($1,07 \pm 0,17$ eV) son los menos energéticos y la cianobacteria sin NPs (control) es la más energética ($1,81 \pm 0,87$ eV). El ANOVA de una vía reveló que la energía generada por los organismos muertos es significativamente diferente entre los ensayos ($F=5,432$; $p < 0,001$); sin embargo, estos resultados son muy imprecisos debido a que se desconoce la etapa real de muerte, o el porcentaje de viabilidad de las células analizadas.

Por lo que se refiere a la energía calculada en el medio de cultivo BG11o (mayor representatividad y precisión que la energía de la cianobacteria muerta) (Figura 32b), el análisis ANOVA una vía ($F=4,222$; $p=0,001$) y el *test Tuckey* indican que el ensayo de AuNPs_F2 ($1,125 \pm 0,33$ eV), es significativamente más energético que *F. muscicola* con AuNPs_F1 ($q=5,662$; $p=0,001$), AuNPs_Q ($q=4,92$; $p=0,008$) y sin NPs ($q=4,88$; $p=0,009$) con energías de $0,93 \pm 0,12$ eV; $0,95 \pm 0,15$ eV y $0,96 \pm 0,18$ eV, respectivamente. Simultáneamente, no se detectaron diferencias significativas con los ensayos de AgNPs_F2 ($0,99 \pm 0,12$ eV) y AgNPs_F1 ($1,02 \pm 0,11$ eV).

A su vez, la energía emanada por *F. muscicola* viva (Figura 32c), es claramente mayor que la cianobacteria muerta (Figura 32a) y el medio de cultivo BG11o (Figura 32b). En este caso (Figura 32c), con el análisis ANOVA de una vía ($F=5,044$; $p < 0,001$) y la prueba *Tukey*, se demostró que la energía generada por la cianobacteria con AgNPs_F2 ($3,14 \pm 0,94$ eV); es significativamente mayor que los híbridos con AuNPs_Q ($q=6,348$; $p < 0,001$) y AuNPs_F1 ($q=5,035$; $p=0,006$) con energías de $2,07 \pm 0,61$ eV y $2,29 \pm 0,39$ eV, respectivamente. Mientras que, la energía de *F. muscicola* sin NPs ($2,72 \pm 0,84$ eV) es mayor que la energía del híbrido con AuNPs_F2 ($2,46 \pm 0,96$ eV); y ligeramente menor que la cianobacteria con AgNPs_F1 ($2,75 \pm 0,73$ eV), pero no son significativamente diferentes.

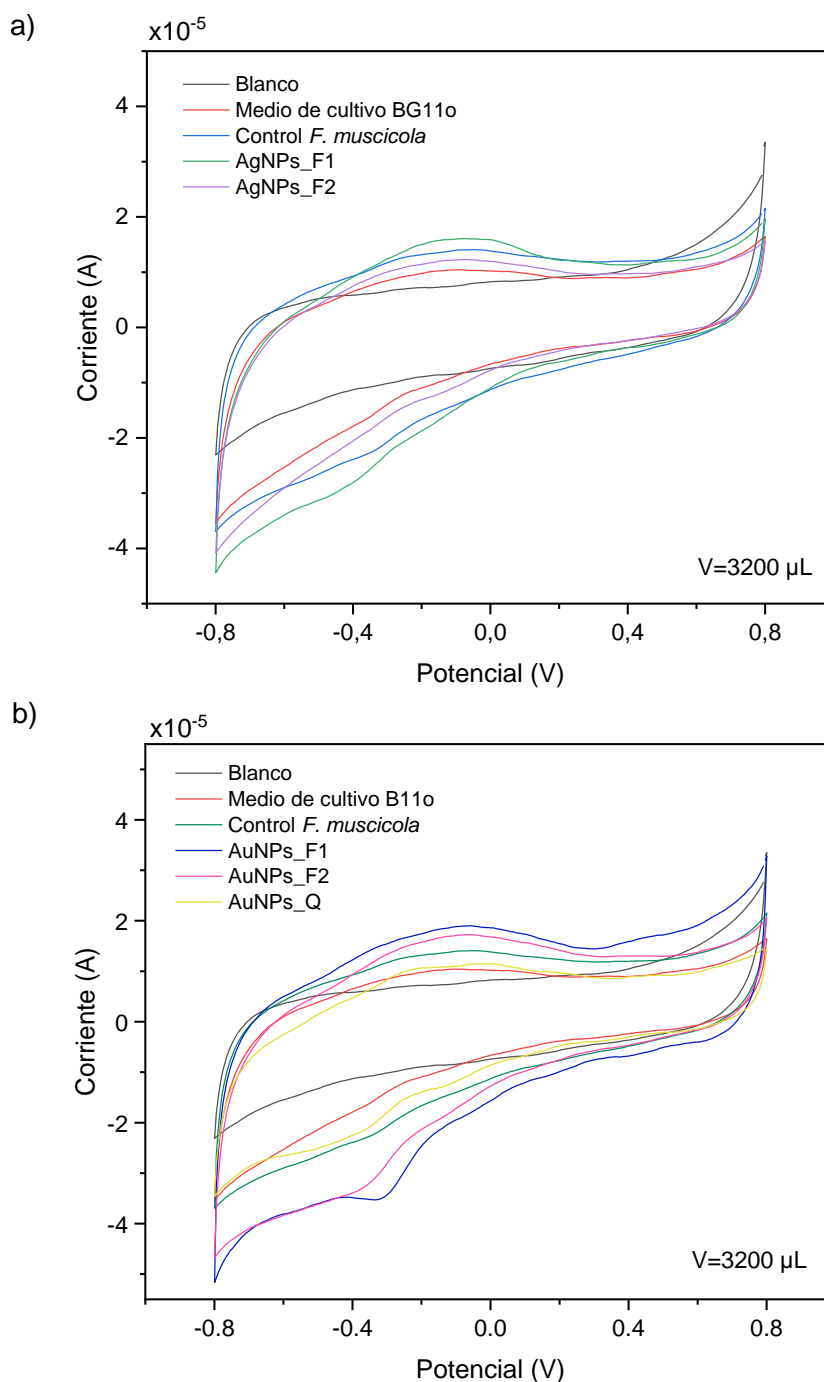
Por lo tanto, se puede deducir que los tratamientos más energéticos son los híbridos con AgNPs, y las cianobacterias con menor energía son aquellas con AuNPs_Q y AuNPs_F1, debido al estado de viabilidad de las células.

Caracterización electroquímica con voltametría cíclica

En la Figuras 33 se presenta los voltamogramas del medio de cultivo, *F. muscicola* sin NPs y los tratamientos con diferentes NPs en 3200 μL de muestra y $0,1 \text{ V s}^{-1}$

Figura 33.

Voltamogramas del medio de cultivo BG11o y *F. muscicola* con los diferentes tratamientos



Nota: Voltametría cíclica con velocidad de barrido de $0,1 \text{ V s}^{-1}$. **a)** Voltamogramas de los tratamientos con AgNPs; **b)** Voltamogramas de los tratamientos con AuNPs (Soria, 2022)

Se evidencia a simple vista la variación de los voltamogramas de cada tratamiento respecto al blanco, y la presencia de curvas más pronunciadas en la zona de reducción que en la oxidación. Así mismo los híbridos con NPs de oro generan mayor cantidad de corriente que las NPs de plata. Sin embargo, se requieren análisis más detallados para determinar las diferencias en los procesos electroquímicos de cada tratamiento.

