

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Biosíntesis de nanopartículas de plata a  
partir de hongos rizosféricos y su  
inmovilización en una fibra natural para  
el control *in vitro* de la bacteria  
fitopatógena (*Pectobacterium  
carotovorum*)**

**Mayra Eleonora Beltrán Pineda**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2023



# **Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control *in vitro* de la bacteria fitopatógena (*Pectobacterium carotovorum*)**

**Mayra Eleonora Beltrán Pineda**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de: Doctor en Biotecnología

Director (a):

Cesar Augusto Sierra Ávila, Ph.D.

Codirector (a):

Luz Marina Lizarazo Forero, Ph.D., PD.

Línea de Investigación: Bioprocesos

Grupo de Investigación: Macromoléculas- Biología ambiental

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2023



*A mi esposo Camilito y mis hijitos Emilito y Sarita los amores  
de mi vida.*

*A mis padres y hermanos, por su amor incondicional y creer en  
mí.*



## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Mayra Eleonora Beltrán Pineda

7 /07/2023

## Agradecimientos

A Dios por ser mi guía, por permitirme cumplir este sueño a pesar de todas las dificultades que se me presentaron en el camino y por no dejarme desistir.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, a la Gobernación de Boyacá - Sistema Nacional de Regalías que mediante la convocatoria 733 de 2015: "Formación de capital humano de alto nivel para las regiones" fueron los entes financiadores de mi formación doctoral y de este proyecto de investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme formarme íntegramente a nivel de postgrado y al Doctorado en Biotecnología y sus profesores Sonia Ospina, Jairo Cerón, Daniel Uribe y Mónica Guzmán por sus enseñanzas y contribuciones para consolidar el proyecto de investigación. A Raquel Noguera por su apoyo y orientación en trámites académicos y administrativos durante el desarrollo de mi Doctorado.

Al profesor Cesar Augusto Sierra Ávila director de este trabajo de investigación por su don de gentes, por creer en mí, por su valiosa asesoría académica y apoyo en todas las etapas de la investigación. A la codirectora del proyecto, profesora Luz Marina Lizarazo Forero por su asesoría académica durante la formulación y desarrollo del proyecto y por permitirme realizar gran parte del trabajo experimental en su laboratorio de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) en Tunja, lo que me permitió estar cerca de mi familia.

A la profesora Julia Reyes de la UPTC en Tunja por su apoyo y asesoría en diversas etapas del proyecto. Al profesor León Pérez del grupo de investigación en Macromoléculas-UN (Makro) por su gestión para la realización de algunas técnicas de caracterización de las nanopartículas de plata (AgNp's). A los profesores José Castellanos, Ingrid Fonseca de la Universidad de Boyacá y a la profesora Mónica Becerra de la UPTC en Tunja por su amistad y asesoría en diferentes momentos del desarrollo de la investigación.

Al señor Álvaro Bohórquez y su esposa María del Carmen Molano propietarios de los terrenos de donde se tomaron las muestras de suelo de cultivos de papa en el municipio de Ventaquemada- Boyacá. Al Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes (LAMFU) por la donación de la cepa de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* para poder realizar los ensayos antibacteriales a nivel *in vitro*. Al laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad de Antioquia y a Jhon Aragón



profesional del laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá por los análisis respectivos. Al profesional Juan Pablo Rosas del grupo de trámites ambientales de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por la asesoría para generar el contrato de acceso a recurso genético requerido en esta investigación.

A Mauricio Acelas, Andrea Garzón, Julián Porras y Angie Roperero integrantes del grupo de investigación en Macromoléculas- UN (Makro) por su colaboración en la recepción y entrega de muestras a otras dependencias de la Universidad Nacional Sede Bogotá, durante la pandemia por COVID 19, mientras me encontraba en la ciudad de Tunja y me era imposible viajar, así como por su asesoría para la realización de algunos análisis de caracterización de las AgNp's.

A mi papá Edgar Beltrán por su amor a la ciencia y su motivación constante, a mi mamá Soraya Pineda y mis hermanos Roció, Andrés y Valentina por su amor incondicional. A mi suegro Joaquín Bohórquez que en vida me apoyo y ahora desde el cielo me acompaña, a mi suegra Carmen Rosa Dallos y mi tía Irma Pineda por su apoyo con el cuidado de mis niños mientras estudiaba. A Manuel Bohórquez y Katherine Poveda por el alojamiento en Bogotá cuando lo necesité durante este Doctorado. **A mi esposo Camilo Bohórquez por su amor, paciencia y apoyo constante, por creer en mí aún en los momentos más difíciles, sin ti no hubiera sido posible... A mis pequeños Emilito y Sarita por alegrarme la vida y permitirme compartir su tiempo con este Doctorado.**

A todas las demás personas que de una u otra forma me colaboraron. Mil graci...

## Resumen

### **Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control *in vitro* de la bacteria fitopatógena (*Pectobacterium carotovorum*) (Resolución 023 de 2015. Artículo 02)\***

En esta investigación inicialmente se realizó un estudio de bioprospección para seleccionar hongos rizosféricos de cultivos de papa, hongos promisorios para la síntesis de AgNp's con acción antibacterial frente a *Pectobacterium carotovorum*, agente fitopatógeno de papa de difícil manejo por técnicas convencionales. Se aislaron cinco hongos de las especies *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* que produjeron AgNp's esféricas de tamaños entre 15 y 45 nm, las cuales presentaron acción antibacterial frente al fitopatógeno. Empleándose a *Fusarium oxysporum* se encontró que al usar una solución de AgNO<sub>3</sub> 3mM, pH de 10, y 27 °C/24 h se obtiene el mayor rendimiento en la síntesis de AgNp's. Posteriormente, estas nanopartículas fueron caracterizadas por TEM, FTIR, XRD, DLS, PI y potencial Z, tras lo cual su poder antibacterial frente al fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* fue estudiado, encontrándose zonas de inhibición de crecimiento de hasta 11,3 mm de diámetro cuando se emplea una dosis de 100 ppm y una MIC de 25 y 50 ppm, determinada por micro y macrodilución respectivamente. También se realizaron estudios a nivel del sustrato vegetal, evidenciándose un efecto protector sobre el tubérculo cuando se aplica una dosis de 100 ppm de AgNp's sobre el tejido a manera de tratamiento preventivo. Posteriormente y para limitar la absorción de las nanopartículas en el tubérculo se realizaron pruebas de inmovilización de las AgNp's sobre fibras de algodón quirúrgico por dos metodologías (cationización y reducción bioquímica *in situ*), obteniéndose dos tipos de fibras denominadas A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi. Fibras que mostraron zonas de inhibición de crecimiento del *Pectobacterium carotovorum*, con una disminución en los recuentos bacterianos a las 24 horas e inhibición de crecimiento a las 48 horas. Donde las pruebas de reuso de estas fibras con nanopartículas mostraron que los dos tipos fibras pueden tener hasta tres usos sucesivos sin perder su efectividad, independientemente del método de modificación empleado. Adicionalmente, es importante resaltar que las pruebas de retención de las AgNp's indicaron que estas permanecen adheridas a las fibras A-AgNp's-C y a las fibras A-AgNp's-RBi después de dos y tres lavados sucesivos, respectivamente. Finalmente, las AgNp's biosintetizadas se adhirieron a fibras de fique por cationización con el objetivo de obtener sacos antibacteriales de 10 x 12 cm, los cuales en pruebas *in vivo* presentaron tan solo un 7,8 % de afectación, mientras que tubérculos almacenados en un saco tradicional tuvieron una afectación del 25%. Por lo tanto, el empleo de hongos rizosféricos para la síntesis de AgNp's con acción nanopesticida frente al fitopatógeno *P. carotovorum* y su inmovilización en fibras naturales, permitirá el desarrollo de una aplicación nanobiotecnológica en el

campo de embalajes para el almacenamiento de papa, con posibilidades de escalamiento, lo que aunará en la implementación de prácticas de agricultura de precisión.

**Palabras clave:** Agricultura de precisión, bioprocesos, *Fusarium oxysporum*, micosíntesis, nanopartículas de plata, *Pectobacterium carotovorum*, *Solanum tuberosum*.

## Abstract

### **Biosynthesis of silver nanoparticles from rhizospheric fungi and their immobilization in a natural fiber for the *in vitro* control of the phytopathogenic bacterium (*Pectobacterium carotovorum*) (Resolución 023 de 2015. Artículo 02)\***

In this research, a bioprospecting study was initially carried out to select rhizospheric fungi from potato crops, promising fungi for the synthesis of AgNPs with an antibacterial action against *Pectobacterium carotovorum*, a potato phytopathogenic agent that is difficult to manage by conventional techniques. Five fungi of *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger*, and *Fusarium oxysporum* that produce spherical AgNPs between 15 and 45 nm in size were isolated and showed antibacterial action against the phytopathogen. Using *Fusarium oxysporum*, it was found that using a solution of AgNO<sub>3</sub> 3mM, pH 10, and 27 °C/24 h obtained the highest yield in AgNPs synthesis. Subsequently, these nanoparticles were characterized by TEM, FTIR, XRD, DLS, PI and Z-potential, after which their antibacterial power against the phytopathogen *Pectobacterium carotovorum* was studied, finding growth inhibition zones up to 11.3 mm in diameter when using a dose of 100 ppm and a MIC of 25 and 50 ppm, determined by micro and macrodilution, respectively. Studies were also carried out at the plant substrate level, showing a protective effect on the tuber when a dose of 100 ppm of AgNPs was applied to the tissue as a preventive treatment. Subsequently, and to limit the absorption of the nanoparticles in the tubercle, immobilization tests of AgNPs on surgical cotton fibers were carried out by two methodologies (cationization and *in situ* biochemical reduction), obtaining two types of fibers called A-AgNPs-C and A-AgNPs-RBi. These fibers showed growth inhibition zones of *Pectobacterium carotovorum*, with a decrease in bacterial counts at 24 hours and growth inhibition at 48 hours. The reuse tests of these fibers with nanoparticles showed that the two types of fibers could have up to three successive uses without losing their effectiveness, regardless of the modification method used. Additionally, it is important to highlight that the retention tests of the AgNPs indicated that they remain attached to the A-AgNPs-C and A-AgNPs-RBi fibers after two and three successive washes, respectively. Finally, the biosynthesized AgNPs were adhered to fique fibers by cationization to obtain antibacterial 10 x 12 cm sacks, which in *in vivo* tests showed only 7.8% of affectation, while tubers stored in a traditional sack had an affectation of 25%. The use of rhizospheric fungi for the synthesis of AgNPs with nanopesticidal action against the phytopathogen *P. carotovorum* and their immobilization in natural fibers will allow the development of a nanobiotechnological application in the field of potato storage packaging, with the possibility of scaling up, which will contribute to the implementation of precision agriculture practices.

**Keywords:** Precision agriculture, bioprocesses, *Fusarium oxysporum*, mycosynthesis, silver nanoparticles, *Pectobacterium carotovorum*, *Solanum tuberosum*.

# Contenido

	Pág.
Agradecimientos .....	VII
Resumen .....	X
Abstract .....	XII
Lista de figuras .....	XVII
Lista de tablas .....	XX
Lista de símbolos y abreviaturas .....	XXI
Introducción .....	1
Prefacio .....	5
<b>Capítulo 1 : Marco teórico.....</b>	<b>7</b>
1.1. Cultivo de la papa y <i>Pectobacterium carotovorum</i> como agente fitopatógeno .....	7
1.2 Nanopartículas de plata (AgNp's) .....	9
1.3 Rutas de síntesis para la obtención de nanopartículas de plata (AgNp's) .....	10
1.4. Micosíntesis: Biosíntesis de AgNp's empleando hongos .....	12
1.5 Mecanismos de micosíntesis de AgNp's .....	15
1.5.1 Síntesis extracelular de AgNp's .....	16
1.5.2 Síntesis intracelular de AgNp's .....	17
1.6 Sustancias estabilizadoras de AgNp's obtenidas por micosíntesis.....	17
1.7 Variables que afectan la micosíntesis <i>in vitro</i> de las AgNp's .....	19
1.7.1 pH .....	21
1.7.2 Temperatura .....	21
1.7.3 Edad del inóculo y cantidad de biomasa .....	22
1.7.4 Concentración del metal .....	23
1.7.5 Otros factores que pueden afectar la micosíntesis <i>in vitro</i> .....	23
1.8 Nanopartículas de plata (AgNp's) como nanopesticidas .....	24
1.9 Inmovilización de nanopartículas de plata (AgNp's) .....	25
<b>Capítulo 2 : Estudio de bioprospección en suelos de páramo para la selección de hongos rizoféricos del cultivo de papa para la biosíntesis de AgNp's .....</b>	<b>28</b>
2.1 Introducción.....	28
2.2 Materiales y Métodos .....	30
2.2.1 Aislamiento e identificación de hongos rizoféricos de la papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	30
2.2.2 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR).....	30
2.2.3 Caracterización molecular de hongos promisorios para la biosíntesis de AgNp's .....	30
2.2.4 Biosíntesis de AgNp's a partir de los hongos promisorios .....	31
2.2.5 Caracterización de las AgNp's obtenidas por los cinco aislamientos productores de AgNp's .....	32
2.2.6 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR) en el FCLM de los cinco aislamientos productores de AgNp's .....	34
2.2.7 Selección de cepa de <i>Pectobacterium carotovorum</i> para ensayos antimicrobianos.....	34
2.2.8 Actividad antibacteriana de las AgNp's contra el agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	35
2.2.8.1 Curva de calibración de <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	35
2.2.9 Análisis estadístico.....	36

2.3. Resultados y discusión .....	37
2.3.1 Aislamiento e identificación de hongos rizosféricos del cultivo de la papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	37
2.3.2 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR).....	37
2.3.3 Caracterización molecular de hongos prometedores para la biosíntesis de AgNp's .....	39
2.3.4 Biosíntesis de AgNp's a partir de los aislamientos promisorios.....	40
2.3.5 Caracterización de las AgNp's obtenidas por los cinco aislamientos productores de AgNp's .....	44
2.3.6 Evaluación de la actividad de la nitrato reductasa (NR) en el FCLM.....	51
2.3.7 Selección de cepa del agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	52
2.3.8 Actividad antibacteriana de las AgNp's contra el agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	54
2.4 Conclusiones .....	57
<b>Capítulo 3 : Obtención de AgNp's con acción antibacterial frente a <i>Pectobacterium carotovorum</i> a partir de un extracto enzimático de <i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	<b>59</b>
3.1 Introducción.....	59
3.2 Materiales y métodos.....	61
3.2.1 Biosíntesis y ensayos de eficiencia para la producción de AgNp's a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	61
3.2.2 Caracterización de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	62
3.2.3 Pruebas antibacteriales de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> frente al agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	62
3.2.3.3 Evaluación del efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de la pudrición blanda del tubérculo bajo condiciones controladas .....	65
3.2.5 Análisis estadístico .....	65
3.3 Resultados y discusión.....	66
3.3.1 Biosíntesis y ensayos de eficiencia para la producción de AgNp's por parte de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	66
3.3.2 Caracterización de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	73
3.3.3 Pruebas antibacteriales de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> frente al agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> .....	76
3.3.4 Evaluación del efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de la pudrición blanda del tubérculo bajo condiciones controladas .....	81
3.4 Conclusiones .....	83
<b>Capítulo 4 : Fibras antibacteriales a partir de AgNp's micosintetizadas para la fabricación de un empaque antibacterial con acción controladora frente a <i>Pectobacterium carotovorum</i>....</b>	<b>85</b>
4.1 Introducción.....	85
4.2 Materiales y métodos.....	86
4.2.1 Obtención de AgNp's a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	86
4.2.2 Inmovilización de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> en una fibra de algodón quirúrgico y su caracterización.....	87
4.2.3 Actividad antimicrobiana de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	88
4.2.4 Prueba de reuso de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	89
4.2.5 Evaluación de la retención de las AgNp's modificadas a fibras de algodón quirúrgico producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	89

4.2.6 Inmovilización de las AgNp's con acción antibacterial sobre fibras de fique como prueba piloto de un costal antibacterial .....	90
4.2.7 Determinación del peso del tejido macerado de los tubérculos almacenados en sacos antibacteriales.....	91
4.2.8 Análisis estadísticos.....	91
4.3 Resultados y discusión.....	91
4.3.1 Obtención de AgNp's con acción antibacterial a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	92
4.3.2 Inmovilización de las AgNp's producidas <i>Fusarium oxysporum</i> en una fibra de algodón quirúrgico y su caracterización .....	92
4.3.3 Actividad antimicrobiana de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	97
4.3.4 Prueba de reuso de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	99
4.3.5 Evaluación de la retención de las AgNp's modificadas a fibras de algodón quirúrgico producidas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	100
4.3.6 Inmovilización de las AgNp's con acción antibacterial sobre fibras de fique como prueba piloto de un costal antibacterial .....	103
4.3.7 Determinación del peso del tejido macerado de tubérculos almacenados en costales antibacteriales.....	105
4.4 Conclusiones .....	106
<b>Capítulo 5 : Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>108</b>
Conclusiones .....	108
Recomendaciones.....	110
<b>Capítulo 6 : Productos generados .....</b>	<b>111</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	

## Anexos



## Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
<b>Figura 1-1:</b> Métodos de producción de nanopartículas (Np's).....	10
<b>Figura 1-2:</b> Esquematación del modelo de micosíntesis extracelular e intracelular de nanopartículas de plata (AgNp's).....	18
<b>Figura 2-1:</b> Dendrograma y micrografías SEM de los hongos promisorios para la biosíntesis de AgNp's. A) Dendrograma realizado con el programa MEGA X con un Bootstrap de 1000 réplicas B) Esporas de <i>Penicillium simplicissimum</i> , C) Conidióforo de <i>Aspergillus niger</i> , y D) Macroconidias de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	40
<b>Figura 2-2:</b> Hongo, reacciones de biosíntesis y espectro de absorción UV-Vis de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), B) H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), C) H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ), D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ). Controles: AgNO <sub>3</sub> y FCLM. ....	42
<b>Figura 2-3:</b> Micrografías TEM y distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), B) H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), C) H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ), D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ). DE: desviación estándar. ....	45
<b>Figura 2-4.</b> Análisis de esfericidad de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), B) H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), C) H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ), D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ). ....	46
<b>Figura 2-5:</b> Análisis de difracción de rayos X de las AgNp's obtenidas a partir los cinco aislamientos productores de AgNp's. H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ); H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ); D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ).....	50
<b>Figura 2-6:</b> Actividad nitrato reductasa en el filtrado celular libre de micelio a partir de; A) H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), B) H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), C) H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ), D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ). Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%.51	51
<b>Figura 2-7:</b> A) Fotografías de la prueba de la pudrición blanda del tubérculo para las cepas PC donada por el LAMFU, Cepa 8,1 aislada de pitahaya ( <i>Selenicereus undatus</i> ), y Cepa 9,1 aislada de pitahaya ( <i>Selenicereus undatus</i> ). B. Peso de tejido macerado de tubérculos de papa generado por tres cepas de <i>Pectobacterium carotovorum</i> a los siete días de evaluación, donde "C" es el control del experimento sin inocular. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%. ....	53
<b>Figura 2-8:</b> Curva de calibración absorbancia vs. UFC/mL para la bacteria fitopatógena <i>Pectobacterium carotovorum</i> . ....	54
<b>Figura 2-9:</b> Zonas de inhibición de crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> producidas por las AgNp's obtenidas por hongos rizosféricos. A) H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), B) H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), C) H14 ( <i>Aspergillus niger</i> ), D) H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> ), y E) H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ). Debido a que el agua destilada esteril (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> ) no inhibió el crecimiento, la barra no es visible. Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%. ....	55
<b>Figura 3-1:</b> Espectros de absorción y fotografías de la reacción de la micosíntesis de AgNp's obtenidas empleando <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando las diferentes condiciones experimentales establecidos según	

el diseño del experimento factorial 2k. Estándar: espectro UV-Vis de las AgNp's obtenidas al emplear las condiciones estándar de síntesis (pH 7, 40°C y AgNO <sub>3</sub> 1mM). .....	67
<b>Figura 3-2:</b> Micrografía TEM y distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas empleando <i>Fusarium oxysporum</i> en; A) Corrida No. 1. (27 °C, pH 7, 1mM); B). Corrida No. 2 (27 °C, pH 10, 3mM); C) Corrida No. 3(42 °C, pH 7, 3mM), y D) Corrida No. 4 (42 °C, pH 10, 1mM). Condiciones estándar (42 °C, pH 7, 1mM). FCLM: filtrado celular libre de micelio.DE: desviación estándar.....	69
<b>Figura 3-3:</b> Análisis estadístico del experimento factorial 2k para los ensayos de eficiencia en la producción de AgNp's en términos de temperatura, pH y concentración de sustancia precursora (AgNO <sub>3</sub> ); A) Grafica normal de efectos estandarizados de los factores experimentales en evaluación; B) Diagrama de Pareto para los efectos de los factores experimentales en evaluación; C) Grafica de los efectos principales de los factores experimentales en evaluación; D) Gráfica de cubos para seleccionar niveles recomendados de cada uno de los factores experimentales en evaluación.....	71
<b>Figura 3-4:</b> A) Espectro UV-Vis de las AgNp's obtenidas con <i>Fusarium oxysporum</i> al emplear las mejores condiciones de síntesis durante 24 horas. ....	73
<b>Figura 3-5:</b> A) Micrografía TEM de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> empleando las mejores condiciones de síntesis, B) Distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo las condiciones mencionadas, C) Analisis de esfericidad de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> bajo las condiciones mencionadas .....	73
<b>Figura 3-6:</b> Análisis SEM-EDS de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	74
<b>Figura 3-7:</b> Análisis FTIR de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	75
<b>Figura 3-8:</b> Análisis de difracción de Rayos X de las AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	76
<b>Figura 3-9:</b> Efecto de la dosis de AgNp's obtenidas a partir <i>Fusarium oxysporum</i> sobre el crecimiento del agente fitopatógeno <i>Pectobacterium carotovorum</i> . La zona de inhibición graficada es el promedio de tres réplicas, donde las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.....	78
<b>Figura 3-10:</b> Curvas de crecimiento de <i>Pectobacterium carotovorum</i> en presencia de diferentes concentraciones de; A) AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> , B) Antibiótico estreptomycin como control positivo. Donde el "control" es medio de cultivo sin adición de sustancia antimicrobiana. ....	80
<b>Figura 3-11:</b> Porcentaje de tejido macerado de piezas de papa tratadas con diferentes dosis de AgNp's obtenidas a partir de <i>Fusarium oxysporum</i> . El porcentaje del tejido macerado es promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%. Donde el control – (negativo) es la rodaja de papa sin inocular y el control + (positivo) es la rodaja de papa inoculada sin adición de AgNp's.	82
<b>Figura 4-1:</b> Micrografías SEM de; A) Fibras de algodón quirúrgico control, B) Fibras de algodón quirúrgico cationizadas, y C) Fibras A-AgNp's-C. ....	93
<b>Figura 4-2:</b> Análisis SEM-EDS de las fibras; A) Fibra de algodón control, y B) Fibras A-AgNp's-C. ....	94
<b>Figura 4-3:</b> Micrografías SEM de; A) Fibras de algodón quirúrgico control, y B) Fibras A-AgNp's-RBi. ....	95
<b>Figura 4-4:</b> Análisis SEM-EDS de las fibras; A) Fibras de algodón quirúrgico control, y B) Fibras A-AgNp's-RBi. ....	96

- Figura 4-5:** Análisis de difracción de rayos X de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*. .....96
- Figura 4-6:** Resultados de la prueba de difusión en agar por el método de la estría paralela para verificar la actividad antibacterial de; A) Fibras de algodón control, B) Fibras A- AgNp's-C, y C) Fibras A- AgNp's-RBi. ....97
- Figura 4-7:** Actividad antibacterial de los efluentes producto de cinco lavados sucesivos de las fibras de algodón (L1-L5) como indicador de la retención de las AgNp's ; A) A-AgNp's-C, B) A-AgNp's-RBi y espectros UV-VIS para las AgNp's presentes en los efluentes producto de lavado de las fibras; C) A-AgNp's-C, y D) A-AgNp's-RBi tras cinco lavados sucesivos (L1-L5). Los recuentos bacterianos son promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%. ....102
- Figura 4-8:** Micrografías SEM de; A) Fibras de fique control sin tratamiento, B) Fibras de fique cationizadas, C) Fibras de fique -AgNp's, y D) Análisis SEM-EDS de las fibras modificadas.....104
- Figura 4-9:** Análisis de difracción de rayos X de las fibras de fique funcionalizadas con AgNp's por cationización. ....105
- Figura 4-10:** Fotografías de; A) Saco tradicional (arriba) y saco antibacterial (Fique AgNp's) (abajo), B) Montaje y resultado del experimento para la determinación del peso de tejido macerado de tubérculos infectados con *Pectobacterium carotovorum* almacenados en sacos antibacteriales y tradicionales C) Maceración de tejido en tubérculo infectado por *Pectobacterium carotovorum*, y D) Porcentaje de tejido afectado de tubérculos almacenados en sacos tradicionales (C+) y sacos antibacteriales. El porcentaje de tejido afectado de los tubérculos es promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%. ....106

## Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
<b>Tabla 1-1:</b> Hongos productores de AgNp's, aplicación y tamaño de las AgNp's producidas.....	14
<b>Tabla 2-1:</b> Prueba cuantitativa para la reducción de nitratos para los 24 aislamientos promisorios para la biosíntesis de AgNp's. ....	38
<b>Tabla 2-2:</b> Rendimiento de la reacción de biosíntesis de AgNp's a partir de los cinco hongos rizosféricos en evaluación. ....	47
<b>Tabla 2-3:</b> Tamaño por DLS, índice de polidispersidad (PI) y carga característica de las AgNp's (potencial Z) obtenidas a partir de los cinco aislamientos promisorios para la síntesis de AgNp's. ..	49
<b>Tabla 3-1:</b> Matriz de diseño para determinar las mejores condiciones de reacción de biosíntesis de AgNp's. ....	61
<b>Tabla 3-2:</b> Tamaño medio de AgNp's y rendimiento de la reacción de biosíntesis de AgNp's en cada corrida experimental. ....	68
<b>Tabla 4-1:</b> Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi sobre <i>Pectobacterium carotovorum</i> . ....	98
<b>Tabla 4-2:</b> Resultados de la prueba de reuso de las fibras A-AgNp's-C B y A-AgNp's-RBi.....	99

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>g</i>	Gramos	g	Gramos
<i>nm</i>	Nanómetros	nm	Nanómetros
<i>nmoles</i>	Nanomoles	nmoles	Nanomoles
<i>mm</i>	Milímetros	mm	Milímetros
<i>mL</i>	Militros	mL	Militros
$R^2$	Coefficiente de determinación	NA	Coefficiente de determinación
<i>Valor p</i>	Valor P	NA	Probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$2\theta$	<i>2 theta</i>	NA	Ángulo de difracción
$\alpha$	<i>alfa</i>	NA	Nivel de significancia estadística

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
AgNp's	Nanopartículas de plata
ANOVA	Análisis de varianza
ARNr	ARN ribosomal
DLS	Análisis de dispersión de luz dinámica
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
FCLM	Filtrado celular libre de micelio
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
RCF	Fuerza centrífuga relativa
ITS	Espaciador transcrito interno
LAMFU	Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes.
NR	Nitrato reductasa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SRP	Resonancia plasmónica superficial
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
XRD	Difracción de rayos X

## Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) es el cuarto alimento de importancia en la cesta básica para la población mundial, con una producción promedio de 385 millones de toneladas por año. Los principales países productores de papa en América Latina son Perú y Colombia, este último ocupando el puesto 21 en la producción mundial (FAOSTAT, 2020). Con una producción cercana a los 2,6 millones de toneladas por año y 120.000 hectáreas de tierras cultivadas (Min. Agricultura, 2021), el cultivo de papa en Colombia ocupa el cuarto lugar en la producción agrícola y representa el 3,3% del PIB agropecuario nacional.

Se ha estimado que, de los costos directos de producción del cultivo, el 41% se invierte en insumos, de los cuales el 53% corresponde a enmiendas, abonos y fertilizantes y el 16% a plaguicidas, lo que indica claramente la relación entre la rentabilidad del cultivo y el costo de estos insumos, y por tanto se

hace imprescindible su manejo adecuado, racional y eficiente (UPRA, 2021). Desafortunadamente, los costos unitarios de producción de papa han aumentado, y esto es debido a que el cultivo de papa es el que hace mayor demanda de pesticidas en el país, debido a que algunos agentes fitopatógenos han desarrollado tolerancia frente a los insumos tradicionales empleados para su manejo (Min. Agricultura, 2021; Lurwanu *et al.*, 2021).

Uno de los agentes fitopatógenos más importantes que afecta la papa es *Pectobacterium carotovorum*, bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, y agente causal de la enfermedad conocida como “pata negra” en las plantas de papa, y la “pudrición blanda” en los tubérculos (Yi *et al.*, 2021). A nivel del tubérculo, la bacteria ingresa por las lenticelas y se multiplica hasta alcanzar un umbral de  $10^7$  -  $10^8$  cel/g de tejido, requisito necesario para que se despliegue el sistema de comunicación celular *Quorum sensing* por medio del cual la bacteria expresa sus factores de virulencia (Barnard & Salmond, 2007). Este sistema de regulación génica media los procesos de secreción de antibióticos carbapenémicos y enzimas pectinolíticas extracelulares que degradan el tejido vegetal generando los síntomas propios de la pudrición blanda. Siendo las principales enzimas degradativas de tejido las pectatoliasas, poligalacturonasas, celulasas y proteasas, las cuales actúan sobre los tubérculos que contienen entre el 50 y el 55 % de sustancias pécticas (Hossain *et al.*, 2005).

La pudrición blanda de la papa es reconocida como la enfermedad más severa que ataca al tubérculo a nivel poscosecha (Sima *et al.*, 2015). Existen algunos reportes que indican que esta enfermedad ha

llegado a ocasionar hasta el 100% de daño en la cosecha, con pérdidas estimadas entre 30 y 100 millones de dólares a nivel mundial (Portela *et al.*, 2013; Potrykus *et al.*, 2014). Y aunque hay otras bacterias fitopatógenas de papa como *Ralstonia solanaceum*, *Streptomyces scabies* y *Clavibacter michiganensis*, la *Pectobacterium carotovorum* se destaca a nivel de almacenamiento, y por eso se considera como la bacteria de mayor importancia en el cultivo a nivel comercial (Franco *et al.*, 2008; Khlaif *et al.*, 2018)

Desafortunadamente, el control de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* se dificulta mucho debido a que se disemina a través del agua de riego, sobrevive en los suelos, en la maquinaria agrícola y en los restos de cosechas infestadas (Reinoso *et al.*, 2006). Por lo cual su manejo se ha basado tradicionalmente en prácticas culturales biosanitarias, métodos de control de tipo físico empleando agua caliente, luz ultravioleta o bajas temperaturas, de tipo químico utilizando plaguicidas convencionales, y prácticas de control biológico con antagonistas naturales (Czajkowski *et al.*, 2011; Doolotkeldieva *et al.*, 2016). Pero a pesar de estos esfuerzos, a la fecha no existe una estrategia de control efectiva y resulta imperativo buscar nuevas opciones de control.

Debido a esta problemática, se ha promovido la implementación de prácticas agrícolas que se fundamenten en el manejo sostenible de los agroecosistemas, y en ese contexto las alternativas de solución que surgen desde la nanobiotecnología son determinantes. La nanotecnología es un área de investigación que ha ganado gran interés durante la última década y se espera que se incremente el número de investigaciones relacionadas con sus aplicaciones en el campo agrícola y ambiental (Khot *et al.*, 2012). Esto es debido a que actualmente el sector agrícola se enfrenta a desafíos como procesos ineficientes de control de plagas, acumulación de insumos químicos por sobredosificación a nivel de suelo y agua, y restricción en el uso de algunos compuestos químicos usados ampliamente en la agricultura (Chen *et al.*, 2011).

Aunque el uso de los nanomateriales en la agricultura es relativamente nuevo y requiere de exploración adicional, se han desarrollado algunos avances para contribuir a la implementación de una agricultura de precisión. Tal es el caso del desarrollo de nanosensores para la detección temprana de fitopatógenos, nanomateriales para la administración y liberación controlada de insumos, como también el uso de nanopartículas de plata (AgNp's) para el control de fitopatógenos, el cual debido a su acción antibacteriana puede superar los protocolos actuales de control a corto y mediano plazo (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Sudheer *et al.*, 2022). Estas últimas se consideran agentes antibacterianos de nueva generación dado que tienen un amplio espectro de acción y son muy efectivas debido a su relación área superficial/volumen, lo cual puede incrementar su contacto con los microorganismos y su habilidad

de permearlos (Alghuthaymi *et al.*, 2015). Como antimicrobianos las AgNp's han sido utilizadas para el control de algunos agentes patógenos humanos con buenos resultados (Hanh *et al.*, 2016). Este tipo de nanopartículas poseen varios mecanismos de acción que podrían actuar conjuntamente. Ha sido reportado que afectan la funcionalidad de algunas proteínas y del ADN, lo cual podría incidir en procesos vitales de la célula como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, la síntesis de proteínas y la replicación del material genético (Gumel *et al.*, 2019). Otros mecanismos actúan a nivel de pared y membrana celular, alterando la integridad de la célula (Kharissova *et al.*, 2013).

Por otra parte, los protocolos de síntesis tradicionales para obtener este tipo de AgNp's se basan en métodos fisicoquímicos y dada la potencial toxicidad de estos procesos, se ha trabajado en la síntesis verde empleándose agentes biológicos, debido a la capacidad de algunos organismos uni y multicelulares de producir materiales de tipo inorgánico ya sea intra o extracelularmente, propiedad que los convierte en eficientes nanofábricas (Abdeen *et al.*, 2013; AbdelRahim *et al.*, 2016). La biosíntesis de nanopartículas (Np) presenta ventajas frente a los métodos fisicoquímicos tradicionales debido a que es más costo-efectiva, dado que sus métodos no requieren presiones ni temperaturas extremas, lo que disminuye el gasto energético del proceso de síntesis. No necesita de equipamiento costoso, y tampoco radiaciones ni reactivos químicos tóxicos (Singh *et al.*, 2013), además al ser obtenidos por biosíntesis estos materiales se consideran más amigables con el medio ambiente, y podrían ser más seguros para los seres humanos, lo cual es fundamental para aplicaciones biomédicas (Singh *et al.*, 2017).

En la actualidad la información disponible acerca del desarrollo de nuevos nanomateriales se basa principalmente en los procesos de síntesis usados, y los aspectos relacionados con su impacto biológico son incipientes. De manera que, si no se tiene información de su toxicidad, se limita el diseño seguro de los nanomateriales. Frente a esto existe una alternativa que es aprovechar la versatilidad de los nanomateriales, pero garantizando su retención en algún tipo de soporte. Al respecto Sharifi *et al.*, 2012, indican la urgente necesidad de inmovilizar las Np's dentro de los productos que las contienen, esto con el fin de evitar su liberación al ambiente durante el ciclo de vida de dichos productos o durante su reciclaje. Actualmente la reconocida toxicidad de la plata a la nanoescala y su potencial impacto ambiental ha empezado a limitar el uso de las AgNp's como agentes antimicrobianos, pero una aproximación para disminuir o mejorar las propiedades adversas de esas AgNp's es incorporarlas en materiales nanoestructurados estables (Zheng *et al.*, 2016).

En ese contexto, surge la posibilidad de utilizar las AgNp's pero ancladas a soportes sólidos para el control de fitopatógenos. Es relevante mencionar que estudios relacionados con biosíntesis de AgNp's



soportadas que puedan tener acción biocontroladora específicamente frente al agente bacteriano causal de la pudrición blanda en papa no han sido reportados. Toda la problemática anteriormente descrita, ha generado el planteamiento del presente proyecto de tesis doctoral que se enmarca dentro del concepto de química verde y cuyo objetivo principal es desarrollar un sistema de biosíntesis de AgNp's para el control *in vitro* de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* mediante el aprovechamiento de la capacidad enzimática de hongos rizosféricos aislados de cultivos de papa, y su inmovilización en una fibra natural que garantice su retención, lo que mitigaría el posible impacto ambiental del nanomaterial biosintetizado. Estos estudios de miconanotecnología que son innovadores y en nuestro conocimiento pioneros en Colombia, permitirán establecer las bases preliminares para el desarrollo de una estrategia de biocontrol amigable con el medio ambiente y más efectiva para el manejo de este patógeno vegetal que genera grandes pérdidas económicas para los productores de papa a nivel mundial, sin dejar de lado el cuidado por el medio ambiente y la salud humana.

Por último, si se piensa en el impacto final y la aplicación práctica futura de este proyecto, se puede indicar que el desarrollo de un nanomaterial anclado a una fibra natural, otorgando una alta estabilidad operacional, y manteniendo sus propiedades antimicrobianas bajo condiciones normales de campo, podría llevar al estudio de empaques para el almacenamiento de papa. Lo cual actuaría como un mecanismo preventivo frente al ataque del agente fitopatógeno que actúa principalmente a nivel de postcosecha, no obstante, esto no será posible sin antes realizar la investigación básica que este trabajo de doctorado tiene de trasfondo y que es el principal objetivo de este proyecto de investigación.

## Prefacio

Los hongos son organismos extraordinarios con múltiples potencialidades biotecnológicas, y gracias al creciente desarrollo de la nanobiotecnología y sus aplicaciones en diversos campos, incluida la agricultura, surgió esta investigación. El objetivo general de este trabajo de investigación fue desarrollar una metodología de biosíntesis de AgNp's mediante el aprovechamiento de la capacidad enzimática de hongos rizosféricos aislados de cultivos de papa, estudiar la actividad *in vitro* de estas nanopartículas frente a la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*, e inmovilizarlas en una fibra natural para limitar su lixiviación. Todo lo anterior a través del desarrollo de los tres objetivos específicos que fueron 1) Desarrollar un estudio de bioprospección con el fin de seleccionar aislamientos fúngicos de origen rizosférico que resulten promisorios para la síntesis biológica de AgNp's. 2) Obtener y optimizar la producción de AgNp's con acción antibacterial a nivel *in vitro* contra *P. carotovorum* utilizando un extracto enzimático aislado de hongos rizosféricos y 3) Inmovilizar las AgNp's biosintetizadas con acción antibacterial a nivel *in vitro* contra *P. carotovorum* sobre una fibra natural para limitar su lixiviación al ambiente.

Este documento está organizado por capítulos con el propósito de que cada uno sea un artículo de investigación. En el primer capítulo se desarrolla la conceptualización del tema de investigación. En el segundo capítulo se describe el proceso de bioprospección que se realizó en suelos de páramo cultivados con papa, lo cual permitió encontrar cinco hongos filamentosos con actividad enzimática nitrato reductasa (NR), convirtiéndolos en potenciales productores de AgNp's. En el tercer capítulo, empleándose el hongo *Fusarium oxysporum*, se encontraron las condiciones de síntesis en términos de concentración de sustancia precursora, temperatura, y pH que permiten un mayor rendimiento en la producción de AgNp's. Adicionalmente se presenta su caracterización y el estudio de su actividad antibacterial frente al fitopatógeno a nivel *in vitro* por diversas técnicas. En el cuarto capítulo se describen dos metodologías (cationización y reducción bioquímica *in situ*) para inmovilizar las AgNp's producidas por *Fusarium oxysporum* sobre fibras de algodón quirúrgico. En este capítulo también se muestran pruebas de reuso, y retención de las nanopartículas sobre la fibra. Además, se describe una inmovilización adicional de las AgNp's, pero esta vez sobre fibras de fique, con lo cual se fabricaron minicostales antibacteriales, que al servir como empaque de almacenamiento de papa permitieron su estudio frente a la bacteria fitopatógena *P. carotovorum*. Esto último con la intención de desarrollar a futuro, empaques antibacteriales a gran escala para el almacenamiento de papa en postcosecha que lleven a una disminución de las pérdidas en esta etapa del ciclo productivo del cultivo.

# Objetivos

## Objetivo General

Desarrollar una metodología de biosíntesis de AgNp's para el control *in vitro* de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* mediante el aprovechamiento de la capacidad enzimática de hongos rizosféricos aislados de cultivos de papa, e inmovilizarlas en una fibra natural para limitar su lixiviación.

## Objetivos Específicos

1. Desarrollar un estudio de bioprospección con el fin de seleccionar aislamientos fúngicos de origen rizosférico que resulten promisorios para la síntesis biológica de AgNp's.
2. Obtener y optimizar la producción de AgNp's con acción antibacterial a nivel *in vitro* contra *P. carotovorum* utilizando un extracto enzimático aislado de hongos rizosféricos.
3. Inmovilizar las AgNp's biosintetizadas con acción antibacterial a nivel *in vitro* contra *P. carotovorum* sobre una fibra natural para limitar su lixiviación al ambiente.

# Capítulo 1 : Marco teórico

## 1.1. Cultivo de la papa y *Pectobacterium carotovorum* como agente fitopatógeno

La papa es una hortaliza miembro de la familia de las solanáceas, es un alimento que ocupa el tercer lugar en importancia en la cesta básica a nivel mundial después del arroz y el trigo. A través de la historia la papa ha contribuido a la seguridad alimentaria (Vilvert *et al.*, 2022), donde su consumo fresco representa dos tercios de la cosecha, convirtiéndose así en el alimento básico para alrededor de 1300 millones de personas (Devaux *et al.*, 2021). En países en desarrollo, la papa contribuye a combatir las deficiencias nutricionales de la población, problema global que afecta a cerca de 2 billones de personas. Esto gracias a que la papa es una fuente esencial de energía, proteína, micronutrientes como hierro y zinc, vitamina C, B1, B3 y B6, potasio y fibra dietaria (Bailey *et al.*, 2015; Gustavsen *et al.*, 2021).

La papa es una planta herbácea anual que se puede cultivar en diferentes tipos de suelos que varían en pH de 5 a 7,5, siendo los suelos arcillosos con alto contenido de materia orgánica los más favorables para su cultivo, así como las bajas temperaturas (Reddy *et al.*, 2018). El cultivo de papa es muy atractivo ya que puede proveer una gran producción en corto tiempo, generando una baja huella de CO<sub>2</sub>, baja demanda de tierras y gran adaptabilidad a amplio rango de ambientes (De Jong, 2016; Gustavsen *et al.*, 2021). La papa se cultiva actualmente en aproximadamente 20 millones de hectáreas a nivel mundial, con una producción que puede llegar a 366 millones de toneladas (Devaux *et al.*, 2021; Vilvert *et al.*, 2022). En regiones tropicales como la nuestra, la mayoría de los cultivos se establecen en la cordillera de los Andes, en donde alrededor de 4500 cultivares de papa se han adaptado a diferentes entornos (Nasir *et al.*, 2022).

Desafortunadamente varios factores abióticos y bióticos limitan la productividad de la papa, provocando una reducción en el rendimiento. El estrés abiótico causado por altas temperaturas, excesiva radiación solar, fotoperiodo, salinidad del suelo y sequía representan una seria amenaza, provocando pérdidas de hasta un 50% de la cosecha (Nasir *et al.*, 2022). De otro lado, el estrés biótico incluye enfermedades causadas por virus, nemátodos, hongos y bacterias que causan daños severos en la calidad y cantidad del producto durante su cultivo, almacenamiento y procesamiento (Vilvert *et al.*, 2022; Nasir *et al.*, 2022). Por esta razón, la papa es un cultivo “pesticida-dependiente”, y en muchos países hay una sobredosificación de pesticidas por hectárea sembrada (Yuen *et al.*, 2021). Debido a la preocupación actual por las consecuencias del uso desmedido de pesticidas y sus efectos en la salud

humana, se han generado regulaciones estrictas acerca de su uso, y en muchos países se ha disminuido el número de productos aprobados para el manejo de enfermedades en papa (Vilvert *et al.*, 2022). Algunas de las enfermedades más importantes del cultivo de papa son causadas por bacterias, donde se destacan la “marchitez bacteriana” causada por *Ralstonia solanacearum* (con pérdidas hasta del 35%), y la “pudrición blanda” causada por *Pectobacterium carotovorum*, la cual genera una disminución del 40 % de la producción (Vilvert *et al.*, 2022; Nasir *et al.*, 2022).

Esta bacteria, *Pectobacterium carotovorum* causante de grandes pérdidas para los cultivadores de papa es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, no formador de esporas y con presencia de flagelo (Perombelon & Kellman, 1980). El principal factor de virulencia de esta bacteria que la diferencia del resto de los miembros de su familia, es la capacidad de producir grandes cantidades de enzimas pectinolíticas extracelulares responsables de la maceración del tejido parenquimatoso de algunas plantas por medio del sistema de señalización química *Quorum sensing*. Las principales enzimas degradativas incluyen las pectatoliasas, poligalacturonasas, celulasas y proteasas, las cuales actúan sobre las paredes celulares de la planta y especialmente los tubérculos que contienen entre el 50 y el 55 % de sustancias pécticas, generando los síntomas propios de la enfermedad (Hossain *et al.*, 2005). Dichos síntomas se evidencian en la parte aérea de la planta, debido a una coloración negra a nivel de tallos, clorosis y marchitez en general. A nivel del tubérculo, los síntomas varían desde una ligera maceración de tejido hasta una completa pudrición que compromete todo el tubérculo y genera un olor fétido (Czajkowski *et al.*, 2011).