Por lo tanto, se obtuvieron los valores del potencial de oxidación de los voltamogramas de cada tratamiento y se calculó los valores de *HOMO* (Tabla 4).

Tabla 4.

Valores de HOMO obtenidos de los voltamogramas de cada tratamiento

Tratamientos	HOMO (eV)
Medio BG11o	-4,98
Control <i>F. muscicola</i>	-4,86
AgNPs_F1	-4,78
AgNPs_F2	-4,74
AuNPs_F1	-4,51
AuNPs_F2	-4,62
AuNPs_Q	-4,66

Nota: Valores del potencial de oxidación de los voltamogramas a 3200 μL y 0,1 V s^{-1} de cada tratamiento. Se calculó el *HOMO* con la ecuación 7 (Soria, 2022).

En la tabla 4, se observa que los valores *HOMO* del medio BG11o (-4,98 eV) y la cianobacteria sin NPs (-4,86 eV), son muy bajos y alejados del electrodo de ITO (-4,7 eV). En los tratamientos con NPs de plata los valores de *HOMO* para AgNPs_F1 (-4,78 eV) y AgNPs_F2 (-4,74 eV) son muy cercanos al ITO y su energía es mayor que *F. muscicola* sin NPs, mejorando la donación de electrones; sin embargo, la distancia es inferior que el valor requerido para el transporte de huecos (0,4 eV) (de León Santillán, 2010).

En cambio, los tratamientos con AuNPs_Q, AuNPs_F2 y AuNPs_F1, presentan valores de *HOMO* de -4,66 eV, -4,62 eV y -4,51 eV; son superiores al ITO, dificultando aún más la transferencia de huecos; razón por la cual se debería considerar otro electrodo para los estudios posteriores, como el TiO₂ (-4,0 eV) (El alamy et al., 2017).

Cabe recalcar que, la técnica de voltametría cíclica, al igual que los resultados de AFM y cinética de crecimiento sugiere que los mejores cultivos híbridos de *F. muscicola* son las NPs con el extracto natural de F2; sin embargo, es necesario corroborar estos resultados con la caracterización del medio residual para determinar la adherencia de las nanopartículas a *F. muscicola* y la presencia o ausencia de estas en el medio remanente.

Caracterización del medio de cultivo residual

La renovación del medio de cultivo BG11o suplementado con NPs cada 14 días; permitió observar que los ensayos adquirían la coloración correspondiente a cada nanopartícula. Sin embargo, la coloración los ensayos disminuía paulatinamente (Anexo 1, Anexo 2, Anexo 3) y al cabo de 7 días los cultivos no presentaban ninguna pigmentación. De manera análoga, el medio desechado era incoloro.

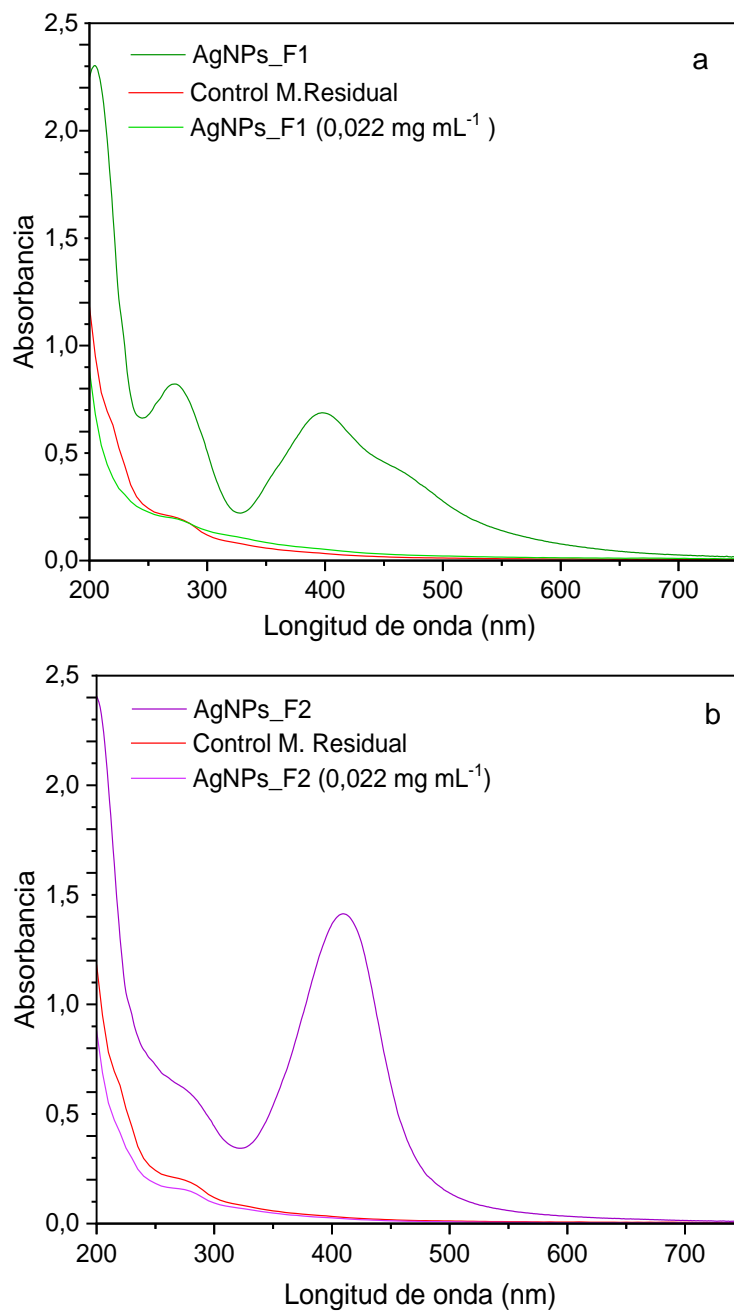
Espectroscopia UV-Vis

En las Figura 34 y 35 se muestra los espectrogramas de cada una de las NPs en relación con los medios desechados.

En la Figura 34, se observa los espectros característicos de las AgNPs sintetizadas con agentes naturales y los espectrogramas del medio residual de los tratamientos con estas NPs a concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹. Se puede evidenciar los medios residuales no presentan ningún pico similar a las NPs.

Figura 34.