Para el manejo de la pudrición blanda producida por la *Pectobacterium carotovorum* se emplean algunas prácticas culturales que incluyen sembrar semilla certificada o libre del patógeno, eliminar residuos de cosecha, controlar la humedad en el suelo, mantener la semilla en condiciones de buena aireación, eliminar plantas infectadas, realizar la rotación de cultivos con gramíneas (pastos o cereales) y fertilizar el cultivo con base en el análisis de suelo (Potrykus *et al.*, 2014). Debido a que el patógeno invade las partes internas de la planta, los productos químicos convencionales utilizados no proveen el control adecuado de la enfermedad. Para resolver este problema muchas investigaciones se han enfocado en buscar soluciones alternativas para el control de la bacteria, como el control biológico, para lo cual se han utilizado bacterias promotoras de crecimiento vegetal y bacterias antagonistas Gram positivas o Gram negativas aisladas de la rizósfera de papa. Y si bien los resultados de esos estudios son promisorios, aun no se cuenta con un agente controlador aplicable que pueda suprimir la enfermedad (Aysan *et al.*, 2003), la cual afecta al cultivo en gran medida durante la postcosecha, y a pesar de los esfuerzos en el adecuado almacenamiento del producto se generan grandes pérdidas (Sima *et al.*, 2015),

llegando a ocasionar hasta el 100% de daño en la cosecha, con pérdidas estimadas entre 30 y 100 millones de dólares a nivel mundial (Al-Zomor *et al.*, 2013). En Colombia, este agente aparece como una de las dos bacterias fitopatógenas más importantes en papa, sin embargo, es la más relevante a nivel de almacenamiento, y la de más importancia en el cultivo a nivel comercial (Franco *et al.*, 2008).

## 1.2 Nanopartículas de plata (AgNp's)

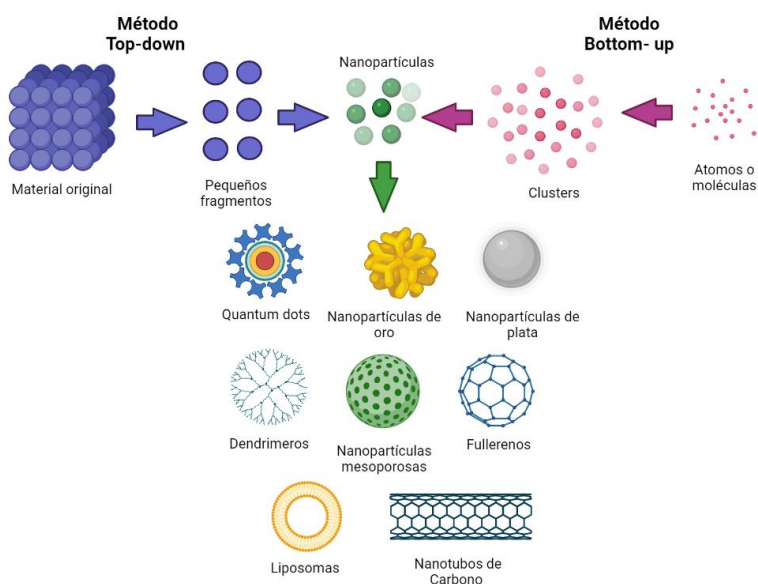
Camacho *et al.*, 2016 definen a un nanomaterial como un material natural o artificialmente sintetizado que exhibe propiedades o efectos biológicos que son atribuibles a sus dimensiones hasta una escala límite de un micrómetro, estos materiales presentan una distribución mayor al 10% de partículas inferiores o iguales a 100 nm en al menos una de sus dimensiones. Las nanopartículas (Np's) son relevantes debido a sus particulares propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas, además de que cuentan con tamaños muy pequeños, lo que las hace susceptibles a nanoingeniería (Salem *et al.*, 2023). Existen varios tipos de Np's, se destacan las Np's de núcleo-envoltura, las Np's recubiertas de biopolímeros y las Np's metálicas, todas ellas con características distintivas y aplicaciones diversas. Estas últimas se obtienen usualmente a partir de metales como el aluminio, cadmio, cobalto, cobre, oro, hierro, zinc, plomo, y plata, empleando procesos constructivos (Bottom-up) o destructivos (Top-down) (Ijaz *et al.*, 2020).

De las Np's ya mencionadas, las nanopartículas de plata (AgNp's) son nanomateriales que han recibido considerable atención, debido a sus propiedades fisicoquímicas particulares y a que no son tóxicas a bajas concentraciones para humanos y animales; razón por la cual tienen aplicaciones en el campo clínico y del medio ambiente (Abdeen *et al.*, 2013; Alghuthaymi *et al.*, 2015). Las AgNp's se pueden encontrar en varias formas tales como nanoesferas, nanotubos o nanocables, con tamaños que oscilan entre 5 y 100 nm, lo cual es muy importante en varias aplicaciones, y por lo tanto la síntesis controlada de esos nanomateriales es un reto para el desarrollo de las nuevas tecnologías (Desai *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2020). Las AgNp's interactúan con luz visible más efectivamente que cualquier cromóforo de tipo orgánico e inorgánico, esa interacción es consecuencia de la gran densidad de electrones conductores y la función dieléctrica del metal, lo que resulta en la existencia de la resonancia de plasmones superficiales (Bhui *et al.*, 2009). Por otra parte, las AgNp's se consideran agentes antibacterianos de nueva generación, dado que tienen amplio espectro de acción y su efectividad se explica debido a su relación área superficial/volumen que puede incrementar su contacto con los microorganismos y su habilidad de permearlos (Alghuthaymi *et al.*, 2015).

### 1.3 Rutas de síntesis para la obtención de nanopartículas de plata (AgNp's)

De manera general los métodos de producción de Np's se clasifican como Top-down y Bottom-up (Beyene *et al.*, 2017; Kotval *et al.*, 2016) (Figura 1-1). En el método Top-down, materiales macroestructurados son descompuestos por influencias mecánicas o químicas hasta fragmentos cada vez más pequeños para su posterior estabilización usando un agente protector del metal nanoparticulado (Velhal *et al.*, 2016). Una de las principales desventajas de este método son las imperfecciones superficiales de las Np's generadas, lo cual puede tener impacto en las propiedades físicoquímicas de las mismas, debido a la alta relación superficie/volumen (Siddiqi *et al.*, 2018).

El método Bottom-up o autoensamblaje es opuesto al Top-down, ya que en este caso un precursor que puede ser un compuesto organometálico o una sal es descompuesto por varios métodos como la termólisis, la excitación óptica o el uso de un agente reductor, lo que conduce a la separación del átomo metálico del residuo orgánico, para luego sufrir un proceso de nucleación hasta la formación de las Np's (Velhal *et al.*, 2016). Una ventaja de este método es que se incrementa la posibilidad de obtener Np's con pocos defectos y con una composición química más homogénea (Thakkar *et al.*, 2010). Por lo tanto, esta técnica es la más empleada tanto en la síntesis química como biológica de Np's (Siddiqi *et al.*, 2018).



**Figura 1-1:** Métodos de producción de nanopartículas (Np's).

De otro lado, los métodos de síntesis de Np's se pueden clasificar en tres grandes categorías: síntesis física, química y biológica (o verde) (Durán *et al.*, 2011). Los métodos físicos involucran usualmente procesos como el desgaste, pirólisis y ultra-sonicación. Los métodos químicos incluyen la irradiación UV, litografía, ablación laser, radiólisis, ultrasonido, además de la reducción química, fotoquímica y electroquímica (Abbasi *et al.*, 2014). Y en los biológicos se ha reportado el uso de polisacáridos y polioxometalatos, el método de Tollens, la irradiación y la biosíntesis (Abbasi *et al.*, 2014). Y aunque las Np's obtenidas por los métodos fisicoquímicos y biológicos han mostrado tener propiedades idénticas, la biosíntesis lleva a un mejor control de parámetros como el tamaño y la forma de las Np's (Hulkoti & Taranath, 2014).

Dentro de estos nanomateriales sintetizados por diversos métodos, las nanopartículas de plata (AgNp's) han sido de particular interés debido a su alta conductividad térmica, resistencia a la oxidación (Dhanasekaran *et al.*, 2011), y capacidad de absorber y dispersar eficientemente la luz, obteniendo un color que depende del tamaño y la forma de la partícula. Todas estas propiedades han permitido emplearlas en diversas áreas, haciendo de las AgNp's uno de los nanomateriales más comercializados, encontrándose en más de 200 productos de consumo (De Souza & Gómez, 2015), con una producción cercana a las 320 toneladas solo en el año 2018 (Siddiqi *et al.*, 2018).

Aunque los métodos fisicoquímicos para la síntesis de AgNp's se consideran fáciles de realizar y con control sobre el tamaño de los cristales, los productos presentan baja estabilidad, en especial para lograr soluciones de partículas monodispersas (Abbasi *et al.*, 2014). Por otra parte, involucran el uso de reactivos costosos y peligrosos para la salud humana, lo que limita su aplicación en el campo clínico (Du *et al.*, 2015). Adicionalmente, incluyen un alto gasto energético, ya que requieren de altas temperaturas y presiones (Abbasi *et al.*, 2014), evidenciando una baja tasa de producción, deformación estructural de las partículas e inhibición del crecimiento de las mismas (Keat *et al.*, 2015). Debido a estos inconvenientes, en los últimos años se ha desarrollado la síntesis de Np's basada en el concepto de nanotecnología verde, donde se utilizan metodologías rápidas, limpias, económicas y altamente eficientes (El-Moslamy *et al.*, 2017). Todo esto, ha sido eficazmente explotado en la biosíntesis de AgNp's (Abbasi *et al.*, 2014), donde se utilizan extractos de organismos vivos que contienen moléculas con potencial reductor, y otras moléculas con capacidad de recubrimiento de las Np's otorgándoles estabilidad destacándose el uso de aminoácidos, polisacáridos, vitaminas, y proteínas/enzimas (Keat *et al.*, 2015). Mediante la biosíntesis se pueden obtener nanopartículas rápidamente, ya que los procesos de reducción y estabilización se realizan en un solo paso, dado que ciertas moléculas biológicas pueden



ser agentes reductores y estabilizadores al tiempo. Además, la tasa de producción de AgNp's es mucho más rápida que con los procesos fisicoquímicos (Khan *et al.*, 2017).

Así, dentro de la biosíntesis de Np's, la utilización de hongos en la síntesis de AgNp's se ha convertido en un campo de investigación prometedor, ya que se han encontrado biomoléculas altamente eficientes, que llegan a comportarse como nanofábricas. No obstante, y a pesar de los avances metodológicos obtenidos en el área, el mecanismo de la micosíntesis de Np's no está totalmente elucidado (El-Moslamy *et al.*, 2017). Hasta el momento, se conoce que para garantizar un proceso de micosíntesis exitoso, primero se deben seleccionar los hongos potenciales y establecer las mejores condiciones para su crecimiento a nivel *in vitro*. Luego se debe definir el catalizador o agente reductor a utilizar durante la reacción, que puede ser la célula completa o una enzima secretada por el organismo. Y finalmente se debe optimizar la actividad enzimática de interés y las condiciones de reacción para obtener las Np's deseadas (Quester *et al.*, 2013).

#### **1.4. Micosíntesis: Biosíntesis de AgNp's empleando hongos**

Los hongos, como microorganismos versátiles, pueden adaptarse y crecer bajo diferentes condiciones extremas en términos de pH y temperatura (Anand *et al.*, 2006), logrando bajo estas condiciones producir un amplio rango de metabolitos de interés, característica que los convierte en grandes recursos biotecnológicos (Alghuthaymi *et al.*, 2015). Sus numerosas habilidades adaptativas les permiten crecer en ambientes con altas concentraciones de metales, debido a que cuentan con mecanismos específicos de resistencia y adaptabilidad ante condiciones extremas, tales como sistemas de eflujo, alteración de la solubilidad y toxicidad del metal por cambios en el estado redox del mismo, y acomplejación extracelular o precipitación (Beveridge *et al.*, 1997). Adicionalmente estos organismos cuentan con una pared celular con excelentes propiedades para captar e inmovilizar metales, los cuales posteriormente pueden adsorberse en grandes cantidades a nivel intracelular (Khan *et al.*, 2017).

Aprovechando todo lo mencionado y su capacidad para secretar grandes cantidades de proteínas y enzimas de tipo reductasa, los hongos han mostrado ser eficientes en la síntesis de AgNp's (Beyene *et al.*, 2017; Velhal *et al.*, 2016). Eficiencia que también ha sido relacionada con otros factores como: A) una mayor relación enzima/unidad de biomasa, con respecto a otros organismos (Siddiqi *et al.*, 2018), B) presencia de micelio fúngico de gran área superficial, lo cual mejora su interacción con precursores metálicos (Siddiqi *et al.*, 2018), C) mayor resistencia a altas presiones y otras condiciones a nivel del biorreactor comparados con otros organismos (Hulkoti & Taranath, 2014), y D) fácil manipulación y

crecimiento sobre variedad de sustratos de tipo inorgánico, haciendo los procesos de micosíntesis económicamente viables y escalables (Beyene *et al.*, 2017). Características que sumadas han permitido el crecimiento rápido de un área de investigación denominada miconanotecnología, la cual se enfoca en el aprovechamiento de los hongos para la síntesis de nanomateriales, incluidas las AgNp's (Meyer *et al.*, 2008). En ese sentido, se conoce que características como la forma y el tamaño de las AgNp's pueden cambiar dependiendo del hongo empleado y de los metabolitos secretados durante la síntesis (Siddiqi & Husen, 2016). Mohammadian *et al.*, 2007 evaluaron la biosíntesis AgNp's por parte del hongo *Fusarium oxysporum*, y encontraron que esta especie puede producir Np's intra y extracelularmente con formas esféricas, hexagonales, pentagonales, cuadradas y rectangulares. Respecto a esto último, la gran variabilidad en tamaño de las AgNp's producidas por hongos, se atribuye al efecto que pueden tener otros factores como la temperatura y el pH del medio de cultivo utilizado durante la biosíntesis. Aunque está reportado que las formas esféricas son las que prevalecen en las AgNp's obtenidas a partir de hongos (Quester *et al.*, 2013).

De los generos fúngicos empleados para la síntesis de AgNp's (Tabla 1-1). El genero *Fusarium* y especialmente la especie *Fusarium oxysporum* se destaca como una nanofábrica eficiente de AgNp's con múltiples aplicaciones. Estudios como los realizados por Ishida *et al.*, 2013 evaluaron la actividad antifúngica de AgNp's a partir de *F. oxysporum* frente a levaduras de interés clínico de las especies *Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. encontrando una concentración mínima inhibitoria  $\leq 1.68 \mu\text{g/mL}$  para ambas especies. Hussein *et al.*, 2015 biosintetizaron AgNp's a partir de *F. oxysporum* y evaluaron su actividad antibacterial frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y su actividad antitumoral, encontrando zonas de inhibición de crecimiento y actividad citotóxica frente a células tumorales encontrando una concentración inhibitoria 50 (CI 50%) de  $121,23 \mu\text{g cm}^{-3}$ . Gupta *et al.*, 2021 evaluaron la actividad antibacterial, antifúngica, fotocatalítica y sobre la germinación de semillas de AgNp's obtenidas a partir de *F. oxysporum*, encontrando que las AgNp's muestran mejor actividad antibacterial que antifúngica. Además, encontraron, que las AgNp's pueden degradar fotocatalíticamente el azul de metileno y favorecer la germinación de semillas de soya verde (*Vigna radiata*) cuando se aplican a una concentración a  $0,5\text{mg/mL}$ . Finalmente Fonseca *et al.*, 2022, evaluaron la actividad de las AgNp's sobre aislados orales de *Candida* sp, siendo efectivas a bajas concentraciones.

Adicionalmente a *Fusarium*, otros hongos han sido utilizados para la fabricación de AgNp's tanto intra como extracelularmente. Específicamente con los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se han producido Np's estables y con dimensiones que oscilan entre los 2 y 105 nm (Alghuthaymi *et al.*, 2015) (Tabla 1-1). Muchos de estos géneros fúngicos reportados hacen parte de la microbiota de los suelos, y se ha

empezado a realizar la búsqueda de microorganismos potenciales productores de AgNp's en diversos ecosistemas (Dhoble *et al.*, 2015; Ottoni *et al.*, 2017).

**Tabla 1-1:** Hongos productores de AgNp's, aplicación y tamaño de las AgNp's producidas.

Género/Especie	Aplicación	Tamaño de la nanopartícula (nm)	Referencia
<i>Acremonium diospyri</i>	ND	40	Bhat <i>et al.</i> , 2012
<i>Alternaria alternata</i>	Antifúngica	20-60	Gajbhiye <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria solani</i>	ND	25	Al juraifani <i>et al.</i> , 2015
<i>Amylomyces rouxii</i> KSU09	Antimicrobiana	5-27	Musarrat <i>et al.</i> , 2010
<i>Artbroderma fulvum</i>	Antifúngica	2,6-16	Xue, 2016
<i>Aspergillus clavatus</i>	Antibacterial	10-25	Verma <i>et al.</i> , 2010; Saravanan & Nanda, 2010
<i>Aspergillus flavus</i>	ND	7-10	Vigneshwaran <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ND	5-25	Bhainsa <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus niger</i>	Antifúngica y antibacteriana	6-20	Gade <i>et al.</i> , 2008; Devi <i>et al.</i> , 2015; Madakka <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus tamarii</i>	ND	3-3,5	Devi <i>et al.</i> , 2015; Kumar <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus terreus</i>	Antifúngica y antibacteriana	1-20	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>Beauveria bassiana</i>	insecticida	3-25	Kamil <i>et al.</i> , 2017
<i>Bipolaris tetramera</i>	Antibacterial	55-74	Fatima <i>et al.</i> , 2015
<i>Bipolaris nodulosa</i>	Antibacterial	10-60	Saha <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ND	10-100	Balaji <i>et al.</i> , 2009
<i>Colletotrichum sp</i>	Antibacterial	20-50	Azmath <i>et al.</i> , 2016
<i>Corioliolus versicolor</i>	ND	25-75	Sanghi & Verma, 2009
<i>Curvularia lunata</i>	Antimicrobiana	10-50	Ramalingmam <i>et al.</i> , 2015
<i>Fusarium acuminatum</i>	Antibacterial	5-40	Ingle <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium semitectum</i>	ND	10-60	Madakka <i>et al.</i> , 2018; Basavaraja <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium solani</i>	ND	5-35	Ingle <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium oxysporum</i>	Antibacterial	5-15	Abdeen <i>et al.</i> , 2013; Ahmad <i>et al.</i> , 2003; Al juraifani, <i>et al.</i> , 2015; Mukherjee <i>et al.</i> , 2004.
<i>Geotricum sp</i>	ND	30-50	Jebali <i>et al.</i> , 2011
<i>Guignardia mangiferae</i>	Antifúngica	5-30	Balakumaran <i>et al.</i> , 2016
<i>Hormoconis resinae</i>	ND	20-80	Varshney <i>et al.</i> , 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Mosquitocida	28-38	Amerasan <i>et al.</i> , 2016
<i>Neurospora intermedia</i>	Antibacterial	24	Hamedi <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium atramentosum</i>	Antibacterial	5-25	Sarsar <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium brevicompactum</i>	ND	23-105	Shaligram <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium fellutanum</i>	ND	5-25	Kathiresan <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium purpurogenum</i> NPMF	Antibacterial	5-25	Nayak <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium ochrochloron</i>	ND	4,3-7,7	Devi <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium nalgiovense</i>	ND	2,6-15,2	Maliszewska <i>et al.</i> , 2013

**Tabla 1-1:** Hongos productores de AgNp's, aplicación y tamaño de las AgNp's producidas. Cont.

<i>Penicillium italicum</i>	Antibacterial	30	Nayak <i>et al.</i> , 2018
<i>Pestalotia sp.</i>	Antibacterial	12,4	Raheman <i>et al.</i> , 2011
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ND	5-200	Vigneshwaran <i>et al.</i> , 2006
<i>Phoma glomerata</i>	Antibacterial	60-80	Birla <i>et al.</i> , 2008; Chen <i>et al.</i> , 2003; Gade <i>et al.</i> , 2014
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Antibacterial	53-104	Chan & Don, 2013
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Antibacterial	5-50	Nithya & Ragunathan, 2009
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Antifúngica	20-30	Owaid <i>et al.</i> , 2015
<i>Puccinia graminis</i>	ND	30-120	Kirthi <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhizopus nigricans</i>	ND	35-48	Ravindra & Rajasab, 2014
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ND	25-30	Binupriyaa <i>et al.</i> , 2010
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Antibacterial	10	Saxena <i>et al.</i> , 2016
<i>Trichoderma asperellum</i>	ND	13-18	Mukherjee <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma barzilianum</i>	Antibacterial	51	Ahluwaila <i>et al.</i> , 2014
<i>Trichoderma viride</i>	Preservación de frutas y vegetales	5-40	Fayaz <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichoderma reesei</i>	Antibacterial	5-50	Vahabi <i>et al.</i> , 2011
<i>Volvariella volvacea</i>	ND	20-150	Philip, 2009
<i>Verticillium sp.</i>	ND	25-12	Mukherjee <i>et al.</i> , 2001

ND: no determinado.

Finalmente, una característica relevante de las AgNp's obtenidas por micosíntesis es que pueden absorber biomoléculas en su superficie cuando están en contacto con fluidos biológicos, lo que conduce a la formación de una corona de tipo orgánico que interactúa con los sistemas biológicos incrementando su eficacia (Singh *et al.*, 2016). Por esta razón se afirma que las AgNp's obtenidas por micosíntesis son más biocompatibles que las obtenidas por rutas tradicionales (Khan *et al.*, 2017)

## 1.5 Mecanismos de micosíntesis de AgNp's

La capacidad de los hongos para llevar a cabo reacciones redox permite que estos puedan ser utilizados para la síntesis de AgNp's, dado que actualmente se conoce que se requiere de este tipo de reacción para que el compuesto metálico elemental sea reducido y se formen las AgNp's. No obstante, los detalles del mecanismo exacto implicado en este proceso redox están aún en estudio (AbdelRahim *et al.*, 2017; Alghuthaymi *et al.*, 2015; El-Moslamy *et al.*, 2017).

Químicamente, la plata posee cuatro diferentes estados de oxidación  $Ag^0$ ,  $Ag^{1+}$ ,  $Ag^{2+}$  y  $Ag^{3+}$  (Riedel & Martin, 2009). La formación de AgNp's involucra específicamente la reducción del ión metálico desde  $Ag^{1+}$  hasta  $Ag^0$ , el cual es un átomo metálico eléctricamente neutro y constituyente principal

de las AgNp's (Siddiqi & Husen, 2016). Particularmente, en la biosíntesis esta reducción es llevada a cabo por la enzima nitrato reductasa (NR) presente en los hongos, la cual se activa en presencia de iones nitrato. Donde la enzima toma los electrones desde el NADH<sup>+</sup>, que actúa como transportador de electrones, el cual es oxidado a NAD<sup>+</sup>, mientras que la enzima se oxida simultáneamente por la reducción de los iones plata a nanopartículas (Hulkoti & Taranath, 2014). Mecanismo de síntesis que, como se ha dicho, puede ocurrir intra o extracelularmente (Biswas & Mulaba, 2016).

Numerosos reportes avalan la acción de la enzima NR para la biosíntesis de AgNp's, cuando se emplean los hongos *Fusarium acuminatum* (Ingle *et al.*, 2008); *Aspergillus niger* (Jaidev & Narasimha, 2010), *Aspergillus fumigatus* (Zomorodian *et al.*, 2016), *Amylomyces rouxii* (Musarrat *et al.*, 2010) y *Penicillium* sp. (Kathiresan *et al.*, 2009; Alghuthaymi *et al.*, 2015). También se ha indicado que aparte de las enzimas reductasas, otros agentes como los derivados de las quinonas (naftaquinonas y antraquinonas) y la glucosa actúan como centros de reacción redox en la producción de AgNp's (Durán *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2017). Al respecto, en la especie *Fusarium oxysporum* se han descrito enzimas reductasas dependientes de NADPH y la quinona, compuesto orgánico que actúa como bomba de protones durante el proceso de reducción (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011).

### 1.5.1 Síntesis extracelular de AgNp's

En el caso específico de la síntesis extracelular de AgNp's, el "atrapamiento" de los iones plata tiene lugar en la superficie de la célula fúngica (Bhattacharya & Gupta, 2005). Para que esto ocurra existen dos formas de captura, la primera mediante la interacción electrostática entre los grupos carboxilo de algunas enzimas con la pared celular de carga negativa y los iones plata (Ag<sup>+</sup>) (Zhang *et al.*, 2011). La segunda es la secreción de sustancias poliméricas extracelulares que adhieren los iones de plata a la superficie de la pared celular (Zhang *et al.*, 2011).

Posteriormente a la captura, los iones plata son reducidos por las enzimas NR presentes en la pared celular, conduciendo a la formación del núcleo de plata. El cual continúa creciendo por la reducción adicional de iones plata y su acumulación en ese núcleo, hasta formar el clúster de átomos o AgNp's, proceso que puede durar pocos minutos (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Bhattacharya & Gupta, 2005) (Figura 1-2). Por lo tanto, la biosíntesis extracelular de AgNp's es la mejor elección a la hora de realizar un proceso de escalamiento, ya que por esta ruta las AgNp's son liberadas en la solución y se eliminan algunos pasos requeridos durante la recuperación y purificación de las mismas (Beyene *et al.*, 2017; Siddiqi *et al.*, 2018). Esto ha llevado a que la síntesis extracelular se presente como más

atractiva para aplicaciones comerciales, aunque disminuir la polidispersidad sea aún un reto dentro la optimización de las condiciones de síntesis.

### **1.5.2 Síntesis intracelular de AgNp's**

La síntesis intracelular de AgNp's implica una serie de mecanismos consecutivos. En la etapa preliminar de bio-reducción, el atrapamiento de los iones metálicos ocurre de manera similar a la reportada para la síntesis de tipo extracelular (Bhattacharya & Gupta, 2005; Dhillon *et al.*, 2012). En la siguiente etapa probablemente los iones son reducidos por las enzimas NR o azúcares que se encuentran dentro de la pared celular o en el citoplasma, permitiendo la agregación de iones metálicos y la formación de AgNp's. Las cuales son difundidas en el interior celular, quedando atrapadas dentro del citoplasma (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Dhillon *et al.*, 2012; Hulkoti & Taranath, 2014) (Figura 1-2).

A diferencia de la síntesis extracelular, se ha reportado que la síntesis intracelular tiene mejor control sobre la forma, tamaño y distribución de las AgNp's (De Souza, 2015), obteniendo partículas con baja polidispersidad (Narayanan & Sakthivel, 2010). Donde la etapa de separación puede incluir sonicación para romper la pared celular y liberar las Np's formadas, además de procesos de centrifugación y de lavado, en donde se emplean detergentes específicos que ayudan al rompimiento de la célula y posterior liberación de las Np's (Quester *et al.*, 2013; Thakkar *et al.*, 2010). Desafortunadamente, debido a que las Np's obtenidas con este tipo de síntesis son muy pequeñas, se dificulta su separación y purificación, haciendo el proceso complejo, costoso y dispendioso (Narayanan & Sakthivel, 2010; Siddiqi & Husen, 2016).

## **1.6 Sustancias estabilizadoras de AgNp's obtenidas por micosíntesis**

Otra ventaja de la biosíntesis versus la síntesis convencional de Np's, es que estas últimas requieren de un agente estabilizante, mientras que, en la biosíntesis, los microorganismos producen naturalmente estos estabilizantes. Los procesos de síntesis convencional de Np's tienen la tendencia a formar agregados de gran tamaño, generando propiedades indeseables en los materiales, lo que limita su aplicación (Bhattacharya & Gupta, 2005; De Souza, 2015; Mohanpuria *et al.*, 2008).

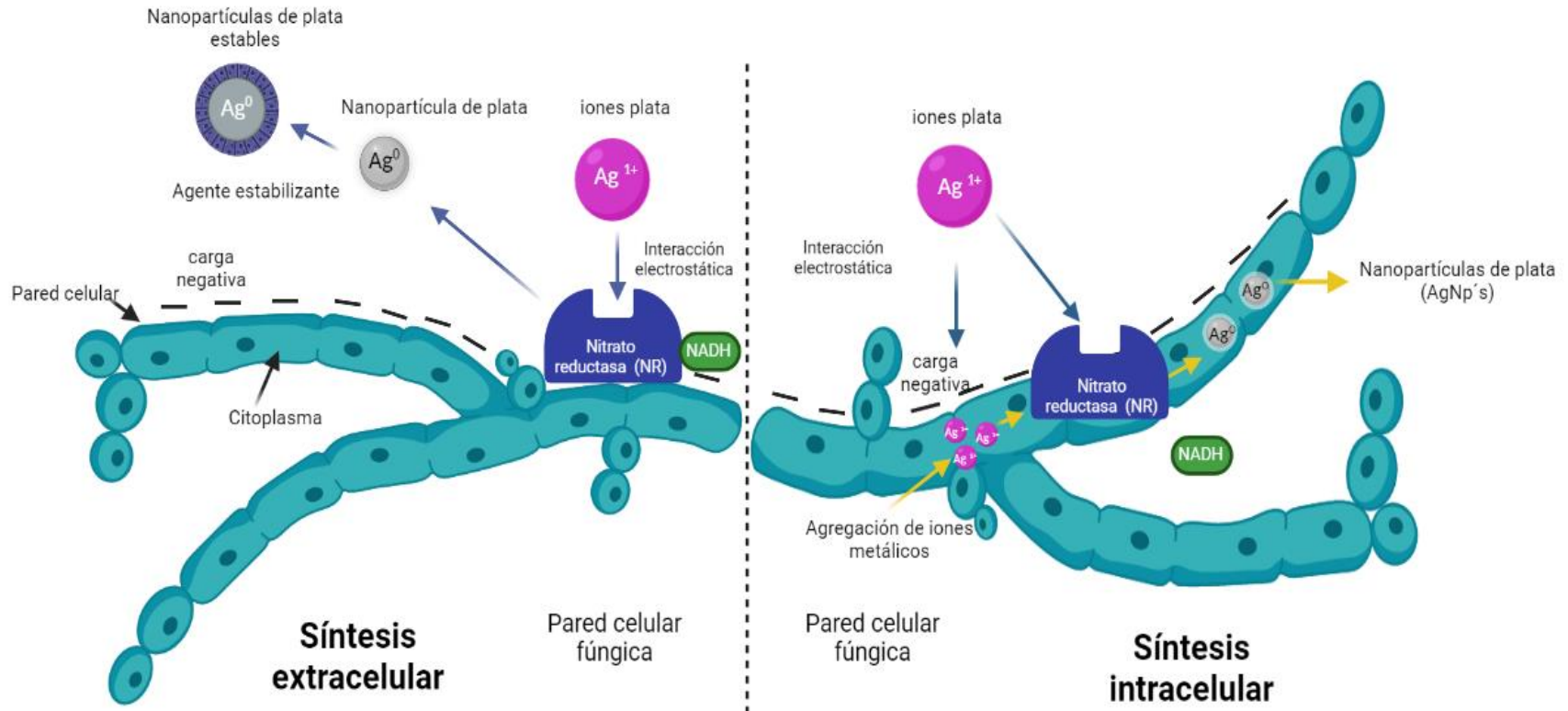


Figura 1-2: Esquemática del modelo de micosíntesis extracelular e intracelular de nanopartículas de plata ( $AgNp's$ ).

Por lo tanto, el estabilizante tiene como función mantener una suspensión de Np's estables en el tiempo, propiciado por impedimentos estéricos (De Souza, 2015; Nam *et al.*, 2016), o la formación de superficies cargadas (Dhillon *et al.*, 2012) que favorecen repulsiones electrostáticas. Dentro de los surfactantes usados están el polivinil alcohol, albumina de suero bovino, goma ghatti, glicosaminoglicanos, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, y polimetilmetacrilato (Abbasi *et al.*, 2014; De Souza, 2015).

Como se mencionó anteriormente, las AgNp's obtenidas por biosíntesis, generalmente no requieren agentes estabilizantes adicionales, ya que algunas moléculas secretadas por los microorganismos actúan como agentes de cobertura, cumpliendo esta función estabilizadora (Korbekandi *et al.*, 2009). Varias investigaciones han reportado que proteínas fúngicas, presentes en el medio de cultivo durante la biosíntesis extracelular de AgNp's, previenen la agregación al unirse a la superficie de las Np's (Bhattacharya & Gupta, 2005; Dhillon *et al.*, 2012; Mohanpuria *et al.*, 2008; Vigneshwaran *et al.*, 2007; Gade *et al.*, 2008). Estas proteínas estabilizantes son de alto peso molecular y algunas son ricas en cisteína como el citocromo C (Dhillon *et al.*, 2012; Durán *et al.*, 2011). También se ha descrito que las AgNp's presentan estabilidad en solución a pH superiores a 12, mientras que a pH inferiores a 2 se presenta agregación, sugiriendo la desnaturalización de las proteínas de cobertura que serían las responsables de dicha estabilidad (Korbekandi *et al.*, 2009)

Similarmente, la presencia de algunos grupos funcionales como éter, éster y alquenos en compuestos heterocíclicos de tipo proteico y presentes en el extracto fúngico, pueden formar coberturas en las Np's (Sanghi & Verma, 2009) actuando como estabilizantes. Hulkoti *et al.*, 2014 y Kumar *et al.*, 2009 han demostrado que durante la síntesis extracelular de AgNp's, residuos de aminoácidos que contienen grupos carboxílicos tienen la habilidad de unirse a la plata y formar una cobertura sobre las Np's metálicas, previniendo su aglomeración. Además, algunos de estos péptidos pueden sufrir hidrólisis generando grupos carboxilo y amino libres que pueden actuar como agentes protectores de las Np's. De manera similar, Rani *et al.*, 2017 reportan que algunos metabolitos secundarios presentes en hongos endófitos pueden ser responsables de la estabilización de las Np's producidas. Estabilidad que ha sido seguida por UV a 420nm, donde AgNp's obtenidas utilizando el hongo *Aspergillus flavus* fueron estables en agua por un periodo de tres meses, debido a la presencia de proteínas estabilizantes secretadas por el hongo (Vigneshwaran *et al.*, 2006).

## 1.7 Variables que afectan la micosíntesis *in vitro* de las AgNp's



La literatura científica muestra que las condiciones de reacción durante la biosíntesis de AgNp's deben optimizarse para lograr una buena monodispersidad, estabilidad y biocompatibilidad de las Np's producidas (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Balakumaran *et al.*, 2016; Korbekandi *et al.*, 2009). Pero dentro de estas condiciones, tal vez las más importantes son la especie de microorganismo y el medio de cultivo empleado para su crecimiento (Asmathunisha & Kathiresan, 2013; Gaikwad *et al.*, 2013; Ottoni *et al.*, 2017; Rani *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2011). Además, la micosíntesis puede verse influenciada también por la fase de crecimiento del hongo y la cantidad de biomasa utilizada durante el proceso (Korbekandi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Ya que se ha reportado que las proteínas, polisacáridos y ácidos orgánicos exudados por el hongo tienen la habilidad de generar efectos en la forma del cristal (Hulkoti & Taranath, 2014; Mohanpuria *et al.*, 2008; Ingle *et al.*, 2008, Alghuthaymi *et al.*, 2015; Sinha *et al.*, 2009). Aunque no se pueden obviar otros parámetros relacionados con las condiciones de crecimiento del hongo, como el pH del medio de cultivo, temperatura de incubación, tasa de agitación, tiempo de reacción o exposición a la sustancia precursora, concentración del sustrato y naturaleza del compuesto metálico parental (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Hulkoti & Taranath, 2014).

Por todo lo anterior, y aunque en la mayoría de micosíntesis de AgNp's reportadas el sustrato seleccionado es AgNO<sub>3</sub> (1mM) junto con 10 g de biomasa, resulta complejo definir cuáles son los otros parámetros que lleven a una micosíntesis exitosa. Algunos investigadores recomiendan el uso de medios de cultivo líquidos para la obtención de biomasa fúngica, que van desde medios de cultivo listos para su uso como es el caldo papa dextrosa (PDB) o el caldo malta glucosa peptona (MGYP), hasta medios ricos en sales minerales (Gahlawat *et al.*, 2019). Para otros, la cantidad de biomasa no es un criterio relevante y fabrican el filtrado celular libre de micelio (FCLM) con la biomasa que resulta de un proceso de fermentación (AbdelRahim *et al.* 2016). Experimentalmente, esto último es muy importante ya que durante la producción de AgNp's a nivel de laboratorio, es beneficioso obtener un filtrado celular libre de micelio (FCLM) que incluya las enzimas reductasas, por lo que los mecanismos de síntesis extracelular resultan ser más interesantes que los intracelulares (Mohanpuria *et al.*, 2008). Adicionalmente, en las reacciones de tipo extracelular la reducción de los iones plata se refleja en la coloración de los filtrados libres de células, los cuales varían de amarillo pálido a café (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Korbekandi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Coloración debida principalmente a la resonancia de plasmones superficiales (RPS) de las AgNp's, las cuales exhiben colores llamativos debido a la excitación de la superficie de plasmones causada por la vibración en la partícula (Abdeen *et al.*, 2013).

A continuación, se describen algunos aspectos relevantes de los factores que tienen incidencia durante el proceso de micosíntesis de AgNp's.

### 1.7.1 pH

Aunque las enzimas involucradas en la biosíntesis de AgNp's muestran una alta actividad catalítica a pH alcalino y se inhiben a pH ácido, y esto podría usarse como guía para seleccionar el pH en biosíntesis, los resultados muestran que la selección del pH de trabajo depende de muchas otras variables. El pH óptimo para la biosíntesis varía mucho entre los organismos empleados, pero en general el pH neutro favorece el proceso (Ma *et al.*, 2017). Singh *et al.*, 2014 indican que el pH óptimo de la enzima NR es de 7,0 y que, con ese pH, el máximo de absorción de las AgNp's es de 450 nm, lo cual indica la presencia de Np's en el rango entre 10 y 100 nm. Pradhan *et al.*, 2011 indican que alteraciones en el pH pueden generar cambios conformacionales en la enzima NR presente en el FCLM, lo cual puede afectar la forma y el tamaño de las AgNp's producidas. En estudios realizados con el hongo *Verticillium luteoalbum* el pH no afectó la capacidad de síntesis de Np's, pero se encontró que al emplear diferentes pH se obtienen Np's con diferentes formas. A pH 3 las Np's fueron de forma esférica y de un tamaño uniforme. Mientras que a pH 5 se formó una mezcla de Np's pequeñas y redondas, así como grandes partículas con formas triangulares, hexagonales, esféricas y bastones. Y, por último, a pH 9 se formaron grandes Np's con formas irregulares (Dhillon *et al.*, 2012; Hulkoti & Taranath, 2014).

Pero también se conoce que con la desnaturalización de la enzima NR, se obtienen AgNp's de gran tamaño o con alta polidispersidad (Husseiny *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014), como lo reportado por Kathiresan *et al.*, 2009 utilizando el hongo *Penicillium fellutanum*, donde se encontró que el tamaño de la nanopartícula aumenta cuando el pH es 6. Shahzad *et al.*, 2019 y Nayak *et al.*, 2018 también encontraron que el pH óptimo para la obtención de AgNp's es de 6,0 al trabajar con el hongo *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium italicum*, respectivamente. Lo cual puede atribuirse a que el pH óptimo de acción del NADH está entre 6,5 y 7,0, y este compuesto juega un rol fundamental en la producción microbiana de algunas AgNp's. También ha sido reportado que el pH alcalino favorece la biosíntesis, así el uso de pH de 9,5 en la síntesis de AgNp's resultó más eficiente en comparación con los ensayos realizados a pH de 5,5 y 6,5 (Manimozhi & Anitha, 2014; Qian *et al.*, 2013 y Saxena *et al.*, 2016).

### 1.7.2 Temperatura

Así como el pH, la temperatura también puede afectar el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Dhillon *et al.*, 2012), y en los procesos de síntesis de AgNp's este parámetro tiene efectos sobre el tamaño, la morfología y la monodispersidad de las mismas (Zhang *et al.*, 2011). Se conoce que el incremento de la temperatura permite la formación de las partículas más pequeñas a un ritmo más

rápido, dado que la enzima responsable de la síntesis tiene mayor actividad (Dhillon *et al.*, 2012; El-Moslamy *et al.*, 2017; Hulkoti & Taranath, 2014; Qian *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016). Velhal *et al.*, 2016 y Husseiny *et al.*, 2015 encontraron que a temperaturas moderadas (45-50 °C) se obtenía un tamaño de partícula pequeño, pero al respecto Ma *et al.*, 2017 indican que estas temperaturas moderadas pueden inducir la aglomeración de las AgNp's formadas. Mientras que Manimozhi & Anitha, 2014, trabajando con extractos de *Aspergillus flavus* encontraron que una temperatura de 100 °C favoreció la síntesis rápida de AgNp's. Sin embargo, Gericke *et al.*, 2006, indican que el uso de altas temperaturas puede generar una muy baja monodispersidad de las Np's obtenidas.

De otro lado, si bien a temperaturas bajas la formación de AgNp's se da a un ritmo más lento, el tamaño de las mismas puede ser controlado (Dhillon *et al.*, 2012). Shahzad *et al.*, 2019 y Singh *et al.*, 2014 trabajando a 25 °C, reportaron la máxima producción de pequeñas AgNp's, mientras que Ma *et al.*, 2017 usando el hongo *Penicillium aculeatum* Su1 encontraron AgNp's con buen tamaño y alta productividad a 37 °C.

### 1.7.3 Edad del inóculo y cantidad de biomasa

La edad de la célula fúngica o la etapa de crecimiento del cultivo también juega un rol fundamental en la toma de iones metálicos que conducen a la formación de Np's. Varias enzimas y proteínas involucradas en la reducción de metales se producen durante la fase de crecimiento exponencial de los hongos o idiofase, y se ha evidenciado que el número de partículas formadas por célula fúngica disminuye cuando el cultivo se colecta durante la fase de crecimiento tardío o trofofase (Zhang *et al.*, 2011). Al respecto Hamedi *et al.*, 2017, indican que la mayor tasa de formación de Np's se da en la fase estacionaria temprana, dado que en esa fase la enzima NR alcanza su mayor actividad, por esa razón, un cultivo joven genera un tamaño de partícula más pequeño. Se estima que la mejor edad del cultivo para obtener las AgNp's más pequeñas es de siete días, pues con cultivos más jóvenes o más antiguos el tamaño de partículas obtenidas es mayor (Husseiny *et al.*, 2015; Shahzad *et al.*, 2019). Sin embargo, Dhillon *et al.*, 2011 indican que la edad del cultivo no tiene ningún efecto en la forma de las Np's sintetizadas. Estos resultados indicarían que la mejor edad del hongo para producir Np's pequeñas va a depender de la especie de hongo seleccionada para el proceso y no se puede generalizar.

Así mismo se ha encontrado que un incremento en la cantidad de biomasa puede llevar a un aumento de la actividad enzimática responsable de la formación de AgNp's (Husseiny *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2016). Autores como Husseiny *et al.*, 2015 y Singh *et al.*, 2014 indican que la mejor cantidad de biomasa oscila

entre los 11 y 20g. No obstante, en varios estudios de micosíntesis, 10 g de biomasa es la cantidad que prevalece (Balakumaran *et al.*, 2016; Hamedí *et al.*, 2017), y se ha indicado que cantidades superiores o inferiores de biomasa conducen a la formación de Np's de mayor tamaño (Ma *et al.*, 2017). De otro lado, existen varios reportes que indican que 7g de biomasa es la cantidad ideal para obtener AgNp's de buen tamaño y con buena monodispersidad, independientemente del organismo que se esté empleando (Shahzad *et al.*, 2019; Velhal *et al.*, 2016).

#### **1.7.4 Concentración del metal**

Cuando los hongos se exponen a altas concentraciones de un metal, estos secretan enzimas que reducen los iones metálicos a formas menos tóxicas como mecanismo de adaptación (Dhillon *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2017). Así, en la biosíntesis de AgNp's la presencia del sustrato metálico en el medio induce la liberación de la enzima, y cuanto más sustrato se suministre al medio, la secreción de la enzima aumentará proporcionalmente hasta que se encuentre el umbral o punto de saturación (Husseiny *et al.*, 2015). Por lo cual, durante la síntesis de AgNp's la concentración de los iones metálicos tiene un efecto en el tamaño y la monodispersidad de partículas obtenidas (Zhang *et al.*, 2011). Al respecto Husseiny *et al.*, 2015 encontraron, que el tamaño de partícula más pequeño se dió cuando se utilizó una solución precursora a una concentración de 10mM. Velhal *et al.*, 2016 indican que el tamaño de las AgNp's disminuye si la concentración del precursor metálico disminuye, donde una concentración de 6 mM de AgNO<sub>3</sub> permitió la formación de las AgNp's más pequeñas.

Interesantemente y contrario a lo anterior, varios autores coinciden al indicar que la concentración óptima de AgNO<sub>3</sub> es de 1 mM (Moteshafí *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2014). Dado que cuando la concentración de AgNO<sub>3</sub> aumenta, se incrementa una competencia entre iones plata y algunos grupos funcionales presentes en el FCLM, lo que conduce a la formación de Np's de gran tamaño con inestabilidad y agregación (Shahzad *et al.*, 2019). Adicionalmente se ha encontrado que excesivas concentraciones de iones plata pueden acelerar la agregación de AgNp's, lo que conduce a la formación de partículas muy grandes (Ma *et al.*, 2017) o también pueden llegar a impedir la formación de AgNp's (Kathiresan *et al.*, 2009).

#### **1.7.5 Otros factores que pueden afectar la micosíntesis *in vitro***

La composición del medio de cultivo ha sido considerada un factor fundamental en la síntesis de Np's. Se ha evidenciado que, con el mismo tipo de microorganismo, amortiguadores de pH pueden tener un

efecto en el tamaño y la monodispersidad de las Np's obtenidas (Zhang *et al.*, 2011). Así mismo, un incremento en la relación C/N en el medio de cultivo puede mejorar el crecimiento fúngico y por tanto la actividad nitrato reductasa (NR), debido a que a altas concentraciones de glucosa inducen la secreción de esta enzima (Hamedi *et al.*, 2017).

Durante el proceso de síntesis, la agitación es otro parámetro que tiene efectos en el control del tamaño de las Np's obtenidas. Mokhtari *et al.*, 2009 encontraron que si bien bajo condiciones de agitación la monodispersidad de las AgNp's mejora, la cantidad de Np's producidas puede disminuir hasta 15 veces con respecto a las obtenidas en un proceso sin agitación. Al respecto Motesfahi *et al.*, 2012 reportaron que, bajo condiciones limitantes de oxígeno, como las que pueden darse en un proceso sin agitación, la ruta bioquímica de la NR es más activa. De otro lado, la luz también puede tener un efecto sobre el total de proteínas excretadas por el hongo, ya que cuando la incubación se da en presencia de luz se incrementa la secreción de la enzima NR (Hamedi *et al.*, 2017).

Finalmente, el tiempo de exposición a la sustancia precursora también tiene efectos en la forma de la nanopartícula. Gericke & Pinches, 2006 realizando la biosíntesis de AgNp's, encontraron que las partículas más pequeñas y con mejor monodispersidad fueron obtenidas cuando las células estuvieron expuestas a la solución metálica a menores tiempos. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que largos tiempo de incubación pueden incrementar la presencia de sustancias bioactivas, que pueden limitar la producción de AgNp's (Ma *et al.*, 2017), así, mejores tasas de producción de AgNp's se han reportado para tiempos de incubación de 36 horas (Birla *et al.*, 2013).

## 1.8 Nanopartículas de plata (AgNp's) como nanopesticidas

Debido a la problemática actual de los pesticidas tradicionales, por sus efectos negativos sobre el ambiente, la salud humana y la aparición de resistencia de muchos patógenos a estos insumos, se requieren de nuevas estrategias de control y la introducción de tecnologías innovadoras que se fundamentan en nanotecnología han mostrado resultados promisorios en cuanto al control de agentes fitopatógenos (Kim *et al.*, 2012; Athanassiou *et al.*, 2018). El desarrollo de ingredientes activos con dimensiones en la nanoescala definidos como nanopesticidas, así como su formulación y liberación son un campo de investigación en expansión.

Al respecto se destacan algunas investigaciones como las realizadas por Park *et al.*, 2006 quienes emplearon Np's de sílice-plata obtenidas por métodos físicos para el control de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causante del tizón bacteriano y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causante de la podredumbre negra, encontraron inhibición únicamente a la dosis más alta empleada en el estudio, 100 ppm. Similarmente, Oh *et al.*, 2006, utilizando diferentes concentraciones de Np's de sílice-plata sintetizadas por métodos fisicoquímicos evaluaron su capacidad para controlar el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* encontrando una eficiencia del 65 % y 99% utilizando dosis de 10 ppm y 100 ppm, respectivamente. Aguilar & San Martín (2008), obtuvieron por métodos tradicionales AgNp's y evidenciaron su actividad antimicrobiana contra *Colletotrichum gloeosporoides* agente causal de la antracnosis. La actividad antifúngica de dichas Np's fue evaluada mediante la técnica de inhibición en placa utilizando diferentes concentraciones de Np's, encontrando que a una concentración de 16µL/mL y luego de diez días de incubación, no se presentó crecimiento del hongo evaluado. Kim *et al.*, 2009 evaluaron el efecto inhibitorio de una suspensión de AgNp's frente al crecimiento y germinación de conidias del hongo patógeno causante de la marchitez del roble *Raffaella* sp., encontrando una inhibición significativa, pero dosis dependiente.

Kim *et al.*, 2012 evaluaron el efecto antifúngico de AgNp's comerciales frente a varios hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Stemphylium lycopersici*, *Pythium spinosum* y *Glomerella cingulata* encontrando que las AgNp's son capaces de inhibir esos patógenos. Sin embargo, los resultados varían de acuerdo a la concentración y tipo de AgNp's aplicada, no obstante, todos mostraron inhibición cuando fueron sometidos a una concentración de 100 ppm de AgNp's. Particularmente y relacionado a esta tesis, se puede observar que estudios acerca de la actividad antimicrobiana de las AgNp's obtenidas por biosíntesis sobre bacterias fitopatógenas no han sido reportados. Además, investigaciones de este tipo, en donde se evalúe la actividad antibacteriana de AgNp's sobre agentes causales de enfermedades propias de la papa como lo es la pudrición blanda tampoco han sido realizados.

## 1.9 Inmovilización de nanopartículas de plata (AgNp's)

La inmovilización de AgNp's en diferentes tipos de soporte es una alternativa segura que permite aprovechar su versatilidad, pero limitando su liberación durante el ciclo de vida de los productos que las contienen o durante su reciclaje, lo cual es deseable y responsable en aplicaciones que involucren el contacto directo o indirecto con seres vivos (Sharifi *et al.*, 2012). Esto es relevante debido a la potencial

citotoxicidad de las AgNp's y su potencial impacto ambiental, que ha empezado a limitar el uso de las AgNp's como agentes antimicrobianos (Zheng *et al.*, 2016). De otro lado con la inmovilización se puede mejorar la actividad de las AgNp's pues cuando se encuentran en suspensión coloidal, estas presentan una fuerte tendencia a agregarse lo cual interfiere con su actividad, y por eso la presencia de un soporte puede estabilizarlas y controlar su accionar (Adepu *et al.*, 2017).

En este aspecto, las AgNp's han sido soportadas sobre sustratos sintéticos o biopolímeros de acuerdo a su aplicación final (Dong & Hinestroza, 2009). Dentro de los biopolímeros, especialmente la celulosa ha sido muy utilizada, dada su biocompatibilidad, estructura química activa, y bajo impacto ambiental (Durán *et al.*, 2007; Elrafie *et al.*, 2010; Castellanos *et al.*, 2012; Bastidas *et al.*, 2018). Este polisacárido presente en muchas fibras naturales ha demostrado ser un material apto para su funcionalización, lo cual ha podido atribuirle propiedades catalíticas o antibacteriales (Diez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018). Dentro de los nanomateriales con acción antibacteriana se destacan las AgNp's, y debido a que el desarrollo de materiales celulósicos antimicrobianos es un reto ya se han reportado diferentes estrategias para anclar AgNp's a estos sustratos (Elrafie *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018).

En general dichas estrategias pueden realizarse por métodos de ensamblaje electrostático o a nivel *in situ* sobre los sustratos (Castellanos *et al.*, 2012). En los primeros, que se conocen como procesos húmedos, el material celulósico que sirve de soporte y las AgNp's, se producen separadamente y luego se mezclan, garantizando su unión covalente gracias a interacciones electrostáticas (Castellanos *et al.*, 2012). De otro lado, la reducción química *in situ* es una estrategia que involucra el crecimiento de AgNp's en el material celulósico, en este caso los iones de plata pasan al interior de las fibras gracias a su superficie nanoporosa y se inicia la formación de las AgNp's, gracias a un agente reductor externo y quedando atrapadas en la fibra. Con este enfoque, en algunos casos el material celulósico no solo actúa como soporte, sino que también participa en el proceso de reducción por la alta densidad de átomos de oxígeno presentes en las fibras (Dong & Hinestroza, 2009; Xu *et al.*, 2018).

Al respecto existen varios estudios que han mostrado la efectividad de la inmovilización de AgNp's a diversos sustratos vegetales. Tal es el caso de la investigación realizada por Diez *et al.*, 2011 quienes funcionalizaron nanofibrillas de celulosa con AgNp's para elaborar un complejo fluorescente con actividad antibacteriana frente a *E.coli*. Por su parte Iturbe *et al.*, 2013 fabricaron un biocompuesto empleando un extracto vegetal a partir de *Camelia sinensis* y fibras de algodón como soporte. Emam *et al.*, 2015 obtuvieron y caracterizaron AgNp's soportadas en fibras de algodón empleando goma xantana como agente reductor y estabilizante, el complejo mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Zhang *et al.*, 2013 fabricaron un tejido de algodón antibacteriano injertado con AgNp's que

muestra alta durabilidad frente al lavado. Y Ovalle *et al.*, 2013 realizaron la síntesis de un material nanocompuesto mediante la deposición *in situ* de AgNp's sobre fibras de fique.



## Capítulo 2 : Estudio de bioprospección en suelos de páramo para la selección de hongos rizosféricos del cultivo de papa para la biosíntesis de AgNp's

### 2.1 Introducción

Los páramos son ecosistemas que se encuentran dentro de los Andes Tropicales en una serie de cumbres montañosas aisladas a altitudes de entre 2.800 y 4.700 m sobre el nivel del mar. Estos cubren aproximadamente 35.000 km<sup>2</sup> (Madríñan *et al.*, 2021), donde el 99 % de los páramos del mundo se encuentran en la cordillera de los Andes. Específicamente para Colombia, el páramo se localiza en las tres cordilleras y en la Sierra Nevada de Santa Marta, cubriendo un área de 14.434 km<sup>2</sup>, equivalente al 49 % de los páramos del mundo, siendo el departamento de Boyacá el que cuenta con mayor extensión de páramos, con un 16 % del total nacional (Garavito *et al.*, 2015).

Los ecosistemas paramunos colombianos no solo son importantes por su papel como reguladores del ciclo hidrológico, sino porque pueden considerarse ambientes altamente diversos (Madríñan *et al.*, 2021). De hecho, Colombia es uno de los países considerados megadiversos y por esa razón, tiene el potencial para que se adelanten investigaciones relacionadas con bioprospección, proceso que se define como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que posean un valor económico actual o potencial y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica (Duarte *et al.*, 2009).

Dentro de esos organismos con potencialidad de bioprospección, los hongos son relevantes. Estos cuentan con más de 1,5 millones de especies en todo el mundo, pero se conoce que solo el 5% de las especies fúngicas han sido caracterizadas taxonómicamente (Ibrahim *et al.*, 2021). Los hongos se adaptan a diversos entornos y desarrollan una serie de mecanismos de supervivencia que les permiten fabricar una gran variedad de sustancias químicas de interés para el hombre, y por eso se reconocen como un reservorio de metabolitos (Ibrahim *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2022).

Dentro de estos metabolitos, las enzimas pueden tener múltiples aplicaciones biotecnológicas, tal es el caso de la nitrato reductasa (NR), enzima extracelular, responsable de la desnitrificación, proceso del ciclo

del nitrógeno que involucra la reducción de nitritos ( $\text{NO}_2$ ) o nitratos ( $\text{NO}_3$ ) hasta óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) o nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) (Wang *et al.*, 2021). Esta enzima posee un alto potencial redox y es utilizada en nanotecnología para la reducción de compuestos metálicos a sus respectivas nanopartículas (Fatima *et al.*, 2015). Específicamente puede reducir la plata iónica ( $\text{Ag}^+$ ) a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ), dando lugar a la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNp's) (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Fatima *et al.*, 2015; Abassi *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2020). Por lo tanto, los hongos sobresalen en los procesos de biosíntesis de AgNp's debido a su alta tolerancia a metales, capacidad de bioacumulación de los mismos, alta tasa de crecimiento, y requerimientos de bajo costo durante la producción de AgNp's a gran escala. Pero tal vez, lo más relevante es que cuentan con una alta tasa de secreción de proteínas, enzimas y metabolitos que están implicados en la biosíntesis de AgNp's (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Beyene *et al.*, 2017; Fatima *et al.*, 2015; Hamedi *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, las AgNp's han empezado a emplearse en el campo agrícola dada su acción antibacterial, la cual ha sido verificada sobre patógenos de importancia clínica, haciendo frente adicionalmente a la resistencia que muchos agentes fitopatógenos han desarrollado frente a los pesticidas tradicionales, lo cual ha perjudicado globalmente a la agricultura. El uso de estos nanomateriales para el control de dichos agentes, podría superar los protocolos actuales de control de tipo fisicoquímico y biológico a corto y mediano plazo (Mishra *et al.*, 2015; Alghuthaymi *et al.*, 2015), y por eso los estudios nanobiotecnológicos han ganado popularidad en los últimos años (Chauhan *et al.*, 2022)

Debido a que los hongos de las clases basidiomicetos y ascomicetos han sido reportados como productores sobresalientes de AgNp's (Priyadarshini *et al.*, 2021) y estos predominan en los suelos, surge la iniciativa de realizar un estudio de bioprospección en un ecosistema de páramo localizado en el Departamento de Boyacá con suelos sometidos a agricultura intensiva de papa, con el objetivo de encontrar hongos filamentosos con actividad nitrato reductasa sobresaliente, rasgo deseable para la biosíntesis de AgNp's. Y una vez obtenidas dichas partículas, resulta interesante evaluar su acción antibacterial frente al agente fitopatógeno de papa *Pectobacterium carotovorum* dado su potencial nanopesticida.

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Aislamiento e identificación de hongos rizosféricos de la papa (*Solanum tuberosum*)

El muestreo de suelos se realizó en el sector Montoya de la vereda San José del Gacal, municipio de Ventaquemada-Boyacá, en cuatro parcelas contiguas cultivadas con papa y geoposicionadas en las coordenadas N 05° 25'26,07" y W 073°30'48,5". A partir de muestras de suelo rizosférico se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa, empleando agar papa dextrosa agar (PDA) suplementado con cloranfenicol a 30 ppm para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas de Petri se incubaron a 28 °C/7 días, y los hongos que aparecieron en todas las placas de Petri se purificaron empleando cabina de flujo laminar hasta obtener un total de 50 aislamientos. La identificación de los hongos se llevó a cabo de forma descriptiva, determinando el género mediante la observación de las características macroscópicas como el color, diámetro, textura, y características microscópicas tales como morfología de hifas, esporas y estructuras reproductivas, las cuales se observaron a partir de preparaciones teñidas con azul de lactofenol (Samson *et al.*, 2004; Pitt *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR)

La prueba colorimétrica de reducción de nitrato se realizó según Winn *et al.*, 2006 con algunas modificaciones. Utilizando caldo de nitrato ® Merck como medio de cultivo para el ensayo y revelando la presencia de nitritos añadiendo el reactivo de Griess-Ysolav, la aparición de una coloración roja tras la adición del revelador indica una prueba positiva. Los aislados que resultaron positivos en análisis cualitativo se evaluaron cuantitativamente mediante el método colorimétrico descrito por Harley *et al.*, 1993. La actividad enzimática de la nitrato reductasa se cuantificó determinando la concentración de nitritos en nmol/mL presente en el sobrenadante del medio de cultivo líquido inoculado tras 7 días de incubación. Y, los cinco aislados que mostraron la mayor actividad nitrato reductasa se conservaron en papel de filtro a 4 °C utilizando la metodología sugerida por Hu *et al.*, 2014, para posteriores análisis.

### 2.2.3 Caracterización molecular de hongos promisorios para la biosíntesis de AgNp's

El análisis filogenético y la secuenciación del espaciador intergénico transcrito (ITS) de los aislados se llevó a cabo en el centro de investigación CORPOGEN en Bogotá-Colombia. Se realizó la extracción del ADN ribosomal fúngico y para la amplificación de los fragmentos de interés se utilizaron los primers universales ITS4 (5'-TCC TCC GCTT AT TGA TAT ATGC-3) y ITS 5 (5'-TCC TCC GCT TAT TAT TGA TAT ATG C-3'). La presencia y el tamaño del producto de la PCR se confirmó en un gel de agarosa al 1%, según Sambrook *et al.*, 2001. La purificación y secuenciación del fragmento de la PCR se realizó mediante el método de Sanger. El análisis de la secuencia se efectuó con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), comparándolo con la colección de nucleótidos denominada “(nr/nt)” del mismo NCBI. Para el análisis filogenético, las secuencias se alinearon utilizando la herramienta *Mega Align*, y los extremos de las secuencias de baja calidad se eliminaron manualmente utilizando este mismo programa. El análisis de las secuencias se realizó con el programa MEGA X, para construir árboles filogenéticos por el método del *neighbor-joining*.

## 2.2.4 Biosíntesis de AgNp's a partir de los hongos promisorios

Para realizar la biosíntesis se siguieron las metodologías sugeridas por Ahluwalia *et al.*, 2014; Al juraifani *et al.*, 2015; Krishnakumar *et al.*, 2015, y AbdelRahim *et al.*, 2017 con pequeñas modificaciones. Utilizando los aislamientos conservados, se empleó un papel de filtro colonizado como inóculo y usando caldo Sabouraud Dextrosa (SDB) para obtener biomasa. Este cultivo se colocó en un agitador orbital a 120 rpm/24°C/7 días, y la biomasa obtenida fue colectada y filtrada a través de papel de filtro estéril Whatman No. 1, para luego lavar tres veces con agua destilada estéril y así eliminar los restos de componentes del medio de cultivo.

Para preparar el filtrado celular libre de micelio (FCLM), se pesaron asépticamente 10 g de biomasa fúngica fresca y se transfirieron a un erlenmeyer con 100 mL de agua Milli-Q. La mezcla se mantuvo en un agitador orbital a 24 °C/ 24 horas, a 120 rpm, y luego se centrifugó a 5000 RCF (Fuerza centrífuga relativa o fuerza G) durante 5 minutos, y el sobrenadante FCLM obtenido se utilizó para la biosíntesis de AgNp's. En este caso, 100 mL del FCML se mezclaron con 100 mL de AgNO<sub>3</sub> 1mM. La reacción bioquímica entre el sobrenadante y los iones de plata se llevó a cabo en condiciones de oscuridad durante 96 horas a 180 rpm, pH 7 y 40 °C.

La reducción bioquímica de los iones de plata se monitoreó por el cambio de color de la solución y se verificó por espectroscopía (Al juraifani *et al.*, 2015). El espectro UV-Vis se realizó entre 300 y 700 nm utilizando agua destilada estéril como blanco, monitoreando el máximo de absorción de las AgNp's que

generalmente aparece a 420-430 nm. La banda de absorción debida al fenómeno de resonancia plasmónica superficial (RPS) muestra su mayor incidencia en ese rango del espectro electromagnético. Además, se utilizaron dos controles experimentales: uno que consistió únicamente en FCML, y el otro en una solución de AgNO<sub>3</sub> en agua Milli-Q sin filtrado celular.

### 2.2.5 Caracterización de las AgNp's obtenidas por los cinco aislamientos productores de AgNp's

La caracterización detallada del tamaño y morfología de las AgNp's se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras se sonicaron a temperatura ambiente durante cinco minutos y a continuación, una alícuota de la suspensión acuosa de AgNp's fue dispuesta en una rejilla de cobre recubierta y se dejó secar antes del análisis. El análisis TEM de AgNp's se llevó a cabo utilizando un instrumento Tecnai F20 ajustado a 100 kV (AbdelRahim *et al.*, 2017). El tamaño medio de las AgNp's biosintetizadas se determinó utilizando el software Image J 1.45 s. Luego con el objetivo de corroborar la morfología de las AgNp's se realizó la prueba de esfericidad empleando el programa Matlab r2023a ®, este parámetro se define como la relación entre el diámetro de un círculo inscrito en la partícula (cuando ésta descansa en una de sus caras más grandes), entre el diámetro del círculo más pequeño circunscripto (Wadell, 1935). Esta característica puede estimarse de manera bidimensional utilizando la proyección de las partículas para obtener las coordenadas de sus fronteras en micrografías TEM. La esfericidad (E) puede calcularse utilizando la expresión propuesta por Cox (1927) como lo indica la ecuación 1.

$$Esfericidad = \frac{4 \pi \text{ área}}{\text{perímetro}^2}$$

1

Para esto fue necesario en primera medida transformar las imágenes TEM a una versión monocromática con el fin de contrastar el perímetro de cada una de las partículas analizadas, luego se realizó una depuración de la imagen a fin de eliminar toda información con baja resolución, estableciendo un umbral para este fin, además de definir un borde para cada una de las AgNp's. A continuación, las coordenadas de las fronteras de cada elemento fueron obtenidas, facilitando el cálculo de áreas y perímetros de cada una de las partículas incluidas en la micrografía TEM y la esfericidad se calculó introduciendo el código correspondiente al sistema de programación y cómputo numérico. Para interpretar ese análisis se debe tener cuenta que en un análisis bidimensional una partícula con una proyección circular tendría un valor de esfericidad igual a 1 y a medida que la forma se distancia de un círculo, su valor disminuirá hasta aproximarse a cero.

Ahora para poder determinar la concentración de AgNp's producidas por cada hongo, se realizó una búsqueda árdua para descifrar la forma de hacerlo, pues este procedimiento no aparece en los reportes de micosíntesis de AgNp's a la fecha. Finalmente se encontró el metodo propuesto por González *et al.*, 2015 quienes presentan que empleando el tamaño promedio de las AgNp's según análisis TEM, se puede hallar el número de AgNp's / mL como se indica a continuación:

1. Calcular el número de átomos de plata disponibles para la formación de AgNp's.

$$\text{No. de átomos} = \text{Concentración de la sal precursora (1mM)} * \text{No. de avogadro}$$

$$\text{No. de átomos} = 10^{-3} * 6.023 * 10^{23} = 6.023 * 10^{20} \text{ átomos}$$

2. Para calcular el número de nanopartículas formadas suponiendo que todo el precursor metálico se reduce:

$$\text{No. AgNp's} = \frac{\text{No. de átomos de Ag}}{\text{No. de átomos por partícula}} \quad \boxed{2}$$

3. Para determinar el número de átomos por nanopartícula es necesario tener el valor medio del diámetro de las AgNp's y así el volumen de una AgNp's es:

$$\text{Volumen} = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2}\right)^3 \quad \boxed{3}$$

y Si  $ra$  es el radio atómico de un átomo de Ag y N el número de átomos en una Np's, se cumple:

$$\text{Volumen} = N \frac{4}{3} ra^3 \quad \boxed{4}$$

4. Igualando las ecuaciones 3 y 4 se obtiene:

$$\frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2}\right)^3 = N \frac{4}{3} ra^3 N = \left(\frac{D}{2}\right)^3 / ra^3$$

$$N = \left(\frac{D}{2ra}\right)^3 \quad \boxed{5}$$

5. Reemplazando 5 en 1 se obtiene finalmente:

$$\text{No. de AgNp's} = \frac{\text{No. de átomos de Ag}}{\left(\frac{D}{2ra}\right)^3} \quad \boxed{6}$$

6. Si  $V_c$  es el volumen total del coloide sintetizado en mL la concentración de AgNp's en la reacción será:

$$\text{Concentración de AgNp's} = \frac{\text{No. de AgNp's}}{V_c} \quad \boxed{7}$$

Posteriormente para realizar el análisis de dispersión de luz dinámica (DLS), el cálculo del índice de polidispersidad (PI) y la determinación del potencial Z de las AgNp's, la solución acuosa de AgNp's fue previamente filtrada a través de un filtro con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , y analizada empleando el equipo HORIBA Scientific SZ-100 V2 (Maliszewska *et al.*, 2013). Finalmente, para el análisis de difracción de rayos X (XRD), las AgNp's fueron liofilizadas y evaluadas en el difractómetro de Rayos X "BRUKER D8 Advance ECO". El equipo de difracción se configuró en geometría Bragg-Brentano usando un tubo cerámico con ánodo de cobre (Cu) emitiendo una longitud de onda de 1,54 Å, con 40kV y 25 mA, para una potencia de 1000 W. Las mediciones fueron realizadas con un aumento de paso de 0,019° y un tiempo/paso de 0,4s, el barrido fue realizado desde 20° hasta 70° 2 $\theta$ . Los códigos de las fases cristalinas detectados en las muestras fueron identificados empleando el software Profex versión 4.3.6 (Döbelin & Kleeborg, 2015).

### **2.2.6 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR) en el FCLM de los cinco aislamientos productores de AgNp's**

Para el estudio de la NR se empleó el método colorimétrico descrito por Harley *et al.*, 1993 con pequeñas modificaciones. En este se mezclaron 10 mL del FCLM de cada aislado con 10 mL de caldo de nitrato ® Merck y se incubaron a 30 °C en ausencia de luz durante 1 h. A continuación, se añadieron 5 mL de solución de sulfanilamida al 1% en HCl al 25%, y 5 mL de solución de 0,02 N-1-naftil etilendiamina-dihidrocloreuro (NEED) para determinar la formación de nitritos. Finalmente, las soluciones que adquirieron una coloración rojiza (debido a la liberación de nitrito en el medio de ensayo) se midieron a 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. La actividad enzimática se cuantificó determinando la cantidad de nitrito en nanomoles de nitrito/h/mL presente en el sobrenadante tras 1 h de reacción.

### **2.2.7 Selección de cepa de *Pectobacterium carotovorum* para ensayos antimicrobianos.**

Para la selección de la cepa, se contó con tres cepas de *Pectobacterium carotovorum* identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales. Donde dos de estas fueron aisladas de pitahaya (*Selenicereus undatus*) y denominadas para este estudio como 8,1 y 9,1 y la tercera fue donada con fines de investigación por el Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes (LAMFU) - Bogotá- Colombia, en donde reposa como la cepa No.9 y denominada cepa PC. Para definir la cepa con la que se realizaron

los ensayos antimicrobianos con las AgNp's obtenidas por biosíntesis se realizó una prueba de patogenicidad *in vitro*, modificando las metodologías propuestas por Lelliot *et al.*, 1966 y Hu Dong *et al.*, 2004. Para esto, tubérculos de papa fueron obtenidos de mercados locales, lavados y desinfectados superficialmente con etanol al 70%, luego fueron pelados y cortados en rodajas de 7-8 mm de ancho y 5 g de peso con bisturí estéril, para posteriormente abrirles un orificio de 2 mm en el centro de cada una. Estas rodajas en evaluación se dispusieron en cajas de Petri que contenían agua destilada estéril, de tal forma que la mitad de las rodajas quedaran sumergidas. A partir de un cultivo de cada una de las cepas de *P. carotovorum* a una DO de 0,1 ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), se tomó un inóculo de 10  $\mu$ L y se sirvió en el orificio de cada rodaja. El ensayo se realizó por triplicado por cada cepa, y como control negativo se incluyó una rodaja sin inocular. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C por 7 días, momento en que aparecieron los síntomas de la pudrición blanda, que incluyen la producción de un olor desagradable y la maceración del tejido vegetal. Al finalizar el proceso de incubación se evaluó la integridad de la rodaja y con ayuda de una espátula se retiró el tejido macerado que fue pesado empleando una balanza analítica. Para culminar los postulados de Koch's, la bacteria inoculada fue reaislada a partir del tejido macerado empleándose el método de recuento en placa utilizando agar nutritivo con incubación a 28 °C/24 horas. La identidad de la cepa reaislada se confirmó al comparar características morfológicas de la colonia, tinción de Gram, y resultados de la prueba de oxidasa con respecto a la cepa original. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA y una prueba de Tukey al 5%.

La cepa que resultó seleccionada en los ensayos de patogenicidad fue identificada molecularmente por secuenciación del gen 16sRNA en el centro de investigación CORPOGEN Bogotá- Colombia. Inicialmente se realizó la extracción del ADN bacteriano y se procedió a amplificar por PCR el gen ribosomal 16sRNA empleando los primers 337F, 518F, 800R, y 1100R. Los amplicones fueron purificados y secuenciados por medio del método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron editadas y limpiadas hasta obtener la secuencia problema, la cual fue finalmente analizada mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), comparando contra la base de datos RNA de referencia "refseq\_rna" (Hauben *et al.*, 1997).

## **2.2.8 Actividad antibacteriana de las AgNp's contra el agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum***

### **2.2.8.1 Curva de calibración de *Pectobacterium carotovorum***



A partir de un cultivo sólido de *Pectobacterium carotovorum* en agar nutritivo se tomaron colonias aisladas que fueron diluidas en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución salina NaCl (0,85%) estéril. Hasta obtener densidades ópticas (DO) entre 0,1 y 1,2 a 600 nm, empleando un espectrofotómetro UV-Vis, y utilizando como blanco una solución salina de NaCl al 0,85% (Pepper & Gerba, 2005). Luego se realizaron diluciones seriadas a cada uno de los tubos con la DO estandarizada (0,1-1,2), usando el método de recuento en placa con siembra en superficie, y utilizando el medio de cultivo agar nutritivo con incubación a 28 °C/ 24 horas (APHA, 2004). Para esto, se tuvieron en cuenta las cajas en donde se encontraron de 30-300 unidades formadoras de colonias (UFC), reportando el UFC/mL para cada punto de la curva por triplicado. Esta curva permite conocer la correspondencia entre las medidas de biomasa en el cultivo y la absorbancia, lo cual es necesario para definir concentraciones de inóculo o recuentos bacterianos en los análisis antibacteriales de las AgNp's.

### **2.2.8.2 Determinación de la actividad antibacterial de las AgNp's por el método de difusión en agar**

Para evidenciar la actividad antibacterial de las AgNp's, se empleó el método de difusión en agar con modificaciones (Ahluwalia *et al.*, Shelar *et al.*, 2014). Para la obtención del inóculo se realizó un cultivo de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* en caldo nutritivo hasta obtener una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^8$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL), según lo reportado en la curva de calibración. Con el inóculo se realizó una siembra masiva en cajas de Petri con agar nutritivo. Así, discos de papel de fibra de vidrio con un diámetro de 0,5 mm, fueron impregnados con las diferentes disoluciones de AgNp's obtenidas a partir de los cinco aislamientos fúngicos promisorios a una concentración de 100 ppm, y colocados sobre la superficie del agar previamente inoculado con el fitopatógeno. Posteriormente las cajas se incubaron a 28 °C/24 h y se midió el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento en milímetros. En este ensayo se tomó como estándar de referencia el antibiótico estreptomina, el cual es efectivo frente a *Pectobacterium carotovorum* y puede generar un tamaño de halo de 13 mm (Rojas *et al.*, 2014; Gokul *et al.*, 2019), y como control negativo se usó agua destilada estéril, realizando tres réplicas por AgNp's evaluada.

### **2.2.9 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para evaluar la actividad enzimática de aislamientos y la actividad antibacteriana de las AgNp's obtenidas de cada uno de los aislamientos seleccionados utilizando el software estadístico Minitab 19 ®.

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1 Aislamiento e identificación de hongos rizosféricos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*)

Siguiendo el protocolo enunciado anteriormente se obtuvieron 50 aislamientos de hongos a partir de las muestras de suelo rizosférico, y se purificaron por medio de subcultivo. Mediante microscopía óptica y utilizando preparaciones teñidas con azul de lactofenol, se observaron las características morfológicas del micelio y las conidias hasta definir el género de cada aislamiento (Samson *et al.*, 2004; Pitt *et al.*, 2009). Los 50 aislamientos obtenidos se distribuyeron entre 14 géneros de hongos, siendo el género *Penicillium* sp. el más numeroso con 27 miembros, seguido de los géneros *Aspergillus* sp., con ocho aislamientos, *Fusarium* sp., y *Rhizopus* sp., con tres y dos aislamientos, respectivamente. Los géneros con menos aislamientos fueron *Absidia* sp., *Acremonium* sp., *Mortierella* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Periconia* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Scopulariopsis* sp. y *Trichoderma* sp., cada uno con un solo aislado.

Como se puede observar, la mayoría de los hongos aislados pertenecen a los géneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp, los cuales han sido reportados previamente como productores eficientes de AgNp's (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Dhoble *et al.*, 2015; Nayak *et al.*, 2018; Madakka *et al.*, 2018). Destacándose que *Penicillium simplicissimum* se reporta aquí por primera vez como productor de AgNp's con hasta  $4,6 \times 10^{12}$  AgNp's/mL. *Penicillium simplicissimum* es un hongo del suelo que puede solubilizar compuestos metálicos dada su producción de ácidos orgánicos como el ácido cítrico (Sayer *et al.*, 1995). También se ha reportado que esta cepa solubiliza fosfatos en suelos cultivados con trigo (Wakelin *et al.*, 2014), y es reconocido por solubilizar carbón en presencia de fuentes de nitrógeno orgánico, lo que lleva a la formación de importantes materias primas para la producción de combustibles líquidos (Achi *et al.*, 1993). Todo lo cual convierte a esta especie en un hongo con gran potencial biotecnológico.

### 2.3.2 Evaluación de la actividad nitrato reductasa (NR)

Los hongos aislados y criopreservados en papel se reactivaron tomando un círculo de papel de filtro colonizado por el hongo en condiciones asépticas y poniéndolo a crecer un caldo Sabouraud Dextrosa (SDB) con incubación a 28 °C /7 días, para luego evaluar cualitativamente la actividad nitrato reductasa (NR) como criterio de selección inicial. Después de este procedimiento, solo 24 de los 50 aislados mostraron actividad NR positiva, posiblemente porque la enzima nitrato reductasa es especie específica (Priyadarshini *et al.*, 2021) y no fue posible detectarla en todos los hongos evaluados. Por lo tanto, solo

los 24 aislados con actividad NR positiva fueron evaluados cuantitativamente por triplicado siguiendo la metodología de Harley *et al.*, 1993 para determinar la concentración de nitrito (nmol/mL) liberada en el medio de cultivo después de 7 días de incubación (Tabla 2-1), medida directa de la actividad nitrato reductasa.

Los resultados muestran que estadísticamente se presentan diferencias significativas entre los hongos evaluados, siendo el aislado H14 el que liberó la mayor cantidad de nitrito al medio con un valor de 2099,9 nmol/mL, seguido por H18, H2, H4, y H39, con concentraciones entre 2057,9 y 1229,2 nmol/mL. El hongo H57 presentó la menor concentración de nitritos con 97,9 nmol/mL. De acuerdo con los resultados obtenidos, los aislados con el potencial de formación de AgNp's al presentar la actividad enzimática más elevada fueron H2 (*Penicillium* sp.), H4 (*Penicillium* sp.), H14 (*Aspergillus* sp.), H18 (*Penicillium* sp.) y H39 (*Fusarium* sp.).

**Tabla 2-1:** Prueba cuantitativa para la reducción de nitratos para los 24 aislamientos promisorios para la biosíntesis de AgNp's.

Aislamiento	Concentración de nitrito (nmoles/mL)
H2 ( <i>Penicillium</i> sp.)	1772,5 <sup>a</sup>
H4 ( <i>Penicillium</i> sp.)	1731,9 <sup>a</sup>
H9 ( <i>Penicillium</i> sp.)	1075,2 <sup>bc</sup>
H14 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	2099,9 <sup>a</sup>
H15 ( <i>Paecylomyces</i> sp.)	934,5 <sup>bcde</sup>
H18 ( <i>Penicillium</i> sp.)	2057,9 <sup>a</sup>
H21 ( <i>Penicillium</i> sp.)	994,5 <sup>bcd</sup>
H25 ( <i>Penicillium</i> sp.)	421,9 <sup>fgh</sup>
H26 ( <i>Penicillium</i> sp.)	1017,2 <sup>bcd</sup>
H30 ( <i>Rhizopus</i> sp.)	646,5 <sup>cdefg</sup>
H33 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	1025,9 <sup>bcd</sup>
H34 ( <i>Penicillium</i> sp.)	325,9 <sup>fgh</sup>
H36 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	448,5 <sup>efgh</sup>
H39 ( <i>Fusarium</i> sp.)	1229,2 <sup>b</sup>
H40 ( <i>Penicillium</i> sp.)	769,9 <sup>bcdef</sup>
H42 ( <i>Scopulariopsis</i> sp.)	491,9 <sup>efgh</sup>
H43 ( <i>Penicillium</i> sp.)	447,2 <sup>efgh</sup>

Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%.

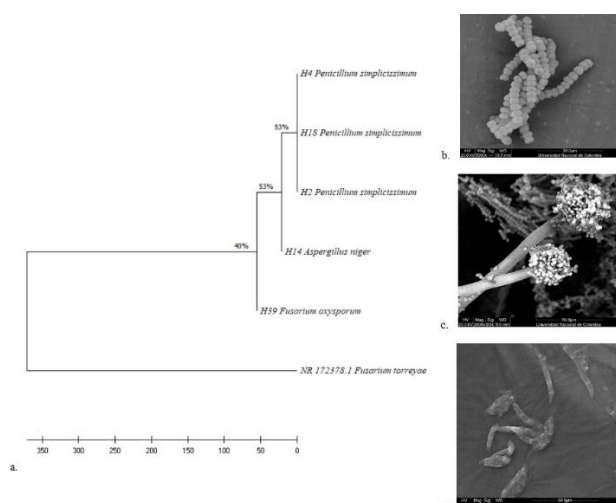
**Tabla 2-2 :** Prueba cuantitativa para la reducción de nitratos para los 24 aislamientos promisorios para la biosíntesis de AgNp's. Cont.

Aislamiento	Concentración de nitrito (nmoles/mL)
H46( <i>Penicillium</i> sp.)	416,5 <sup> fgh</sup>
H48 ( <i>Fusarium</i> sp.)	347,9 <sup> fgh</sup>
H51 ( <i>Mucor</i> sp.)	360,5 <sup> fgh</sup>
H52 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	441,2 <sup> e fgh</sup>
H54( <i>Aspergillus</i> sp.)	541,2 <sup> defgh</sup>
H57 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	97,9 <sup> h</sup>
H58 ( <i>Aspergillus</i> sp.)	209,9 <sup> gh</sup>

Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%.

### 2.3.3 Caracterización molecular de hongos prometedores para la biosíntesis de AgNp's

Teniendo en cuenta la actividad presentada por algunos hongos en la biosíntesis de AgNp's, se hicieron análisis moleculares mediante la amplificación de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ARNr del hongo utilizando los primers ITS4 e ITS5, y comparándolos con las bases de datos disponibles tales como EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), UNITE y *Warcup Fungal ITS trainset 2*. Los resultados comprobaron que los aislados H2, H4 y H18 pertenecen a la especie *Penicillium simplicissimum*, H14 a *Aspergillus niger* y H39 a *Fusarium oxysporum*, con un porcentaje de identidad del 99% en todos los casos. El dendrograma permite observar la agrupación de los aislados según la especie, y en las micrografías SEM se observan las estructuras características de cada uno de ellos (Figura 2-1).



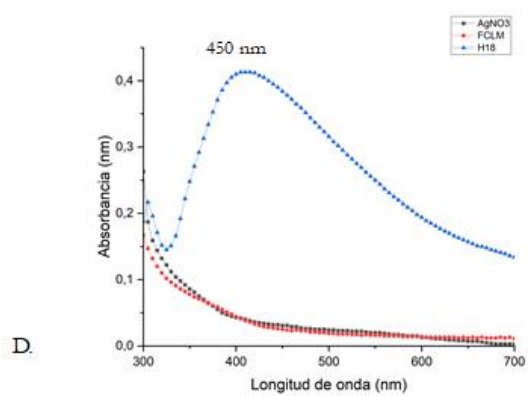
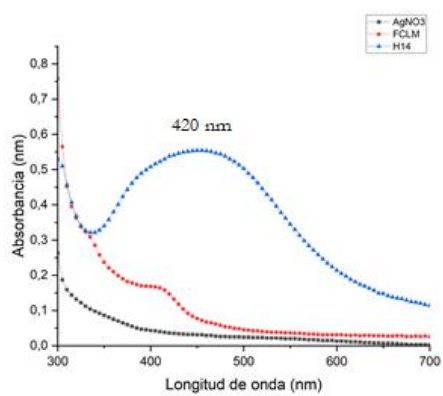
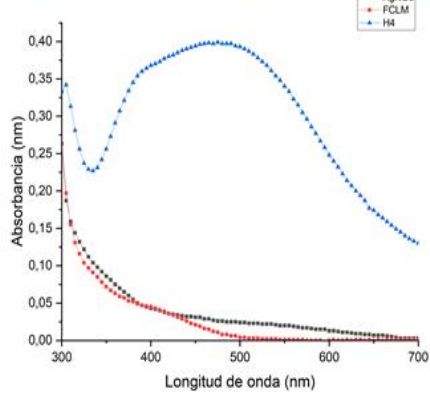
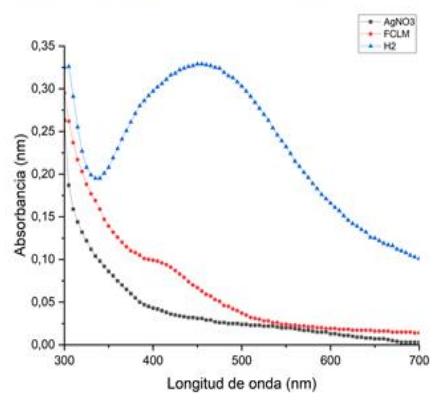
**Figura 2-1:** Dendrograma y micrografías SEM de los hongos promisorios para la biosíntesis de AgNp's. A) Dendrograma realizado con el programa MEGA X con un Bootstrap de 1000 réplicas B) Esporas de *Penicillium simplicissimum*, C) Conidióforo de *Aspergillus niger*, y D) Macroconidias de *Fusarium oxysporum*.

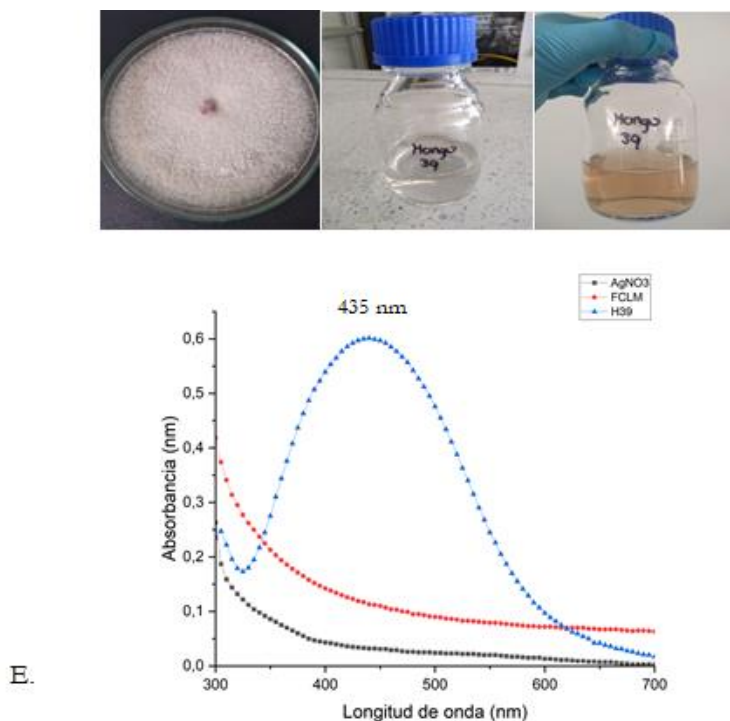
### 2.3.4 Biosíntesis de AgNp's a partir de los aislamientos promisorios

En todas las reacciones de biosíntesis realizadas con los cinco hongos seleccionados (sección 2.3.3) tras 96 horas de incubación, se observó la aparición de una coloración que variaba de amarillo oscuro a marrón, según el aislado. Este cambio de color sugiere que ocurrió la reducción de los iones de plata y se han formado las AgNp's (Figura 2-2). Por otro lado, los controles experimentales, el filtrado celular libre de micelio (FCLM) sin AgNO<sub>3</sub> y la solución de AgNO<sub>3</sub> 1mM, no mostraron un cambio de color después del tiempo de incubación. Adicionalmente, para verificar la presencia de AgNp's en la solución, se realizó un análisis espectrofotométrico en cada mezcla de reacción, detectando bandas de absorbancia entre 420 y 475 nm tras 96 horas de incubación en todas las muestras, confirmando así la presencia de AgNp's.

Para las AgNp's obtenidas con los hongos H2, H4, y H18 pertenecientes a la especie *Penicillium simplicissimum*, se observaron máximos de absorción a 450, 475 y 420 nm, respectivamente (Figura 2-2 A, B, D). Para las AgNp's obtenidas del hongo H14 (*Aspergillus niger*), el máximo de absorción fue de 450 nm (Figura 2-2 C). Y, en el caso de las AgNp's obtenidas con el hongo H39 (*Fusarium oxysporum*), se observó un máximo de absorción a 435 nm (Figura 2-2 E).

Cabe resaltar que durante la biosíntesis de AgNp's con los cinco aislados prometedores, la cepa H4 (*P. simplicissimum*) fue la que mostró un cambio de color más intenso, lo que sugiere que este hongo produce la mayor cantidad de AgNp's. Se sabe que la intensidad del color aumenta con el tiempo de incubación y con el aumento del número de AgNp's (Jain *et al.*, 2011; Elamawi *et al.*, 2018). Otros investigadores, trabajando con hongos como *Trichoderma viride* y *Aspergillus flavus* también han indicado estos cambios de color como indicio para validar sus resultados preliminares (Elgorban *et al.*, 2016; Jain *et al.*, 2011). Sin embargo, al determinar la concentración de AgNp's sintetizada por cada aislado, se encontró que el hongo H14 (*Aspergillus niger*) produjo el mayor número de Np's, indicando, al menos para nuestro caso, que la intensidad de color de la mezcla de reacción no confirma una mayor concentración de AgNp's, y que es necesario cuantificar las AgNp's producidas por el aislamiento para determinar la eficacia del proceso. Lamentablemente, como se ha mencionado anteriormente, este valor no se ha reportado en las investigaciones anteriores que utilizan hongos.





**Figura 2-2:** Hongo, reacciones de biosíntesis y espectro de absorción UV-Vis de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 (*Penicillium simplicissimum*), B) H4 (*Penicillium simplicissimum*), C) H14 (*Aspergillus niger*), D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*). Controles: AgNO<sub>3</sub> y FCLM.

Es importante resaltar que las condiciones de reacción seleccionadas permitieron biosíntesis de Np's con todos los aislados evaluados en este estudio. La concentración de la solución precursora utilizada en las reacciones (AgNO<sub>3</sub>, 1mM) favoreció la actividad nitrato reductasa, la misma concentración reportada como efectiva para la biosíntesis en el estudio realizado por Singh *et al.*, 2014. Además, se ha informado que se producen AgNp's más grandes a concentraciones más altas de AgNO<sub>3</sub>, alcanzando el orden de los micrómetros, pero presentando formas irregulares que no son deseables en varias aplicaciones (Almeida *et al.*, 2017). Por su parte, el pH neutro utilizado fue eficaz, ya que las enzimas implicadas en la biosíntesis de las AgNp's tienen una alta actividad catalítica a pH alcalino y se inhiben a pH ácido; aun así, en general, el pH neutro favorece el proceso (Ma *et al.*, 2017).

Para las reacciones de biosíntesis de AgNp's realizadas en este estudio, se utilizaron 10 g de biomasa para obtener 100 mL de filtrado celular libre de micelio (FCLM). Cantidad también que también se empleó durante la síntesis de AgNp's desarrollada por Elamawi *et al.*, 2018. En cambio, autores como Singh *et al.*, 2014 indican que las mejores cantidades de biomasa oscilan entre 11 y 20g, para obtener el mismo volumen de FCLM. Almeida *et al.*, 2017 sugieren que el aumento de la cantidad de biomasa incrementa

el tamaño de las AgNp's obtenido, debido a que la concentración de la enzima en el FCLM aumenta. Aunque, utilizando estas condiciones estándar de síntesis reportadas por varios autores, se obtuvieron AgNp's en todos los casos, aquí se propone que el aumento del tiempo de contacto entre la biomasa y el agua Milli-Q, para obtener el FCLM, favorece el proceso ya que la secreción de la enzima nitrato reductasa podría aumentar, lo que podría representar una mayor tasa de producción de AgNp's.