Espectroscopia UV/VIS de NPs y del medio residual de los tratamientos con AgNPs

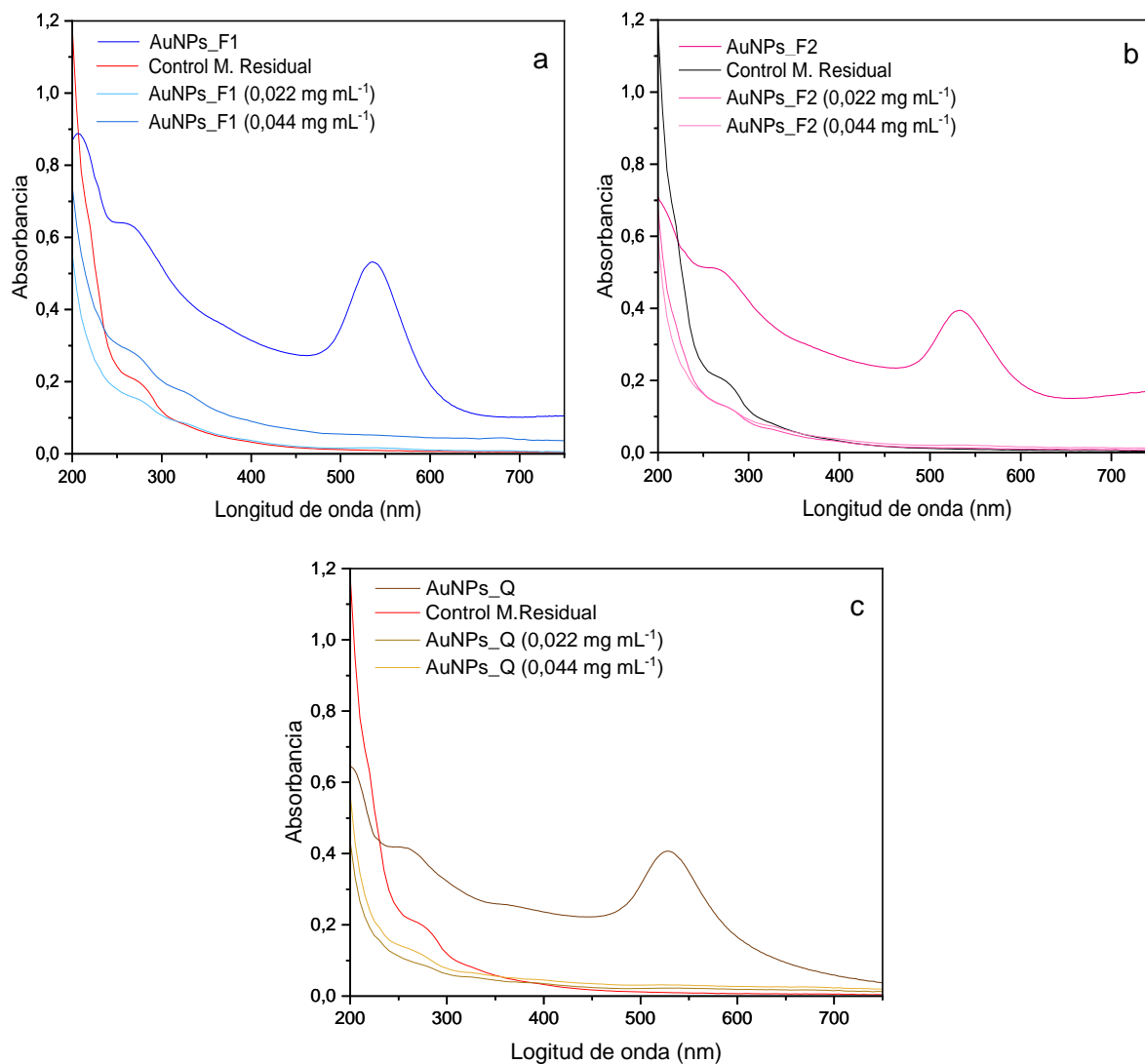


Nota: a) Espectroscopía UV/VIS de AgNPs_F1; b) Espectroscopía UV/VIS de AgNPs_F2; (Soria, 2022).

De manera análoga, en la Figura 35, se observa que los espectrogramas de las NPs de oro; difieren de los espectros de absorbancia del medio residual analizado porque no presentan picos característicos.

Figura 35.

Espectroscopia UV/VIS de NPs y del medio residual de los tratamientos con AuNPs



Nota: a) Espectroscopía UV/VIS de AuNPs_F1; **b)** Espectroscopía UV/VIS de AuNPs_F2; **c)** Espectroscopía UV/VIS de AuNPs_Q; (Soria, 2022).

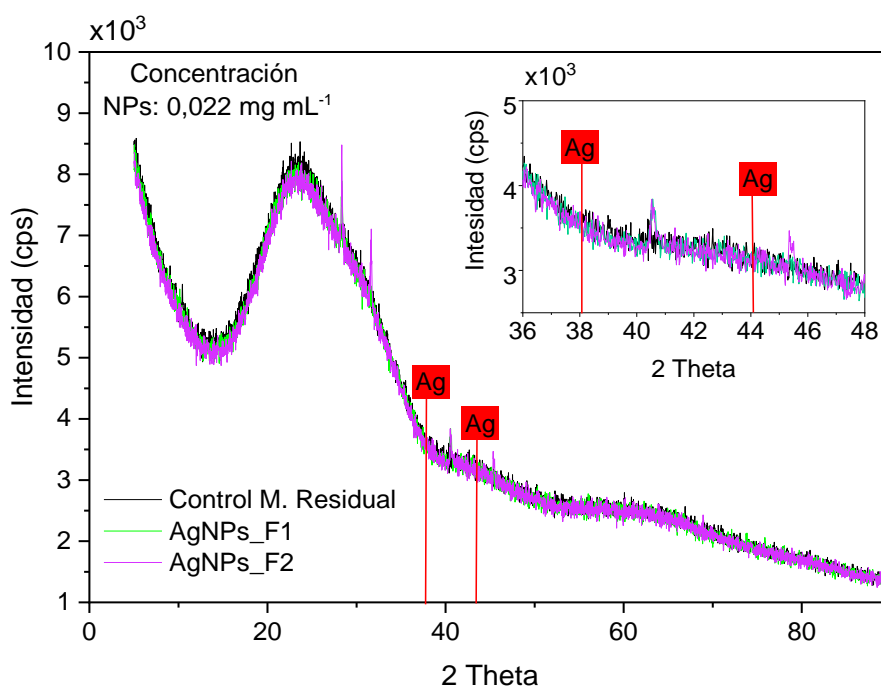
Debido a que las concentraciones de las NPs utilizadas (0,022 y 0,044 mg mL⁻¹) fueron mínimas respecto al volumen en el que se cultivaron los híbridos; además, el medio de cultivo BG11o estaba constituido de varias de sales; que pueden interferir en los resultados, los espectros de absorción no reflejaron la presencia de las NPs en el medio residual.

Técnica XRD

En las Figuras 36 se evidencian picos en los 28,3° y 31,7°; mientras que, en la Figura 37b, únicamente se muestra el pico a 31,7°. Estos picos reflejan el ruido generado porque no existe homogeneidad del tamaño de grano de la muestra y no representan ningún elemento característico del medio residual o de las NPs.