En cuanto al análisis espectroscópico de las Np's obtenidas, los máximos de absorción aparecieron entre 420 y 475 nm para las AgNp's obtenidas con los tres aislados de la especie *Penicillium simplicissimum*. Honary *et al.*, 2013 y Majeed *et al.*, 2018, trabajando con los hongos *Penicillium* sp. y *Penicillium brevicompactum*, respectivamente, también encontraron el máximo de absorción a 420 nm. Para las AgNp's obtenidas con (H14) *Aspergillus niger*, se evidenció un máximo de absorción a 450 nm, diferente del reportado por Al juraifani *et al.*, 2015, quienes encontraron la máxima absorción a 435 nm. Finalmente, en esta investigación, las AgNp's obtenidas a partir del hongo (H39) *Fusarium oxysporum* mostraron un máximo de absorción a 435 nm (Figura 2-2 E), similar a lo reportado por otras investigaciones anteriores (Al juraifani, 2015, Ahmad *et al.*, 2003), además con este hongo el espectro de absorción mostró el área bajo la curva más estrecha, lo que indica mayor uniformidad de tamaños de las AgNp's.

Se ha informado que las AgNp's homogéneas producen una banda de resonancia plasmónica superficial a 420 nm (Ahmad *et al.*, 2003). Sin embargo, en este trabajo, es evidente que el máximo de absorción varía de posición dependiendo del hongo evaluado y esto también se relaciona con la diferencia en el tamaño de las AgNp's generadas (Guilger *et al.*, 2019). Además, fue posible evidenciar en todas las reacciones una banda plasmónica única con diferentes intensidades, lo que corresponde a la producción de Np's isotrópicas y con una distribución de tamaño uniforme en todos los casos (Hamedi *et al.*, 2017). Esto sugiere que la reacción de biosíntesis con los cinco hongos estudiados fue especie específica y generó rendimientos diferentes, hipótesis soportada con los resultados de cuantificación de las AgNp's obtenidas con cada hongo, los cuales se presentan en esta investigación (Tabla 2-2).

Asimismo, el hongo H4 (*Penicillium simplicissimum*) produjo AgNp's con una absorción máximo a 475 nm y un tamaño medio de 35 nm según análisis TEM. Mientras que las AgNp's más pequeñas presentaron un máximo de absorción a 450 nm y una longitud media de 15 nm según análisis TEM utilizando *Aspergillus niger*. Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que la señal de resonancia plasmónica superficial (RPS) se relaciona con el tamaño de la partícula y esta se desplaza a longitudes de onda más largas con el aumento del tamaño de las partículas, lo que indicaría que en nuestro caso existe una correlación lineal entre el tamaño, la cantidad de AgNp's, y la intensidad de la señal SRP (Wakelin *et al.*,

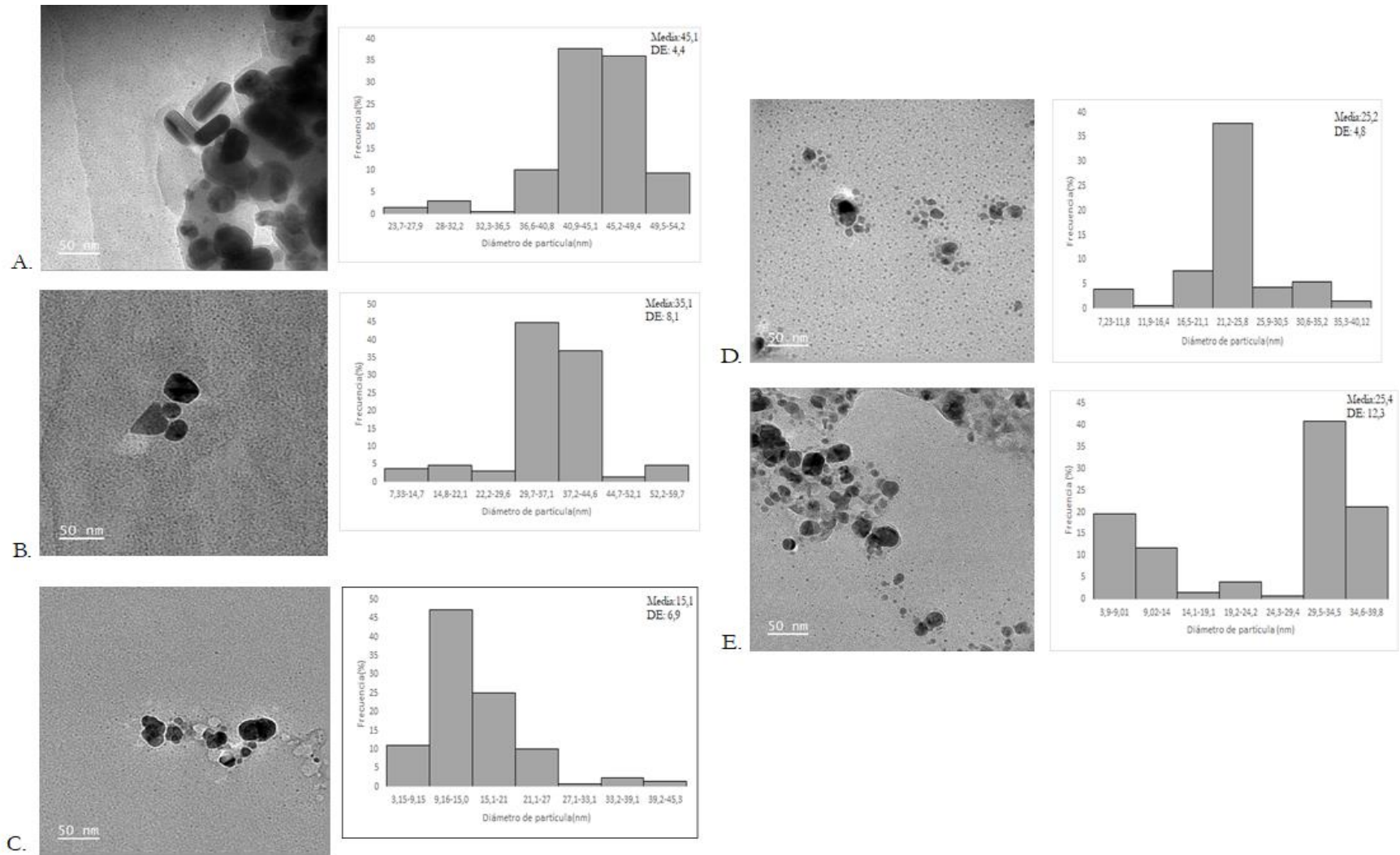


2014; Zomordian *et al.*, 2016). Sin embargo, Jaived *et al.*, 2010 sugieren que este tipo de correlación no siempre se aplica.

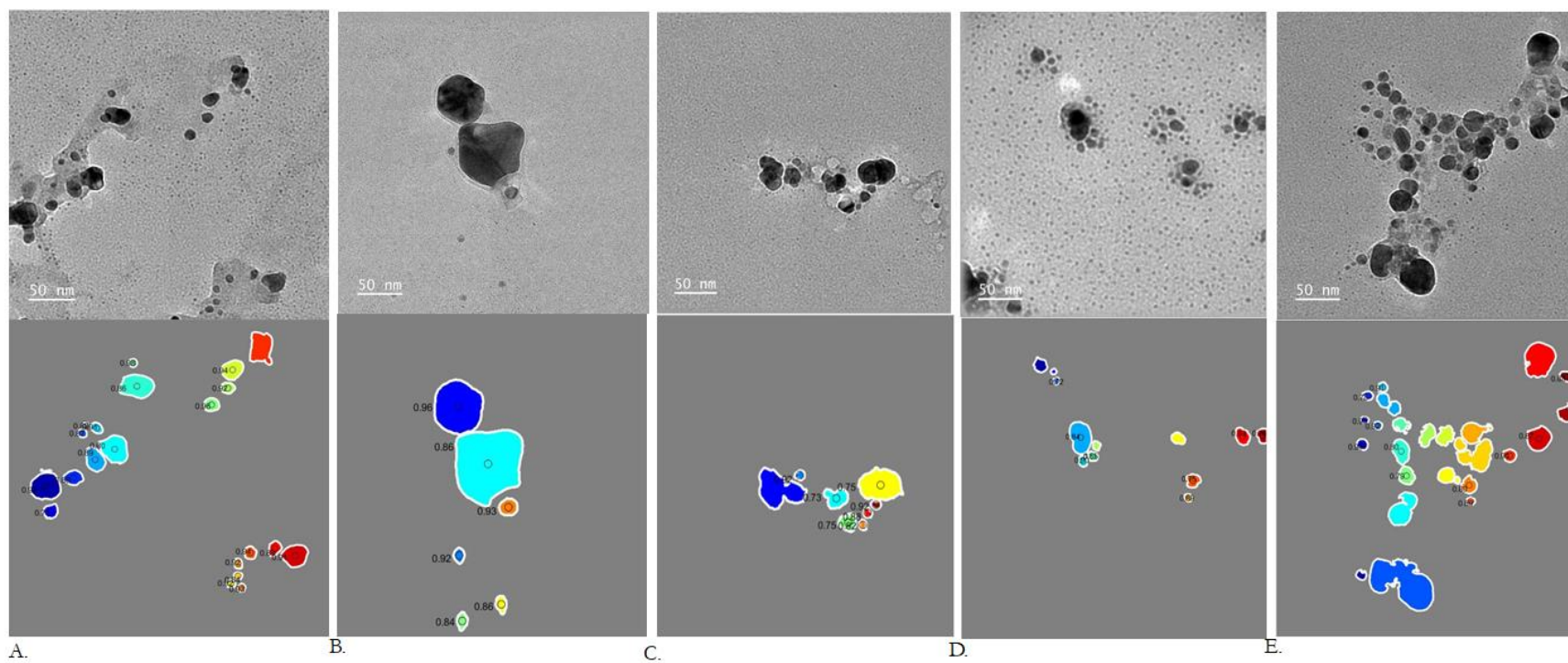
### 2.3.5 Caracterización de las AgNp's obtenidas por los cinco aislamientos productores de AgNp's

Dentro de las caracterizaciones realizadas, las imágenes de TEM mostraron partículas esféricas para las AgNp's obtenidas con los hongos H2, H4 y H18 pertenecientes a la especie *Penicillium simplicissimum*, con tamaños medios de 45, 35 y 25 nm, y frecuencias máximas de tamaño cerca de los 40,9-45 nm, 29,7-31,7nm y 21,2-25,8 nm, respectivamente. Similarmente, para H14 (*Aspergillus niger*) y H39 (*Fusarium oxysporum*), se observaron partículas esféricas, pero más pequeñas, de un tamaño medio de 15 nm y 25 nm, con frecuencias de tamaño máximas cerca de los 9,16-15 nm y 29,5-34.5 nm, respectivamente (Figura 2-3).

Para corroborar la morfología esférica de las AgNp's que sugieren las micrografías TEM, se realizó el análisis de esfericidad encontrando que todas las AgNp's obtenidas presentaron esfericidades cercanas a 1, siendo las menos esféricas las correspondientes al aislado H18 (*Penicillium simplicissimum*) con un valor promedio de 0,70 y las más esféricas las AgNp's que provienen del hongo H4(*Penicillium simplicissimum*) con un valor promedio de 0,91 (Figura 2-4).



**Figura 2-3:** Micrografías TEM y distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 (*Penicillium simplicissimum*), B) H4 (*Penicillium simplicissimum*), C) H14 (*Aspergillus niger*), D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*). DE: desviación estándar.



**Figura 2-4.** Análisis de esfericidad de las AgNp's obtenidas a partir de; A) H2 (*Penicillium simplicissimum*), B) H4 (*Penicillium simplicissimum*), C) H14 (*Aspergillus niger*), D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*).

Por otra parte, a partir de los datos de tamaño obtenidos por TEM fue posible determinar la cantidad de AgNp's producidas con cada aislado, según Gonzalez *et al.*, 2015, dato muy importante para los procesos de micosíntesis, pues se relaciona con la calidad del hongo como potencial productor de AgNp's, y el cual, como se ha dicho repetidamente en este texto, no es analizado por ningún trabajo anteriormente reportado. Así, nuestros resultados muestran que el aislado que produjo la mayor cantidad de AgNp's fue H14 (*Aspergillus niger*), y el hongo que generó la menor cantidad de AgNp's fue el H2 (*Penicillium simplicissimum*) (Tabla 2-2).

**Tabla 2-3.** Rendimiento de la reacción de biosíntesis de AgNp's a partir de los cinco hongos rizosféricos en evaluación.

Hongo	Rendimiento de la reacción (AgNp's/mL)
H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	$7,9 \times 10^{11}$
H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	$1,7 \times 10^{12}$
H14( <i>Aspergillus niger</i> )	$2,1 \times 10^{13}$
H18( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	$4,6 \times 10^{12}$
H39( <i>Fusarium oxysporum</i> )	$4,6 \times 10^{12}$

El análisis DLS permitió tener una estimación del tamaño de las AgNp's. Reportando tamaños que oscilaron entre 37,8 nm para las AgNp's obtenidas por el aislamiento H2 (*Penicillium simplicissimum*) y 71,6 nm para el aislamiento H18 (*Penicillium simplicissimum*) (Tabla 2-3). Cabe anotar que estos valores son mayores a los reportados mediante análisis TEM, pero ha sido reconocido por diferentes autores que esto puede ocurrir, y se debe a que este análisis mide específicamente el radio hidrodinámico de las AgNp's, cuyo tamaño se puede incrementar hasta 1,3 veces el diámetro medido por otras técnicas. Ese aumento también ha sido atribuido a la presencia de proteínas de cobertura hidratadas y por efectos de solvatación (Maliszewska *et al.*, 2008; Alhawaila *et al.*, 2014; Ottoni *et al.*, 2017). Reportes anteriores por DLS de AgNp's obtenidas a partir del hongo *Penicillium* sp., indican un tamaño de 150 nm (Maliszewska *et al.*, 2008), para *Aspergillus foetidus* de 104,9 nm (Roy *et al.*, 2019), y para *Fusarium oxysporum* AgNp's de 44 nm (Hamedi *et al.*, 2007), valores superiores a los encontrados para las AgNp's obtenidas en este estudio.

Por su parte, el índice de polidispersidad (PI) es un parámetro que se obtiene simultáneamente a la medición de tamaño de las AgNp's por DLS y es relevante pues brinda información acerca de la

distribución de tamaño de las partículas, la escala de este índice puede oscilar entre 0 y 1 (Abdel-Hadi *et al.*, 2023), y ha sido reportado que las muestras con una distribución de tamaño muy amplia tienen un PI mayor a 0,7 (Honary *et al.*, 2001). Con respecto a este parámetro se encontró que todas las AgNp's evaluadas mostraron valores menores a 0,7; siendo las AgNp's del hongo H4 (*Penicillium simplicissimum*) las que mostraron la mayor polidispersidad con un valor de 0,238 mientras que las menos polidispersas fueron las del hongo H39 (*Fusarium oxysporum*) con un PI de 0,139 (Tabla 2-3). Al respecto Honary *et al.*, 2001 sintetizaron AgNp's a partir de *Penicillium citrinum* que mostraron un índice de polidispersidad de 0,1. Shahzad *et al.*, 2019, por su parte, sintetizaron AgNps a partir de *Aspergillus fumigatus* BTCB10 encontrando un PI de 0,278. Finalmente, Hamedi *et al.*, 2017 trabajando con el hongo *Fusarium oxysporum* encontraron que la variación del medio de cultivo durante la obtención de biomasa puede incidir en el PI de las AgNp's obtenidas, en su estudio se reportaron PI de 0,14 y 0,27 para las AgNp's obtenidas cuando se emplearon los medios de cultivo Agar (MGYP) y caldo papa dextrosa (PDB).

Finalmente, el potencial Z permite conocer la carga de las AgNp's, y de otro lado se relaciona con la estabilidad de dispersiones coloidales, ya que valores elevados indican mayor presencia de fuerzas repulsivas que impiden que las partículas se aglomeren (Gaidwak *et al.*, 2013; Phanjom *et al.*, 2015; Balakumaran *et al.*, 2016). En este caso fue posible evidenciar valores de potencial Z negativos para las cinco AgNp's evaluadas, estos resultados son deseables pues sugieren interacciones de repulsión entre partículas, lo cual incrementa su estabilidad (Sadowsky *et al.*, 2008; Alhawaila *et al.*, 2014).

Los valores de potencial Z oscilaron entre -30.77 mV para las AgNp's derivadas a partir de H39 (*Fusarium oxysporum*) y -46.3 mV para las obtenidas a partir del aislamiento H18 (*Penicillium simplicissimum*) (Tabla 2-3). Pero es de resaltar que las AgNp's producidas a partir de H39 (*Fusarium oxysporum*) en disolución mostraron una baja tasa de floculación/sedimentación con respecto a las de los demás hongos evaluados, lo cual es relevante desde el punto de vista técnico pues esto se relaciona con procesos de repulsión entre partículas. Sadowsky *et al.*, trabajando con AgNp's obtenidas a partir de *Penicillium* sp., reportaron un potencial Z de -26.3 mV y Ottoni *et al.*, 2017 sintetizaron AgNp's a partir de *Aspergillus niger* con un potencial Z de -23.5 mV, valores cercanos a los encontrados para todas las AgNp's obtenidas a partir de esos géneros fúngicos.

**Tabla 2-4:** Tamaño por DLS, índice de polidispersidad (PI) y carga característica de las AgNp's (potencial Z) obtenidas a partir de los cinco aislamientos promisorios para la síntesis de AgNp's.

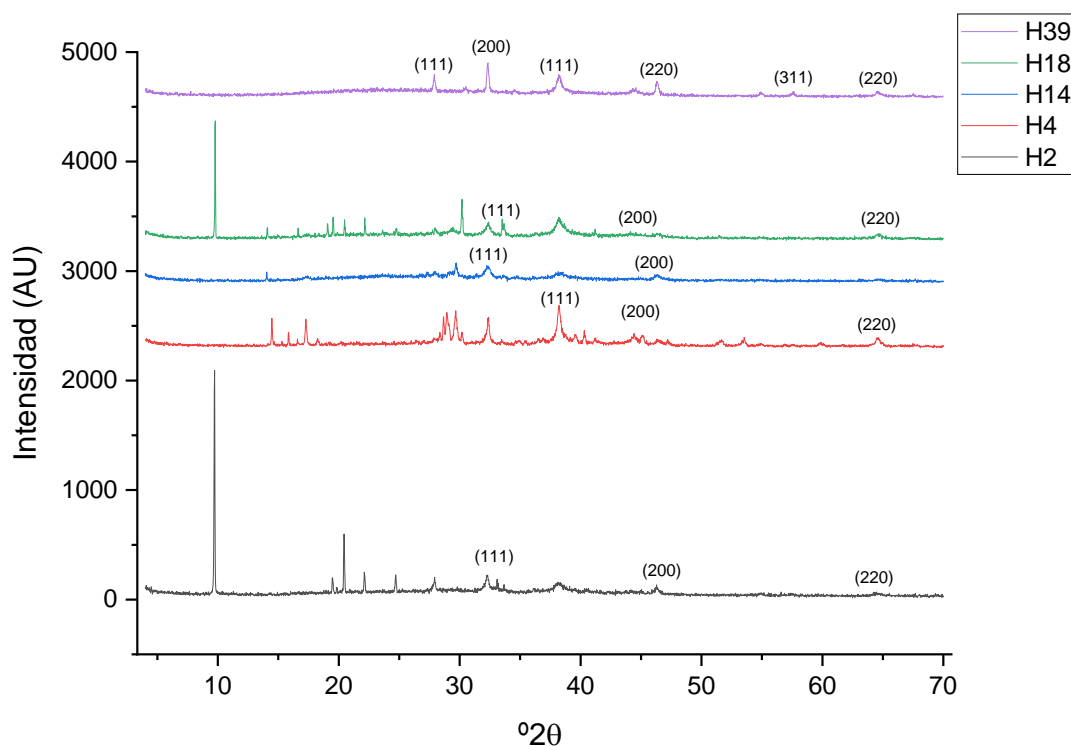
Aislamiento	Tamaño de partícula promedio (nm)	Índice de polidispersidad (PI)	potencial Z promedio (mV)
H2 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	37,8	0,140	-41
H4 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	43,2	0,238	-38,14
H14 ( <i>Aspergillus niger</i> )	44,1	0,194	-42,18
H18 ( <i>Penicillium simplicissimum</i> )	71,6	0,168	-46,38
H39 ( <i>Fusarium oxysporum</i> )	51,4	0,139	-30,77

Siguiendo con las caracterizaciones, el análisis de difracción de rayos X permitió verificar la composición cristalina de las AgNp's obtenidas a partir de los cinco aislamientos promisorios, lo cual se evidencia por la intensidad de los picos registrados en cada caso (Roi *et al.*, 2015) (Figura 2-5). Con respecto a este análisis se ha reportado que las posiciones de los picos se determinan por los ángulos de difracción y las dimensiones de la unidad de celda, que es la unidad más pequeña de espacio real que puede ser traducida en tres dimensiones para obtener la estructura completa del cristal, mientras que la intensidad de los picos está determinada por el tipo y las posiciones relativas de los átomos dentro de la celda unidad (Roi *et al.*, 2015; Ingham, 2015). En otras palabras, las posiciones e intensidades de los picos de la difracción son propios de una determinada fase cristalina, y una fase se define como un sólido cristalino con una disposición tridimensional regular de los átomos, así en el DRX la intensidad de un pico es proporcional a la cantidad de su fase en la mezcla (Jian *et al.*, 2003).

En general se observaron patrones de señales variados que se asocian con diversos arreglos de átomos dentro de la celda unidad de cada tipo de AgNp's, pero en todos los casos se encontraron señales que muestran la formación de AgNp's esféricas con estructura cubica de cara centrada (FCC), según reportes previos analizados a continuación. Todas las AgNp's obtenidas a partir de los tres aislamientos de la especie *Penicillium simplicissimum* (H2, H4, H18) presentaron señales en los ángulos 38,1° (111), 46,2° (200), 64,4° (220), señales reportadas para AgNp's obtenidas en otros estudios empleando el mismo género fúngico (Nayak *et al.*, 2011; Pradhan *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2017; Feroze *et al.*, 2019). Para las AgNp's obtenidas a partir de la especie (H18) *Aspergillus niger* se encontraron señales en los ángulos 38,1° (111) y 46,2° (200), también ya obtenidos en otras investigaciones empleando dicho género (Li *et al.*, 2012; Ningnanagouda *et al.*, 2013; Phanjom *et al.*, 2015). Finalmente, para las AgNp's conseguidas a partir del

hongo (H39) *Fusarium oxysporum* se encontraron señales en los ángulos  $27,8^\circ$ , (111),  $32,2^\circ$  (200),  $38,1^\circ$  (111),  $46,2^\circ$  (220),  $54,9^\circ$  (311),  $57,5^\circ$  (222) y  $64,5^\circ$  (220) que corresponden a la estructura FCC de la plata, y que han sido reportados por Fathima *et al.*, 2014; Gaidwak *et al.*, 2013; Gholami *et al.*, 2014; y Husseiny *et al.*, 2015.

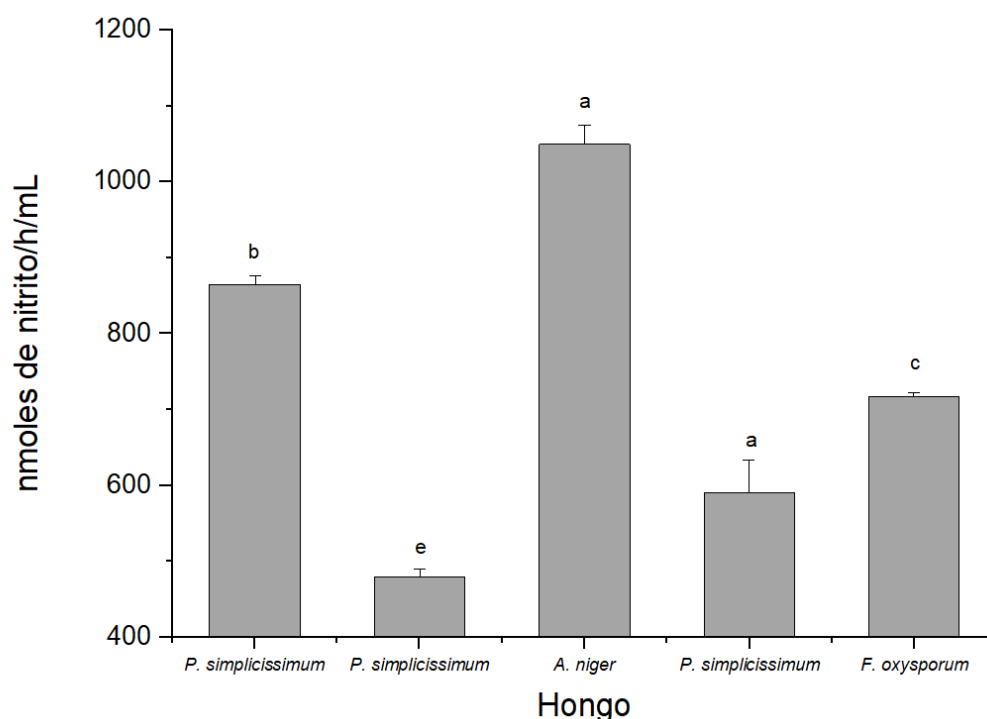
Las señales no asignadas en el difractograma no corresponden a lo esperado para las AgNp's y corresponderían a la cristalización de la fase bioorgánica, presente en la superficie de las AgNp's, dicha fase está constituida por macromoléculas presentes en el extracto celular que pueden ser responsables del proceso de reducción de iones plata durante la formación de las AgNp's (Shankar *et al.*, 2003; Phillip *et al.*, 2009; Jemal *et al.*, 2017).



**Figura 2-5:** Análisis de difracción de rayos X de las AgNp's obtenidas a partir los cinco aislamientos productores de AgNp's. H2 (*Penicillium simplicissimum*), H4 (*Penicillium simplicissimum*); H14 (*Aspergillus niger*); D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*).

### 2.3.6 Evaluación de la actividad de la nitrato reductasa (NR) en el FCLM

Este análisis permite confirmar la presencia de la enzima extracelular nitrato reductasa (NR) en el filtrado obtenido con cada uno de los aislados, y mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 2-6). La mayor actividad NR se observó en el hongo H14 (*Aspergillus niger*) con un valor medio de 1050 nmol de nitrito/h/mL, en comparación con la menor actividad enzimática del hongo H4 (*Penicillium simplicissimum*) con un valor medio de 478,6 nmol de nitrito/h/mL.



**Figura 2-6:** Actividad nitrato reductasa en el filtrado celular libre de micelio a partir de; A) H2 (*Penicillium simplicissimum*), B) H4 (*Penicillium simplicissimum*), C) H14 (*Aspergillus niger*), D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*). Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey al 5%.

El dato de la actividad enzimática NR en el extracto celular es de gran importancia para determinar la eficiencia de un aislado en la biosíntesis de AgNp's, y muy pocos estudios lo han contemplado. El-Moslamy *et al.*, 2017 reportaron una actividad nitrato reductasa de 320 nmol de nitrito/h/mL en el FCLM del hongo *Trichoderma barzianum* SYA.F4. Además, Naveen *et al.*, 2010 encontraron un valor de 270 nmol de nitrito/h/mL en el FCLM de *Penicillium* sp., mientras Devi *et al.*, 2015 con hongos del género *Trichoderma* sp., informaron de actividades entre 50 y 250 nmol de nitrito/h/mL. Valores mucho más



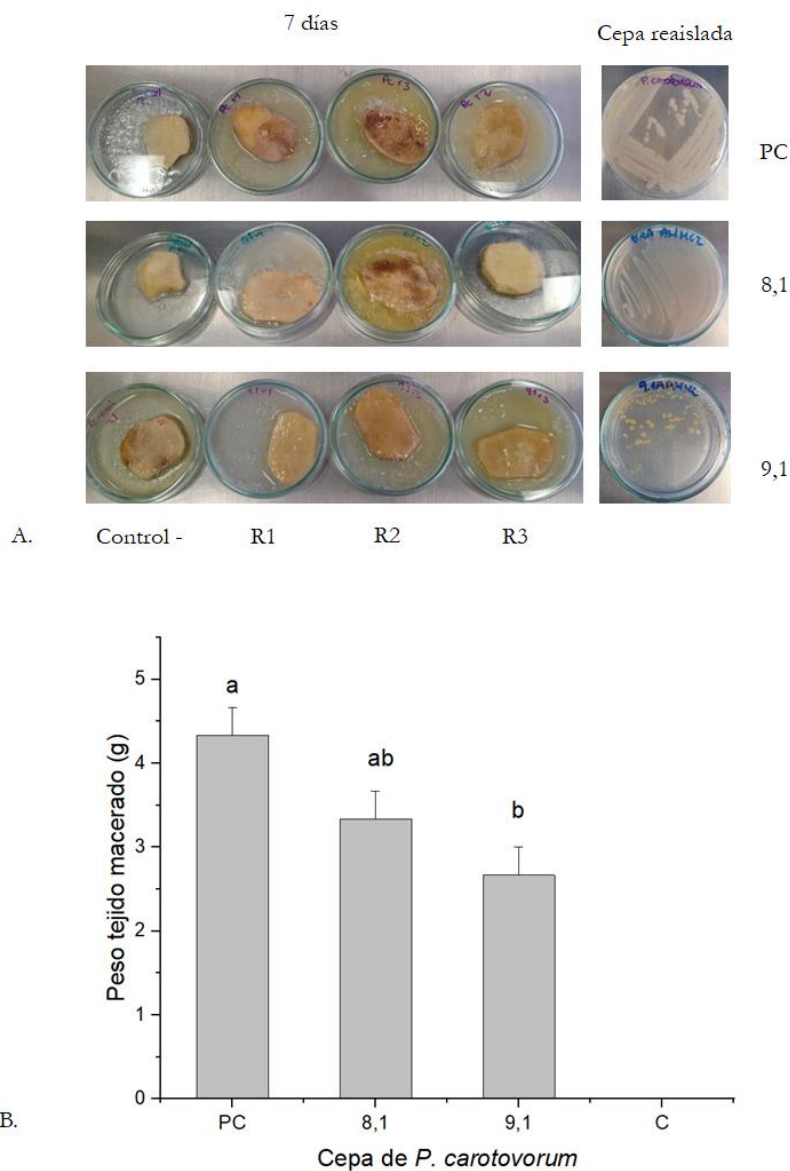
bajos que los encontrados en esta investigación, lo que podría indicar que este estudio de bioprospección fue eficiente al permitir encontrar aislados rizosféricos con actividad NR destacada para la biosíntesis de AgNp's.

Adicionalmente, la correlación entre la concentración de AgNp's obtenida con la actividad enzimática muestra que el hongo H14 (*Aspergillus niger*) con la mayor actividad enzimática genera la mayor cantidad de AgNp's/mL ( $2,1 \times 10^{13}$  AgNps/mL). Sin embargo, en estudios anteriores realizados con esta especie, ni la actividad enzimática del FCLM ni la concentración de AgNp's han sido reportados, por lo que estos datos son una contribución crucial de este trabajo al estado del arte.

### **2.3.7 Selección de cepa del agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*.**

Para realizar las pruebas antibacteriales de las AgNp's frente al fitopatógeno, era necesario contar con la cepa bacteriana más virulenta en papa, por esa razón se realizó una prueba de patogenicidad con las tres cepas del agente fitopatógeno que se tenían disponibles. Los resultados de la prueba permitieron confirmar la patogenicidad de las tres cepas al observarse una pudrición evidente en las rodajas de papa en evaluación. La pudrición del tejido del tubérculo inició a las 72 horas post-incubación, pero a los siete días se evidenció la pudrición total de las muestras en evaluación (Figura 2-7 A).

De acuerdo con el análisis estadístico se observan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el peso de tejido macerado producido por las tres cepas evaluadas después del proceso de incubación (Figura 2-7 B), siendo la cepa más virulenta la denominada PC donada con fines de investigación por el LAMFU de la Universidad de los Andes, seguida de la cepa 8,1 y por último la cepa 9,1, estas dos últimas aisladas de Pitahaya (*Selenicereus undatus*). Basados en estos resultados se decidió enviar a identificación molecular la cepa PC y con este análisis se pudo confirmar la identidad de esta, con un porcentaje de similitud del 98% con respecto a secuencias reportadas para la especie *Pectobacterium carotovorum*.

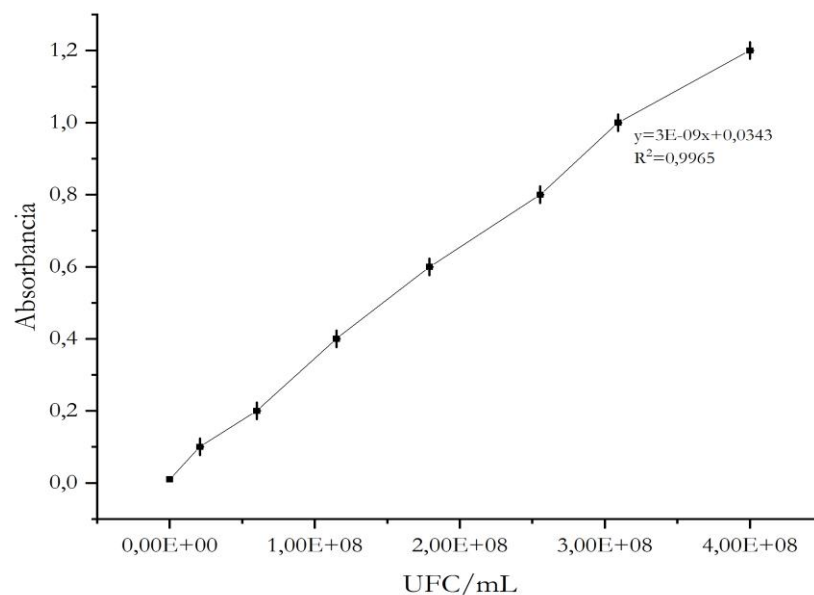


**Figura 2-7:** A) Fotografías de la prueba de la pudrición blanda del tubérculo para las cepas PC donada por el LAMFU, Cepa 8,1 aislada de pitahaya (*Selenicereus undatus*), y Cepa 9,1 aislada de pitahaya (*Selenicereus undatus*). B. Peso de tejido macerado de tubérculos de papa generado por tres cepas de *Pectobacterium carotovorum* a los siete días de evaluación, donde “C” es el control del experimento sin inocular. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.

### 2.3.8 Actividad antibacteriana de las AgNp's contra el agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*

#### 2.3.8.1 Curva de calibración de *Pectobacterium carotovorum*

La curva de calibración del agente fitopatógeno permite conocer la correspondencia entre las medidas de biomasa en el cultivo y la absorbancia, lo cual es necesario para definir concentraciones de inóculo o recuentos bacterianos en los análisis antibacteriales de las AgNp's. Al graficar e interpolar las DO estandarizadas (0,1-1,2) con los recuentos bacterianos obtenidos en cada caso en UFC/mL, se pudo obtener una ecuación de la recta con un valor  $R^2=0,99$  (Figura 2-8).

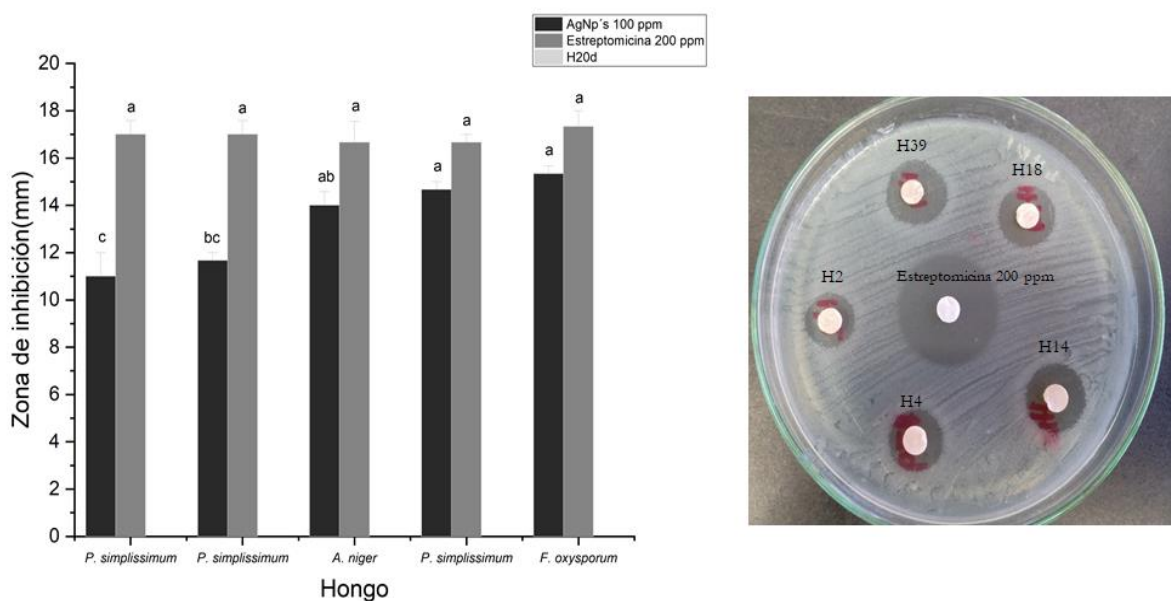


**Figura 2-8:** Curva de calibración absorbancia vs. UFC/mL para la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.

#### 2.3.8.2 Determinación de la actividad antibacteriana de las AgNp's por el método de difusión en agar.

Después de la incubación de las cajas de Petri sembradas con el agente fitopatógeno y enfrentadas a las diferentes AgNp's, se comprobó la actividad antibacteriana de las mismas obtenidas a partir de los cinco hongos promisorios. Se pudo evidenciar que las AgNp's producidas a partir de los hongos H18

(*Penicillium simplicissimum*) y H39 (*Fusarium oxysporum*) generaron zonas de inhibición con tamaños de 14,6 y 15,3 mm respectivamente. Por su parte el antibiótico estreptomicina empleado como control positivo mostró zonas de inhibición valores promedio de 16,8 mm y el control negativo del experimento que fue agua destilada esteril ( $H_2O_d$ ) no mostró inhibición de crecimiento (Figura 2-9).



**Figura 2-9:** Zonas de inhibición de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* producidas por las AgNp's obtenidas por hongos rizoféricos. A) H2 (*Penicillium simplicissimum*), B) H4 (*Penicillium simplicissimum*), C) H14 (*Aspergillus niger*), D) H18 (*Penicillium simplicissimum*), y E) H39 (*Fusarium oxysporum*). Debido a que el agua destilada esteril ( $H_2O_d$ ) no inhibió el crecimiento, la barra no es visible. Las barras corresponden al promedio con su respectivo error estándar. Letras diferentes difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 5%.

A la fecha, la actividad antibacteriana de las AgNp's obtenidas por micosíntesis ha sido evaluada principalmente frente a bacterias de la familia Enterobacteriaceae de importancia clínica. Nakak *et al.*, 2018 encontraron halos de inhibición de 12 mm frente a *E. coli* usando AgNp's producidas por *Penicillium italicum*. Mientras Shahzad *et al.*, 2019 con AgNp's obtenidas a partir de *Aspergillus niger* reportaron halos de inhibición de 33 mm en contra de *Klebsiella* sp. En general, las zonas de inhibición registradas en este estudio son superiores en tamaño a las reportadas al utilizar AgNp's obtenidas de estos géneros fúngicos contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *V. cholera* y *E. coli* (Castellani & Chalmers; Hamad *et al.*, 2019; Kishnakumar *et al.*, 2015).

Un análisis detallado de los resultados muestra que el hongo H2 (*Aspergillus niger*) produjo las AgNp's más pequeñas (15 nm), y a su vez, con la menor actividad antibacteriana. Estos resultados difieren de los de Moritz *et al.*, 2013, que indican que las AgNp's más pequeñas tienen una mayor superficie y una mejor actividad en las pruebas de susceptibilidad. Del mismo modo, Ottoni *et al.*, 2017 encontraron que las AgNp's más pequeñas obtenidas de *Rhizopus arrhizus* eran las más eficaces contra *E.coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Esto podría indicar que el tamaño no es el único factor que determina la actividad bactericida; parámetros como la biocompatibilidad que puede estar relacionada con compuestos de tipo orgánico que estabilizan las AgNp's obtenidas por biosíntesis también deben ser considerados.

Otro aspecto que determina la actividad antibacteriana de las AgNp's es la concentración evaluada, ha sido reportado que la inhibición aumenta con el incremento de la concentración de AgNp's (El gorban *et al.*, 2015) sin embargo, en este estudio este factor se normalizó al evaluar todas las AgNp's a la misma concentración de 100 ppm. Todas las AgNp's obtenidas mostraron valores de potencial Z negativos, y mostraron actividad antibacteriana, a pesar de que Np's con un potencial Z positivo muestran mejores actividades antibacterianas ya que las AgNp's establecen interacciones electrostáticas con la pared celular bacteriana, lo que facilita su ingreso al interior celular (Kumar *et al.*, 2009).

Aunque en este escrito se han mostrado muchos trabajos sobre micosíntesis de AgNp's es importante resaltar que estos resultados son el primer reporte de la aplicación de AgNp's obtenidas por micosíntesis como agentes controladores potenciales de una bacteria fitopatogena. De manera que, teniendo en cuenta la poca información al respecto, la actividad antibacteriana de las AgNp's frente a *Pectobacterium carotovorum* puede atribuirse al hecho de que estas partículas poseen varios mecanismos de acción que actúan conjuntamente a nivel de la pared y de la membrana celular, pudiendo alterar la integridad de la estructura celular. Se ha reportado también que afectan a la funcionalidad de algunas proteínas y el ADN, lo que podría afectar a procesos celulares vitales, como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, la permeabilidad celular, la síntesis de proteínas y la replicación del material genético (Alghuthaymi *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016). Comprobar la eficacia de este nanomaterial para el control del agente causal de la podredumbre blanda, ayuda a sentar las bases para aplicar estas nuevas estrategias de gestión a mayor escala.

Basados en estos resultados de actividad antibacteriana y algunos aspectos desde el punto de vista técnico durante la micosíntesis de AgNp's al emplear a *Fusarium oxysporum*, como por ejemplo, su abundante producción de biomasa en cortos periodos de tiempo, alta actividad nitrato reductasa, a que el espectro de absorción de las AgNp's obtenidas mostró el área bajo la curva más estrecha, lo que se relaciona con

la uniformidad en el tamaño de las AgNp's y la baja tasa de floculación/sedimentación de dichas AgNp's en solución, se definió al aislamiento H39 (*Fusarium oxysporum*) como el seleccionado para continuar con las siguientes etapas del proyecto.

*Fusarium oxysporum* es un hongo que hace parte de la microbiota rizosférica, es una especie predominantemente saprófita, pero algunas cepas pueden ser patógenas e inducir la marchitez o pudrición de raíz en especies vegetales como banano, algodón, melón, cereales, entre otras (Fravel *et al.*, 2003; Michielse *et al.*, 2009). No obstante, también ha sido reportado que algunas cepas no patógenas han sido declaradas como promotoras de crecimiento vegetal y agentes de biocontrol (Ibrahim *et al.*, 2021; Bitas *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2022). El potencial biotecnológico y nanotecnológico de *Fusarium oxysporum* es relevante, este hongo ha sido destacado como un reservorio de metabolitos como alcaloides, jasmonatos, antranilatos, péptidos cíclicos, depsipéptidos cíclicos, xantonas, quinonas y terpenoides (Ibrahim *et al.*, 2021) con gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, y también como una fuente de biocombustibles y múltiples enzimas con aplicaciones biotecnológicas e industriales como las celulasas (Becker *et al.*, 2013). Por otro lado, su potencial nanotecnológico también es enorme pues ha sido considerado una nanofábrica muy eficiente para la obtención extracelular de AgNp's, Np's de oro, platino y sílice (Rai *et al.*, 2021).

## 2.4 Conclusiones

El estudio de bioprospección realizado en suelos del páramo cultivados con papa fue eficaz al encontrar cinco aislados de hongos pertenecientes a las especies *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger*, y *Fusarium oxysporum*, que mostraron potencial para la biosíntesis extracelular de AgNp's. Esto fue confirmado por la espectroscopia UV-VIS, que mostró máximos de absorción entre 420 y 475 nm, donde el análisis TEM reveló la forma esférica de las AgNp's obtenidas con tamaños entre 15 y 45 nm, y el análisis DLS evidenció tamaños entre 37,8 y 71,6 nm, índice de polidispersidad < a 0,7 en todos los casos y un potencial Z negativo en todas ellas. Además, la concentración de AgNp's producida por los hongos seleccionados se relacionó con su actividad NR, parámetros que no se tienen en cuenta de forma rutinaria en los estudios de micosíntesis de AgNp's. Esto último permitió concluir que *Aspergillus niger* mostró la mayor actividad enzimática, y fue la especie más eficiente en la producción de AgNp's en términos de cantidad en comparación con otras especies estudiadas. Finalmente, la actividad antibacteriana de las AgNp's obtenidas contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum* se verificó mostrando que las AgNp's obtenidas con las especies *Penicillium simplicissimum* y *Fusarium oxysporum* presentan la actividad antibacteriana más destacada. Estos resultados indican que la biosíntesis de AgNp's es una alternativa muy atractiva para el control de agentes fitopatógenos en papa y otros cultivos de interés agronómico. Finalmente, debido a la

sobresaliente actividad antibacteriana y los algunos aspectos técnicos ventajosos durante la biosíntesis de AgNp's a partir de *Fusarium oxysporum*, este hongo fue seleccionado para realizar las siguientes fases de la investigación.