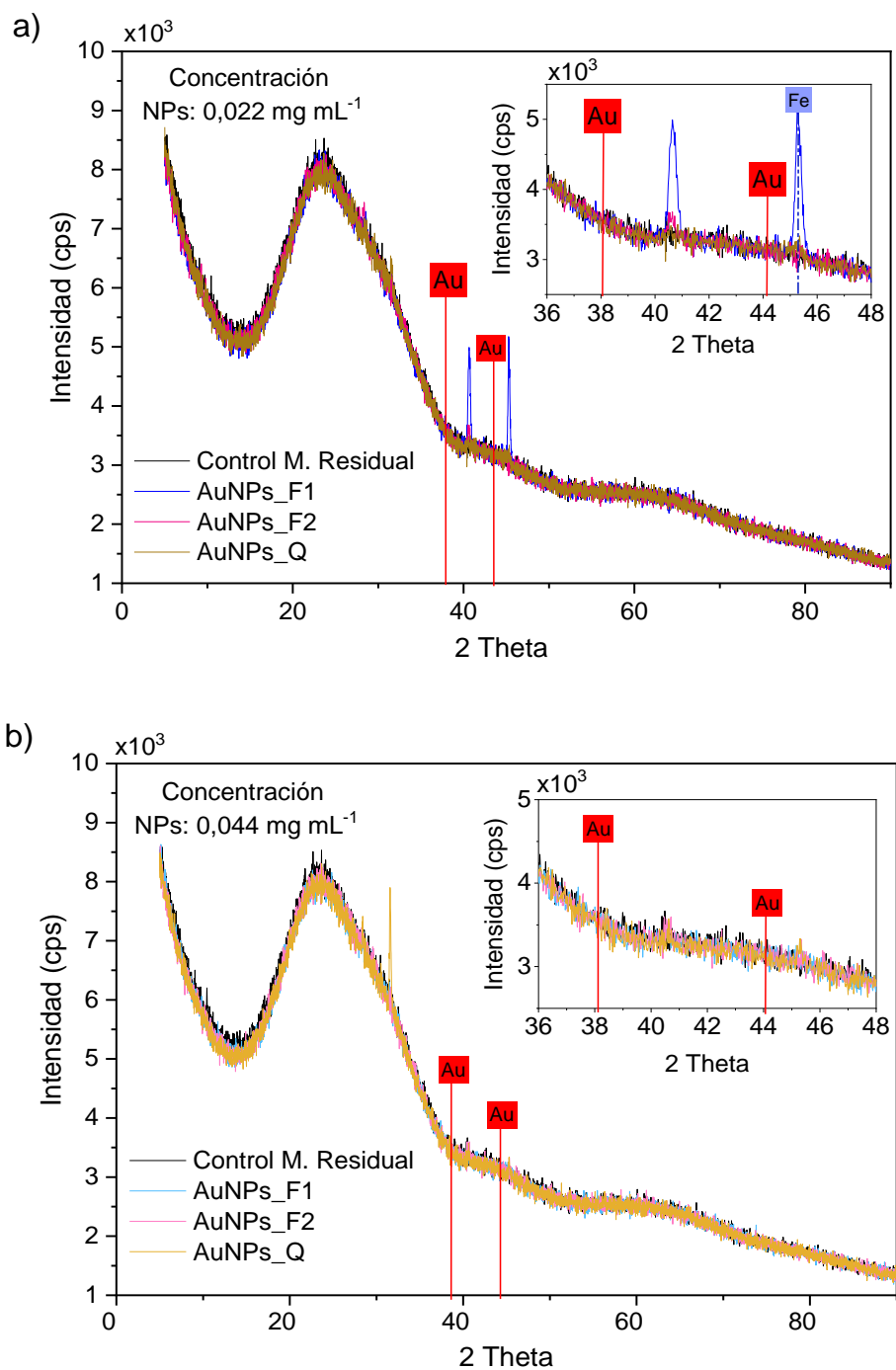
Figura 36.

Difractogramas del medio residual de F. muscicola con AgNPs



Nota: Difractograma del medio residual con AgNPs a 0,022 mg mL⁻¹; (Soria, 2022).

Por otro lado, en la Figura 37a, aparecen picos en 40,7° y 45,2°, donde este último corresponde al hierro (Fe) en el plano <229>; sin embargo, el pico de 40,7° es insuficiente para determinar a qué elemento representa.

Figura 37.*Difractogramas del medio residual de F. muscicola con diferentes AuNPs*

Nota: a) Difractograma del medio residual con AuNPs a 0,022 mg mL⁻¹; b) Difractograma del medio residual con AuNPs a 0,044 mg mL⁻¹; (Soria, 2022).

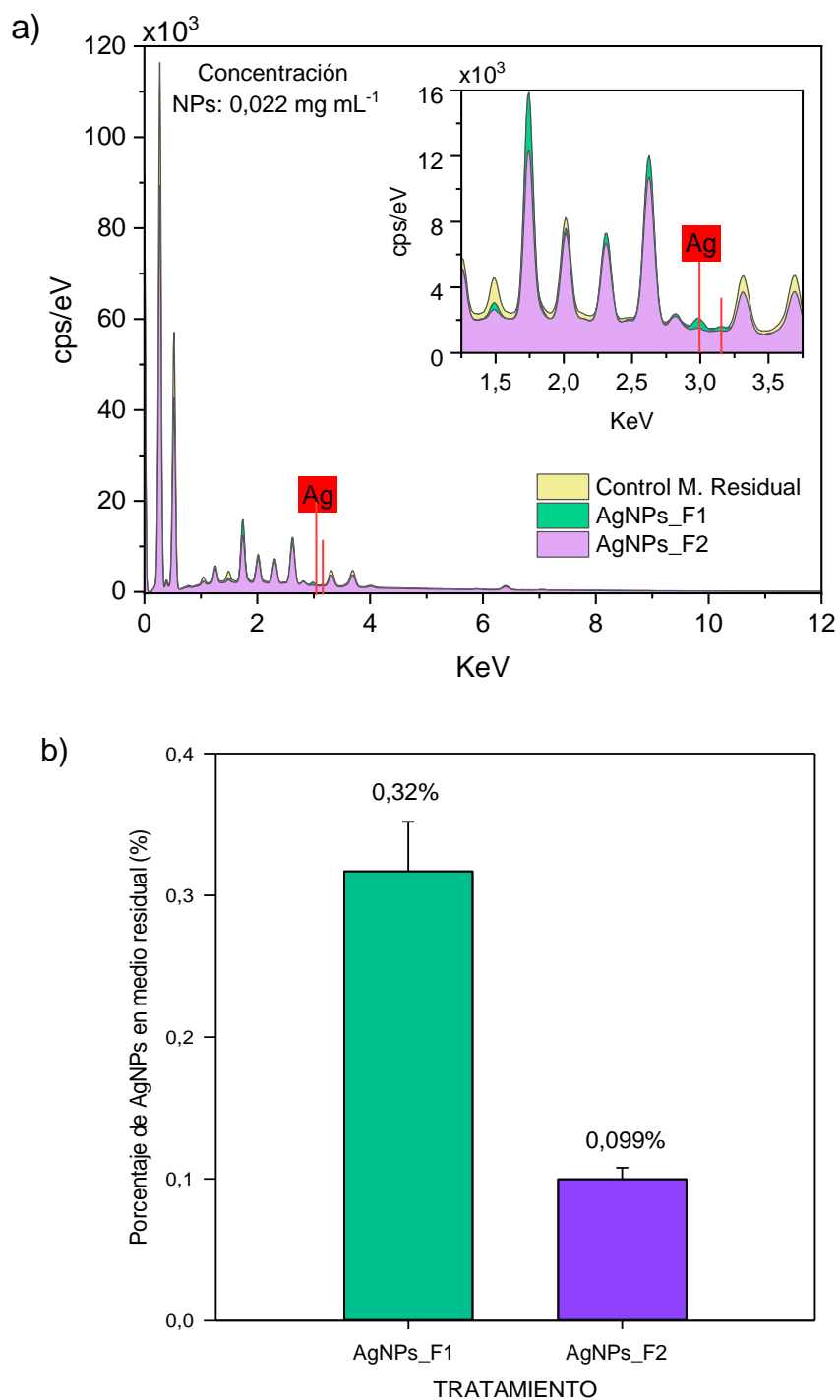
Según Arroyo et al. (2020), los picos que reflejan las NPs de plata se encuentran en los planos <111>, <022> y <113> a 38,2°, 44,2° y 64,5° en cada caso. Mientras que, Zangeneh & Zangeneh (2020), afirman que los picos de AuNPs están indexados como planos <111>, <200>, <220> que corresponde a 38,2°, 44,2° y 64,7° respectivamente.

Sin embargo, en las Figuras 36 y 37 ninguno de los picos corresponde al oro o plata mencionados en estas investigaciones. De la misma forma, debido a que las muestras analizadas fueron escasas por la dificultad de obtener una biopelícula homogénea; se puede deducir que los difractogramas de XRD, no mostraron la presencia de NPs en el medio residual.

Técnica EDS

Con la espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS), al ser una técnica que permite la caracterización química y el análisis elemental de materiales (Scimeca et al., 2018), se logró identificar la presencia de oro y plata en el medio residual de los diferentes tratamientos.

Como se muestra en la Figura 38a, existe un pequeño pico de Ag en ambos ensayos; sin embargo, el tratamiento con AgNPs_F1 (0,32±0,035 % de Ag en el medio remanente) fue significativamente mayor (ANOVA de una vía F=182,9; p<0,001) que en el medio con AgNPs_F2 (0,099±0,003 % de Ag en el medio residual) (Figura 38b). Señalando que las NPs se adhirieron de mejor manera a *F. muscicola* en el tratamiento con AgNPs_F2, y que hubo menor muerte de los híbridos. Posiblemente debido a que, las NPs de tamaños nanométricos fueron internalizadas de mejor manera en la célula, y el agente reductor F2 poseía antioxidantes que redujeron su toxicidad.

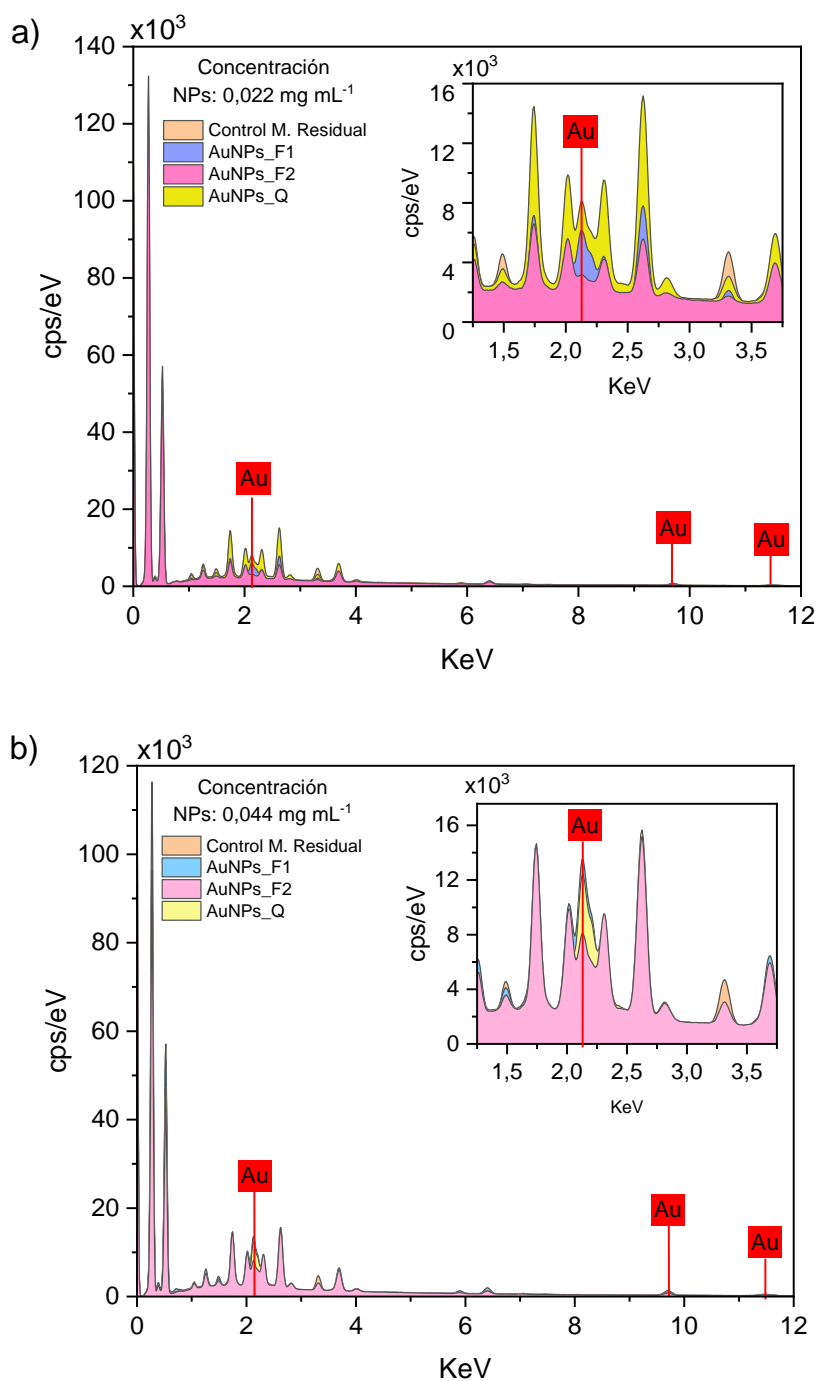
Figura 38.*Análisis elemental del medio residual de F. muscicola con AgNPs*

Nota: a) Espectro del medio residual con AgNPs b) Análisis ANOVA una vía del porcentaje de Ag en el medio residual; (Soria, 2022).

Con respecto a los tratamientos con AuNPs, se evidenció la presencia de los picos correspondientes al oro en los espectros de los medios residuales de concentraciones 0,022 y 0,044 mg mL⁻¹ de nanopartículas (Figura 39a, 39b).

Figura 39.

Análisis elemental del medio residual de F. muscicola con AuNPs



Nota: **a)** Espectro del medio residual con AuNPs a 0,022 mg mL⁻¹; **b)** Espectro del medio residual con AuNPs a 0,044 mg mL⁻¹; (Soria, 2022).