## Capítulo 3 : Obtención de AgNp's con acción antibacterial frente a *Pectobacterium carotovorum* a partir de un extracto enzimático de *Fusarium oxysporum*

### 3.1 Introducción

*Pectobacterium carotovorum*, es una bacteria Gram-negativa causal de la podredumbre blanda en diversos cultivos de hortalizas (Yi *et al.*, 2021); que puede macerar los tejidos parenquimatosos de las plantas, gracias a la producción de una gran cantidad de enzimas que degradan la pared celular como las pectinasas, proteasas, celulasas y hemicelulasas (Perombelon & Kelman, 1980). Enfermedad que puede ocurrir durante el procesamiento, almacenamiento o el transporte y ha restringido gravemente la producción, generando pérdidas económicas de hasta el 60 % (Khlaif *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2021). *Pectobacterium carotovorum* es una bacteria de difícil manejo por técnicas convencionales, y por esa razón es necesario indagar nuevas posibilidades de control que favorezcan el establecimiento de prácticas de agricultura de precisión, especialmente en países en desarrollo.

Las prácticas de agricultura de precisión se realizan con el fin de reducir costos y maximizar rendimientos en la producción, y en ese campo la nanotecnología tiene un gran potencial para contribuir a su implementación. Al respecto se han desarrollado aplicaciones como nanopartículas como agentes controladores de plagas o nanopesticidas (Dita *et al.*, 2012; Kah & Hofmann, 2014, Rai *et al.*, 2012; Mishra & Singh, 2015; Alghuthaymi *et al.*, 2015; Khandel & Kumar *et al.*, 2018; Sudheer *et al.*, 2022). Esta área de investigación ha recibido gran atención debido a la incidencia de enfermedades vegetales que generan grandes pérdidas económicas, y a que se requiere minimizar la aplicación de pesticidas tradicionales para contribuir al equilibrio ambiental de los agroecosistemas (Mishra & Singh, 2015).

Los nanopesticidas son productos fitosanitarios de bajo impacto ambiental que incluyen sustancias en el rango de los nanómetros (nm), exhibiendo propiedades antimicrobianas novedosas debido a su tamaño (Kah & Hofmann, 2014; Yadav *et al.*, 2015). Como se dijo anteriormente, esta área ha sido de gran interés investigativo, empleando nanopartículas inorgánicas obtenidas por rutas fisicoquímicas a partir de silicio



- plata, dióxido de titanio y cobre, como ingredientes activos para el control de diversos insectos plaga y hongos fitopatógenos (Park *et al.*, 2006; Barik *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2009; Kasproicz *et al.*, 2010; Lamsal *et al.*, 2011, Mondal *et al.*, 2012; Kha *et al.*, 2013). De hecho, cerca del 55% de la investigación en el área se centra en productos insecticidas seguido de fungicidas y herbicidas (Kah & Hofmann, 2014). Pero a la fecha no existen reportes del desarrollo de productos bactericidas a base de nanopartículas de plata (AgNp's) para el manejo de agentes fitopatógenos.

Las AgNp's pueden ser producidas eficientemente por hongos gracias a la acción de una reductasa dependiente de NADH (nicotinamida adenindinucleótido reducido) denominada nitrato reductasa (NR), la cual reduce los iones metálicos ( $Ag^{+1}$ ) hasta  $Ag^0$  o AgNp's (Zomordian *et al.*, 2016 Almeida *et al.*, 2017, Zielonka & Klimek, 2017; Roy *et al.*, 2019). Esta enzima ha sido detectada en el género *Fusarium* sp. y la especie *Fusarium oxysporum* ha sido reportada en literatura como una nanofábrica muy eficiente para la producción de nanopartículas de oro (AuNp's), platino, sílice y AgNp's a nivel intra y extracelular (Almeida *et al.*, 2017; Rai *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2021).

*F. oxysporum* también produce metabolitos secundarios como las quinonas (antroquinonas y naftoquinonas) que han sido reportadas como centros de reacciones redox, que favorecen la síntesis de AgNp's (Ibrahim *et al.*, 2021). Las AgNp's obtenidas a partir de este hongo tienen mejor actividad antibacteriana frente a diversas especies bacterianas, en comparación con AgNp's producidas por rutas químicas. Lo cual se atribuye a su alta biodisponibilidad, debido a su pequeño tamaño, monodispersidad y la presencia de una cobertura proteica que las rodea, lo que facilita su ingreso al interior celular, potencializando su acción antimicrobiana (Ibrahim *et al.*, 2021). Además, las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium* sp. no solo tienen acción antibacteriana, también se ha encontrado que tienen potencial antiparasitario, antiviral, antifúngico y anticancerígeno (Rai *et al.*, 2021).

En esta parte de la investigación se realizó la síntesis de AgNp's empleando una cepa nativa de *Fusarium oxysporum*, estudiando la eficiencia de la síntesis con relación al pH, la temperatura y la concentración de sustancia precursora, hasta llegar a las mejores condiciones de síntesis. Luego se realizaron estudios antibacteriales para evaluar la acción nanopesticida de las AgNp's obtenidas frente *Pectobacterium carotovorum* a través de pruebas a nivel *in vitro*, y a nivel de sustrato vegetal bajo condiciones controladas, como estrategia novedosa para el control de dicho agente. El desarrollo de esta aplicación resulta interesante, ya que las AgNp's obtenidas por ruta biológica generan bajo impacto ambiental y muestran poca toxicidad para organismos eucariotas a bajas concentraciones (Gholami-Shabani *et al.*, 2014; Mishra & Singh, 2015; Mohanta *et al.*, 2018; Loo *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2019).

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Biosíntesis y ensayos de eficiencia para la producción de AgNp's a partir de *Fusarium oxysporum*.

La cepa de *Fusarium oxysporum* fue seleccionada tras la realización del estudio de bioprospección en suelos de paramo cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) en Boyacá-Colombia. Estudio que tuvo el objetivo de encontrar hongos promisorios para la biosíntesis de AgNp's (Beltrán *et al.*, 2022). Para la reacción de biosíntesis se siguió la metodología mencionada en la sección 2.2.4, pero para obtener un mayor rendimiento del proceso de biosíntesis, se realizaron pruebas de eficiencia para algunas de las condiciones de la reacción. Se empleó un diseño de experimentos de tipo factorial 2k. Se evaluaron cuatro tratamientos según la matriz de diseño generada por el programa estadístico Minitab® Release 19 Statistical Software (Tabla 3-1) durante 96 horas. A manera de control experimental se realizó un ensayo en condiciones estándar reportadas por literatura (pH 7, 40°C y AgNO<sub>3</sub> 1mM) (Krishnakumar *et al.*, 2015 y AbdelRahim *et al.*, 2016). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

**Tabla 3-1:** Matriz de diseño para determinar las mejores condiciones de reacción de biosíntesis de AgNp's.

Corrida	pH	Temperatura	Concentración AgNO <sub>3</sub>
1	-1 (7)	-1 (27 °C)	-1 (1mM)
2	1(10)	-1 (27 °C)	1(3mM)
3	-1(7)	1 (42 °C)	1 (3mM)
4	1(10)	1 (42 °C)	-1(1mM)

Fuente: DOE generado por el software estadístico Minitab® Release 19 Statistical Software. 1: Valor máximo del nivel. -1: valor mínimo del nivel

La reducción bioquímica de los iones plata en cada corrida experimental se monitoreó con el cambio de color de la solución, y se verificó por espectroscopía UV-Vis (Al juraifani *et al.*, 2015, Pordeli *et al.*, 2018). Los espectros UV-Vis se realizaron entre los 300 y 700 nm utilizando agua destilada estéril como blanco, y monitoreando el máximo de absorción de las AgNp's que generalmente aparece entre los 420 - 440 nm. Se emplearon dos controles experimentales, uno consistió en un FCLM, y el otro, una solución de AgNO<sub>3</sub> 1mM en agua Milli-Q. El tamaño de partícula obtenido en cada corrida experimental fue

calculado empleando el software Image J 145s. Con el diámetro medio de las AgNp's obtenidas se determinó la concentración de AgNp's/mL según González *et al.*, 2015.

### 3.2.2 Caracterización de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*

Las AgNp's obtenidas a partir de *F. oxysporum* empleando las mejores condiciones de reacción fueron caracterizadas por diversas técnicas, tal como lo indicó la sección 2.2.5. Pero además se realizó el análisis de composición elemental de las AgNp's por medio del análisis SEM- EDS, para esto las AgNp's se fijaron en una cinta de grafito y se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) en el equipo DENTON VACUUM Desk IV. Luego se analizaron en el microscopio electrónico de barrido en alto vacío con el fin de obtener imágenes en alta resolución. Se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología, topografía de las muestras en el equipo JEOL JSM 6490 LV con un voltaje de aceleración de 10Kv. Finalmente, también se realizó el análisis de espectroscopía infraroja con transformada de Fourier (FTIR), para esto las muestras de las AgNp's fueron liofilizadas y analizadas en el espectrofotómetro Shimadzu Prestige-21, realizando el muestreo con 32 escaneos y una resolución de 4, 0 cm<sup>-1</sup> en el rango de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.3 Pruebas antibacteriales de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* frente al agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*

#### 3.2.3.1 Concentración de las AgNp's

Al conocer el tamaño promedio de las AgNp's según análisis TEM, se determinó la concentración de las mismas mediante la ecuación sugerida por González *et al.*, 2015, la cual indica el cálculo para determinar el número de AgNp's/mL (Sección 2.2.5) y luego, al emplear factores de conversión de unidades se hizo el cálculo de partes por millón (ppm) a partir de número de AgNp's /mL aplicando la ecuación 8:

$$PPM \left( \frac{mg}{L} \right) = \left( \frac{AgNp's}{ml} * densidad\ de\ la\ plata \left( \frac{g}{cm} \right) * \frac{1}{6} * \frac{22}{7} * promedio\ del\ diametro\ de\ la\ np\ en\ nm^3 * 10^{-21} \left( \frac{cm^3}{nm^3} \right) * 10^6 \left( \frac{\mu g}{g} \right) \right)$$

8

Donde:

Volumen de una partícula esférica:  $(1/6) \pi D^3$

$10^{-21}$ : factor de conversión de  $\text{cm}^3$  a  $\text{nm}^3$

$10^6$ : factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a  $\text{g}$

Finalmente, al aplicar la relación  $C_1 V_1 = C_2 V_2$  se obtuvieron las disoluciones de AgNp's a diferentes dosis para los ensayos antibacteriales.

### 3.2.3.1 Ensayo de antibiosis por el método de difusión en agar

Para este experimento se empleó el método de difusión en agar mencionado en la sección 2.2.8.2, pero en esta oportunidad los discos de fibra de vidrio fueron impregnados con las diferentes concentraciones de las AgNp's a evaluar (12,5; 25; 50; y 100  $\mu\text{m}$ ) durante 10 minutos. Estos fueron colocados sobre la superficie del agar que previamente se ha inoculado con la bacteria *P. carotovorum* a una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^8$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Posteriormente a la incubación, que se realizó a 28 °C/24h, se midieron las zonas de inhibición de crecimiento en milímetros. En este ensayo se tomó como estándar de referencia el antibiótico estreptomomicina y se realizaron tres replicas por cada concentración evaluada.

### 3.2.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por micro y macrodilución

Para poder determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual se define como la menor concentración de sustancia antimicrobiana capaz de inhibir completamente el desarrollo de microorganismo, se adaptaron los métodos de micro y macrodilución. Para la técnica por microdilución se empleó la metodología propuesta por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio con algunas modificaciones (CLSI, 2007). Para la preparación del inóculo se tomaron con un hisopo con punta de rayón-nylon estéril colonias aisladas de un cultivo sólido en agar nutritivo después de 24 h de incubación a 28 °C, y se suspendieron en solución salina de NaCl 0,85%, ajustando a una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^8$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Las disoluciones de AgNp's a evaluar se obtuvieron a partir de una solución stock de AgNp's de 4708 ppm, aplicando la relación  $C_1 V_1 = C_2 V_2$ , y teniendo en cuenta que, con el agregado de la suspensión bacteriana al pozo, las concentraciones de las AgNp's se diluirán a

la mitad y por eso deben ser preparadas al doble de la concentración final deseada, es decir a concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ppm.

El montaje del experimento se realizó en microplacas de 96 pozos, adicionando a cada pozo 50 $\mu$ L del inóculo bacteriano a una DO de 0,1 y 50  $\mu$ L de las diluciones de las AgNp's y del antibiótico estreptomycin como estándar de referencia, garantizando concentraciones finales a nivel del pozo de 12,5; 25; 50; y 100 ppm. Se incluyó como control negativo, el medio de cultivo sin inóculo, y como control positivo, el medio de cultivo inoculado con la cepa bacteriana. Las microplacas se incubaron en agitación a 28 °C/24 h, y luego se realizó la lectura a 590 nm en el lector BioWhittaker Elk808. Para definir la MIC se evaluó la turbidez de los pozos tratados con diferentes concentraciones de AgNp's y estreptomycin, y dicho valor se comparó con el del control positivo. Para comprobar la MIC, se realizó una siembra por agotamiento de 10  $\mu$ L del contenido de los pozos correspondientes a la MIC sobre la superficie del agar nutritivo con incubación a 28 °C/ 24 horas y se realizó la observación del crecimiento bacteriano.

Posteriormente para determinar la MIC por la técnica de macrodilución, se adaptó el experimento de acuerdo con lo sugerido por Hamedi *et al.*, 2017. Para la preparación del preinóculo se tomó una colonia de *Pectobacterium carotovorum* y se sembró en 10 mL de caldo nutritivo con incubación a 28 °C/ 24 h en agitación y se ajustó su concentración a una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Luego 100  $\mu$ L del preinóculo fresco se transfirieron a un vial que contenía 300 mL de caldo nutritivo y se incubó a 28 °C hasta conseguir un inóculo con una DO de 0,5 que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (8,2 Log UFC/mL). Posteriormente se tomaron viales de 100 mL a los que se les agregaron 10mL del inóculo a una DO de 0,5, 10 mL de las AgNp's y del antibiótico estreptomycin, garantizando concentraciones finales en el vial de 12,5; 25; 50; y 100 ppm de las sustancias antimicrobianas. Un vial sin adición de AgNp's ni antibiótico fue el control positivo del experimento. Todos los viales fueron incubados en agitación a 28 °C/ 8h, y la densidad óptica de cada uno fue medida cada hora a 590 nm.

Luego se determinó la actividad antibacteriana de las AgNp's al obtener la curva de crecimiento bacteriana en ausencia y presencia de diferentes dosis de AgNp's y del antibiótico estreptomycin. Los experimentos se realizaron por duplicado, reportando los valores promedio. Para cada tiempo de evaluación se realizó un análisis de varianza entre los tratamientos, con el fin de definir la MIC como la mínima concentración en la que se evidencian diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos de la curva de crecimiento con respecto al control.

### 3.2.3.3 Evaluación del efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de la pudrición blanda del tubérculo bajo condiciones controladas

Para este ensayo a nivel *in vivo* se adaptó la metodología propuesta por Hu Dong *et al.*, 2004. Las muestras de papa (*Solanum tuberosum*) fueron obtenidas en mercados locales, lavadas con agua de grifo, desinfectadas con etanol al 70% durante cinco minutos y enjuagadas con agua destilada estéril. Para garantizar la uniformidad de las unidades experimentales, se cortaron rodajas de 5 mm de ancho con un bisturí estéril y de cada rodaja se cortó un cuadrado de 2 cm<sup>2</sup> con un peso constante de 2,5 g/rodaja. Cada pieza de papa se dispuso en una caja de Petri que contenía papel absorbente estéril humedecido con agua destilada estéril y tratada con 100 µL de diferentes dosis de las AgNp's (12,5; 25; 50; y 100 ppm) por triplicado. Estas cajas de Petri, con las piezas de papa tratadas se dispusieron en una incubadora a 37 °C durante media hora para reducir la humedad superficial del tejido. Luego se inocularon con 100 µL de la suspensión bacteriana a una DO de 0,3 que corresponde a  $8,8 \times 10^7$  UFC/mL (7,9 Log UFC/mL). Todas las cajas Petri que contenían los bioensayos fueron selladas con papel parafilm con el fin de evitar contaminación del mismo, y fueron dispuestas en la incubadora a 28 °C hasta que se evidenciaron los síntomas de maceración en el tejido vegetal propios de la pudrición blanda del tubérculo. Los cambios en el desarrollo de los síntomas en el tejido vegetal se monitorearon por observación visual a diario, y se determinó el peso de tejido macerado en gramos al final del experimento, para determinar el porcentaje de tejido afectado en cada caso. Se emplearon tres controles con fines de comparación, en primer lugar, una pieza de papa tratada con 100 µL de agua destilada estéril (control negativo), en segundo lugar, una pieza tratada con solución 100 µL de estreptomycin a 12,5 ppm, como estándar de referencia, y en tercer lugar un control de infección sin tratamiento (control positivo).

### 3.2.5 Análisis estadístico

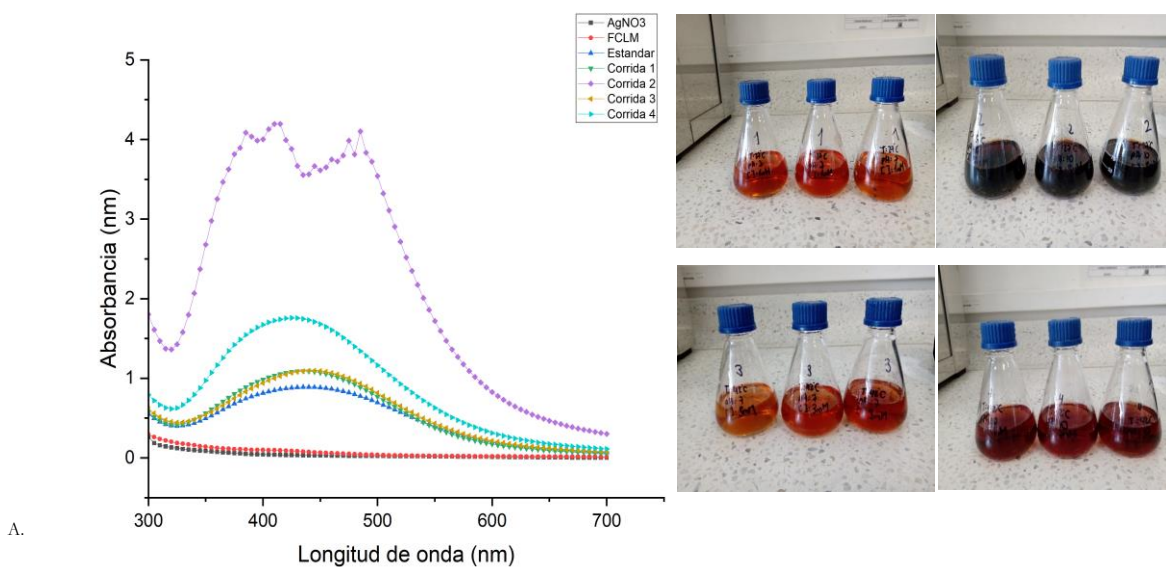
Se realizó un análisis de experimentos de tipo factorial 2k con el fin de conocer las mejores condiciones de síntesis de AgNp's en términos de temperatura, pH y concentración de sustancia precursora (AgNO<sub>3</sub>). También se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para evaluar actividad antibacteriana de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* contra *Pectobacterium carotovorum*, y para evaluar el efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda, utilizando el software estadístico Minitab 19 ®.

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Biosíntesis y ensayos de eficiencia para la producción de AgNp's por parte de *Fusarium oxysporum*

Al realizar la reacción de biosíntesis bajo las diferentes condiciones experimentales definidas en la Tabla 3-1, además de la reacción en condiciones estándar como control positivo del proceso (pH 7, 40°C y  $\text{AgNO}_3$  1mM), se observaron mezclas de reacción de diversas tonalidades de café, lo que indica de manera preliminar la presencia de AgNp's en las soluciones (Figura 3-1). El éxito de la micosíntesis de AgNp's radica en múltiples factores, como el medio de cultivo empleado para la obtención de biomasa y la etapa de crecimiento del hongo. En este caso se empleó por primera vez el caldo Saboraud Dextrosa (CSD) como sustrato para la obtención de biomasa. En otros procesos de micosíntesis con el género *Fusarium* se han empleado medios de cultivos líquidos formulados por componentes que incluyen glucosa, extracto de malta, extracto de levadura, fosfato de potasio monobásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), y nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), a diferentes concentraciones, o el caldo papa dextrosa para obtener biomasa (Birla *et al.*, 2013; Basavaraja *et al.*, 2008). Los cuales, a pesar de ser medios de cultivo diferentes, tienen en común a la glucosa como fuente de carbono, ya que altas concentraciones de este azúcar pueden inducir la secreción de la enzima nitrato reductasa y por tanto la formación de AgNp's con distribución de tamaño más uniforme (Hamedi *et al.*, 2017).

Durante los ensayos de biosíntesis es crucial hacer uso de la espectroscopía UV-Vis como técnica para confirmar la presencia del AgNp's (Nanda & Saravanan, 2013; Madakka *et al.*, 2018). En este caso, en tres de las cuatro corridas experimentales se encontraron espectros UV-Vis con solamente un máximo de absorción (Figura 3-1). Lo que se atribuye a la producción de nanopartículas isotrópicas y a una distribución de tamaño estrecha (Hamedi *et al.*, 2017). En estos ensayos de eficiencia se observaron máximos de absorción entre los 415 y 440 nm, resultados acordes a los reportados en otros procesos de micosíntesis con *Fusarium* sp., en donde se han obtenido máximos de absorción que aparecen en este rango de longitud de onda (Birla *et al.*, 2013; Durán *et al.*, 2005; Durán *et al.*, 2007).



**Figura 3-1:** Espectros de absorción y fotografías de la reacción de la micosíntesis de AgNp's obtenidas empleando *Fusarium oxysporum* utilizando las diferentes condiciones experimentales establecidos según el diseño del experimento factorial 2k. Estándar: espectro UV-Vis de las AgNp's obtenidas al emplear las condiciones estándar de síntesis (pH 7, 40°C y AgNO<sub>3</sub> 1mM).

Tanto en la corrida No. 1 (27 °C, pH 7, 1mM) como en la corrida No. 3 (42 °C, pH 7, 3mM), se generaron espectros UV-vis comparables al obtenido bajo condiciones estándar (Figura 3-1) y se obtuvieron valores de absorbancia similares con AgNp's de tamaños equivalentes según análisis TEM (Figura 3-2A – 3-2C), aunque para la corrida 3 se encontró una mayor concentración de AgNp's en solución (Tabla 3-2). En la corrida No. 2 (27 °C, pH 10, 3Mm) se obtuvieron las absorbancias más altas con las AgNp's más pequeñas según análisis TEM y más concentradas (Figura 3-1-Figura 3-2B, Tabla 3-2), no obstante, el espectro de absorción obtenido no fue el esperado, pues se observaron varias bandas de absorción, que indican la formación de partículas irregulares (Martínez *et al.*, 2008) y al respecto también ha sido reportado que la aparición de altas absorbancias puede indicar la naturaleza polidispersa de las partículas (Owaid *et al.*, 2019).

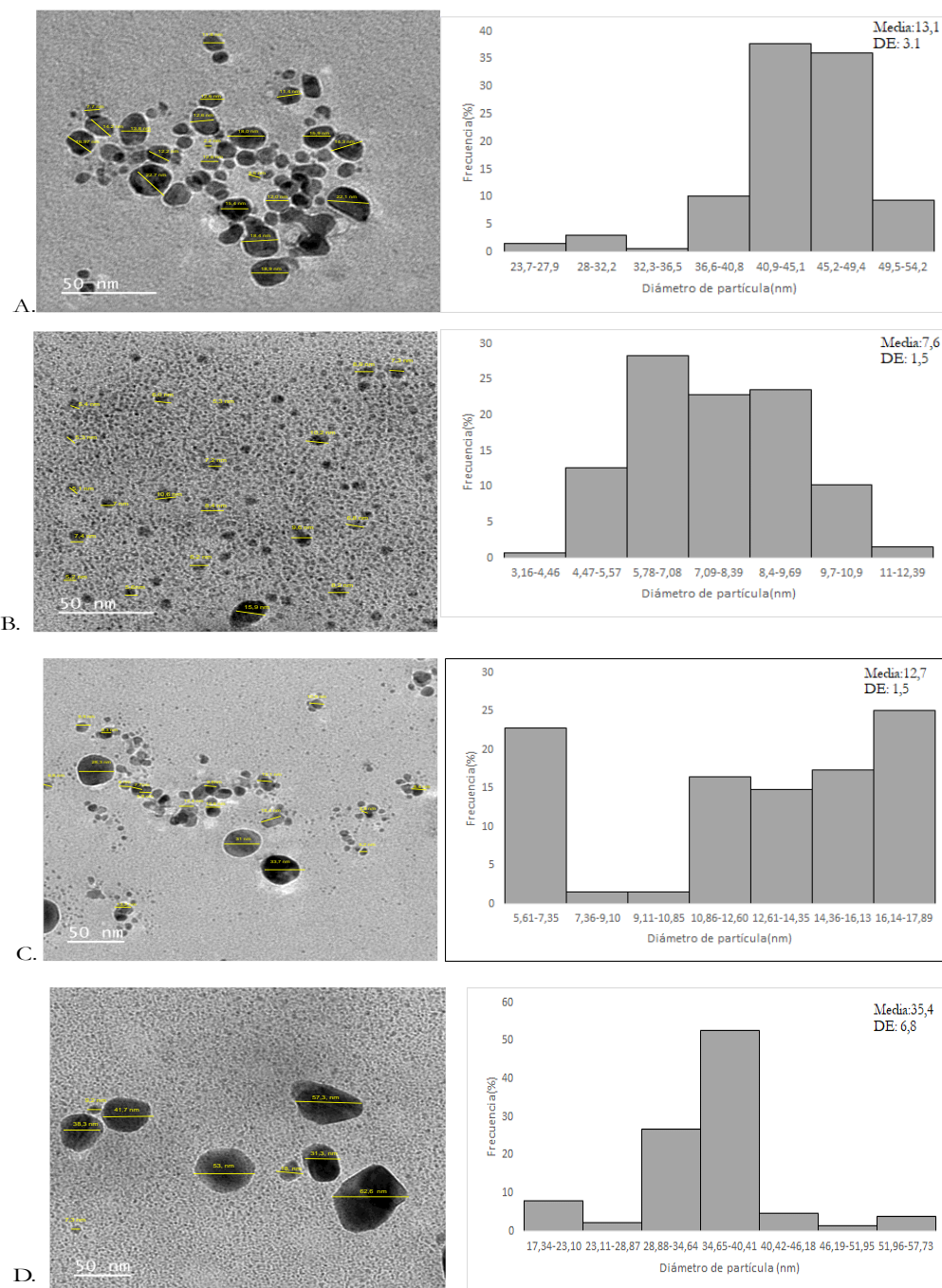


**Tabla 3-2:** Tamaño medio de AgNp's y rendimiento de la reacción de biosíntesis de AgNp's en cada corrida experimental.

Corrida	Tamaño promedio de las AgNp's (nm)	Rendimiento de la reacción (AgNp's/mL)
1	13,1±3,1	1,3 x 10 <sup>14</sup>
2	7,6±1,5	2 x 10 <sup>15</sup>
3	12,7±1,5	4,2 x 10 <sup>14</sup>
4	35,4±6,8	6,5x10 <sup>12</sup>

Finalmente, en la corrida No. 4 (42 °C, pH 10, 1mM) se obtuvieron altas absorbancias y las AgNp's más grandes según análisis TEM, aunque en menor concentración, lo que indicaría que no siempre una alta absorbancia se relaciona con alta concentración de AgNp's (Figura 3-2D - Tabla 3-2). A diferencia de lo reportado por Nayak *et al.*, 2011 y Hamedí *et al.*, 2017 quienes sugirieron que el incremento en la intensidad de color del filtrado es un indicador de la productividad del proceso de bio-reducción y su absorbancia se relaciona con el incremento en el número de nanopartículas. De manera que todo lo anterior nos lleva a sugerir, que en el campo de la micosíntesis no se puede generalizar.

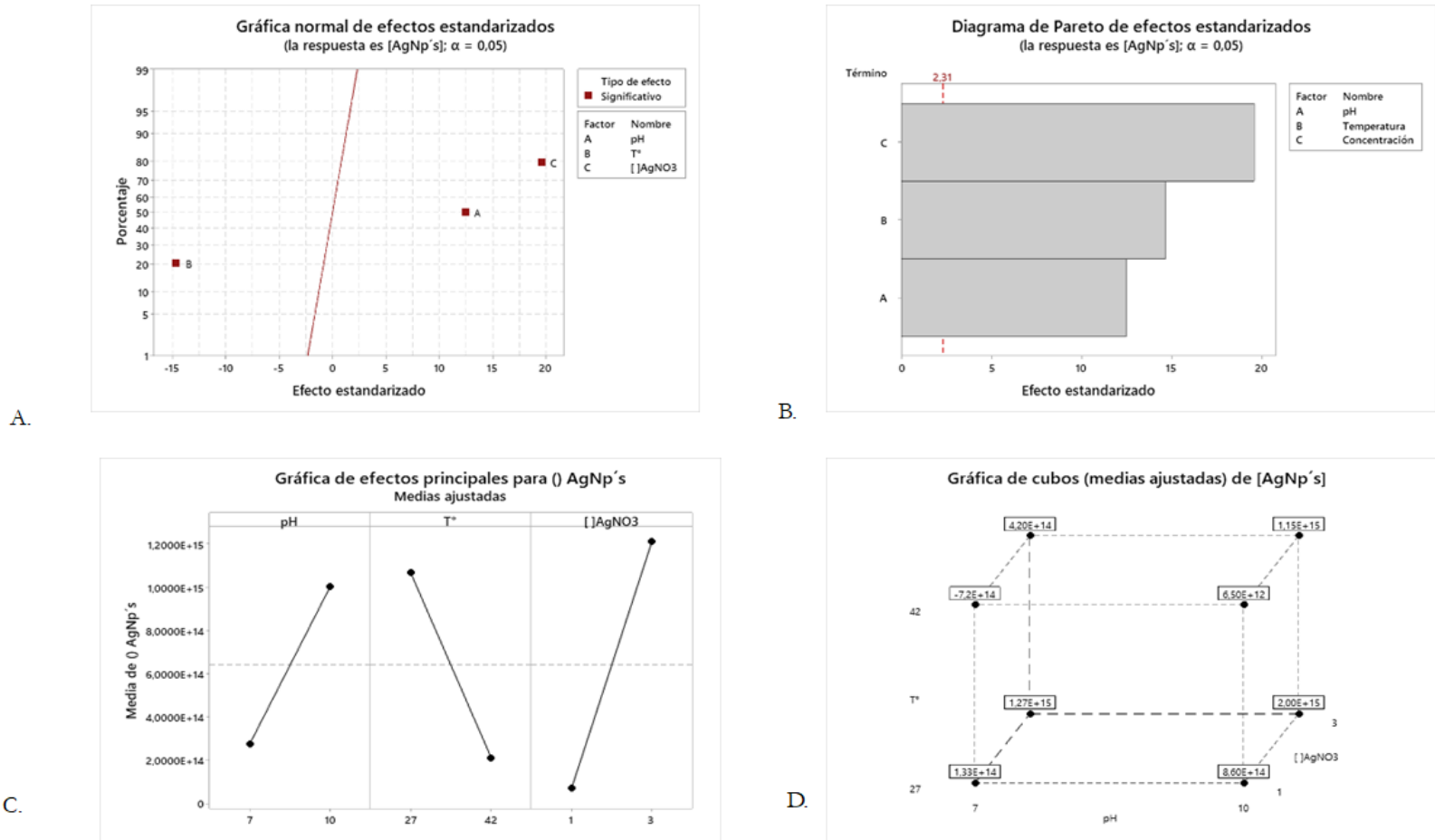
Ahora, al realizar la determinación de tamaño de las AgNp's obtenidas por TEM, se encontró que las AgNp's más pequeñas (7,6 nm) mostraron una banda con un máximo a los 415 nm, mientras que las más grandes (35,4 nm) exhibieron un máximo de absorción a los 425 nm (Figura 3-1, Tabla 3-2). Esto puede explicarse ya que es reconocido que el cambio en la posición del máximo de absorción depende del cambio de tamaño de las AgNp's. La presencia de bandas a longitudes de onda más bajas se asocia con AgNp's más pequeñas y un cambio hacia longitudes de onda superiores indica la presencia de AgNp's más grandes (Martínez *et al.*, 2008; Khandel *et al.*, 2018; Guilger *et al.*, 2019).



**Figura 3-2:** Micrografía TEM y distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas empleando *Fusarium oxysporum* en; A) Corrida No. 1. (27 °C, pH 7, 1mM); B). Corrida No. 2 (27 °C, pH 10, 3mM); C) Corrida No. 3(42 °C, pH 7, 3mM), y D) Corrida No. 4 (42 °C, pH 10, 1mM). Condiciones estándar (42 °C, pH 7, 1mM). FCLM: filtrado celular libre de micelio.DE: desviación estándar.

Estudios con *Fusarium oxysporum* han permitido obtener AgNp's de tamaños que oscilan entre los 2nm a los 40 nm (Almeida *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2020), donde la variación en el tamaño se ha atribuido a la edad de la biomasa empleada para la obtención del FCLM, encontrándose que la biomasa de siete días de crecimiento permite la obtención la AgNp's más pequeñas con respecto a biomasa de mayor edad (Husseiny *et al.*, 2015). En nuestro estudio, el FCLM se elaboró partir de la biomasa colectada a los siete días de incubación, momento en el que ha sido reportado que el hongo se encuentra en la fase estacionaria temprana de crecimiento y es en donde la enzima nitrato reductasa alcanza su máxima expresión (Hamedi *et al.*, 2017). Varios estudios de micosíntesis con el genero *Fusarium* han empleado biomasa de 5 a 7 días de crecimiento lo que les ha permitido obtener AgNp's de pequeño tamaño y monodispersas (Motesshafi *et al.*, 2012; Gaidwak *et al.*, 2013; Birla *et al.*, 2013). Por otra parte, en el estudio realizado por Shanzad *et al.*, 2019 se realizó la síntesis de AgNp's a partir de *Aspergillus fumigatus* BTCB10 utilizando biomasa de 3 a 7 días de crecimiento, encontrando que al emplear la biomasa más joven se obtuvieron AgNp's muy grandes, mientras que, al emplear biomasa de siete días de crecimiento, se obtuvieron las AgNp's más pequeñas y 100% monodispersas. Con respecto a la edad del cultivo, también se ha observado que cuando se emplea biomasa de mayor edad, es decir la que ha alcanzado la fase tardía de crecimiento o trofofase, la cantidad de AgNp's obtenidas disminuye, lo cual no es deseable dentro de un proceso de biosíntesis (Gericke *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011). De otro lado, en nuestro estudio, además, se logró determinar la concentración de AgNp's obtenidas que es un parámetro no reportado en la literatura y que resulta relevante para conocer la relación entre la cantidad de AgNp's y su acción bactericida.

Con respecto al análisis estadístico de los datos obtenidos en el experimento, el análisis de varianza indicó que todos los factores experimentales inciden sobre la variable respuesta, que en este caso es la concentración de AgNp's/mL ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 3-3A). Pero de los tres factores el que tiene mayor efecto sobre la producción de AgNp's es la concentración de la sustancia precursora ( $\text{AgNO}_3$ ), seguido de la temperatura y por último el pH de la reacción (Figura 3-3B). De acuerdo con la inclinación de la pendiente que se observa en el gráfico de efectos principales (Figura 3-3C), el aumento de pH y sustancia precursora tiene un efecto positivo sobre la concentración de AgNp's/mL, pero el aumento de temperatura tiene un efecto negativo sobre la concentración de estas. Esto podría explicarse ya que ha sido reportado que a pH alcalinos las enzimas implicadas en la reducción de los iones plata muestran su mayor actividad catalítica, lo que favorece la biosíntesis con respecto a cuándo la reacción se da a pH neutrales o ácidos (Saxena *et al.*, 2016).



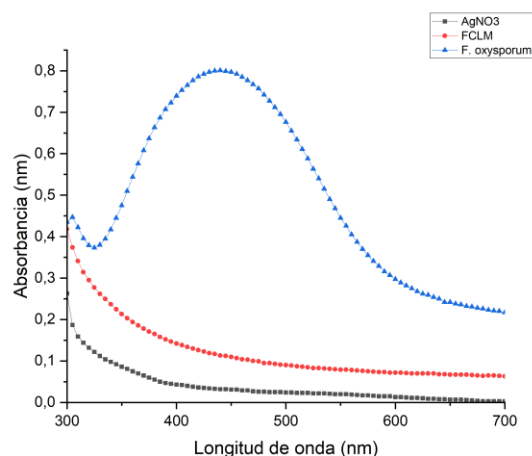
**Figura 3-3:** Análisis estadístico del experimento factorial 2k para los ensayos de eficiencia en la producción de AgNp's en términos de temperatura, pH y concentración de sustancia precursora (AgNO<sub>3</sub>); A) Gráfica normal de efectos estandarizados de los factores experimentales en evaluación; B) Diagrama de Pareto para los efectos de los factores experimentales en evaluación; C) Gráfica de los efectos principales de los factores experimentales en evaluación; D) Gráfica de cubos para seleccionar niveles recomendados de cada uno de los factores experimentales en evaluación.

Por otro lado, el incremento en la sustancia precursora facilita la formación de centros de nucleación que posteriormente catalizan la reducción de nuevos átomos que permiten la consolidación del cluster de AgNp's (Hamedi *et al.*, 2017). Otros autores por su parte sugieren que el aumento en la concentración de la sustancia precursora puede impedir la formación de AgNp's (Khandel *et al.*, 2018). Se conoce que, si bien el incremento en la temperatura puede acelerar la actividad enzimática de la NR, también se puede generar la desnaturalización de las proteínas de cobertura presentes en la superficie de las AgNp's, lo que induce el aumento de su tamaño y su agregación (Guilger *et al.*, 2019).

Finalmente, la gráfica de cubos (Figura 3-3D) indicó que las condiciones establecidas en la segunda corrida (27°C, pH 10 y AgNO<sub>3</sub> 3mM) serían las mejores para obtener un mayor rendimiento en la biosíntesis con un nivel de significancia del 95%. Pero dado que bajo esas condiciones experimentales se generó un espectro de absorción no deseable, lo cual se atribuyó a posibles procesos de agregación y alteración de las propiedades fisicoquímicas de las AgNp's (Moritz & Geszke, 2013; Khandel *et al.*, 2018), se consideró que la reacción de biosíntesis debería durar menos de las 96 horas propuestas inicialmente.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se realizó una nueva reacción empleando las mejores condiciones experimentales según el diseño experimental (27°C, pH 10 y AgNO<sub>3</sub> 3mM), pero únicamente por 24 horas. Modificación que resultó exitosa, pues se obtuvieron gran cantidad de AgNp's, que mostraron un espectro de absorción con un solo máximo de absorción a los 430 nm (Figura 3-4). Y se ha estimado que la presencia de una única banda en el espectro es un resultado que ha sido indicativo de la producción de nanopartículas monodispersas (Hamedi *et al.*, 2017).

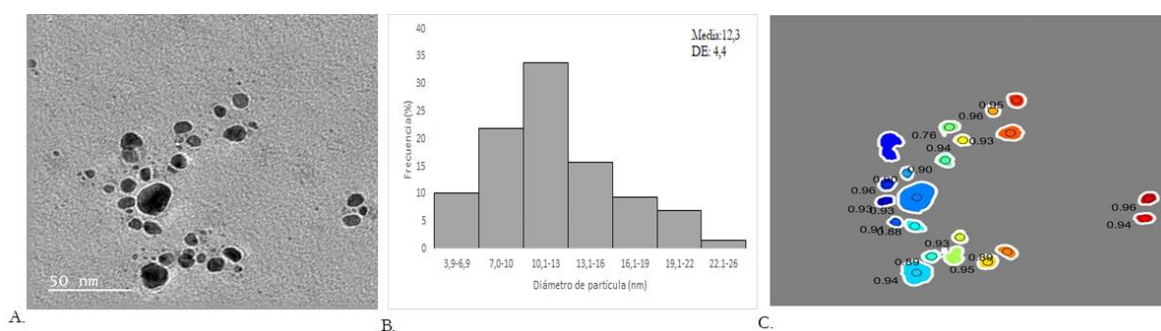
Estos resultados han sugerido que el número de bandas de resonancia plasmónica superficial (SPR) se incrementa a medida que la simetría de la nanopartícula disminuye, por lo tanto, para AgNp's de formas esféricas se espera solo un máximo de absorción, como ocurrió en nuestro estudio, pero para nanopartículas triangulares es usual encontrar varias bandas de absorción (Emam *et al.*, 2015).



**Figura 3-4:**A) Espectro UV-Vis de las AgNp's obtenidas con *Fusarium oxysporum* al emplear las mejores condiciones de síntesis durante 24 horas.

### 3.3.2 Caracterización de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*

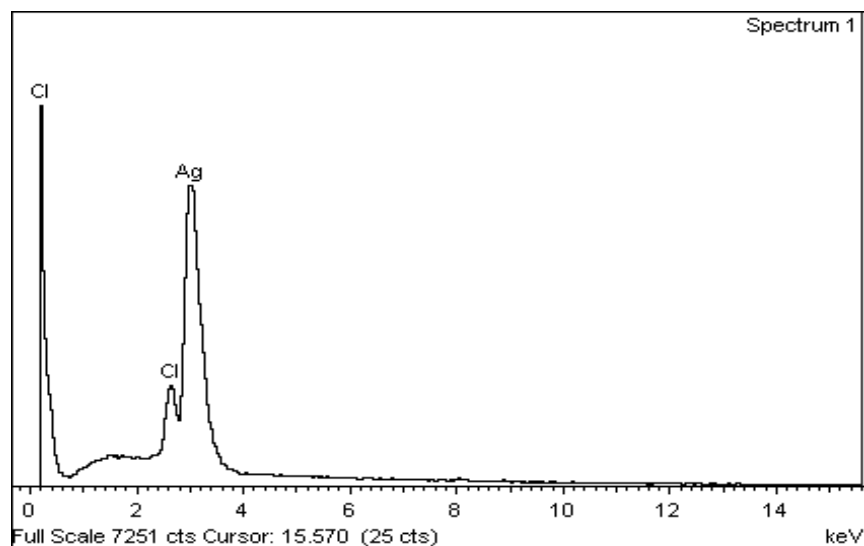
Las micrografías TEM indicaron que las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* son de forma esférica con tamaños promedio de  $12,3 \text{ nm} \pm 4,3$ , y con una frecuencia máxima de tamaño cerca de los 10,1-13 nm (Figura 3-5). Resultados comparables a los encontrados en investigaciones previas realizadas con esta especie en donde reportaron la formación de AgNp's esféricas con tamaños que oscilaron entre 3 y 44 nm (Ahmad *et al.*, 2003; Husseiny *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017). El análisis de esfericidad arrojó un valor promedio de 0,94 indicando que las condiciones optimizadas de síntesis favorecieron la producción de AgNp's mas esféricas y en general con morfología más uniforme (Figura 3-5).



**Figura 3-5:** A) Micrografía TEM de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* empleando las mejores condiciones de síntesis, B) Distribución de tamaño de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* bajo las condiciones mencionadas, C) Analisis de esfericidad de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* bajo las condiciones mencionadas

El análisis DLS estimó un tamaño promedio de las AgNp's de 48,6 nm, un índice de polidispersidad de 0,02 y con un potencial Z de -37,6. Estos resultados difieren a los obtenidos para este hongo cuando empleamos las condiciones estándar de síntesis (pH 7, 40°C y AgNO<sub>3</sub> 1mM), en donde se encontró un mayor tamaño (51,4 nm), un índice de polidispersidad de 0,139 y un potencial Z menos negativo (-30,7) (Beltrán *et al.*, 2022). De otro lado Gaikwad *et al.*, 2013 obtuvieron AgNp's a partir de *Fusarium trincictum* con un potencial Z de -38,3, similar al reportado para las AgNp's que se obtuvieron en este estudio a partir de *Fusarium oxysporum*. Fonseca *et al.*, 2022 empleando a *Fusarium oxysporum*, obtuvieron AgNp's con un índice de polidispersidad de 0,231 y Abdel-Hadi *et al.*, 2023 empleando a *F. oxysporum* sintetizaron AgNp's que mostraron un índice de polidispersidad de 0,3, estos valores son superiores a los reportados en esta investigación y sugieren un proceso de biosíntesis eficiente.

El análisis SEM-EDS permitió verificar la composición elemental de las AgNp's, evidenciándose una señal cerca de los 3 KeV (Figura 3-6), que se relaciona con la presencia de plata. Estudios como los de Devi *et al.*, 2015 y Othman *et al.*, 2019 reportaron que los nanocristales de plata metálica generalmente aparecen a los 3 KeV como resultado de la resonancia de los plasmones superficiales.

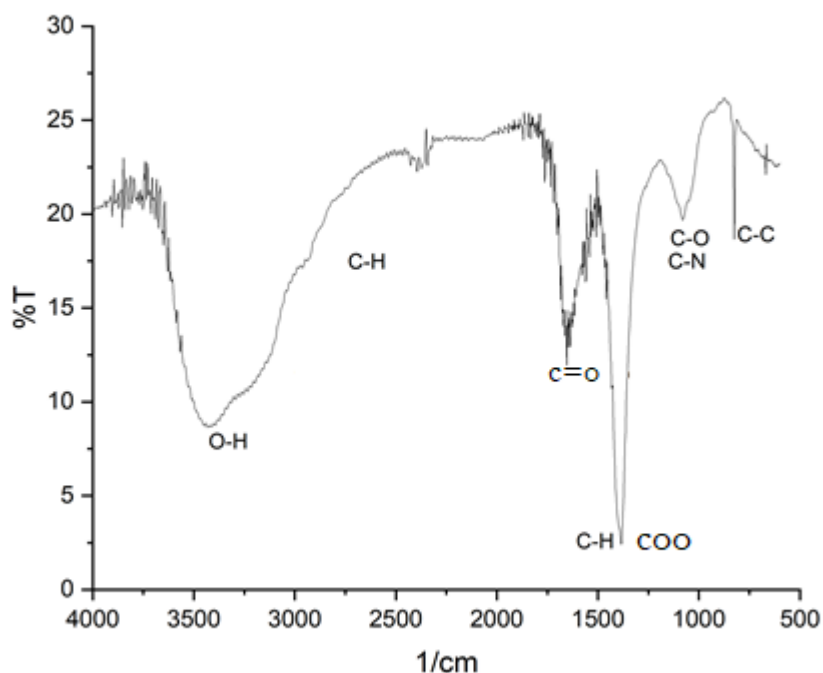


**Figura 3-6:** Análisis SEM-EDS de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*.

Por su parte, el análisis FTIR (Figura 3-7) mostró bandas propias de enlaces C-O, C-N (1100 cm<sup>-1</sup>) y C-C (850 cm<sup>-1</sup>), indicando la presencia de compuestos orgánicos en la superficie de las AgNp's, lo cual también ha sido obtenido en la biosíntesis de AgNp's empleando los hongos *Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum* (Maliszewska *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2017; Bawaskar *et al.*, 2010). También se encontraron

bandas a los  $1390\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al enlace COO y C-H y a  $2900\text{ cm}^{-1}$  aparece de nuevo la banda que se asocia a este último enlace, informados en investigaciones como las de Naveen *et al.*, 2010 y Almeida *et al.*, 2017. Estas últimas bandas se asocian con la presencia de hidrocarburos aromáticos que corroboran la presencia de aminoácidos como tirosina y triptófano en la superficie de las proteínas de cobertura de las AgNp's. Adicionalmente se encontró una banda a los  $3200\text{ cm}^{-1}$  asociado a la presencia de grupo O-H proveniente posiblemente de ácidos carboxílicos, igualmente indicado por Honary *et al.*, 2013 al emplear el hongo *Penicillium* sp. para la síntesis de AgNp's.

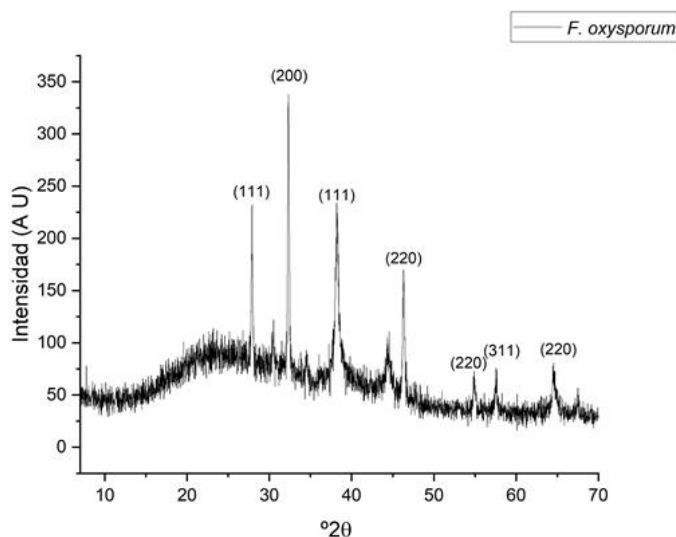
Finalmente, la banda cerca de  $1700\text{ cm}^{-1}$  es proveniente posiblemente de algunos aminoácidos (C=O) y la banda a  $1100\text{ cm}^{-1}$  se asocia con el enlace C-N que sugiere la presencia de aminas alifáticas, también señalado por Singh *et al.*, 2014 empleando a *Penicillium* sp. para la síntesis de AgNp's. Todos estos hallazgos indican que las proteínas provenientes del extracto celular libre de micelio pudieron haberse unido a las AgNp's a través de grupos amino libres y residuos de cisteína, por medio de interacciones electrostáticas, actuando como agentes de cobertura que estabilizan las AgNp's y previenen su agregación en un medio acuoso (Basavaraja *et al.*, 2008; Bawaskar *et al.*, 2010)



**Figura 3-7:** Análisis FTIR de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*.



El análisis DRX permitió verificar la composición cristalina, mostrando señales características de AgNp's con estructura cúbica de cara centrada (FCC) y ángulos en posiciones 27,8°, (111), 32,2° (200), 38,1° (111), 46,2° (220), 54,9° (311), 57,5° (222) y 64,5° (220), que representan la presencia de planos cristalinos de la estructura de la plata metálica. Donde las señales para los planos (111) y (220) fueron los que mostraron mayor intensidad (Figura 3-8). Soportando el análisis anterior, un patrón similar de estructura FCC ha sido reportado para las nanopartículas sintetizadas por diversas especies del género *Fusarium* sp. (Basavaraja *et al.*, 2008; Husseiny *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2019).



**Figura 3-8:** Análisis de difracción de Rayos X de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*.

### 3.3.3 Pruebas antibacteriales de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* frente al agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*

#### 3.3.3.1 Concentración de las AgNp's

Al emplear la ecuación 7 que indica el cálculo para hallar el número de AgNp's / mL según González *et al.*, 2015, se halló la concentración de la solución stock de AgNp's obtenidas en la reacción de biosíntesis empleando a *Fusarium oxysporum*.

$$No. de AgNp's = \frac{No. de átomos}{\left(\frac{D}{2ra}\right)^3}$$

7

Donde:

D: Diámetro medio de las AgNp's por TEM

Ra: Radio teórico de un átomo de plata

$$\text{No. de AgNp's} = \frac{1.8069 * 10^{21}}{\left(\frac{12,3}{2 * 0.144}\right)^3} = 2.3 * 10^{16}$$

Y una concentración de:

$$\text{Concentración de AgNp's} = \frac{\text{No. de nanopartículas}}{\text{Volumen del coloide sintetizado}}$$

$$\text{Concentración de AgNp's} = \frac{2,3 * 10^{16}}{50 \text{ mL}} = 4,6 * 10^{14} \text{ AgNp's} \frac{\text{s}}{\text{mL}}$$

Ahora al emplear factores de conversión de unidades se hizo el cálculo de ppm a partir de número de nanopartículas/mL aplicando la ecuación 8:

$$\text{PPM} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \left( \frac{\text{AgNp's}}{\text{ml}} * \text{densidad de la plata} \left( \frac{\text{g}}{\text{cm}} \right) * \frac{1}{6} * \frac{22}{7} * \text{promedio del diametro de la np en nm}^3 * 10^{-21} \left( \frac{\text{cm}^3}{\text{nm}^3} \right) * 10^6 \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) \right)$$

8

Donde:

Volumen de una partícula esférica es:  $(1/6) \pi D^3$

$10^{-21}$ : factor de conversión de  $\text{cm}^3$  a  $\text{nm}^3$

$10^6$ : factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a g

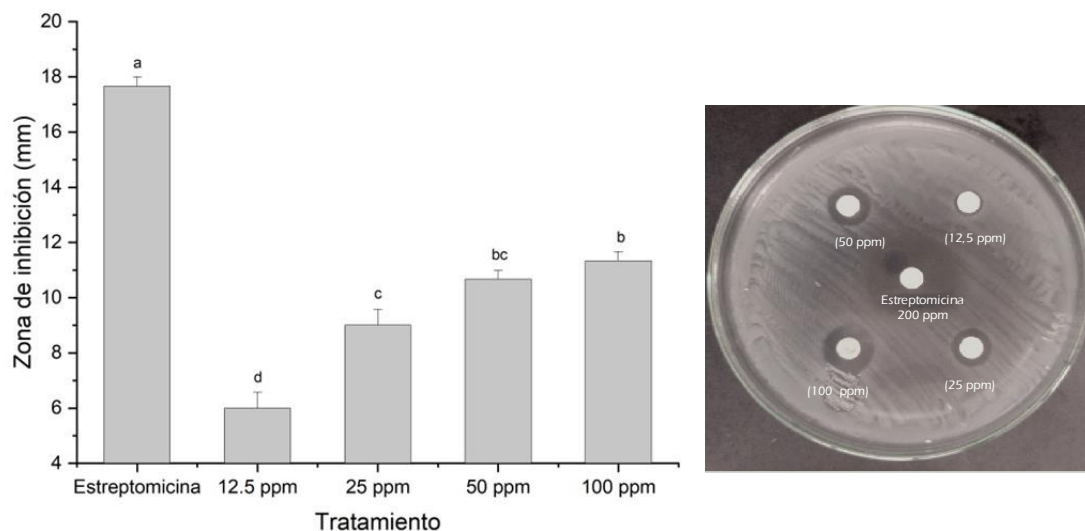
Entonces:

$$\text{PPM} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \left( \frac{4,6 * 10^{14}}{\text{ml}} * 10,5 \left( \frac{\text{g}}{\text{cm}} \right) * \frac{1}{6} * \frac{22}{7} * 12,3^3 * 10^{-21} * 10^6 = 4708 \text{ ppm} \right)$$

Ahora empleando la relación  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$  se obtuvieron las diferentes disoluciones de AgNp's a diferentes dosis para los ensayos antibacteriales (12,5; 25; 50 y 100 ppm).

### 3.3.3.1 Ensayo de antibiosis por el método de difusión en agar

En este experimento se pudo observar que la dosis de AgNp's más elevada (100 ppm) mostró zonas de inhibición con un valor promedio de 11,3 mm y por su parte la dosis más baja empleada en el ensayo (12,5 ppm) generó zonas de inhibición de 6 mm. El control positivo del experimento (estreptomycin a 200 ppm) generó zonas de inhibición con tamaño promedio de 17,6 mm (Figura 3-9).



**Figura 3-9:** Efecto de la dosis de AgNp's obtenidas a partir *Fusarium oxysporum* sobre el crecimiento del agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*. La zona de inhibición graficada es el promedio de tres réplicas, donde las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.

Los resultados encontrados en el análisis de antibiosis muestran zonas de inhibición mayores a las reportadas por Madakka *et al.*, 2018 quienes evaluaron la actividad antibacteriana de AgNp's a 5 ppm obtenidas a partir de *Fusarium semisectum* frente a *E. coli*, encontrando zonas de inhibición de 1 mm en promedio. Pero de otro lado, son menores a lo indicado por Krishnakumar *et al.*, 2015, quienes obtuvieron halos de inhibición de 20 mm frente a la misma *E. coli* empleando 25 uL de AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* a una concentración desconocida. Estas diferencias en la efectividad de la acción antibacteriana de las AgNp's posiblemente se atribuyen a diferencias en la concentración de AgNp's evaluadas (El gorban *et al.*, 2015) o quizá las diferencias en el diámetro de la zona de inhibición puede verse influenciado por la tasa de difusión de las AgNp's individuales (Suresh *et al.*, 2010).

Según el análisis estadístico se pudo observar un efecto de la dosis empleada sobre la actividad antibacteriana de las AgNp's ( $p \leq 0,05$ ), encontrándose una relación directamente proporcional entre dichas variables, relación ya reportada por otros autores (Otoni *et al.*, 2017 y Madakka *et al.*, 2018). Sin embargo, es de anotar que la correlación entre efecto bactericida y concentración de AgNp's depende de la especie bacteriana evaluada (Zhang *et al.*, 2014). Ha sido reconocido que las AgNp's son más efectivas

frente a bacterias Gram negativas que frente a bacterias Gram positivas debido a diferencias estructurales en la pared celular, en estas últimas la presencia de múltiples capas de peptidoglicano, que contienen ácidos teicoicos y lipoteicoicos con carga negativa pueden contribuir al secuestro de iones de plata libres, necesarios para ejercer la acción antibacterial (Mohammed *et al.*, 2010; Khodashenas, 2016). Dada la naturaleza del agente fitopatógeno en evaluación, era de esperar una buena actividad bactericida, ya que siendo una bacteria Gram negativa cuenta con una pared celular que presenta una capa delgada de peptidoglicano, lo que favorece el ingreso de las AgNp's al interior celular y su posterior acción antibacterial. Esa acción antibacterial en sistemas sólidos como lo es el agar, podría atribuirse a los iones de plata que son liberados de la superficie de las AgNp's y se difunden al medio (Morones *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008) y sus efectos van desde la alteración de la estructura de pared y membrana celular, hasta la alteración de la función de algunas proteínas y ADN que pueden impactar procesos vitales como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, síntesis de proteínas y replicación del material genético (Kharissova *et al.*, 2013)

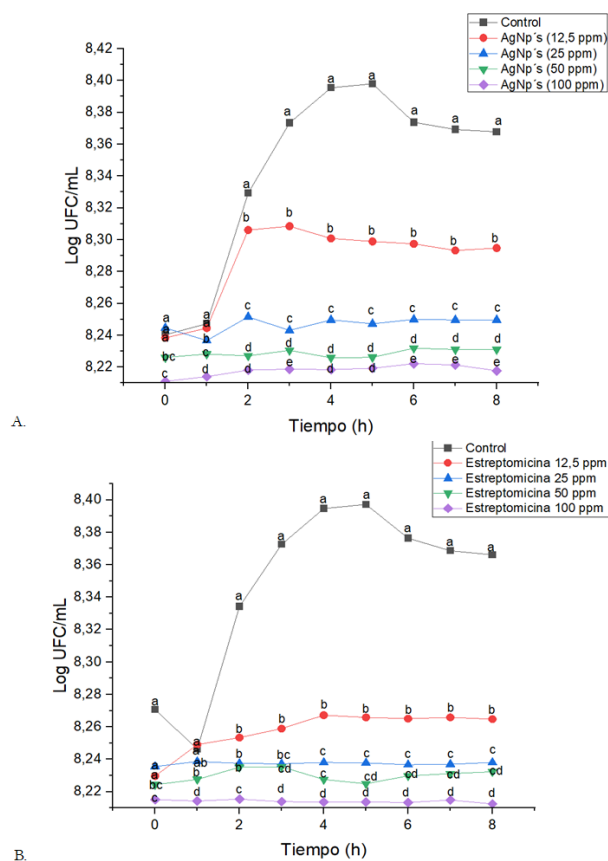
Nuevamente, es importante resaltar que la posibilidad de emplear AgNp's obtenidas por ruta biológica para el control de bacterias fitopatógenas no ha sido reportado, y es relevante, ya que a la más baja concentración de AgNp's empleada (12,5 ppm,) ya se observa inhibición. En cuanto al uso de AgNp's para el control de bacterias fitopatógenas, se han empleado nanopartículas de silica-plata obtenidas por métodos físicos para el control de bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas siringae pv.* y *Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria*, causantes del tizón bacteriano y la podredumbre negra respectivamente, siendo inhibidas únicamente a la dosis más alta empleada en el estudio que fue de 100 ppm (Park *et al.*, 2006).

### **3.3.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por micro y macrodilución**

Para esta determinación se emplearon dos metodologías, micro y macrodilución con fines de comparación del comportamiento de las AgNp's en diferentes niveles de escalamiento. Por la técnica de microdilución, al evaluar la turbidez de la microplaca con el lector ELISA, se encontró que en los pozos tratados con 12,5 ppm de AgNp's presentaron una DO de 0,46, que corresponde a  $1,42 \times 10^8$  UFC/mL (8,15 Log UFC/mL). Para los pozos en donde se evaluaron las concentraciones de 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm no se encontró turbidez al comparar con el control positivo (medio de cultivo inoculado) y sus DO son iguales al medio de cultivo sin inóculo que es el control negativo del experimento. Por esa razón se seleccionó a la concentración de 25 ppm como la MIC para las AgNp's. Para el caso de la

estreptomycin como estándar de referencia también se encontró una MIC de 25 ppm. Estos resultados fueron comprobados al no evidenciar crecimiento en las cajas de agar nutritivo que fueron sembradas con el contenido de los pozos cuya concentración se definió como la MIC.

Al emplear la técnica de macrodilución, todas las concentraciones de AgNp's evaluadas mostraron un efecto en la disminución de la tasa de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*, reducción que fue más drástica a medida que se incrementó la concentración de AgNp's en la solución. Para las dosis de 12,5 y 25 ppm de AgNp's no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los dos primeros tiempos en evaluación (0-1) con respecto al control. Pero para las dosis de 50 ppm y 100 ppm se hallaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en todos los tiempos de evaluación y esto permitió definir a 50 ppm como la MIC. En cuanto a la estreptomycin, también se evidenció una MIC de 50 ppm (Figura 3-10).



**Figura 3-10:** Curvas de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* en presencia de diferentes concentraciones de; A) AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*, B) Antibiótico estreptomycin como control positivo. Donde el "control" es medio de cultivo sin adición de sustancia antimicrobiana.

Es importante anotar que el valor de la MIC para este tipo de nanopartículas frente a un agente fitopatógeno no ha sido descrito en estudios previos. Al respecto solo existen algunos reportes que han determinado la MIC por microdilución de AgNp's obtenidas por biosíntesis frente a patógenos humanos. Tal como los indicados por Balakumaran *et al.*, 2016 y Krishnakumar *et al.*, 2015 quienes empleando AgNp's obtenidas por los hongos *Aspergillus terreus* y *Fusarium oxysporum* (MTCC-2480) registraron una MIC de 6,25 y 20 ppm, respectivamente, frente a las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi*.

Una posible causa de la MIC tan baja obtenida (50 ppm) durante nuestro estudio, puede estar relacionado con lo encontrado por FTIR, análisis que sugiere la presencia de una cobertura de naturaleza orgánica en las AgNp's. En cuanto a esto ha sido reportado que la naturaleza orgánica superficial de las AgNp's incrementa su biocompatibilidad (Balakumaran *et al.*, 2016; Ovais *et al.*, 2018), propiedad que facilita el ingreso de las partículas al interior celular, permitiendo una mejor actividad antibacteriana (Mandal *et al.*, 2006; Gahlawat *et al.*, 2019).

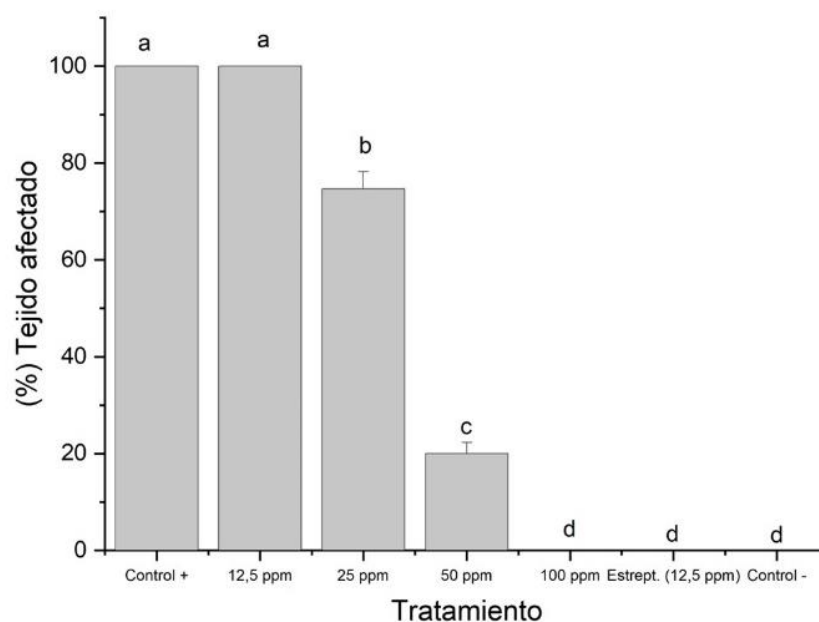
Adicionalmente se ha informado que las AgNp's obtenidas por ruta biológica generan MIC más bajas con respecto a las generadas cuando se emplean AgNp's sintetizadas por ruta tradicional. Como en el estudio realizado por Sintubin *et al.*, 2011, quienes realizaron una comparación entre la actividad antibacteriana de AgNp's sintetizadas por ruta química y biológica frente a bacterias patógenas como *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, reportando para el primer caso una MIC de 500 ppm, mientras que para las AgNp's obtenidas por biosíntesis la MIC fue de entre 12,5 y 50 ppm, lo que se atribuye al mayor tamaño de las AgNp's obtenidas por ruta química, lo cual se ha mencionado puede inhibir la actividad antibacteriana, ya que partículas grandes tienen menor área de superficie para interactuar con la bacteria y a procesos de agregación que se ven disminuidos en AgNp's obtenidas por ruta biológica gracias a la presencia de proteínas de cobertura (Lok *et al.*, 2007).

### **3.3.4 Evaluación del efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de la pudrición blanda del tubérculo bajo condiciones controladas**

En este experimento a nivel *in vivo* los síntomas de la pudrición blanda en las piezas de papa control positivo (infección sin tratamiento) aparecieron a los siete días de incubación, y en ese momento se realizó el pesaje del tejido macerado y la determinación del porcentaje de tejido afectado. Se encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Para las piezas de papa que fueron tratadas con la solución de AgNp's a 12,5 ppm se evidenciaron los mismos síntomas de infección que en el control

de infección. Lo que indica que esta dosis es demasiado baja para ejercer algún efecto protector significativo frente al desarrollo de la pudrición blanda del tubérculo.

Sin embargo, al emplear dosis más altas; como 25 y 50 ppm de AgNp's, se pudo observar una disminución en el peso de tejido macerado de las piezas de papa tratadas con porcentajes de afectación del tejido del 76 y 20% respectivamente. Y para la dosis de 100 ppm, no se evidenció maceración de tejido, lo que podría atribuirse a un efecto protector de las AgNp's sobre el tejido vegetal. Debido a que los tubérculos de papa están destinados a consumo humano, este resultado resulta relevante ya que la plata (Ag) a 100 ppm presenta muy poca toxicidad sistémica para los humanos (Le & Stellaci *et al.*, 2015). De hecho, en el estudio de Samberg *et al.*, 2012, no se encontró toxicidad en células madre derivadas de tejido adiposo humano cuando se expusieron a AgNp's a una concentración de 100 ppm durante 24 horas. En general en estudios de nanotoxicología han concluido que la concentración y el tamaño de las AgNp's administradas determina la respuesta intracelular de células eucariotas y su grado de toxicidad (Cypriana *et al.*, 2021). Para el caso del control negativo y el antibiótico estreptomycin, estándar de referencia, no se evidenció maceración de tejido vegetal, lo cual valida los resultados obtenidos (Figura 3-11).



**Figura 3-11:** Porcentaje de tejido macerado de piezas de papa tratadas con diferentes dosis de AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*. El porcentaje del tejido macerado es promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren

significativamente según la prueba de Tukey al 5%. Donde el control – (negativo) es la rodaja de papa sin inocular y el control + (positivo) es la rodaja de papa inoculada sin adición de AgNp's.

Cabe resaltar que al aplicar las AgNp's sobre la papa las propiedades antibacteriales de las AgNp's no se vieron alteradas, y como se mencionó, a 100 ppm ocasionaron un efecto protector sobre el tejido. En varios estudios ha sido reportado que la presencia de materia orgánica puede alterar la química de superficie de las AgNp's (Phyllipe & Schaumann, 2014), y ya que los constituyentes de la materia seca del tubérculo incluyen compuestos orgánicos tales como almidón, lípidos, fibra y proteínas, estos podrían haber alterado el comportamiento de las AgNp's a nivel del tejido vegetal (Leonel *et al.*, 2017). También ha sido reportado que las proteínas pueden adsorberse a la superficie de las AgNp's formando una capa externa que puede causar su agregación y limitar la liberación de iones  $Ag^{+1}$  con acción antibacterial. (Nel *et al.*, 2016; Pokhrel *et al.*, 2013). Sin embargo, al aplicar las AgNp's sobre dicho sustrato vegetal las propiedades antibacteriales de las AgNp's no se vieron alteradas y como se mencionó, a 100 ppm ocasionaron un efecto protector sobre el tejido.

Por otra parte, las condiciones aeróbicas en las que se planteó el experimento favorecieron la actividad antibacterial de las AgNp's sobre el sustrato vegetal. Se ha observado un efecto del oxígeno sobre la acción bactericida de las AgNp's dado que estas pueden sufrir una disolución oxidativa que genera la liberación de iones  $Ag^{+1}$ . En el estudio realizado por Lok *et al.*, 2007, las AgNp's perdieron acción antibacterial en una atmósfera inerte, pero en presencia de oxígeno se inhibió notablemente el crecimiento bacteriano. De igual manera en el estudio de Xiu *et al.*, 2012 se encontró que las AgNp's tienen una actividad antibacterial más baja cuando se evalúan en condiciones anaerobias comparado con la que se obtiene en condiciones aeróbicas. Finalmente, la presencia de oxígeno durante el ensayo también pudo favorecer acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelularmente, produciéndose estrés oxidativo y muerte de la bacteria (Le & Stellacci, 2015; Gumel *et al.*, 2019).

### 3.4 Conclusiones

La cepa nativa de *Fusarium oxysporum* mostró una capacidad sobresaliente para producir AgNp's la cual fue potencializada al lograr establecer las condiciones de síntesis más efectivas, que permitieron obtener un mayor rendimiento en la producción de AgNp's. Dichas AgNp's que lograron obtenerse en tan solo 24 horas fueron caracterizadas por diferentes técnicas y ejercieron acción antibacterial frente a *Pectobacterium carotovorum*. La eficacia nanopesticida de las AgNp's se verificó empleando métodos *in vitro* encontrándose zonas de inhibición de crecimiento de 17,6 mm en la prueba de difusión en agar cuando se aplican 100 ppm de AgNp's y una MIC de 25 y 50 ppm por las técnicas de micro y macro dilución



respectivamente. Además, los estudios sobre sustrato vegetal bajo condiciones controladas permitieron evidenciar que al aplicar AgNp's a una concentración de 100 ppm sobre los tubérculos se genera un efecto protector frente al desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda. Estos resultados son la base para profundizar en la búsqueda de aplicación de AgNp's obtenidas por micosíntesis como nanopesticidas en cultivos de papa.

## Capítulo 4 : Fibras modificadas con AgNp's micosintetizadas para la fabricación de un empaque antibacterial con acción controladora frente a *Pectobacterium carotovorum*.

### 4.1 Introducción

Muchos microorganismos proliferan sobre hortalizas, frutas y vegetales dado su alto contenido de humedad (75-90 %), viéndose afectada su producción entre los periodos de cosecha y consumo (Singh & Sharma, 2018; Sofi *et al.*, 2018). Las pérdidas postcosecha de alimentos perecederos en países en desarrollo han sido estimadas entre el 30 y el 50% de la producción, lo que representa millones de dólares para la industria alimenticia, y millones de personas a las cuales no llegan los alimentos (Brooks, *et al.*, 2008; Al tayar *et al.*, 2019). La mayor parte de las enfermedades postcosecha se atribuyen al efecto de diversos géneros fúngicos tales como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Sclerotinia*, y géneros bacterianos como *Pseudomonas* sp. y *Pectobacterium* sp. (Singh & Sharma, 2018).

Para el caso específico de la papa, las pérdidas postcosecha alcanzan hasta el 60% de la producción, y pueden ocurrir durante cualquier momento, desde la cosecha hasta el consumo. Por esta razón, son uno de los problemas más graves de la agricultura moderna y de la industria de alimentos a nivel mundial (Lastochkina *et al.*, 2020). La bacteria *Pectobacterium carotovorum* es relevante por causar daños en múltiples especies vegetales incluida la papa (*Solanum tuberosum*), y a nivel de postcosecha es el agente causal de la pudrición blanda del tubérculo, enfermedad genera grandes pérdidas económicas (Masum *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2021). Debido a que la papa es la hortaliza más consumida en el mundo por ser una fuente de nutrientes de alta calidad, es imperativo el desarrollo de estrategias que protejan este producto agrícola una vez está almacenado (Benkeblia, 2012; Motelica *et al.*, 2020).

Dado que el almacenamiento y transporte de productos agrícolas como la papa se hace en sacos textiles sin protección adicional (Muratore *et al.*, 2019; Motelica *et al.*, 2020), una aplicación biotecnológica innovadora en el campo del embalaje de alimentos en la poscosecha, es el desarrollo de empaques

antibacteriales, que puedan preservar la calidad y prolongar la vida útil de los alimentos (Kolarova *et al.*, 2017; Adepu *et al.*, 2017; Mangaraj *et al.*, 2018; Al tayar *et al.*, 2019; Muratore *et al.*, 2019; Motelica *et al.*, 2020; Jafarzadeh *et al.*, 2020; Kamarudin *et al.*, 2022). Actualmente para elaborar estos empaques se han empleado biopolímeros de baja toxicidad tales como el ácido poliláctico (PLA), el quitosán, el almidón y la celulosa (Rhim *et al.*, 2013; Marrez *et al.*, 2019; Jafarzadeh *et al.*, 2020; Kamarudin *et al.*, 2022). Este último homopolisacárido lineal constituyente de las fibras vegetales, puede ser funcionalizado con diversos materiales a nivel de superficie gracias a su naturaleza química, lo que permite otorgarle diferentes propiedades (Pinto *et al.*, 2007; Bastidas *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

Algunas fibras vegetales como el algodón y el fique se emplean rutinariamente para la elaboración de embalajes y también son sustratos a base de celulosa que se han utilizado para inmovilizar nanomateriales por diferentes enfoques (He *et al.*, 2003; Dong & Hinestroza 2009), y por lo anterior, se están empezando a desarrollar embalajes inteligentes de tipo biodegradable, que impiden o limitan la proliferación de patógenos (Al tayar *et al.*, 2019; Kamarudin *et al.*, 2022). La acción antibacteriana de esos empaques puede ser atribuida a la presencia de nanomateriales con reconocida acción antibacteriana como las AgNp's (Rhim *et al.*, 2013; Adepu *et al.*, 2017; Kolarova *et al.*, 2017; Al tayar *et al.*, 2019; Marrez *et al.*, 2019).

Las AgNp's pueden obtenerse tradicionalmente por métodos fisicoquímicos o por biosíntesis empleando hongos. Y con el objetivo de contribuir a la generación de nuevos embalajes de base biológica con bajo impacto ambiental, en esta investigación se emplearon AgNp's obtenidas a partir de una cepa nativa de *Fusarium oxysporum* que se inmovilizaron en fibras de algodón quirúrgico para ser evaluadas como soportes antibacteriales por dos metodologías (cationización y reducción bioquímica *in situ*). Para luego empleando la cationización como metodología de anclaje, desarrollar una aplicación que se adapte mejor a las condiciones reales de almacenamiento de papa, en donde se fabricaron pequeños sacos de fique antibacteriales. Estos sacos disminuyeron el porcentaje de afectación de tubérculos almacenados con respecto a los que permanecieron en sacos tradicionales durante el ensayo. Esta novedosa aplicación podría contribuir al manejo del agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* durante el almacenamiento de papa a gran escala, pues favorecerá a la inocuidad del producto y a mitigar en gran parte las pérdidas económicas para los productores.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Obtención de AgNp's a partir de *Fusarium oxysporum*

Para la reacción de biosíntesis se siguió la metodología indicada en la sección 2.2.4, pero manteniendo la mezcla en oscuridad y mezclando 100 mL del FCLM con 100 mL de la solución precursora de  $\text{AgNO}_3$  3 mM durante 24 h/120 rpm/pH 10/27 °C. Parámetros más adecuados para obtener el mayor rendimiento en la reacción de síntesis como se indicó en la sección 3.3.1.

## **4.2.2 Inmovilización de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* en una fibra de algodón quirúrgico y su caracterización**

Las fibras de algodón fueron modificadas con AgNp's empleándose dos metodologías, para de esa forma preparar dos tipos de fibras. Las fibras con nanopartículas y obtenidas por cationización (Castellanos *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2015) en adelante se denominarán "A-AgNp's-C" y las fibras con nanopartículas y obtenidas por reducción bioquímica *in situ* (Sivaranjana *et al.*, 2017) se denominarán "A-AgNp's-RBi".

### **4.2.2.1 Modificación por cationización**

Las fibras A-AgNp's-C, se fabricaron tomando 5 g de fibras de algodón que fueron remojadas en 10 mL de agua Milli Q y luego sumergidas en una solución compuesta por 10 mL de NaOH al 10% y 5 mL de solución de cloruro de glicidil trimetilamonio (GTAC) al 75% durante 15 minutos en agitación a 150 rpm, la función de este último reactivo es enlazar grupos de amonio cuaternario bajo condiciones fuertemente alcalinas a la superficie de las fibras de algodón. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua destilada y secado al aire. Para el ensamblaje de las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* en la superficie de las fibras cationizadas, se tomaron los 5 g de fibra pretratada y se sumergieron en agua Milli-Q durante cinco minutos, e inmediatamente después se empaparon en 10 mL de la solución de AgNp's por cinco minutos más, y posteriormente se enjuagaron con agua Milli-Q (Castellanos *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2015).

### **4.2.2.2 Modificación por reducción bioquímica *in situ***

Las fibras A-AgNp's-RBi, se obtuvieron acondicionando la fibra de algodón quirúrgico empleándose una solución de LiOH al 8% y urea al 15% durante 25 minutos en agitación a 150 rpm, hasta formar una masa fibrosa de celulosa a la que se le adicionó alcohol absoluto durante 24 horas. Luego las fibras fueron lavadas con agua destilada para remover residuos de alcohol y así contar con fibras purificadas para el

proceso de reducción bioquímica *in situ*. A continuación, la matriz fibrosa fue dispuesta en un erlenmeyer que contenía 100 mL de una solución de  $\text{AgNO}_3$  a una concentración de 3 mM durante 12 horas, para favorecer la absorción de iones plata en la estructura fibrosa. Posterior a esta formación de algodón- $\text{Ag}^+$ , se realizó un lavado de las fibras con agua destilada para eliminar iones plata que no hayan quedado atrapados en la estructura. Y luego, para realizar la reducción bioquímica *in situ*, 5 g de la matriz fibrosa algodón- $\text{Ag}^+$  se dispusieron en un erlenmeyer que contenía 100 mL del filtrado celular libre de micelio (FCLM) obtenido a partir de *Fusarium oxysporum* como agente reductor.

#### **4.2.2.3 Caracterización de las fibras de algodón modificadas con AgNp's**

Los dos tipos de fibras fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM- EDS) para verificar la presencia de las AgNp's, y confirmar la eficiencia de la modificación. Para esto las fibras se fijaron en una cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) en el equipo DENTON VACUUM Desk IV y se analizaron en el microscopio electrónico de barrido en alto vacío con el fin de obtener imágenes en alta resolución. Se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología, topografía de las muestras en el equipo JEOL JSM 6490 LV con un voltaje de aceleración de 10Kv. El análisis de DRX a las fibras de algodón modificadas con AgNp's se realizó según lo indicado en la sección 2.2.5.

#### **4.2.3 Actividad antimicrobiana de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por *Fusarium oxysporum***

La bacteria fue cultivada en caldo tripticasa soya (TSB) en agitación a 28 °C/ 24 h, hasta obtener una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). El efecto antibacterial de las fibras modificadas con AgNp's se evaluó, tomando el inóculo y realizando cinco estrías paralelas de 6 mm de ancho, y separadas por 1 mm sobre en cajas de agar nutritivo. Luego se tomaron fragmentos de 2cm<sup>2</sup> de las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi, previamente esterilizadas, y se dispusieron sobre el medio de cultivo inoculado haciendo presión para garantizar el contacto de las fibras con el agar (AATCC Test Method 147-2004). Finalmente, las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C/24 h y se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano, usando como control fragmentos de algodón quirúrgico estéril sin tratamiento.

Posteriormente se realizó la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las fibras adaptando la metodología de Durán *et al.*, 2007, tomando fragmentos de textil más grandes y modificando el medio de cultivo por caldo nutritivo, además en nuestro caso se evaluó la disminución de los recuentos bacterianos en unidades logarítmicas a diferencia de los sugerido por dichos autores en donde evaluaron el porcentaje de reducción bacteriana como se menciona a continuación.

Se tomaron fragmentos de 2 cm de largo de las fibras A- AgNp's-C y A-AgNp's-RBi y se dispusieron por separado en un vial que contenía 1mL de agua destilada estéril durante 10 minutos. A continuación, a estos viales se le agregó 1,5 mL de caldo nutritivo y se inocularon con una alícuota de 10 uL de suspensión bacteriana de *Pectobacterium carotovorum* a una DO 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Los viales fueron incubados a 28°C y a las 24 y 48 h de incubación se realizó el recuento en placa, utilizando el medio de cultivo agar nutritivo, para evaluar la actividad bactericida de las fibras de algodón. Un vial sin fibras antimicrobianas fue el control negativo del experimento y todos los recuentos se realizaron por triplicado.

#### **4.2.4 Prueba de reuso de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por *Fusarium oxysporum***

La efectividad antimicrobiana las fibras A-AgNp's- C y A-AgNp's-RBi se evaluó durante tres usos consecutivos modificando la metodología sugerida por Durán *et al.*, 2007. Para esto se tomaron fragmentos de los dos tipos de fibras de 2 cm de largo y se dispusieron por separado en un vial que contenía 1mL de agua destilada estéril durante 10 minutos. Posteriormente a estos viales se les agregó 1,5 mL de caldo nutritivo, y se inocularon con una alícuota de 10 uL de suspensión bacteriana de *Pectobacterium carotovorum* a una DO 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Los viales fueron incubados a 28°C/48 h, realizando el recuento en placa utilizando el medio de cultivo agar nutritivo. Luego, las fibras antibacteriales ya utilizadas, fueron enjuagadas con agua destilada estéril y se volvieron a evaluar bajo el mismo el procedimiento dos veces consecutivas. Un vial sin fibras antimicrobianas fue el control negativo del experimento y todos los recuentos se realizaron por triplicado.

#### **4.2.5 Evaluación de la retención de las AgNp's modificadas a fibras de algodón quirúrgico producidas por *Fusarium oxysporum***

Para conocer la retención de las AgNp's sobre las fibras, se ajustó el método sugerido por Durán *et al.*, 2007. Para esto se tomaron fragmentos de 2 cm de largo de las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi que fueron sometidas a cinco lavados sucesivos con agua destilada estéril. El efluente producto de estos lavados fue colectado para verificar su acción antimicrobiana debido a la presencia de AgNp's que se liberan en la solución. Se emplearon microplacas de 96 pozos, los pozos en evaluación fueron inoculados con 50µL de cada uno de los efluentes y 50µL del cultivo bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* a una DO de 0,1 que corresponde a  $2,2 \times 10^7$  UFC/mL (7,3 Log UFC/mL). Las microplacas fueron incubadas en agitación a 28°C/ 48h y se realizó su lectura a 590 nm después del tiempo de incubación. Luego se reemplazó el valor de absorbancia obtenida en la ecuación de la curva de calibración (Sección 2.3.8.1-Figura 2.7) por el número de UFC/mL, para obtener los recuentos correspondientes en Log UFC/ mL y verificar la acción antibacterial de los efluentes evaluados, lo cual es un indicador de la retención de las AgNp's a sus soportes. Se empleó un medio de cultivo inoculado como control positivo y agua destilada estéril como control negativo. Todas las lecturas se realizaron por triplicado. Finalmente, como verificación adicional de la presencia de AgNp's en los efluentes producto de cada lavado, se realizó un espectro UV-VIS entre 300 y 700 nm a cada muestra, con el fin de observar el máximo de absorción propio de las AgNp's y el comportamiento de la absorbancia.

#### **4.2.6 Inmovilización de las AgNp's con acción antibacterial sobre fibras de fique como prueba piloto de un costal antibacterial**

Debido a que la papa en postcosecha se almacena generalmente en costales de fique, se propuso realizar la inmovilización de las AgNp's con acción antibacterial ya comprobada, sobre este tipo de fibras para generar un tipo de empaque que se adapte mejor a las condiciones reales. Para esto se empleó la cationización como metodología de inmovilización (Castellanos *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2015), ya que la heterogeneidad estructural de la superficie porosa de las fibras de fique es fundamental para facilitar la captura de AgNp's por este método (Castellanos *et al.*, 2012), además por facilidad técnica y por los antecedentes obtenidos con las fibras de algodón en donde se evidenció que este método es el que generó menor lixiviación del material, manteniendo la actividad antibacterial de la fibra. Luego y para verificar la eficiencia de la modificación de las fibras de fique con AgNp's se realizó la caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM- EDX) y análisis de DRX.

#### 4.2.7 Determinación del peso del tejido macerado de los tubérculos almacenados en sacos antibacteriales

Después de comprobar la eficiencia del material nanoestructurado fique-AgNp's (*in vitro*), se fabricó el potencial saco antibacterial siguiendo la metodología de cationización, pero a mayor escala. Así, sacos de fique- AgNp's con una dimensión de 10 x 12 cm fueron desarrollados y con estos se realizó un último experimento con tubérculos almacenados (*in vivo*). Este último ensayo se realizó con el fin de evidenciar el efecto protector del saco antibacterial sobre el desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda del tubérculo, bajo condiciones más reales de poscosecha de papa. En el ensayo se plantearon un control positivo que incluía una papa infectada almacenada en un saco tradicional estéril (C+), un tratamiento que consistió en una papa infectada y dispuesta en un saco antibacterial estéril (Fique-AgNp's (T1), y un control negativo (C-) que era una papa sana en un saco antibacterial (Fique-AgNp's). El experimento fue realizado por triplicado.

Para realizar los experimentos se seleccionaron tubérculos de aproximadamente 20g, como unidades experimentales, lo cuales fueron lavados, desinfectados con etanol al 70% y enjuagados con agua destilada estéril. Posteriormente, para el caso de los tuberculos infectados, estos fueron sumergidos por cinco minutos en un cultivo de *Pectobacterium carotovorum* a una DO de 0,3 que corresponde a  $8,9 \times 10^7$  (7,9 Log UFC/mL) como dosis infectiva. Luego los tubérculos tratados fueron dispuestos en su embalaje respectivo, y se mantuvieron a 28 °C/7 días. Pasado el tiempo de incubación se determinó el peso del tejido macerado en gramos de cada tubérculo y se calculó el porcentaje de afectación en cada caso.

#### 4.2.8 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey al 5% para evaluar la actividad antibacterial que ejercen las fibras sobre el agente fitopatogéno, para verificar su efectividad después de tres usos consecutivos, para evaluar la retención de las AgNp's a sus soportes y para determinar el peso de tejido afectado en tubérculos almacenados en sacos tradicionales y antibacteriales.

### 4.3 Resultados y discusión



### **4.3.1 Obtención de AgNp's con acción antibacterial a partir de *Fusarium oxysporum***

Las AgNp's a inmovilizar sobre las fibras naturales se obtuvieron a partir de *Fusarium oxysporum* empleando las mejores condiciones de síntesis (Sección 3.3.1- Figura 3.4), estas fueron caracterizadas por diversas técnicas tal como lo mostró la sección (3.3.2), y además su actividad antibacterial frente al agente fitopatógeno *P. carotovorum* fue verificada como se indicó en las secciones 3.3.3.1 y 3.3.3.2.

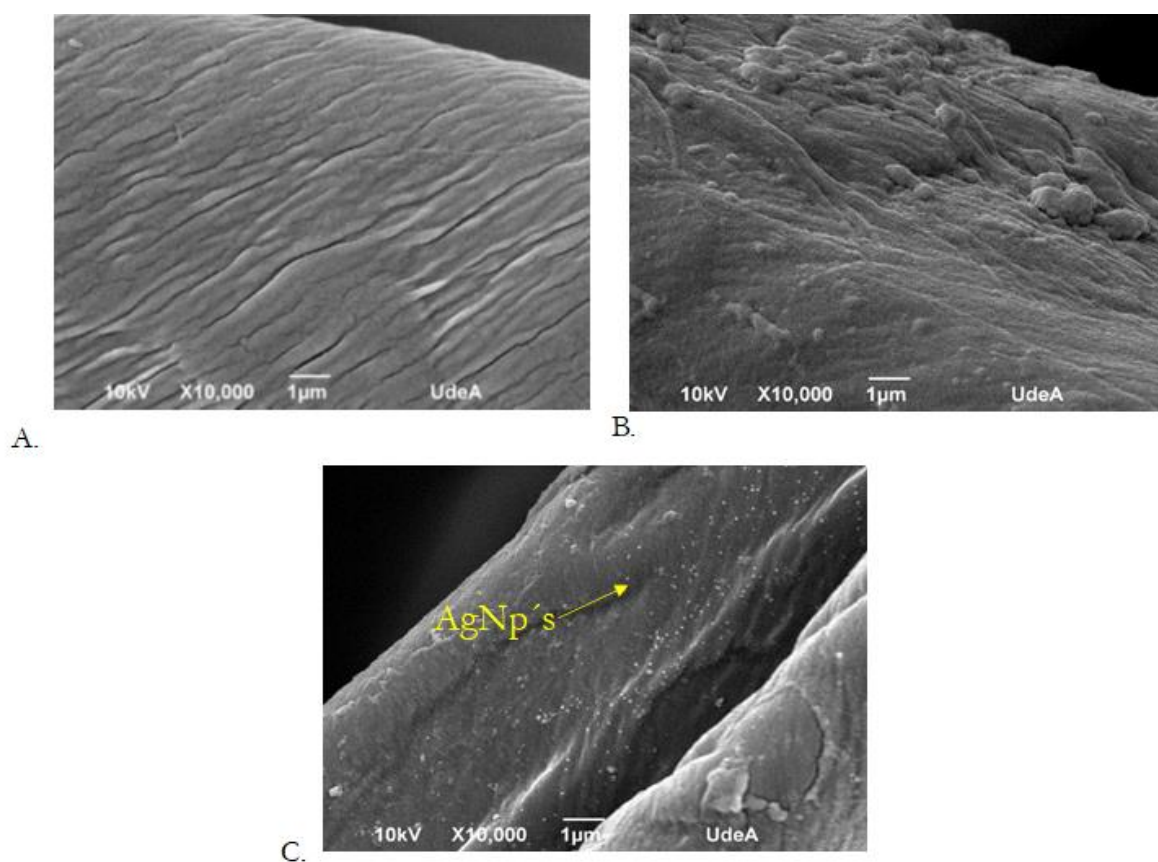
### **4.3.2 Inmovilización de las AgNp's producidas *Fusarium oxysporum* en una fibra de algodón quirúrgico y su caracterización**

Varios tipos de nanopartículas han sido ensamblados sobre celulosa para otorgarle actividad catalítica o antibacterial (Diez *et al.*, 2011). Otros estudios han mostrado que las fibras de celulosa pueden ser usadas como soporte durante la síntesis de nanopartículas, empleando métodos *in situ* y por ensamblaje electrostático, haciendo uso de su estructura nanoporosa (He *et al.*, 2003; Dong & Hinestroza 2009; De santamaria *et al.*, 2009). Por lo tanto, la posibilidad de inmovilizar AgNp's en estos sustratos es relevante pues estos nanocomplejos, o materiales nanoestructurados, muestran una actividad antimicrobiana superior que la plata en estado coloidal (Adepu *et al.*, 2017) y se ha reportado que la toxicidad potencial de las AgNp's puede prevenirse debido a que su tasa de lixiviación al ambiente se reduce, lo que genera beneficios desde el punto de vista ambiental y para la salud en general (Adepu *et al.*, 2017).