No obstante, como se indica en el ANOVA de dos vías, hay diferencias significativas tanto en tratamientos ($F=60,2$; $p<0,001$) como en concentraciones ($F=32,1$; $p<0,001$); a pesar de que no se presenten diferencias significativas en la interacción de ambos factores ($F=0,449$; $p=4,142$).

Por consiguiente, con el método post-hoc *Holm-Sidak* se corroboró que existen diferencias significativas del porcentaje de oro en el medio de cultivo remanente (Tabla 5). Únicamente entre los ensayos con AuNPs_F1 y AuNPs_Q no se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$), lo que sugiere que en ambos casos las NPs no se adhirieron a *F. muscicola*, y que los híbridos tuvieron mayor muerte celular y fueron desechados en el medio residual.

Tabla 5.

Análisis estadístico de comparación múltiple de los tratamientos.

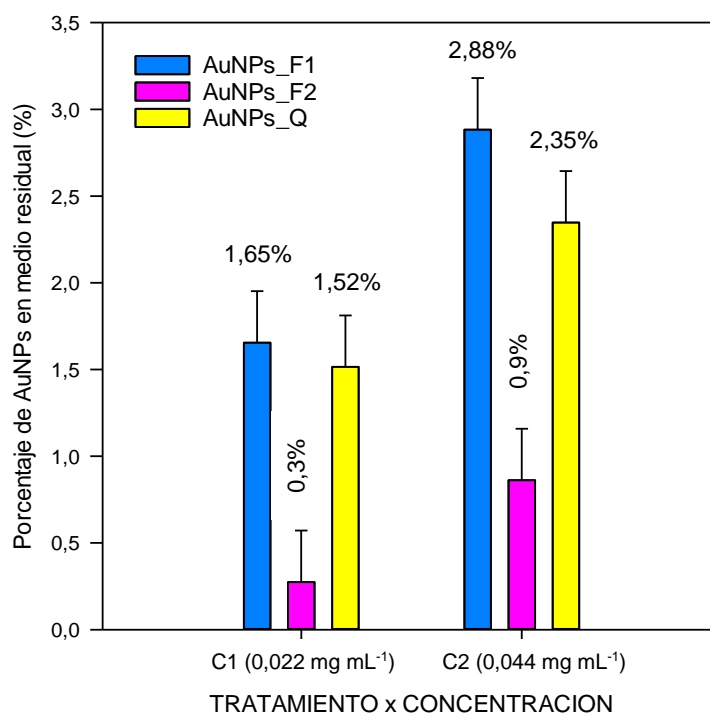
Factor	Comparación	Diferencia de medias (% Au)	t	p
Tratamiento	AuNPs_F1 vs. AuNPs_F2	1,701	9,866	<0,001
	AuNPs_Q vs. AuNPs_F2	1,363	9,091	<0,001
	AuNPs_F1 vs. AuNPs_Q	1,136	0,775	0,446
Concentración 0,022 mg mL ⁻¹ vs 0,044 mg mL ⁻¹	AuNPs_F1	1,229	2,224	0,036
	AuNPs_F2	0,587	5,617	<0,001
	AuNPs_Q	0,832	1,974	0,060

Nota: Método post-hoc Holm-Sidak (Soria, 2022)

Al comparar las concentraciones de los tratamientos, en el caso de los ensayos con AuNPs_Q, hay apenas 0,6% más de oro en los tratamientos con 0,044 mg mL⁻¹ respecto a los de 0,022 mg mL⁻¹, señalando que este factor no es significativamente influyente para que los cultivos con AuNPs_Q, tengan menos adherencia de las NPs a la cianobacteria y mayor muerte celular de los híbridos formados (Figura 40).

Figura 40.

Análisis ANOVA de dos vías del porcentaje de Au en el medio residual.



Nota: Análisis ANOVA dos vías del porcentaje de Au en el medio residual.

En la Figura 40, se muestra que los medios con porcentajes menores de Au fueron en los tratamientos con AuNPs_F2 para las concentraciones de 0,022 y 0,044 mg mL⁻¹ con 0,3 % y 0,9% respectivamente. Es decir, las NPs fueron absorbidas por mecanismos poco agresivos para la estructura celular y los híbridos se adaptaron adecuadamente a las NPs, disminuyendo el porcentaje de muerte celular.

Sin embargo, los tratamientos con AuNPs_F1 y AuNPs_Q, como ya se mencionó con los resultados previos, presentan mayor toxicidad para las células por los agentes reductores. Por lo tanto, las cianobacterias que absorben las NPs tienen mayor porcentaje de muerte celular: o a su vez con el paso del tiempo, las NPs que no fueron asimiladas por *F. muscicola*, se acumularon en el medio de cultivo causando sobredosis. Por consiguiente, la Figura 40, indica que en los medios residuales hay porcentajes similares de AgNPs_F1 y AgNPs_Q en concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹ (1,65 y 1,52 % de Au) y 0,044 mg mL⁻¹ (2,88 y 2,35 % de Au).

Conclusiones

- ✓ Los cultivos de *F. muscicola* en el medio de BG11o han registrado altas cantidades de heterocistos y con una actividad fotosintética óptima, alcanzando hasta un 25% más de biomasa respecto a cultivos en medio BG11 de investigaciones preliminares.
- ✓ Todos los híbridos de *F. muscicola* presentaron viabilidad y crecimiento celular hasta el día 38; sin embargo, luego de 60 días únicamente los tratamientos con AgNPs_F2 y AuNPs_F2 en concentraciones de 0,022 mg mL⁻¹, mantuvieron un crecimiento exponencial con variaciones de 11,2 % y 13,3 % respecto al control; debido a la compatibilidad del extracto de F2 con los requerimientos nutricionales de la cianobacteria.
- ✓ Los estudios realizados de las cianobacterias híbridas mediante AFM y voltamperometría cíclica, registraron que el mejor tratamiento para la generación de energía corresponde a los híbridos con AgNPs_F2 ya que, la cianobacteria viva posee 3,14±0,94 eV; con un HOMO de -4,74 eV cercano al electrodo de ITO.
- ✓ Los análisis de espectrofotometría UV-Vis, XRD y EDS mostraron que las pérdidas de nanopartículas de Ag y Au durante el cambio de medio de cultivo residual cada 14 días son mínimos y que el mejor híbrido que se adaptó a la presencia de NPs fue el tratamiento con AgNPs_F2 con 0,099±0,003 % de Ag en el medio residual.

Recomendaciones

- Determinar la densidad celular y cinética de crecimiento mediante espectrofotometría UV-vis para corroborar los resultados obtenidos del conteo celular.
- Seguir el estudio de crecimiento celular por más días a las descritas en este trabajo.
- Optimizar los protocolos de homogenización de los cultivos de *F. muscicola*.
- Los electrodos empleados para capturar la energía generada por AgNPs puede estar recubiertos de ITO; sin embargo, para los tratamientos con AuNPs, se recomienda investigar otro tipo de electrodo que permita la captación de energía.

- Respecto a la técnica de voltametría cíclica se recomienda optimizar protocolos de limpieza de los electrodos de carbono vitrio y platino y revisar el estado de los mismos.
- Se puede caracterizar los cultivos híbridos con espectrofotometría UV-Vis y EDS en periodos de tiempo continuos para determinar la adhesión o internalización de las NPs a las cianobacterias.
- Para una mejor visualización de los difractogramas, se recomienda preparar la muestra en sustratos *Zero background* para obtener resultados más detallados
- Estandarizar protocolos para la preparación de la muestra de EDS.

Bibliografía

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2008.03918.X>
- Abril, N., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez-Valdés, F., & Túnez, I. (2017). *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Aguilera, A., & Echenique, R. O. (2015). *Consideraciones generales de Cyanobacteria: aspectos ecológicos y taxonómicos*.
- Ahmad, S., Munir, S., Zeb, N., Ullah, A., Khan, B., Ali, J., Bilal, M., Omer, M., Alamzeb, M., Salman, S. M., & Ali, S. (2019). Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles — An ecofriendly approach. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5087–5107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>
- Al-Yousef, H. M., & Amina, M. (2021). Phytoconstituents and pharmacological activities of cyanobacterium *Fischerella ambigua*. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 14, Issue 6, p. 103153). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103153>
- Alvarez, D. (2022). *Cianobacterias: qué son, características y ejemplos - Resumen*. <https://www.ecologiaverde.com/cianobacterias-que-son-caracteristicas-y-ejemplos-3546.html>

- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). *CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO View project Value products from microalgae View project*.
<https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Arroyo, G., Angulo, Y., Debut, A., & Cumbal, L. H. (2021). Synthesis and characterization of silver nanoparticles prepared with carrasquilla fruit extract (*Berberis hallii*) and evaluation of its photocatalytic activity. *Catalysts*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/CATAL11101195/S1>
- Arroyo, G. V., Madrid, A. T., Gavilanes, A. F., Naranjo, B., Debut, A., Arias, M. T., & Angulo, Y. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 55(11), 1304–1320.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1790953>
- Baker, A. (2017). *Phycokey: una clave basada en imágenes para algas (PS Protista), cianobacterias y otros objetos acuáticos*. Centro de Biología de Agua Dulce de La Universidad de New Hampshire.
http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_filaments/cyano_branched_fil/cyano_true_branches/FISCHERELLA/Fischerella_key.html
- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289–299. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- Cahya, E., Yulianto, B., Suyatman, S., & Dipojono, H. (2015). Theoretical Investigation of Anthocyanidin Aglycones as Photosensitizers for Dye-Sensitized TiO₂ Solar Cells. *Advanced Materials Research*, 1112(March 2015), 317–320.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1112.317>
- Chamé, K. F. (2013). Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas. *Tesis de Maestría*, 87.
- Chávez, D. (2019). *Síntesis verde de nanopartículas mediante interacción de la radiación ultravioleta visible*.

- Comisión Europea. (2012). *Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales*.
http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/ict/key_technologies/kets_high_level_group_en.htm.
- Compton, R., Laborda, E., & Ward, K. (2014). *Understanding Voltammetry: Simulación of Electrode processes*.
- De Caro, C., & Haller, C. (2015). *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications*.
Mettler Toledo.
https://www.researchgate.net/publication/321017142_UVVIS_Spectrophotometry_-_Fundamentals_and_Applications
- de León Santillán, A. (2010). Síntesis de nanopartículas de oro en presencia de un poli(feniletinileno). Desarrollo de celdas solares. In *Materiales Avanzados: Vol. Maestría*.
- Del Castillo, D., Arroyo, G., Escorza, J., Angulo, Y., Debut, A., Vizúete, K., Izquierdo, A., & Arias, M. (2021). Development of a hybrid cell for energy production. *Nanotechnology*, 32(41), 415401. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac0c3e>
- Del Castillo, Dennisse. (2019). *Análisis de la absorción de nano partículas de plata por la cianobacteria Fischerella muscicola en diferentes medios de cultivo para su aplicación en energía*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/20825/1/T-ESPE-039682-R.pdf>
- del Rocío, E., Ávila, L., & Arroyo, O. (2017). Nanopartículas de plata: Mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39–54.
- El alamy, A., Bourass, M., Amine, A., Hamidi, M., & Bouachrine, M. (2017). New organic dyes based on phenylenevinylene for solar cells: DFT and TD-DFT investigation. *Karbala International Journal of Modern Science*, 3(2), 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.03.002>
- EMS. (2021). *Hemocitometría de Neubauer*.
<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx>
- Fernández, V., Bennasar, A., Sureda, A., Ramis, G., & Agawin, N. S. R. (2020). Differential Effects of Varying Concentrations of Phosphorus, Iron, and Nitrogen in N₂-Fixing

- Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11(September), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.541558>
- Franco, J. (2012). *Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) -Espectrometría de dispersión de longitud de onda de rayos X (WDS)*.
- Galindo, R. (2014). *Determinación de los niveles HOMO-LUMO mediante voltamperometría cíclica*.
- García, M., García, M., & Gómez, M. (2020). *Difracción de rayos X*. X Ray Data.
<https://www.xdataser.com/difraccion-de-rayos-x/>
- Gil Martínez, M. (2022). *Efecto de las nanopartículas de plata Argovit™ en la microalga Chattonella sp.*
- Girão, A. V., Caputo, G., & Ferro, M. C. (2017). Application of Scanning Electron Microscopy–Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS). *Comprehensive Analytical Chemistry*, 75, 153–168. <https://doi.org/10.1016/BS.COAC.2016.10.002>
- Gómez, S., & Quesada de Corral, A. (2011). *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. Ministerios de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <https://www.sergas.es/Saude-publica/Documents/1477/CATÁLOGO CIRES QUESADA.pdf>
- Hamida, R. S., Ali, M. A., Redhwan, A., & Bin-Meferij, M. M. (2020). Cyanobacteria – a promising platform in green nanotechnology: A review on nanoparticles fabrication and their prospective applications. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 15, pp. 6033–6066). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S256134>
- Holder, C. F., & Schaak, R. E. (2019). Tutorial on Powder X-ray Diffraction for Characterizing Nanoscale Materials. *ACS Nano*, 13(7), 7359–7365.
https://doi.org/10.1021/ACSNANO.9B05157/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NN-2019-051577_0009.GIF
- Honsberg, C., & Bowden, S. (2022). *Energía del fotón*. PVEducation.
<https://www.pveducation.org/es/fotovoltaica/2-propiedades-de-la-luz-del-sol/energía-del-fotón>

- Huamán Aguirre, A. A. (2016). *ELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS DE TiO₂ /MgO APLICADOS A CELDAS SOLARES SENSIBILIZADAS CON COLORANTE* (Issue April). http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/4891/1/huaman_aa.pdf
- Huang, Y. W., Cambre, M., & Lee, H. J. (2017). The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 18, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms18122702>
- Inel, G. A., Soare, M. L., Bujduveanu, M. R., Varga, Ş., Ungureanu, E. M., & Birzan, L. (2014). Electrochemical characterization of some azulene selenium compounds. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 76(1), 3–10.
- ITIS. (2022). *ITIS - Report: Fischerella musicola*. Sistema Integrado de Información Taxonómica. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=1414#null
- Jalili, N., & Laxminarayana, K. (2004). A review of atomic force microscopy imaging systems: Application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics*, 14(8), 907–945. <https://doi.org/10.1016/J.MECHATRONICS.2004.04.005>
- Jill, B. (2022). *Química analítica. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)*. . JoVE Science Education Database, Cambridge, MA,. <https://www.jove.com/es/v/10204/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy?language=Spanish>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology 2022 20:1*, 20(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/S12951-022-01477-8>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.05.011>
- Kim, M. J., Lee, S., Moon, C. K., Kim, J. J., Youn, J. R., & Song, Y. S. (2020). A Broadband