#### **4.3.2.1 Modificación por cationización**

Después de realizar la modificación de las fibras de algodón con AgNp's empleando la cationización como metodología de anclaje, las fibras adquirieron un cambio en su coloración tornándose de color café. Ha sido reportado que la impregnación de AgNp's a un soporte, se puede visualizar por la coloración de amarillo o café que adquieren dichos sustratos y que dicha coloración se vuelve más oscura con el incremento del contenido de AgNp's (Cai *et al.*, 2009; Emam *et al.*, 2015; Pivec *et al.*, 2017; Marrez *et al.*, 2019). Para verificar la eficiencia de la modificación de las fibras A-AgNp's-C, se realizaron micrografías SEM, y tal como se observa en la Figura 4-1B, ocurrió un cambio de morfología de la fibra al cationizarse con respecto al control (Figura 4-1 A). Esto pudo deberse a que la exposición de fibras de celulosa a condiciones altamente alcalinas puede promover la destrucción de los puentes de hidrógeno intermoleculares, con la consecuente afectación de su estructura superficial (Gañan & Mondragón, 2002;

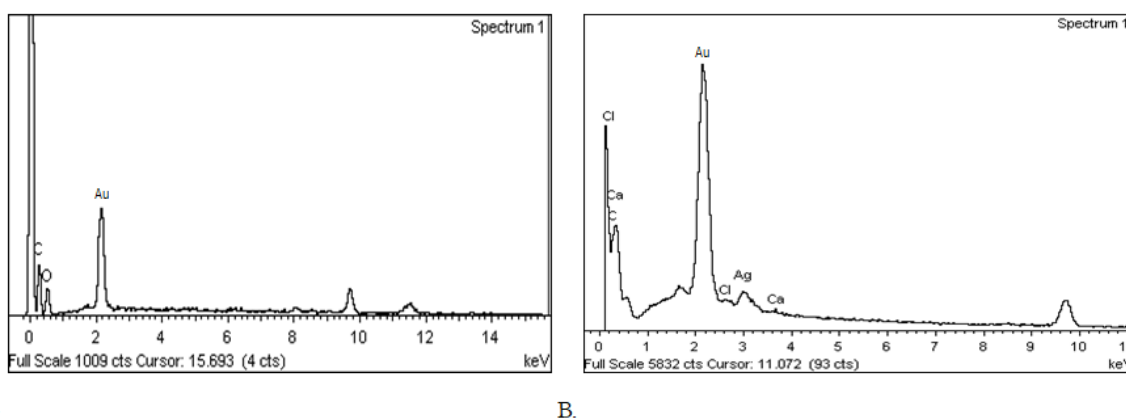
Pivec *et al.*, 2017). Adicionalmente en la figura 4-1 C se observan AgNp's adheridas a la superficie de la celulosa sin la presencia de agregados, lo que indica una modificación exitosa. Ha sido reportado que mediante la modificación por cationización se tiene la ventaja de que se establecen interacciones electrostáticas entre la celulosa cationizada y las nanopartículas cargadas negativamente lo que favorece su retención (Dong *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2015). La retención de AgNp's en un soporte es relevante, pues esto favorece su estabilidad, ya que las AgNp's en suspensión coloidal poseen una fuerte tendencia a agregarse y a perder su actividad. Además, los soportes permiten una tasa de liberación apropiada de acuerdo con su posterior aplicación (Zeng *et al.*, 2007).



**Figura 4-1:** Micrografías SEM de; A) Fibras de algodón quirúrgico control, B) Fibras de algodón quirúrgico cationizadas, y C) Fibras A-AgNp's-C.

Mediante el análisis SEM-EDS se logró comprobar la composición elemental de las AgNp's presentes en la fibra A-AgNp's-C, observándose una señal para el átomo de plata a los 3 KeV (Figura 4-2), esta misma señal ya había sido identificada en el análisis SEM-EDS de las AgNp's obtenidas a partir de *F. oxysporum* en suspensión (Figura 3-6). La presencia de los demás elementos (Ca y Cl), se atribuye al

proceso industrial del blanqueamiento del algodón quirúrgico, en donde se emplean compuestos como hipoclorito de calcio. Este análisis también fue realizado por Emam *et al.*, 2015 quienes inmovilizaron AgNp's obtenidas a partir de goma xantana en fibras de algodón, encontrando la misma señal característica a los 3 KeV. De otro lado Ahamed *et al.*, 2015 fabricaron un biomaterial de la mezcla de celulosa, quitosan impregnado con AgNp's con y sin el antibiótico gentamicina como material para apósitos en heridas experimentales de ratas, en ese estudio el espectro EDS también mostró la presencia de plata con la señal correspondiente a los 3 KeV.



**Figura 4-2:** Análisis SEM-EDS de las fibras; A) Fibra de algodón control, y B) Fibras A-AgNp's-C.

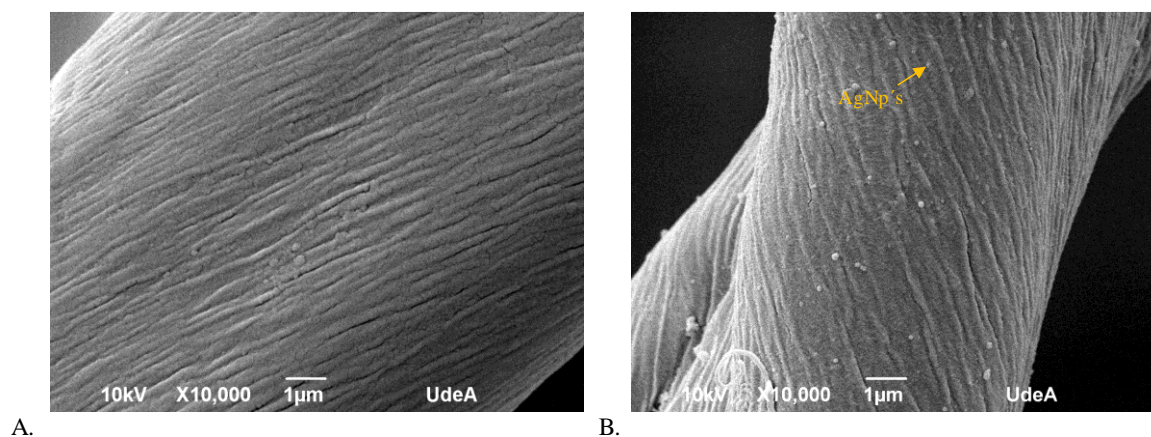
#### 4.3.2.2 Modificación por reducción bioquímica *in situ*

La reducción bioquímica *in situ* involucra el crecimiento o formación de las AgNp's directamente sobre las fibras ya que los iones plata al movilizarse al interior de la matriz fibrosa permiten iniciar el proceso de formación y crecimiento de las AgNp's, y al final estas quedan inmersas en la fibra y en su superficie, por esta razón se considera una reacción *in situ* (Dong & Híneztroza, 2009; Xu *et al.*, 2018).

La formación de las AgNp's en la matriz de celulosa se pudo corroborar a simple vista por el cambio de color de las fibras que viraron de gris hasta un color café oscuro (Sivaranjana *et al.*, 2017). Las micrografías SEM (Figura 4-3), permiten comprobar que se dió la reducción bioquímica *in situ* sobre las fibras de algodón quirúrgico al emplear como agente reductante el filtrado celular libre de micelio (FCLM) obtenido a partir de *Fusarium oxysporum*.

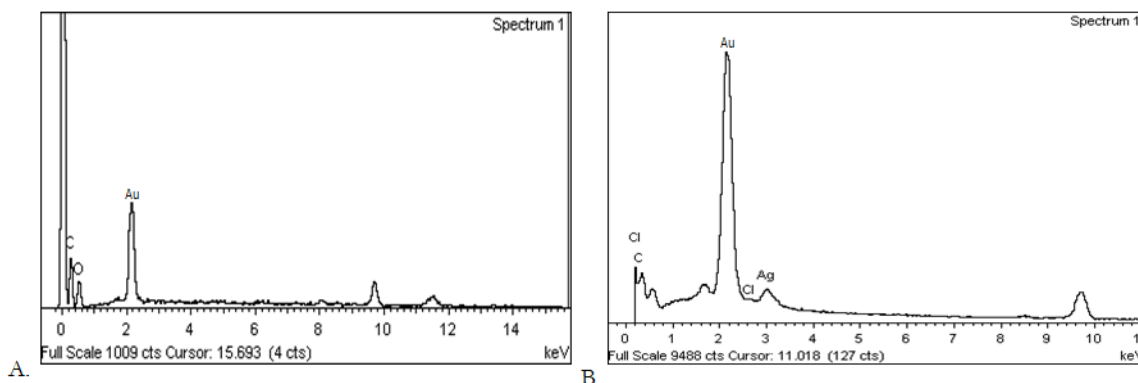
Las fibras de celulosa cuentan con superficies heterogéneas con muchos poros y grietas que se pueden utilizar eficazmente como centros de nucleación y estabilización para la síntesis de AgNp's a nivel *in situ* (He *et al.*, 2003; Padalkar *et al.*, 2010). La estructura porosa de la celulosa estabiliza las AgNp's gracias a la alta densidad de oxígeno que rodea la nanopartícula, esto hace posible que se genere un efecto similar al denominado "efecto éter corona", en donde los átomos de oxígeno se ligan fuertemente formando complejos químicos en forma de anillo con superficies hidrofóbicas, en donde el catión se ubica en el interior de este (Ovalle *et al.*, 2013). De otro lado, la celulosa también tiene carácter reductor gracias la presencia de grupos OH, lo que también pudo favorecer el proceso de reducción *in situ* (Barud *et al.*, 2008; Pivec *et al.*, 2017).

En la superficie de la fibra A-AgNp's-RBi se pueden observar AgNp's dispersas sin la presencia de agregados con respecto al control (Figuras 4-3A y 4-3B), la ausencia de agregados de AgNp's sobre la fibra es lo ideal, dado que ya ha sido informado que cuando las AgNp's se agrupan, pueden perder su actividad antibacteriana (Adepu *et al.*, 2017). En este caso el potencial z negativo de las AgNp's de *Fusarium oxysporum* pudo contribuir a su repulsión haciendo que permanecieran dispersas aún sobre el sustrato. Estos resultados difieren a lo reportado por De Santamaría *et al.*, 2009 en donde el análisis SEM indica que las AgNp's aparecen como agregados de tamaño mayor a 100 nm sin morfología definida sobre las fibras.



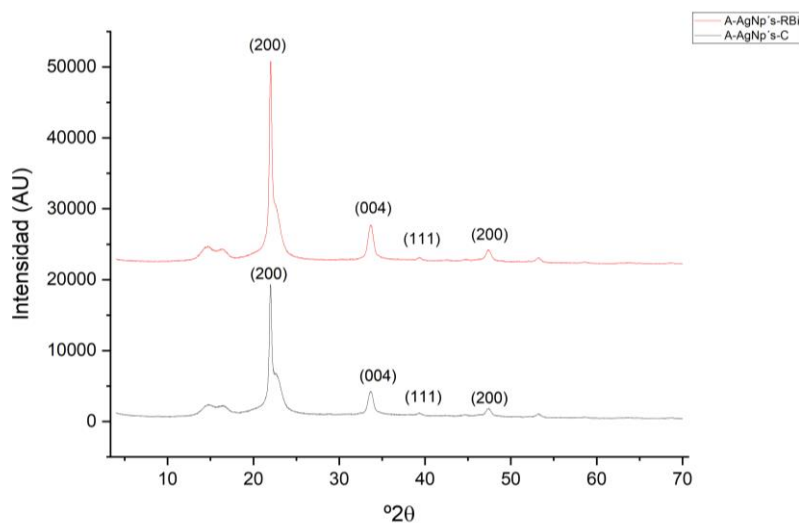
**Figura 4-3:** Micrografías SEM de; A) Fibras de algodón quirúrgico control, y B) Fibras A-AgNp's-RBi.

Mediante el análisis SEM- EDS se logró comprobar la composición elemental de las AgNp's inmovilizadas en las fibras A-AgNp's-RBi, observándose una señal característica para el átomo de plata a los 3 KeV (Figura 4-4), también observado para las AgNp's en suspensión y para las fibras A-AgNp's-C.



**Figura 4-4:** Análisis SEM-EDS de las fibras; A) Fibras de algodón quirúrgico control, y B) Fibras A-AgNp's-RBi.

De otro lado, el análisis DRX de las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi permitió verificar la composición cristalina de la plata adherida a la superficie de la celulosa. En ambos casos se pudo evidenciar patrones de difracción similares, con señales en los ángulos  $21,09^\circ$  (200),  $33,7^\circ$  (004) propios de la celulosa, principal constituyente de la fibra del algodón quirúrgico (Barud *et al.*, 2008; Drogat *et al.* 2010; Adepu *et al.*, 2017) y otros ángulos de difracción en posiciones  $39,4^\circ$  (111) y  $47,4^\circ$  (200) correspondientes a la plata en una estructura cristalina cúbica centrada en las caras cuando está inmovilizada en el sustrato vegetal (Figura 4-5).

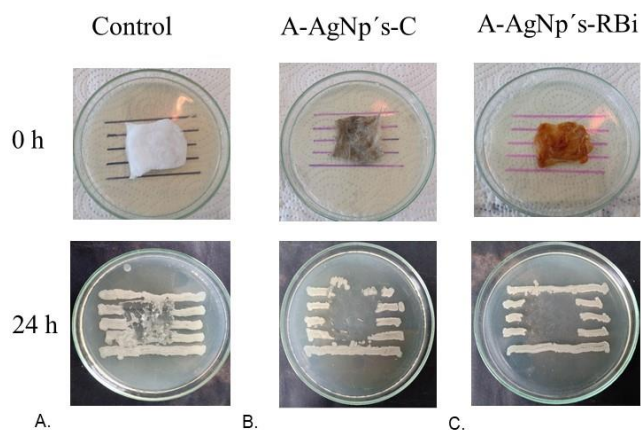


**Figura 4-5:** Análisis de difracción de rayos X de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum*.

Estas mismas señales fueron reportadas por Ovalle *et al.*, 2013 al realizar la síntesis *in situ* de AgNp's sobre fibras de fique y también por Arif *et al.*, 2015 quienes fabricaron un tejido de algodón con nanopartículas de quitosano y plata cuyo análisis DRX mostró las señales ya mencionadas para la plata.

### 4.3.3 Actividad antimicrobiana de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por *Fusarium oxysporum*

El método de la estría paralela es una prueba cualitativa que permite conocer el potencial antibacterial de materiales textiles, al ponerlos en contacto sobre un medio de cultivo inoculado con una bacteria con el fin de observar la inhibición de crecimiento producto de su actividad (ATCC Test Method 147-2011). En este experimento, al retirar los fragmentos de las diferentes fibras en evaluación que estaban ubicadas sobre los cultivos microbianos, se observó que los dos tipos de fibras mostraron actividad antibacterial, ya que, en las áreas de contacto con el medio de cultivo, no se observó crecimiento bacteriano, a diferencia de lo ocurrido con la fibra control en donde el crecimiento bacteriano no fue inhibido (Figura 4-6).



**Figura 4-6:** Resultados de la prueba de difusión en agar por el método de la estría paralela para verificar la actividad antibacterial de; A) Fibras de algodón control, B) Fibras A- AgNp's-C, y C) Fibras A-AgNp's-RBi.

Otros investigadores han determinado la actividad de nanocomplejos obtenidos por diversas rutas frente a bacterias de importancia clínica. Tal es el caso de Arif *et al.*, 2015 quienes evaluaron la actividad antibacteriana de un material antibacteriano a base algodón, quitosano y AgNp's obtenidas por ruta tradicional empleando la técnica de la estría paralela frente a bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* y Gram positivas como *B. cereus* y *S. aureus*, encontrando también zonas de inhibición de crecimiento. Diez *et al.*, 2011 evaluaron la actividad antibacterial frente a *E.coli* de nanocomplejos de

celulosa- plata fluorescente, obtenidas tradicionalmente, encontrando zonas de inhibición que se produjeron gracias a la liberación de iones plata o *nanoclusters*, indicando que existen diversos factores que pueden afectar la disolución de iones plata al medio, como el tiempo de exposición, temperatura y pH del agar.

Posteriormente, para comprobar la actividad antibacterial evidenciada en la prueba de la estría paralela, se realizó una evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las fibras. En este experimento, después de poner en contacto las fibras (A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi) con un cultivo líquido de *P. carotovorum* se estimaron los recuentos de células viables después de la incubación a las 24 y 48 horas. Al realizar tales recuentos, se encontró que los dos tipos de fibras mostraron actividad antibacterial, pues a las 24 horas se evidenció una disminución de los recuentos de *P. carotovorum* y a las 48 horas hubo inhibición completa del crecimiento bacteriano en todos los casos (Tabla 4-1). Estos resultados podrían indicar la efectividad de las dos metodologías de inmovilización, para obtener nanocomplejos con acción antibacterial, comprobando que existe una sinergia entre el soporte y las AgNp's.

**Tabla 4-1:** Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi sobre *Pectobacterium carotovorum*.

Tipo de fibra	Recuentos Log UFC/mL a las 24 horas	Recuentos Log UFC/mL a las 48 horas
A- AgNp's-C	3,0 ±0,01 <sup>c</sup>	<1 <sup>b</sup>
A-AgNp's-RBi	3,1 ±0.01 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>
Fibras control	7,4±0.001 <sup>a</sup>	7,4±0.001 <sup>a</sup>

El recuento reportado es promedio de tres réplicas ± error estándar. En cada momento de evaluación letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%. < 1 Log UFC/mL es el límite de cuantificación de la técnica (Sutton, 2011).

La mayoría de los estudios que evalúan la actividad antibacterial de nanocomplejos utilizan el porcentaje de reducción bacteriana como un indicador de dicha actividad. Se tienen algunos reportes del uso de nanocomplejos para el control de agentes patógenos de importancia clínica como Arif *et al.*, 2005 quienes determinaron el porcentaje de reducción bacteriana de un material a base de algodón, quitosán y AgNp's mostrando una reducción del 99% frente a *S. aureus* y 98% frente a *E. coli*. Por otra parte, Ilic *et al.*, 2009 evaluaron la eficiencia antimicrobiana de AgNp's obtenidas por ruta química frente a *E.coli*, *S. aureus* y el

hongo *Candida albicans* encontrando porcentajes de reducción de 99,7; 99,9 y 99,8 % respectivamente. En el estudio de Adepu *et al.*, 2017 prepararon nanocomplejos de celulosa bacteriana y nanopartículas de plata por reducción *in situ* empleando borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) como agente reductor, estos complejos mostraron una actividad antimicrobiana del 99,9% frente a hongos y bacterias obtenidas de alimentos deteriorados, lo que se atribuyó a la liberación prolongada de AgNp's a partir de la matriz.

Pero en nuestro estudio se decidió realizar por primera vez la determinación de la reducción bacteriana en términos de Log UFC/mL como indicador de la actividad antimicrobiana de las fibras, ya que se ha estimado que un material o sustancia que reduzca en al menos tres unidades logarítmicas los recuentos bacterianos puede considerarse un agente antibacterial relevante (Pankey *et al.*, 2004). Basado en los resultados obtenidos se podría indicar que las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi son materiales biodegradables y antibacteriales eficientes. Es de resaltar que el uso de este tipo de materiales para el control de un agente fitopatogéno no ha sido reportado, resultados que son prometedores a la hora de generar algún empaque de tipo antibacterial a nivel del almacenamiento de papa.

#### 4.3.4 Prueba de reuso de las fibras de algodón quirúrgico modificadas con AgNp's producidas por *Fusarium oxysporum*

Es importante conocer la efectividad antibacterial de los nanocomplejos después de varios usos pues esto se relaciona con la vida útil del mismo. Los resultados indican que las fibras de algodón modificadas por los dos métodos retienen efectivamente las AgNp's después de tres usos consecutivos, aunque para las fibras A-AgNp's-RBi se puede observar una leve disminución de la efectividad de estas en el tercer uso (Tabla 4-2).

**Tabla 4-2:** Resultados de la prueba de reuso de las fibras A-AgNp's-C B y A-AgNp's-RBi

Tipo de fibra	Recuentos Log UFC/mL		
	Primer uso	Segundo uso	Tercer uso
A-AgNp's-C	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,5 <sup>b</sup>
A-AgNp's-RBi	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>
Fibras control	7,4 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,02 <sup>a</sup>



El recuento reportado es promedio de tres réplicas  $\pm$  error estándar. En cada uso, letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.  $< 1$  Log UFC/mL es el límite de cuantificación de la técnica (Sutton, 2011).

Posiblemente si se realizan más ciclos de resuso, la actividad antibacterial de las fibras irá disminuyendo, lo que es acorde con lo sugerido por Mohammed *et al.*, 2017 quienes indican que la actividad antibacterial de las telas antimicrobiana se correlaciona indirectamente con el número de lavados. Para evitar la pérdida de la actividad de las fibras tras usos sucesivos, Ilic *et al.*, 2009 sugieren que, para conseguir una actividad antimicrobiana duradera, las fibras deben cargarse con una gran cantidad de AgNp's, ya que un coloide de mayor concentración proporciona un aumento general de la superficie de plata activa debido a la alta relación superficie/volumen de cada nanopartícula.

La excelente actividad antimicrobiana de fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi después de varios usos, demuestra claramente que hay suficiente cantidad de iones  $\text{Ag}^+$  o AgNp's que se liberan de forma controlada para ejercer su acción antibacterial en el tiempo (Pivec *et al.*, 2017). Estos resultados permiten plantear la posibilidad de que, si se fabrican empaques para el almacenamiento de la papa a base de esas fibras antibacteriales, estos podrían ser reutilizables, lo cual también tendría implicaciones positivas de tipo ambiental a la hora de realizar la disposición final de dichos embalajes.

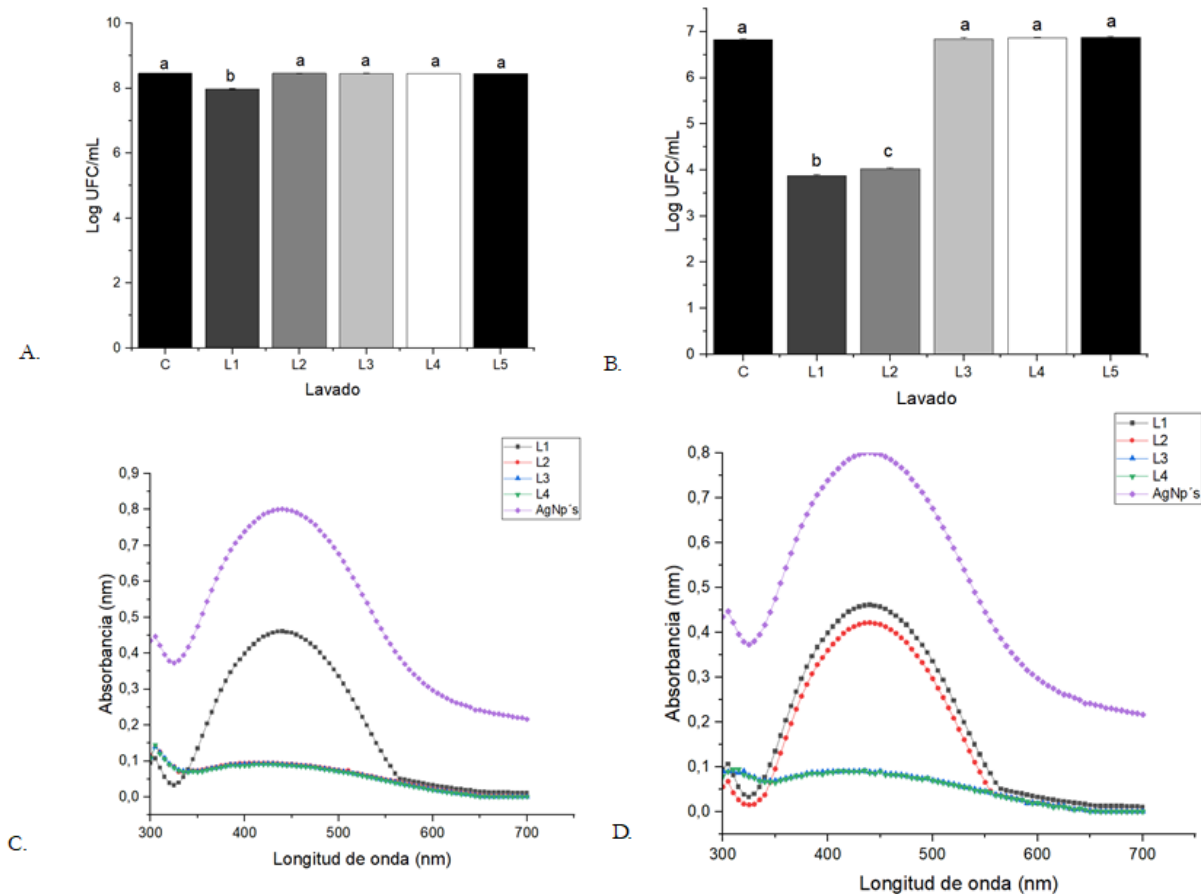
#### **4.3.5 Evaluación de la retención de las AgNp's modificadas a fibras de algodón quirúrgico producidas por *Fusarium oxysporum***

Uno de los principales obstáculos tecnológicos de la modificación de las superficies textiles con AgNp's es su permanencia, la cual es relativamente baja, especialmente frente al lavado (Pivec *et al.*, 2017). En nuestro estudio se observó que las dos fibras evaluadas mostraron diferencias en su tasa de retención de las AgNp's inmovilizadas. Es importante resaltar para este experimento, que la presencia de AgNp's en el efluente producto de los lavados es la responsable de la acción antibacterial frente al fitopatógeno. En ese sentido, para las fibras A-AgNp's-C se puede observar que durante el primer lavado hubo lixiviación de las AgNp's inmovilizadas y por esa razón los recuentos bacterianos son menores a los del control positivo del experimento (cultivo de *Pectobacterium carotovorum* sin tratar), mientras que para las fibras A-AgNp's-RBi se evidenció lixiviación del nanomaterial durante los dos primeros lavados y es por eso que solo hasta el tercer lavado los recuentos bacterianos fueron iguales a los del control positivo (Figura 4-7 A- B).

De otra parte, y para comprobar los anteriores resultados, se realizaron espectros UV-Vis a los efluentes, lo que permite hacer un seguimiento de la presencia de AgNp's en solución. Se encontró que las fibras A-AgNp's-C liberaron una menor cantidad de AgNp's al efluente, pues solo hasta el segundo lavado, se observó una disminución en las unidades de la absorbancia y la desaparición del máximo de absorción que se asocia con la presencia de AgNp's. Mientras que para las fibras A-AgNP's-RBi, se evidenció por UV-Vis una mayor lixiviación de las AgNp's al efluente producto de los lavados, ya que solo hasta el tercer lavado hubo ausencia de AgNp's en los efluentes (Figura 4-7 C-D), todo lo anterior explicaría la acción antibacteriana que se evidenció por parte de los efluentes evaluados durante la prueba.

Estos resultados se relacionan con la eficiencia antibacteriana de las fibras después de varios ciclos de lavado y en ese caso se podría indicar que las fibras más eficientes serían las fibras A-AgNp's-C. Este parámetro ha sido evaluado en diferentes tipos de nanocomplejos por algunos autores encontrando que aún después de 20 lavados las fibras siguen ejerciendo una acción antibacteriana de al menos el 50% con relación a la que se presentaba antes de los lavados (Emam *et al.*, 2005; Arif *et al.*, 2015). Al respecto se ha indicado que dicha eficiencia podría incrementarse si a las fibras tratadas se les adiciona un agente ligante o aglutinante en el proceso como por ejemplo el acrilato (El-rafie *et al.*, 2010), o si se emplean altas temperaturas durante el proceso de recubrimiento de las fibras con las AgNp's pues esto incrementa su adherencia a soporte (Pivec *et al.*, 2017).

Por último, a pesar de que en este estudio no se cuantificó la concentración de AgNp's lixiviadas, este ensayo de retención de las AgNp's a las fibras podría sugerir que la tasa de lixiviación fue baja y esto es relevante si se llega a fabricar un empaque para el almacenamiento de papa, debido a la potencial toxicidad de las AgNp's y sus implicaciones en la salud. En ese sentido el estudio realizado por Avella *et al.*, 2005 mostró que la migración de AgNp's a partir de un nanocomplejo de almidón-arcilla empleado para almacenar vegetales fue mínima, sin embargo, en el estudio se aclara que se necesitan más investigación para llegar a una declaración concluyente.



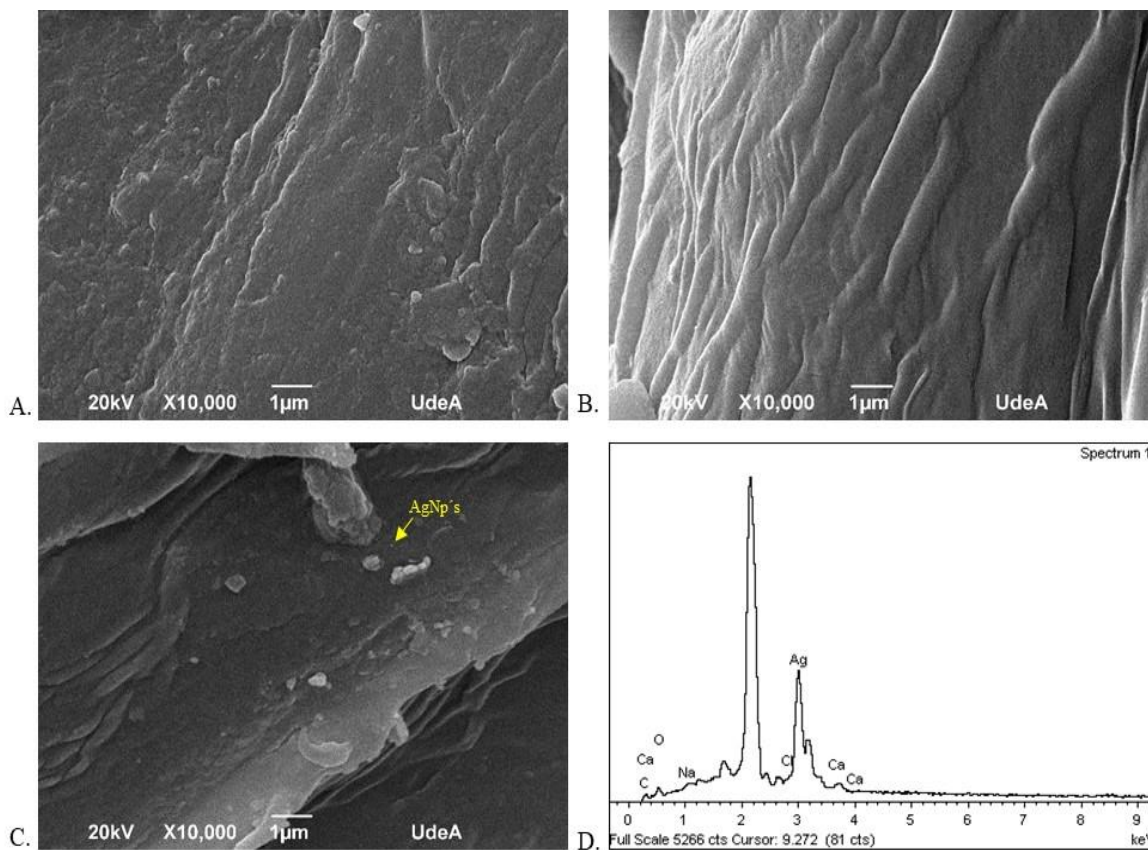
**Figura 4-7:** Actividad antibacteriana de los efluentes producto de cinco lavados sucesivos de las fibras de algodón (L1-L5) como indicador de la retención de las AgNp's ; A) A-AgNp's-C, B) A-AgNp's-RBi y espectros UV-VIS para las AgNp's presentes en los efluentes producto de lavado de las fibras; C) A-AgNp's-C, y D) A-AgNp's-RBi tras cinco lavados sucesivos (L1-L5). Los recuentos bacterianos son promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.

### 4.3.6 Inmovilización de las AgNp's con acción antibacterial sobre fibras de fique como prueba piloto de un costal antibacterial

Estudios anteriores han demostrado que materiales nanoestructurados fabricados a base de fibras vegetales duras, que se caracterizan por ser fuertemente lignificadas y de textura rígida, como el fique, pueden ser usados bajo condiciones extremas de temperatura, humedad y presión, sin que se afecte su funcionalidad (Emam *et al.*, 2015). Por esa razón se realizó un proceso de inmovilización de AgNp's sobre fibras de fique con el objetivo de desarrollar el piloto de un costal antibacterial como potencial aplicación para el almacenamiento de papa en postcosecha.

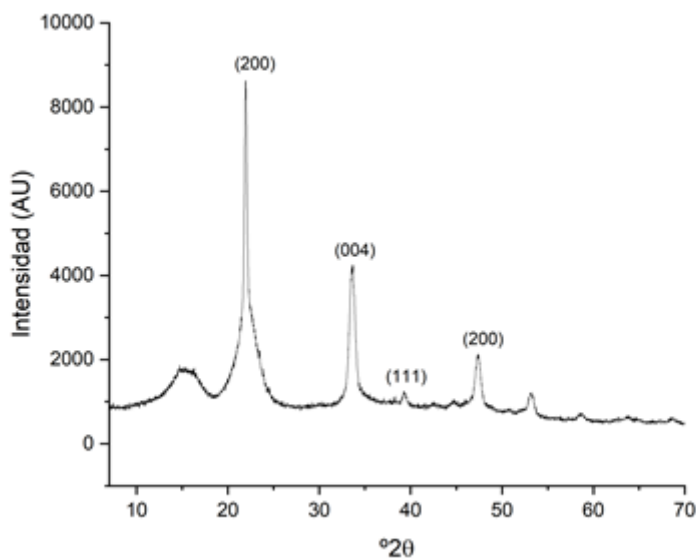
Inicialmente se observó que, tras la modificación, las fibras sufrieron un cambio en la coloración desde un color amarillo hasta un tono café oscuro, lo que sugiere que las AgNp's se han inmovilizado (Kong *et al.*, 2015). Sin embargo, para comprobar el éxito del proceso se realizó el análisis SEM a las fibras de fique, en cada una de las etapas del método que son la cationización y el posterior ensablaje de las AgNp's. Se encontró que después del proceso de cationización se observó un cambio en la morfología de las fibras, ya que perdieron su rugosidad y su superficie se tornó más uniforme con respecto al control, además las condiciones altamente alcalinas pueden incrementar el diámetro de la fibra debido a la pérdida de la lignina (Castellanos *et al.*, 2012) (Figuras 4-8A y 4-8B).

Luego, durante el proceso de ensamblaje de AgNp's, se lograron observar algunos puntos brillantes sobre las fibras de fique que se asocian con la presencia de agregados de AgNp's (Figura 4-8C). La presencia de agregados en fibras naturales ha sido reportada por otros autores como Ibrahim *et al.*, 2016 quienes observaron *clusters* o agrupaciones de AgNp's sobre las fibras de algodón analizadas debido a procesos de agregación a pesar de haber utilizado el procesamiento por ultrasonidos antes del acabado, lo que favorece la disgregación de AgNp's. Por su parte Xu *et al.*, 2015 indicaron que en su estudio las AgNp's no solo estaban embebidas dentro de la fibra de celulosa sino también en la superficie formando agregados lo que puede tener incidencia en la actividad antibacterial del nanocomplejo. Finalmente, la presencia de plata en la superficie de la fibra de fique-AgNp's se pudo comprobar con el análisis SEM-EDS (Figura 4-8D).



**Figura 4-8:** Micrografías SEM de; A) Fibras de fique control sin tratamiento, B) Fibras de fique cationizadas, C) Fibras de fique –AgNp’s, y D) Análisis SEM-EDS de las fibras modificadas.

De igual forma el análisis de difracción de rayos X de las fibras de fique-AgNp’s comprobó la naturaleza cristalina de las AgNp’s inmovilizadas, presentando el mismo patrón de difracción al reportado para los nanocomplejos de algodón (Figura 4-9). Similarmente, Ovalle *et al.*, 2013 sintetizaron un material nanocomplejo mediante la deposición *in situ* de AgNp’s sobre fibras de fique confirmando mediante análisis DRX la presencia de plata sobre el sustrato, dado que en el difractograma se observan señales correspondientes a la plata en una estructura cristalina cúbica centrada en las caras en los ángulos  $38,08^\circ$  (111) y  $47,30^\circ$  (200).

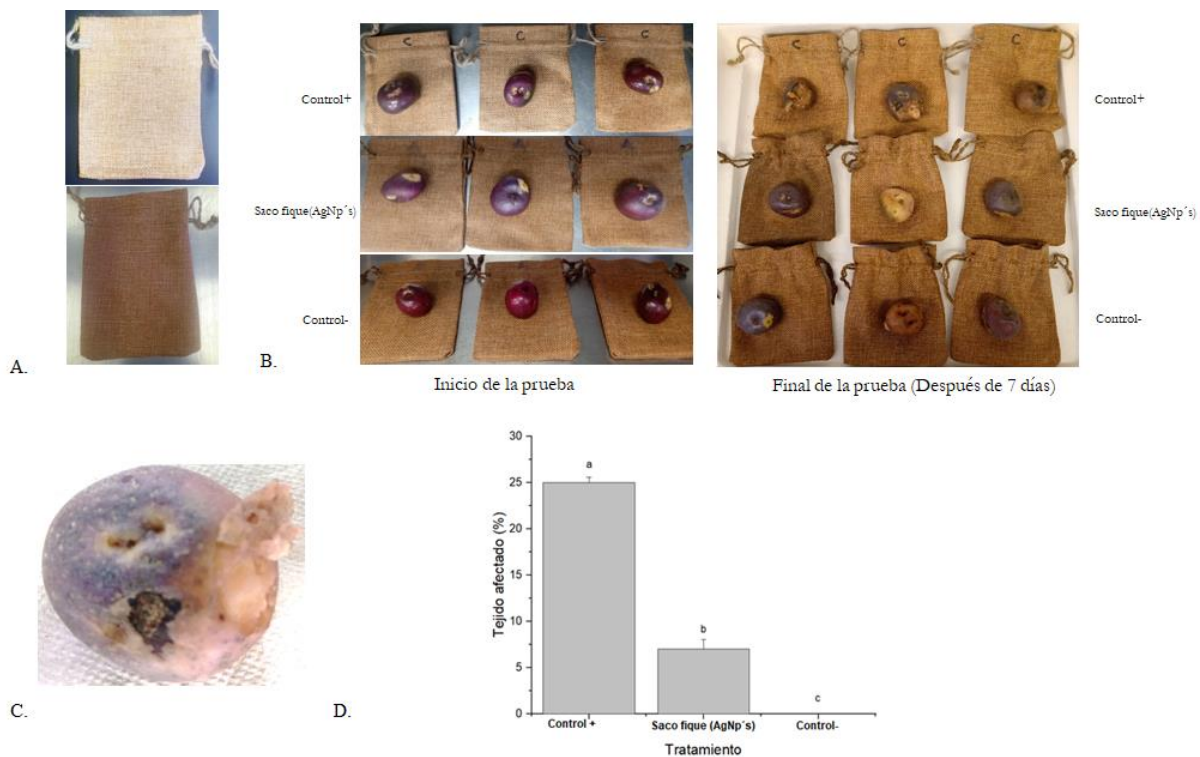


**Figura 4-9:** Análisis de difracción de rayos X de las fibras de fique funcionalizadas con AgNp's por cationización.

#### 4.3.7 Determinación del peso del tejido macerado de tubérculos almacenados en costales antibacteriales

Para verificar la acción antibacterial de los sacos antibacteriales (Fique-AgNp's) se realizó un último ensayo de almacenamiento de papa bajo condiciones controladas. Como se ha mencionado antes, los síntomas propios de la pudrición blanda sobre el tubérculo incluyen la maceración de tejido vegetal y por esa razón este parámetro se definió como la variable respuesta del experimento. Se encontró que después del tiempo de almacenamiento en los dos tipos de sacos, se encontraron diferencias en el peso del tejido macerado y en el porcentaje de afectación de cada tubérculo ( $p \leq 0.05$ ).

Para los tubérculos almacenados en el saco tradicional se encontró un peso de tejido macerado promedio de 5 g que corresponde a un porcentaje de afectación del 25% y para los tubérculos almacenados en el saco antibacterial (Fique-AgNp's) un peso de tejido macerado del 1,6 g que corresponde a un porcentaje de afectación del 7,8% (Figura 4-10).



**Figura 4-10:** Fotografías de; A) Saco tradicional (arriba) y saco antibacterial (Fique AgNp's) (abajo), B) Montaje y resultado del experimento para la determinación del peso de tejido macerado de tubérculos infectados con *Pectobacterium carotovorum* almacenados en sacos antibacteriales y tradicionales C) Maceración de tejido en tubérculo infectado por *Pectobacterium carotovorum*, y D) Porcentaje de tejido afectado de tubérculos almacenados en sacos tradicionales (C+) y sacos antibacteriales. El porcentaje de tejido afectado de los tubérculos es promedio de tres réplicas. Las barras corresponden a la media promedio con su respectivo error estándar. Letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey al 5%.

Con estos primeros resultados de la efectividad del costal antibacterial, se sientan las bases para la realización de estudios a mayor escala y se espera que dicho desarrollo pueda contribuir en la etapa de almacenamiento de papa en postcosecha para proteger al alimento no solo frente al fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* sino otros agentes ya que se ha comprobado que las AgNp's tienen otro tipo de acción pesticida.

#### 4.4 Conclusiones

En esta investigación se lograron inmovilizar AgNp's obtenidas por micosíntesis a partir de *Fusarium oxysporum* sobre fibras de algodón quirúrgico empleando dos metodologías que permitieron preparar las fibras denominadas A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi. Dichas fibras fueron evaluadas como materiales

antibacteriales para el control del agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* inhibiendo su crecimiento. Se pudo comprobar que dichas fibras son efectivas después de tres usos sucesivos independientemente del método de modificación empleado. También se verificó que las AgNp's permanecen adheridas a las fibras A-AgNp's-C y A-AgNp's-RBi después de dos y tres lavados sucesivos respectivamente. Al inmovilizar las AgNp's sobre fibras de fique por cationización se pudo fabricar el piloto de un empaque antibacterial para el almacenamiento de papa que permitió reducir el porcentaje de tejido macerado del 25 % que resultó después de almacenar los tubérculos en sacos tradicionales a un 7,8 %. Además de su efectividad antibacterial, este saco resultaría ser biodegradable y con bajo impacto ambiental.



## Capítulo 5 : Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

1. El estudio de bioprospección en suelos de páramo cultivado con papa permitió el aislamiento de cinco hongos pertenecientes a las especies *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger*, y *Fusarium oxysporum*. Los cuales mostraron potencial para la biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata (AgNp's), que fue confirmado por la espectroscopía UV-VIS, evidenciándose máximos de absorción entre 420 y 475 nm.
2. El análisis TEM y el análisis de esfericidad reveló la forma esférica de las AgNp's obtenidas con tamaños entre 15 y 45 nm, mientras que el análisis DLS mostro tamaños entre 37,8 y 71, 6nm, índices de polidispersidad < a 0,7 y por su parte el potencial Z determinó la carga negativa de todas ellas.
3. La concentración de AgNp's producida por los hongos seleccionados se relacionó con su actividad nitrato reductasa (NR), parámetros que no se han tenido en cuenta de forma rutinaria en los estudios de micosíntesis de AgNp's.
4. *Aspergillus niger* mostró la mayor actividad enzimática (NR), y fue la especie más eficiente en la producción de AgNp's en términos de cantidad en comparación con las especies estudiadas que pertenecen a los géneros *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.
5. Se verificó por difusión en agar la actividad antibacteriana de las cinco diferentes AgNp's obtenidas contra la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, destacándose la actividad de las AgNp's obtenidas de las especies *Penicillium simplicissimum* y *Fusarium oxysporum*.
6. Al emplear la cepa nativa de *Fusarium oxysporum*, y gracias a un diseño de experimentos de tipo factorial 2k, se pudo definir que empleando una concentración de 3mM de AgNO<sub>3</sub>, un pH de 10, a 27 °C/24 h se obtiene el mayor rendimiento en la síntesis de AgNp's.
7. Las AgNp's de *Fusarium oxysporum* fueron caracterizadas por TEM, DRX, FTIR, DLS y potencial Z, y su acción nanopesticida fue verificada por diversos métodos *in vitro*. Se encontraron zonas de inhibición

de crecimiento en placas de agar estableciéndose una relación directamente proporcional con la dosis evaluada, y una MIC de 25 y 50 ppm determinada por micro y macrodilución. Los estudios sobre sustrato vegetal bajo condiciones controladas permitieron evidenciar un efecto protector de las AgNp's frente al desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda del tubérculo cuando son aplicadas como un tratamiento preventivo a una concentración de 100 ppm.

8. Se lograron inmovilizar las AgNp's obtenidas por micosíntesis a partir de *Fusarium oxysporum* en algodón quirúrgico como soporte, por dos metodologías. Las fibras modificadas con AgNp's (AgNp's-C y A-AgNp's-RBi) fueron eficientes en su acción bactericida frente al agente fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*.

9. Las pruebas de reuso de las fibras (AgNp's-C y A-AgNp's-RBi), verificaron su actividad por tres usos consecutivos independientemente del método de modificación utilizado. En las pruebas de retención de las AgNp's sobre las fibras, se evidenció que las nanopartículas permanecen adheridas a las fibras A-AgNp's-C después de dos lavados, mientras que en las fibras A-AgNp's- RBi se mantienen adheridas después de tres lavados consecutivos.