- Multiplex Living Solar Cell. *Nano Letters*, 20(6), 4286–4291.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c00894>
- LaboratoryInfo. (2022). *Recuento manual de células con cámara de Neubauer*.
<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>
- Lea-Smith, D. J., Bombelli, P., Vasudevan, R., & Howe, C. J. (2016). Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(3), 247–255.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.007>
- Liu, S., & Wang, Y. (2011). A Review of the Application of Atomic Force Microscopy (AFM) in Food Science and Technology. *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 201–240.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00006-5>
- Mahana, A., Guliy, O. I., & Mehta, S. K. (2021). Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111662.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111662>
- Martínez, A., Trujillo, M. N., & Ramírez, E. (2020). Crecimiento y metabolismo de Fischerella TB22 en medio de BG11o. *Bol.Micol*, 35(1), 26–34.
<https://doi.org/10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425>
- Martinez, R. (2014). *Aislamiento y Evaluación de la viabilidad de las cianobacterias de la rizosfera de plantas leguminosas cultivadas en la parroquia Poaló, Latacunga-Cotopaxi*.
- MED. (2015). *Componentes del Espectrofotómetro de uv-visible*. <https://med.se-todo.com/himiya/9030/index.html?page=6>
- Meunier, C. F., Yang, X. Y., Rooke, J. C., & Su, B. L. (2011). Biofuel cells based on the immobilization of photosynthetically active bioentities. *ChemCatChem*, 3(3), 476–488.
<https://doi.org/10.1002/CCTC.201000410>
- Mishra, B. N., Kaushik, M. S., Abraham, G., & Singh, P. K. (2018). Physico-chemical factors influencing spore germination in cyanobacterium Fischerella muscicola. *Journal of Basic Microbiology*, 58(8), 679–685. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201800161>

- Nafisi, S., & Maibach, H. I. (2017). Nanotechnology in cosmetics. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications* (pp. 337–361). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00022-7>
- Naranjo, Y. (2017). *Identificación de bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos se las fuentes geotermales: El Riñon- provincia del Azuay y Guapán- provincia del Cañar.*
- Nedbal, jakub. (2020). *Counting Microalgae Culture Density.*
<https://www.protocols.io/view/counting-microalgae-culture-density-rm7vz8ok4vx1/v2>
- Nguyen, M. K., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201(May).
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110781>
- Nikkanen, L., Solymosi, D., Jokel, M., & Allahverdiyeva, Y. (2021). Regulatory electron transport pathways of photosynthesis in cyanobacteria and microalgae: Recent advances and biotechnological prospects. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 514–525.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13404>
- Nikokherad, H., Esmaili-Sari, A., Moradi, A. M., Bahramifar, N., & Mostafavi, P. G. (2022). Bioaccumulation capacity of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* exposed to silver nanoparticles and silver nitrate: Bio- and health risk assessment approach. *Algal Research*, 64, 102671. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102671>
- Palencia, S. L., Combatt, E. M., & Palencia, M. S. (2013). Toxicidad de nanopartículas inorgánicas sobre los microorganismos del suelo con importancia agrícola. una revisión. *Temas Agrarios*, 18(2), 106. <https://doi.org/10.21897/RTA.V18I2.720>
- Parra, O. (2008). *Fischerella Gomont.*
https://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/LucidKeys3.5/Keys_v3.5/Carolina35_Key/Media/Html/Fischerella_Main.html
- Peleato, M., & Gómez-Moreno, C. (2011). *LAS CIANOBACTERIAS: COOPERACIÓN VERSUS COMPETENCIA.*
- Rajneesh, Singh, S. P., Pathak, J., & Sinha, R. P. (2017). Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for

- economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 578–595.
<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.110>
- Rastogi, R. P., & Incharoensakdi, A. (2015). Occurrence and induction of a ultraviolet-absorbing substance in the cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR8215. *Phycological Research*, 63(1), 51–55. <https://doi.org/10.1111/PRE.12069>
- Richmond, A. (2003). Handbook of Microalgal Culture. In *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Rojas, J. (2017). *Voltametría Cíclica*. <https://es.scribd.com/presentation/361923631/voltametria-ciclica>
- Ruvalcada, F., Sánchez, V., Reyes-Becerril, M., Hernández-Adame, L., & Angulo, C. (2020). *Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir de extracto de damiana (Turnera diffusa)*. PCTI. <https://pcti.mx/articulos/sintesis-verde-de-nanoparticulas-de-oro-a-partir-de-extracto-de-damiana-turnera-diffusa/>
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, 62(1), 89–99. <https://doi.org/10.4081/EJH.2018.2841>
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology* 2018 16:1, 16(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S12951-018-0334-5>
- UNP. (2009). *Cianobacterias*. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/botanicageneral/wp-content/uploads/2016/03/Cianobacterias.pdf>
- Vahabi, S., Nazemi Salman, B., & Javanmard, A. (2013). Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(2), 76. [/pmc/articles/PMC3700051/](https://pmc/articles/PMC3700051/)
- Valencia, M. (2018). *Obtención y caracterización de biomasa partir de Fischerella muscicola para aplicación en biocombustibles*.
- Wutthithien, P., Lindblad, P., & Incharoensakdi, A. (2019). Improvement of photobiological

- hydrogen production by suspended and immobilized cells of the N₂-fixing cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR 8215. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3527–3536. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01881-y>
- Yaqoob, A. A., Umar, K., & Ibrahim, M. N. M. (2020). Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience* 2020 10:5, 10(5), 1369–1378. <https://doi.org/10.1007/S13204-020-01318-W>
- Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/C1NR11188D>
- Yunga, J. (2018). *Caracterización de la microalga Fischerella muscicola, para evaluar la biomasa y su potencia uso en la industria alimenticia.*
- Zangeneh, M. M., & Zangeneh, A. (2020). Novel green synthesis of Hibiscus sabdariffa flower extract conjugated gold nanoparticles with excellent anti-acute myeloid leukemia effect in comparison to daunorubicin in a leukemic rodent model. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/aoc.5271>
- Zhou, T., Li, X., Zhang, Q., Dong, S., Liu, H., Liu, Y., Chaves, A. V., Ralph, P. J., Ruan, R., & Wang, Q. (2022). Ecotoxicological response of *Spirulina platensis* to coexisted copper and zinc in anaerobic digestion effluent. *Science of the Total Environment*, 837. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.155874>
- Zúñiga, B. (2018). *Microbiología.* <https://docplayer.es/82628045-T-microbiologia.html>