10. Las AgNp's obtenidas a partir de *Fusarium oxysporum* se inmovilizaron en fibras de fique para elaborar el piloto de un empaque antibacterial para el almacenamiento de papa. Este empaque antibacterial disminuyó el porcentaje de tejido macerado de tubérculos infectados con *Pectobacterium carotovorum* frente a los almacenados en costales tradicionales de un 25% a un 7,8%.

## 5.2 Recomendaciones

1. Realizar nuevos ensayos con los sacos antibacteriales definiendo la carga de AgNp's sobre las fibras para determinar la menor concentración de las mismas que pueda seguir generando la acción antibacterial.
2. Si bien mediante los procesos de inmovilización se limita la lixiviación de las AgNp's al ambiente, se recomienda realizar estudios complementarios de la ecotoxicología de las AgNp's obtenidas con el fin de ampliar el conocimiento del comportamiento de las AgNp's una vez están presentes en los empaques antibacteriales.
3. Se podría evaluar a futuro la efectividad del costal antibacterial sobre otros alimentos de interés agrícolas que sean afectados por este fitopatógeno.
4. La utilización de empaques antibacteriales a base de AgNp's obtenidas por micosíntesis en aplicaciones a mayor escala podrá contribuir a generar una estrategia novedosa de control de este agente fitopatógeno que afecta no solo a la papa sino a otros cultivos a nivel de postcosecha.

## Capítulo 6 : Productos generados

Los productos generados a partir de esta investigación son presentados a continuación por categorías

### 6.1 Artículos científicos publicados

Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. 2022. Antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles (AgNps) against *Pectobacterium carotovorum*. Brazilian Journal of Microbiology <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00757-7>

Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. 2022. Mycosynthesis of silver nanoparticles: a review. Biometals <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00479-1>

### 6.2 Artículos científicos en preparación

Actualmente, se encuentran en elaboración dos artículos derivados de este trabajo con títulos tentativos:

1. Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. AgNp's from *Fusarium oxysporum* as nanopesticides against the phytopathogenic agent *Pectobacterium carotovorum*.
2. Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. Antibacterial fibers from mycosynthetized AgNp's for control of *Pectobacterium carotovorum*.

### 6.3 Participación en Congresos

Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. 2020. Ponencia: Biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNp's) empleando hongos rizosféricos del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). En 2<sup>do</sup> simposio virtual de estudiantes y egresados en Biotecnología y áreas afines. 26-27 de noviembre. Bogotá

Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. 2022. Póster: Antimicrobial sacks for the control of *Pectobacterium carotovorum* phytopathogen of potato. En 10<sup>th</sup> Shelf life International Meeting (SLIM 2022) 28 de noviembre- 1 de diciembre de 2022. Bogotá.

## Referencias bibliográficas

1. Abbasi E, Milani M, Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Nasrabadi H, Nikasa P, Joo A, Hanifehpour Y, Nejati-Koshki K. & Samiei M. 2014 Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Crit Rev Microbiol.* 42(2): 173-180. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.
2. Abdeen S, Isaac R, Geo S, Sornalekshmi S, Rose A, Praseetha P. 2013. Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and actinomycetes sp. on human pathogens. *Nano Biomed. Eng.* 5(1): 39-45. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>.
3. Abdel-Hadi, A.; Iqbal, D.; Alharbi, R.; Jahan, S.; Darwish, O.; Alshehri, B.; Banawas, S.; Palanisamy, M.; Ismail, A.; Aldosari, S.; et al. Myco-Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Bioactive Role against Pathogenic Microbes. *Biology* 2023, 12, 661. <https://doi.org/10.3390/biology12050661>.
4. AbdelRahim K, Mahmoud S. & Ali A. 2016. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stonililifer*. *Saudi J Biol Sci.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>.
5. Achi O. & Emeruwa A. 1993 Influence of cultural conditions on coal solubilization by *Penicillium simplicissimum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 121-125. <https://doi.org/10.1002/jctb.280570205>.
6. Adepu S. & Khandelwal M. 2017. Broad-spectrum antimicrobial activity of bacterial cellulose silver nanocomposites with sustained release. *J Mater Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1638-9>.
7. Aguilar M. & San Martín E. 2008. Preparación y caracterización de nanopartículas de plata: evaluación del efecto antimicrobiano. 1er. Simposio de Tecnología Avanzada CICATA-IPN México D. F. Junio 16-20.
8. Ahamed N, Sankara S, Kashif M, Hayath S. & Sastry T. 2015. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 72: 680-686. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.055>.
9. Ahluwalia V, Kumar J, Sisodia R, Shakil N. & Walia S. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Ind Crops Prod.* 55:202-6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.026>.
10. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan M, Kumar R. *et al.*, 2003. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf. B.* 28(4):313-318. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00174-1).
11. Al jurairfani A. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. *African J Biotechnol.* 14(26):2170-4. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14482>.
12. Alghuthaymi M, Almoammar H, Rai M, Said-Galiev E. & Abd-Elsalam K 2015. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 29(2):221-6. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008194>.
13. Almeida S, De Oliveira D. & Hotza D. 2017 Characterization of silver nanoparticles produced by biosynthesis mediated by *Fusarium oxysporum* under different processing conditions. *Bioprocess Biosyst Eng.* <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1788-9>.
14. Al-Tayyar N, Youssef A. & Al-hindi R. 2019. Antimicrobial food packaging based on sustainable bio-based materials for reducing foodborne pathogens: A Review, *Food. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125915>.
15. Al-Zomor R, Khlaif H. & Akash M. 2013. Detection and identification of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* (Van Hall, 1902) the causal agent of potato blackleg by RFLP-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences.* 9(2): 170-183. <https://doi.org/10.12816/0001100>.
16. Amerasan D, Nataraj T, Murugan K, Panneerselvam Ch, Madhiyazhagan P, Nicoletti M. & Benelli G. 2016. Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium anisopliae* against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae). *J Pest Sci* <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0675-x>.
17. Anand P, Isar J, Saran S. & Saxena R. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology* 97:1018-1025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.046>.

18. APHA. 2004. Chapter 6. Microbiological count methods. Davidson P.M. Roth LA, Gambrel SA, Bruhn J. In H.M. Wehr & J.F. Frank (Ed). Standard methods for the examination of dairy products (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Association.
19. Arif D, Bilal M, Ul-Haq N, Nabeel M. & Hashmi E. 2015. Preparation of antibacterial cotton fabric using chitosan-silver nanoparticles. *Fibers and Polymers* 16(7): 1519-1526. <https://doi.org/10.1007/s12221-015-5245-6>.
20. Asmathunisha N. & Kathiresan K. 2013. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids Surf. B.* 103: 283-287. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.030>.
21. ATCC Test Method 147-2011 (2016)e. AATCC Manual of international test methods and procedures 2021. <https://members.aatcc.org/4DCGI/download/k6n3D4IE7t/TM147.pdf>.
22. Athanassiou C, Kavallieratos N, Benelli G, Losic D, Usha Rani P. & Desneux N. 2018. Nanoparticles for pest control: current status and future Perspectives. *J Pest Sci* 91:1-15 <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0898-0>.
23. Avella M, De Vlieger J, Errico M, Fischer S, Vacca P, Volpe M. 2005. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications, *Food Chem.* 93: 467-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.024>
24. Aysan Y, Karatas A. & Cinar O. 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Prot.* 22: 807-811. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00030-9).
25. Azmath P, Baker S, Rakshith D. & Satish S. 2016. Mycosynthesis of silver nanoparticles bearing antibacterial activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24: 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.008>.
26. Bailey R, West K. & Black R. 2015. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab* 66(Suppl. 2):22-33. <https://doi.org/10.1159/000371618>.
27. Balaji D, Basavaraja S, Deshpande R, Mahesh D, Prabhakara B. & Venkataraman A. 2009. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids Surf. B* 68: 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.09.022>.
28. Balakumaran M, Ramachandran R. & Kalaichelvan P. 2016. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. *Microbiol. Res.* 178: 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.009>.
29. Barik T, Sahu B. & Swain V. 2008. Nanosilica - from medicine to pest control. *Parasitol Res* 103(2):253-258. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-0975-7>.
30. Barnard A. & Salmond G. 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal Bioanal Chem* 387: 415-423. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0701-1>.
31. Barud H, Barrios C, Regiani T, Marques R, Verelst M, Dexpert-Ghys J, Messaddeq Y. & Ribeiro S. 2008. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Mater. Sci. Eng. C* 28: 515-518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2007.05.001>.
32. Basavaraja S, Balaji S, Lagashetty A, Rajasab A. & Venkataraman A. 2008. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater. Res. Bull.* 43(5): 1164 -1170. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2007.06.020>.
33. Bastidas K, Sierra C. & Zea, H. 2018. Heterogeneous Fenton oxidation of Orange II using iron nanoparticles supported on natural and functionalized fique fiber. *J. Env. Chem. Eng.* 6: 4178-4188.
34. Bawaskar M, Gaikwad S, Ingle A, Rathod D, Gade, Duran N, Marcato P. & Rai M. 2010. A new report on mycosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium culmorum*. *Curr Nanosci* 6: 376-380. <http://dx.doi.org/10.2174/157341310791658919>.
35. Becker S, Mattiello A, Da Silva G, Groth D. & Malagi I. 2013. Production of cellulases by the endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbiology Research* 3(4): 131-134. <http://dx.doi.org/10.5923/j.microbiology.20130304.01>.
36. Beltrán M, Lizarazo L, Sierra C. 2022. Antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles (AgNPs) against *Pectobacterium carotovorum*. *Brazilian Journal of Microbiology* <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00757-7>.
37. Benkeblia N. 2012. Postharvest diseases and disorders of potato tuber *Solanum tuberosum* L. Potatoes: production, consumption and health benefits. Kingston: Nova Science 7: 99-114.

38. Beveridge T, Hughes M, Lee H, Leung K, Poole R, Savvaidis I, Silver S. & Trevors J. 1997. Metal–microbe interactions: contemporary approaches. *Adv Microb Physiol* 38: 178-243. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60158-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60158-7).
39. Beyene H, Werkneh A, Bezabh A. & Ambaye T. 2017. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *SM&T* 13: 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>.
40. Bhainsa K. & D'Souza S. 2006. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. *Colloids Surf. B.* 47:160-164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.11.026>.
41. Bhat R, Ganachari S, Deshpande R, Bedre M. & Venkataraman A. 2012. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using extract of fungi *Acremonium diostryri*. *International Journal of Science Research* 1(4): 314-316.
42. Bhattacharya D. & Gupta R. 2005. Nanotechnology and potential of microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25:199-201 <https://doi.org/10.1080/07388550500361994>.
43. Bhui D, Bar H, Sarkar P, Sahoo G, Prasad De S. & Misra A. 2009. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *J. Mol. Liq* 145: 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2008.11.014>.
44. Binupriyaa A, Sathishkumara M. & Yun S-I. 2010. Biocrystallization of silver and gold ions by inactive cell filtrate of *Rhizopus stolonifer*. *Colloids Surf. B.* 79: 531-534. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.021>.
45. Birla S, Gaikwad S, Gade A. & Rai K. 2013. Rapid synthesis of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions. *Hindawi Publishing Corporation the ScientificWorld Journal Volume 2013, Article ID 796018, 12 pages* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/796018>.
46. Birla S, Tiwari V, Gade A, Ingle P, Yadav A. & Rai M. 2009. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 173-179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02510.x>.
47. Biswas S. & Mulaba A. 2016. Optimization of process variables for the biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus wentii* using statistical experimental design *Adv. Nat. Sci* 7- 045005 (10pp).
48. Bitas V, McCartney N, Li N, Demers J, Kim J, Kim H, Mand B. & Kang S. 2015. *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Front. Microbiol.* 6:1248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01248>.
49. Brooks J. & Flint S. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 2163-2176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>.
50. Cai J, Kimura S, Wada M. & Kuga S. 2009. Nanoporous cellulose as metal nanoparticles support. *Biomacromolecules* 10: 87-94. <https://doi.org/10.1021/bm800919e>.
51. Camacho A, Duarte A, Dubayj D, Forero E, González E, Jaramillo F, Maldonado C, Montoya J, Obregón N, Osma J, Sierra C. & Urquijo W. 2016. Definición de nanomateriales para Colombia. *Rev. Colomb. Quim.* 45(1):15-20. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quimv45n1.58955>.
52. Castellanos L, Blanco C, Hinestroza J. & Combariza M. 2012. *In situ* synthesis of gold nanoparticles using fique natural fibers as template. *Cellulose* 19:1933 - 1943. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-012-9763-8>.
53. Chan Y. & Don. 2013. Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. *Mater. Sci. Eng. C* 33: 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.041>.
54. Chauhan A, Anand J, Parkash V. & Rai N. 2022. Biogenic synthesis: a sustainable approach for nanoparticles synthesis mediated by fungi. *Inorganic. Nano Metal Chem.* 1-14. <http://dx.doi.org/10.1080/24701556.2021.2025078>.
55. Chen J, Lin Z, Ma X. 2003. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp.3.2883 with silver nitrate. *Lett Appl Microbiol* 37: 105-8. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01348.x>.
56. Chen Y. & Yada R. 2011. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trends. Food. Sci. Tech.* 22: 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.09.004>.
57. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement (M100-S17). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

58. Cox, E. 1927." A method of assigning numerical and percentage values to the degree of roundness of sand grains". *Journal of Paleontology*. 1, 179-183.
59. Cypriana J, Saigeetha S, Agnes L, Samrot A, Kumar S, Ponniahc P. & Chakravarthic S. 2021. Overview on toxicity of nanoparticles, it's mechanism, models used in toxicity studies and disposal methods-A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 36 :102117. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102117>.
60. Czajkowski R, Perombelon M, Van Veen J. & Van der Wolf J. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathol.* 60: 999-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>.
61. Das C, Kumar V, Dhas T, Karthick V, Govindaraju K, Joselin J. & Baalamurugan J. 2020. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatal. Agric. Biotechnol* 27 :101593. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101593>.
62. De Santa Maria L, Santos A, Oliveira P, Barud H, Messaddeq Y. & Ribeiro S. 2009. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. *Mater. Lett.* 63: 797-799. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.matlet.2009.01.007>.
63. De Souza A. & Gomes A. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi in Fungal biomolecules: sources, applications, and recent developments. Editors, Dr. Vijai Kumar Gupta, Prof. Robert L. Mach, Prof. S. Sreenivasaprasad. ISBN 978-1-118-95829-2.
64. Desai R, Mankad V, Gupta S. & Jha P. 2012. Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment. *Nanosci. Nanotech. Let.* 4:30-34. <https://doi.org/10.1166/nnl.2012.1278>.
65. Devaux A, Goffart J, Kromann P, Andrade J, Polar V, Hareau G. 2021. The Potato of the Future: opportunities and challenges in sustainable agri-food systems. *Potato Res* 681-720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>.
66. Devi L. & Joshi S. 2015. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. *J Microsc Ultrastruct.* 3(1):29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.10.004>.
67. Dhanasekaran D, Latha S, Saha S, Thajuddin & Panneerselvam A. 2011. Biosynthesis and antimicrobial potential of metal nanoparticles. *Int. J. Green Nanotechnol.* 3:1, 72-82. <https://doi.org/10.1080/19430892.2011.574545>.
68. Dhillon G, Brar S, Kaur S. & Verma M. 2012. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 32(1):49-73. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.550568>.
69. Dhoble S. 2015. Biosynthesis of metal nanoparticles from fungal isolates of soybean rhizosphere. *Int J Sci Res.* 4(5):3-5. <https://www.doi.org/10.36106/ijrsr>.
70. Diez I, Eronen P, O' sterberg M, Linder M, Ikkala O. & Ras R. 2011. Functionalization of nanofibrillated cellulose with silver nanoclusters: fluorescence and antibacterial activity. *Macromol. Biosci.* 11: 1185-1191. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100099>.
71. Döbelin N. & Kleeberg R. 2015. Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN. *J. Appl. Crystallogr.* 48:1573-1580. <https://doi.org/10.1107/S1600576715014685>.
72. Dong H & Hinestroza J. 2009. Metal nanoparticles on natural cellulose fibers: electrostatic assembly and *in situ* synthesis. *Applied materials and interfaces.* 1(4):797-803. <https://doi.org/10.1021/am800225j>.
73. Doolotkeldieva T, Bobusheva S. & Suleymankisi A. 2016. Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology.* 6: 104-114. <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=63683&#abstract>.
74. Drogat N, Granet R, Sol V, Memmi A, Saad N, Klein C, Bressollier P. & Krausz P. 2011. Antimicrobial silver nanoparticles generated on cellulose nanocrystals. *J Nanopart Res* 13: 1557-1562. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9995-1>.
75. Du l, Xu Q, Huang m, Xian l. & Feng J. 2015. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Mater. Chem. Phys.* 160: 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.04.003>.
76. Duarte O & Velho L. 2009. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ci. Inf., Brasília, DF,* 38(3): 96-110.



77. Durán N, Marcato P, Alves O, De Souza G. & Esposito E. 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology* 3:8 doi:10.1186/1477-3155-3-8.
78. Durán N, Marcato P, De Souza G, Alves O. & Esposito E. 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol* 3: 203-208. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>
79. Durán N, Marcato P, Durán M, Yadav A, Gade A. & Rai M. 2011. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1609-1624. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3249-8>.
80. Elamawi R, Al-Harbi R, Hendi A. 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egypt J Biol Pest Control*. 28(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0028-1>.
81. Elgorban A, Al-Rahmah A, Sayed S, Hirad A, Mostafa A. & Bahkali A. 2016. Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 30(2):299-304. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1133255>.
82. El-Moslamy S, Elkady M, Rezk A. & Abdel-Fattah Y. 2017. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. *Sci Rep*. 7(1) Article number: 45297. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45297>.
83. El-Rafie M, Mohamed A, Shaheen T. & Hebeish A. 2010. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydr. Polym.* 80: 779-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.028>.
84. Elshahawy I, Mohamed H, Mohamed S. & Mohamed O. 2018. First report of *Pythium aphanidermatum* infecting tomato in Egypt and its control using biogenic silver nanoparticles. *J Plant Prot Res* 58 (2): 137-151. <http://dx.doi.org/10.24425/122929>.
85. Emam H, Zahran M. 2015. Ag<sup>0</sup> nanoparticles containing cotton fabric: synthesis, characterization, color data and antibacterial action. *Int. J. Biol. Macromol.* 75: 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.050>.
86. FAO statistics. 2020. FAO statistics 2020. Food and agriculture organization. <http://www.fao.org/statistics/es/>. Acceso enero 2022.
87. Fathima B, Mohan R. 2014. Biosynthesis and optimization of silver nanoparticles by endophytic fungus *Fusarium solani*. *Mat. Lett* 132: 428-431. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.matlet.2014.06.143>.
88. Fatima F, Bajpai P, Pathak N, Singh S, Priya S. & Verma S. 2015. Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC Microbiol*. 15(1):52. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0391-y>.
89. Fayaz A, Balaji K, Girilal M, Kalaichelvan P, Venkatesan R. 2009. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *Agric Food Chem*. 57:6246-6252. <https://doi.org/10.1021/jf900337h>.
90. Feroze N, Arshad B, Younas M, Irfan M, Saqib S. & Ayaz A. 2019. Fungal mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial activity. *Microsc Res Tech*. 1-9. <https://doi.org/10.1002/jemt.23390>.
91. Fonseca M, Rodrigues D, Sokolonski A, Stanisic D. Tomé L, Góes-Neto A, Azevedo V, Meyer R, Araújo D, Tasic L. *et al.* 2022. Activity of *Fusarium oxysporum*-based silver nanoparticles on *Candida* spp. oral isolates. *Nanomaterials* 12-501. <https://doi.org/10.3390/nano12030501>.
92. Franco Y. & Stefanova M. 2008. Determinación de actividades enzimáticas implicadas en la virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* aisladas de papa. *Agro sur* 36 (3): 130-136.
93. Gade A, Bonde P, Ingle A, Marcato P, Durán N. & Rai M. 2008. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *J Biobased Mater Bioenergy* 2: 1-5. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2008.401>.
94. Gade A, Gaikwad S, Duran N. & Rai M. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* *Micron* 59: 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.12.005>.
95. Gahlawat G & Roin A. 2019. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Adv*. 9: 12944 <https://doi.org/10.1039/c8ra10483b>.

96. Gaikwad S, Birla S, Ingle A, Gade A, Marcato P, Rai M. & Duran N. 2013. Screening of different *Fusarium* species to select potential species for the synthesis of silver nanoparticles. J. Braz. Chem. Soc. 24(12): 1974-1982. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130247>.
97. Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A. & Rai M. 2009. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. Nanomedicine 5:382-386. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.06.005>.
98. Gañan P. & Mondragon I. 2002. Surface modification of fique fibers. Effects on their physico-mechanical properties. Polym. Compos. 23(3): 383-394. <https://doi.org/10.1002/pc.10440>.
99. Garavito L. 2015. Los páramos en Colombia, un ecosistema en riesgo. INGENIARE 11(19): 127-136 ISSN: 1909-2458. <http://dx.doi.org/10.18041/1909-2458/ingeniare.19.530>.
100. Gericke M. & Pinches A. 2006. Biological synthesis of metal nanoparticles. Hydrometallurgy 83: 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.019>.
101. Gholami-Shabani M, Akbarzadeh A, Norouzi D, Amini A, Gholami-Shabani Z, Imani A, Chiani M, Riazi G, Shams-Ghahfarokhi M. & Razzaghi-Abyaneh M. 2014. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. Appl Biochem Biotechnol 172:4084-4098. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0809-2>.
102. Gokul G, Louis V, Namitha P, Mathew D, Girija D, Shylaja M *et al.*, 2019. Variability of *Pectobacterium carotovorum* causing rhizome rot in banana. Biocatal Agric Biotechnol. 17:60-81. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.001>.
103. Gonzalez E, *et al.* 2015. Nanopartículas Coloidales. Ed. Nanocitec. 1ra Ed. ISBN: 978-958-46-6931-5.
104. Guilger M, Lima R. 2019. Synthesis of silver nanoparticles mediated by Fungi: A Review. Front. Bioeng. Biotechnol. 7:287 <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2019.00287>.
105. Gumel A, Surayya M, Yaro M, Waziri I. & Amina A. 2019. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and its synergistic antimicrobial potency: an overview. J Appl Biotechnol Bioeng 6(1):22-28.
106. Gupta K, Singh T, Ahmad N, Malek N. 2021. Antibacterial, antifungal, photocatalytic activities and seed germination effect of mycosynthesized silver nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. Biointerface Research in applied chemistry 11(49): 12082 - 12091 <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1208212091>.
107. Gustavsen G. 2021. Sustainability and potato consumption. Potato Rese 64:571-586. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09493-1>.
108. Hamad M. 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungi and their antibacterial activity. Int J Environ Sci Technol (Tehran). 16: 1015-1024. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1814-8>.
109. Hamed S, Ghaseminezhad M, Shokrollahzadeh S, Shojaosadati S. 2017. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 45(8): 1588-1596. <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1267011>.
110. Hamed S, Shojaosadati S, Shokrollahzadeh S. & Najafabadi S. 2014. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using a novel and non-pathogenic fungus, *Neurospora intermedia*: controlled synthesis and antibacterial activity. World J Microbiol Biotechnol 30:693-704. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1417-y>.
111. Hanh T, Thu N, Hien N, An P, Loan T. & Hoa P. 2016. Preparation of silver nanoparticles fabrics against multidrug-resistant bacteria. Radiat. Phys. Chem. 121:87-92. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.12.024>.
112. Harley S. 1993. Use of a simple, colorimetric assay to demonstrate conditions for induction of nitrate reductase in plants. The American Biology Teacher. 55(3):161-164. <https://doi.org/10.2307/4449615>.
113. He J, Kunitake T. & Nakao A. 2003. Facile *in situ* synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. Chem. Mater. 15: 4401-4406. <https://doi.org/10.1021/cm034720r>.
114. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E. & Naghibi F. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. Trop J Pharm Res. 12(1): 7-11. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i1.2>.
115. Hossain M, Shibata S, Aizawa S. & Tsuyumu S. 2005. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Physiol. Mol. Plant. P. 66: 134-143. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/509628>.

116. Hu Dong Y, Fen Zhang X, Ling X. & Hui Zhang L. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2): 954-960. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.954-960.2004>.
117. Hu X, Webster G, Xie L, Yu C, Li Y. & Liao X. 2014. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. *J Microbiol Methods.* 99(1):81- 3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.009>.
118. Huang T, Qian Y, Wei J. & Zhou Ch. 2019. Polymeric antimicrobial food packaging and its applications, *Polymers* 11-560. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11030560>.
119. Hulkoti N. & Taranath T. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes - A review. *Colloid. Surface. B.* 121: 474- 483. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027>.
120. Hussain N, Baqar Z, Mumtaz M, El-Sappah A, Show P, Iqbal H, Varjani S, Bilal M. 2022. Bioprospecting fungal-derived value-added bioproducts for sustainable pharmaceutical applications. *Sustain. Chem. Pharm.* 29-100755. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100755>.
121. Husseiny S, Salah T. & Anter H. 2015. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef University Journal of basic and applied sciences* 4:225-231. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.004>.
122. Ibrahim H. & Hassan M. 2016. Characterization and antimicrobial properties of cotton fabric loaded with green synthesized silver nanoparticles. *Carbohydr Polym.* <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.041>.
123. Ibrahim S, Sirwi A, Eid B, Mohamed S, Mohamed G. 2021. Bright side of *Fusarium oxysporum*: secondary metabolites bioactivities and industrial relevance in biotechnology and Nanotechnology. *J. Fungi* 7: 943. <http://dx.doi.org/10.3390/jof711943>.
124. Ijaz I, Gilani E, Nazir A. & Bukhari A. 2020. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chem Lett Rev* 13: 223-245 <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1802517>.
125. Ilic V, Šaponjic Z, Vodnik V, Potkonjak B, Jovancic P, Nedeljkovic J. & Radetic M. 2009. The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 78: 564-569.
126. Ingham B. 2015. X-ray scattering characterisation of nanoparticles, *Crystallography Reviews*, 21:4, 229-303, <https://doi.org/10.1080/0889311X.2015.1024114>.
127. Ingle A, Gade A, Bawaskar M. & Rai M. 2009. *Fusarium solani*, a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 11:2079-2085. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9573-y>.
128. Ingle A, Gade A, Pierrat S, Sonnichsen C. & Rai M. 2008. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Curr Nanosci.* 4:141-144. <https://doi.org/10.2174/157341308784340804>.
129. Ishida K, Ferreira T, Miranda G, Weissmüller G, Gomes F, Miranda K. & Rozental S. 2013. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro:* 1-9.
130. Iturbe J, Vilchiz A, Mendieta V. & Borja M. 2013. Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies y Vacío* 26(3): 73-78.
131. Jafarzadeh S, Jafarib S, Salehabadi A, Nafchia A, Kumara U. & Khalila H. 2020. Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products. *Trends Food Sci Technol* 100: 262-277. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.017>.
132. Jaidev L, Narasimha G. 2010. Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids Surf. B.* 81(2):430-3. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.033>.
133. Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar J. & Panwar J. 2011. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. *Nanoscale.* 3(2):635-41. <https://doi.org/10.1039/C0NR00656D>.
134. Jebali A, Ramezani F. & Kazemi B. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Geotrichum* sp. *J Clust Sci* 22:225-232. <https://doi.org/10.1007/s10876-011-0375-5>.

135. Jemal K, Sandeep B, & Sudhakar P. 2017. Synthesis, characterization, and evaluation of the antibacterial activity of *Allophylus serratus* leaf and leaf derived callus extracts mediated silver nanoparticles. *Hindawi Journal of Nanomaterials*. Article ID 4213275, <https://doi.org/10.1155/2017/4213275>.
136. Jian Z, & Hejing W. 2003. The physical meanings of 5 basic parameters for an X-ray diffraction peak and their application. *Chinese Journal of Geochemistry* 22(1):38-44.
137. Jo Y, Kim B. & Jung G. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis* 93,1037-1043. <https://doi.org/10.1094/pdis-93-10-1037>.
138. Kah M, Beulke B, Tiede K. & Hofmann T. 2013. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Crit Rev Environ Sci Technol* 43(16): 1823-1867, <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750>.
139. Kah N. & Hofmann T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment International* 63: 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.
140. Kamarudin S, Rayung M, Abu F, Ahmad S, Fadir F, Abdul A, Nurazzi M, Sarifuddin N, Shaiful M, Mat Z, Salahuddin M. & Chuah L. 2022. A review on antimicrobial packaging from biodegradable polymer composites. *Polymers* 14-174. <https://doi.org/10.3390/polym14010174>.
141. Kamil D, Prameeladevi T, Ganesh S, Prabhakaran N, Nareshkumar R. & Thomas S. 2017. Green synthesis of silver nanoparticle by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their bioefficacy against mustard aphid (*Lipaphys erysimi* Kalt.). *Indian J. Exp. Biol.* 55: 555-561. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/42555>.
142. Kasprowicz M, Koziol M. & Gorczyca, A. 2010. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can J Microbiol* 56(3):247-253. <https://doi.org/10.1139/w10-012>.
143. Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel M. & Dhivya B. 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf. B* 71:133-137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.016>.
144. Keat C, Aziz A, Eid A. & Elmarzugi A. 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticle. *Bioresour. Bioprocess* 2:47. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0076-2>.
145. Kha M. & Hofmann. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environ Int* 63:224-35. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.
146. Khan A, Malik N, Khan M, Cho M. & Khan M. 2017. Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. *Bioprocess Biosyst Eng*. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1846-3>.
147. Khandel P. & Kumar S. 2018. Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges. *J Nanostructure Chem* <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0285-2>
148. Kharissova O, Dias H, Kharisov B, Perez B. & Jimenez V. 2013. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 31(4):240-248. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>.
149. Khlaif H & Wreikat B. 2018. The relationship of potato bacterial soft rot disease with reduced sugar content of potato tubers and calcium. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 14(1): 81-90.
150. Khot L, Sankaran S, Maja J, Ehsani R. & Schuster E. 2012. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop. Prot.* 35: 64-70.
151. Kim S, Jung J, Lamsal K, Kim Y, Min J & Lee Y. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1): 53-58. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>.
152. Kirthi A, Rahuman A, Jayaseelan C, Karthik L, Marimuthu S, Santhoshkumar T. Venkatesan J. Kim S. Kumar G, Ravi S, Kumar S, Rao K. 2012. Novel approach to synthesis silver nanoparticles using plant pathogenic fungi, *Puccinia graminis*. *Mater. Lett.* 81: 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.04.103>.
153. Kolarova K, Samec D, Kvitek O, Reznickova A, Rimpelova S. & Svorcik V. 2017. Preparation and characterization of silver nanoparticles in methyl cellulose matrix and their antibacterial activity. *Jpn. J. Appl. Phys.* 56 06GG09. <http://dx.doi.org/10.7567/JJAP.56.06GG09>.

154. Kong X, Reza M, Ma Y, Hinestroza J, Ahvenniemi E, Vuorinen T. 2015. Assembly of metal nanoparticles on regenerated fibers from wood sawdust and de-inked pulp: flexible substrates for surface enhanced Raman scattering (SERS) applications. *Cellulose* 22:3645-3655.
155. Korbekandi H, Iravani S. & Abbasi S. 2009. Production of nanoparticles using organisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29(4): 279-306. <https://doi.org/10.3109/07388550903062462>.
156. Kotval S, John T. & Kokila A. 2016. A Review: Fabrication of biogenic silver nanoparticles and applications. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 6(3):997-1009.
157. Khodashenas B. 2016. The influential factors on antibacterial behaviour of copper and silver nanoparticles. *Indian Chemical Engineer* 58(3): 224-239. <https://doi.org/10.1080/00194506.2015.1026950>.
158. Krishnakumar S, Sindu D, Shankar G, Williams P. & Sasikumar M. 2015. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs) using *Fusarium oxysporum* (MTCC-2480) and its antibacterial efficacy against Gram negative human pathogens. *J Chem Pharm Res.* 7(1):62-7.
159. Kumar R, Priyadharsani P. & Thamaraiselvi K. 2012. Mycogenic synthesis of silver nanoparticles by the Japanese environmental isolate *Aspergillus tamari*. *J Nanoparticle Res.* 14:860-868. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0860-2>.
160. Kumar U, Saxena P. & Srivastava A. 2007. Bioinspired synthesis of silver nanoparticles. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 4(1): 159 -166.
161. Lamsal K, Kim S, Jung J, Kim Y, Kim K. & Lee Y. 2011. Inhibition effects of silver nanoparticles against powdery mildews on cucumber and pumpkin. *Mycobiology* 39:26-32. <https://doi.org/10.4489/myco.2011.39.1.026>.
162. Lastochkina O, Baymiev A, Shayahmetova A, Garshina D, Koryakov I, Shpirnaya I, Pusenkova L, Mardanshin I, Kasnak C. & Palamutog R. 2020. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants* 9(76). <https://doi.org/10.3390/plants9010076>.
163. Le B. & Stellacci F. 2015. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 10, 339- 354. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.
164. Lelliott R, Billinge A. & Hayward C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J. App. Bact.* 29 (3): 470-489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x>.
165. Leonel M, Lopes E, Mazetti A, Peres R, Marques J, Loli E, Rodrigues T. 2017. Chemical composition of potato tubers: the effect of cultivars and growth conditions. *J Food Sci Technol.* <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2677-6>.
166. Li G, He D, Qian Y, Guan B, Gao S, Cui Y, Yokoyama K. & Wang L. 2012. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 466 - 476. <https://doi.org/10.3390/ijms13010466>.
167. Lok Ch, Ho Ch, Chen R, He Q, Yu W, Sun H, Hang P, Chiu J. & Che Ch. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*, 12: 527-534 <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>.
168. Loo Y, Rukayadil Y, Nor-Khaizura Y, Kuan M, Chieng C, Nishibuchi B. *et al.* 2018. *In vitro* antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 9 -1555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>.
169. Lurwanu Y, Wang Y, Jiao Wu E, Dun-Chun H, Waheed A, Nkurikiyimfura O, Wang Z, Shang L, Na Yang L. & Zhan J. 2021. Increasing temperature elevates the variation and spatial differentiation of pesticide tolerance in a plant pathogen. *Evol Appl.*14:1274-1285. <https://doi.org/10.1111/eva.13197>.
170. Ma L, Su W, Liu J-X, Zeng X, Huang Z, Li W *et al.*, 2017. Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. *Mater Sci Eng C.* 77:963-71. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.294>.
171. Madakka M, Jayaraju N. & Rajesh N. 2018. Mycosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *Methods.* 5:20-9. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.12.003>.

172. Madigan M, Martinko J, Bender K, Buckley D. & Stahl D. 2015. Brock Biología de los microorganismos. 14th ed. Madrid, España. Prentice Hall. 1131p. ISBN:97888490352809.
173. Madriñán S, Cortés A. & Richardson J. 2021. Páramo is the world's fastest evolving and coolest biodiversity hotspot. *Frontiers of genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00192>.
174. Majeed S, Abdullah M, Nanda A. & Ansari M. 2018. *In vitro* study of the antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from *Penicillium brevicompactum* (MTCC-1999). *J Taibah Univ Sci*. 10(4):614-20. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.02.010>.
175. Maliszewska I, Juraszek A, Bielska K. 2013. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using ascomycota fungi *Penicillium nalgiovense* AJ12. *J Clust Sci*. <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0683-z>.
176. Mandal D, Bolander M, Mukhopadhyay D, Sarkar G. & Mukherjee P. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 485-492. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0179-3>.
177. Mangaraj S, Yadav A, Bal L, Dash S. & Mahanti N. 2019. Application of biodegradable polymers in food packaging industry: A comprehensive review. *Journal of Packaging Technology and Research* 3: 7-96. <http://dx.doi.org/10.1007/s41783-018-0049-y>.
178. Manimozhi R. & Anitha R. 2014. Mycosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Aspergillus flavus* mycelium and its characterization. *Int. J. Pharm Drug Anal*. 2(9):734 -739.
179. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer V, Machado M, Toth I, Salmond G. & Foster G. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 13:614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804>.
180. Marrez D, Abdelhamid A. & Darwesh O. 2019. Eco-friendly cellulose acetate green synthesized silver nano-composite as antibacterial packaging system for food safety, *Food Packag. Shelf Life* 20-100302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100302>.
181. Martínez E, Niño N, Martínez F, Martínez J. & Ruiz F. 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res* 10, 1343-1348. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6>.
182. Masum M, Islam S, Islam M. & Kabir M. 2011. Estimation of loss due to post harvest diseases of potato in markets of different districts in Bangladesh. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11892-11902. <http://doi.org/10.26480/faer.01.2021.21.27>.
183. Metak A, Nabhani F. & Connolly S. 2015. Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products, *LWT - Food Sci. Technol*. 64: 781-787. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.001>.
184. Meyer V. 2008. Genetic engineering of filamentous fungi progress, obstacles and future trends. *Biotechnol Adv*. 26:177-185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>.
185. Min J, Kim K, Kim S, Jung J, Lamsal K, Kim S, Jung M. & Lee Y. 2009. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium forming phytopathogenic fungi. *Plant Pathol J* 25:376-380. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.4.376>.
186. Mishra S. & Singh H. 2015. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99:1097-1107. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-6296-0>.
187. Mohammadian A, Sho jaosadati S. & Rezaee M. 2007. *Fusarium oxysporum* mediates photogeneration of silver nanoparticles. *Scientia Iranica* 14(4): 323- 326.
188. Mohammed O, Abdulkhaliq R. & Mohammed R. 2019. The effects of *Fusarium graminearum* silver nanoparticles on *Leishmania tropica* J. Phys.: Conf. Ser. 1294 062075. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/6/062075>.
189. Mohammed A, Bajali K, Girilal M, Yadav R, Thangavelu P. & Venketesan R. 2010 Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6:103-109. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006>.
190. Mohmed A, Fouda M, Elgamal M, Elgamal S, Hassan T, Shaheen S, Salem S. 2017. Enhancing of cotton fabric antibacterial properties by silver nanoparticles synthesized by new egyptian strain *Fusarium keratoplaticum*

- A1-3. Egypt. J. Chem. The 8th. Int. Conf. Text. Res. Div., Nat. Res. Centre, Cairo 63-71. <https://dx.doi.org/10.21608/ejchem.2017.1626.1137>.
191. Mohanpuria P, Rana N. & Yadav S. 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. J. Nanopart Res 10:507-517. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9275-x>.
192. Mohanta Y, Nayak D, Biswas K, Singdevsachan S, AbdAllah E, Hashem A., *et al.* 2018. Silver nanoparticles synthesized using wild mushroom show potential antimicrobial activities against food borne pathogens. Molecules 23: 655- 673 <https://doi.org/10.3390/molecules23030655>.
193. Mokhtari N, Daneshpajouh S, Seyedbagheri S, Atashdehghan R, Abdi K, Sarkar S, Minaian S. & Shahverdi H. 2009. A Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. Mater. Res. Bull. 44: 1415-1421. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2008.11.021>.
194. Mondal K. & Mani C. 2012. Investigation of the antibacterial properties of nanocopper against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, the incitant of pomegranate bacterial blight. Ann Microbiol 62(2):889-93. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-011-0382-7>.
195. Moritz M. & Geszke-moritz M. 2013. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. Chem Eng J 228:596-613. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>.
196. Morones J, Elechiguerra J, Camacho A, Holt K, Kouri J, Ramírez J. & Yacaman M. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 16- 2346 -2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
197. Motelica L, Ficai D, Ficai A, Oprea O, Alpaslan D. & Andrones E. 2020. Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and Perspectives, Foods 9 -1438 <https://dx.doi.org/10.3390/foods9101438>.
198. Motesafari H, Mousavi S, Shojaosadati S. 2012. The possible mechanisms involved in nanoparticles biosynthesis. J Ind Eng Chem 18: 2046-2050. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.05.025>.
199. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar S, Khan M, Parishcha R, Ajaykumar P, Alam M, Kumar R. & Sastry M. 2001. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano Lett. 1(10): 515-519. <https://doi.org/10.1021/nl0155274>.
200. Mukherjee P, Roy M, Mandal B, Dey G, Mukherjee P, Ghatak J, Tyagi A. & Kale S. 2008. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a nonpathogenic and agriculturally important fungus *Trichoderma asperellum*. Nanotechnology. 19: 075103. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.05.025>.
201. Muratore F, Barbosa S. & Martinia R. 2019. Development of bioactive paper packaging for grain-based food products, Food Packag. Shelf Life 20 -100317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100317>.
202. Musarrat J, Dwivedi S, Singh B, Al-Khedhairy A, Azam A, Naqvi A. 2010. Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09. Bioresour. Technol. 101: 8772-8776. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.065>.
203. Nam G, Purushothaman B, Rangasamy S, Song J. 2016. Investigating the versatility of multifunctional silver nanoparticles: preparation and inspection of their potential as wound treatment agents. Int Nano Lett 6:51-63. <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0168-1>.
204. Nanda A. & Saravanan M. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 01: 452- 456. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.012>.
205. Narayanan K & Sakthivel N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Advances in Colloid and Interface Science 156: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>.
206. Nasir M, Toth Z. 2022. Effect of drought stress on potato production: A review. Agronomy 12: 635. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030635>.
207. Naveen H, Kumar G, Karthik L. & Rao B. 2010. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. Arch. Appl. Sci. Res. 2 (6):161-167.
208. Nayak B, Nanda A, Prabhakar V. 2018. Biogenic synthesis of silver nanoparticle from wasp nest soil fungus, *Penicillium italicum* and its analysis against multi drug resistance pathogens. Biocatal Agric Biotechnol. 16:412-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.014>.

209. Nayak R, Pradhan N, Behera D, Pradhan K, Mishra S, Sukla L.& Mishra B. 2011.Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. J Nanopart Res. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0208-8>.
210. Nel A, Xia T, Madler L. & Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 311 (5761): 622-627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
211. Ningangouda S, Rathod V, Jyoti H, Singh D, Prema K, Ul-haq M. 2013. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* and their antimicrobial activity against Gram negative Mdr strains. Int J Pharm Bio Sci 4(2): 222 -229.
212. Nithya R. & Ragunathan R. 2009. Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. Dig. J. Nanomater. Biostructures 4(4): 623 - 629.
213. Oh S, Lee S, Choi S, Lee I, Lee Y, Chun J. & Park H. 2006. Synthesis of Ag and AgSiO<sub>2</sub> nanoparticles by  $\gamma$ -irradiation and their antibacterial and antifungal efficiency against *Salmonella* enteric serovar *typhimurium* and *Botrytis cinerea*. Colloids Surfaces A. 275: 228-233.
214. Othman A, Elsayed M, Al-Balakocy N, Hassan M. & Elshafei A. 2019. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. J Genet Eng Biotechnol 17:8 <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0008-1>.
215. Ottoni C, Simões M, Fernandes S, dos Santos J, Da Silva E, De Souza R *et al.*, 2017. Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. AMB Express. 7(31): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0332-2>.
216. Ovais M, Talha A, Ayaz M, Ahmad I, Kumar S. & Mukherjee, S. 2018. Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: A Mechanistic Approach. Int. J. Mol. Sci. 19, 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>.
217. Ovalle S, Blanco C. & Combariza M. 2018. Exploring the composition of raw and delignified Colombian fique fibers, tow and pulp, Cellulose 25: 151-165 <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1599-9>.
218. Ovalle S, Blanco C. & Combariza M. 2013. Síntesis *in situ* de nanopartículas de plata sobre fibras de fique. Rev. Colomb. Quim. 42(1): 30-37. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>.
219. Owaid M, Raman J, Lakshmanan H, Al-Saeedi S, Sabaratnam V. & Abed I. 2015. Mycosynthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* and its inhibitory effects against *Candida* sp. Mater. Lett. 153: 186-190. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.04.023>.
220. Owaid M. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles by *Pleurotus* (oyster mushroom) and their bioactivity: Review. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management 12 -100256. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100313>.
221. Padalkar S, Capadona J, Rowan V, Weder C, Ho Won Y, Stanciu L. & Moon R. Natural Biopolymers: novel templates for the synthesis of nanostructures, Langmuir 26(11): 8497-8502. <https://doi.org/10.1021/la904439p>.
222. Pankey G. & SabatH L. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis. 15;38(6):864-70. <https://doi.org/10.1086/381972>. Epub 2004 Mar 1.
223. Panyala N, Peña E. & Have J. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?, J. Appl. Biomed. 6 : 117-129. <http://dx.doi.org/10.32725/jab.2008.015>.
224. Park H, Kim S, Kim S. & Choi S. 2006. A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. Plant Pathol J 22: 295-302. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2006.22.3.295>.
225. Pepper I. & Gerba C. 2005. Environmental microbiology a laboratory manual. Elsevier academic press. ISBN:0-12-550656-2.
226. Perombelon M. & Kelman A. 1980. Ecology of soft-rot erwinias. Annu. Rev. Phytopathol. 18: 361- 387.
227. Phanjom P. & Ahmed G. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and its characterizations. Nanoscience and Nanotechnology 5(1): 14-21 <https://doi.org/10.5923/j.nn.20150501.03>.



228. Philip D. 2009. Biosynthesis of Au, Ag and Au/Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochimica Acta Part A*. 73:374-381. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.02.037>.
229. Phyllipe A. & Schaumann G. 2014. Interactions of dissolved organic matter with natural and engineered inorganic colloids: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 48(16): 8946-8962. <https://doi.org/10.1021/es502342r>.
230. Pinto R, Marques P, Martins M, Neto C. & Trindade T. 2007. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. *J. Colloid Interface Sci.* 312: 506-512. doi: 10.1016/j.jcis.2007.03.043.
231. Pitt J. & Hocking A. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3th edition. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.
232. Pivec T, Hribernik S, Kolar M & Stana K. 2017. Environmentally friendly procedure for *in-situ* coating of regenerated cellulose fibres with silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.060>.
233. Pokhrel L, Dubey B. & Scheuerman P. 2013. Impacts of select organic ligands on the colloidal stability, dissolution dynamics, and toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12877-12885. <https://doi.org/10.1021/es403462j>.
234. Pordeli H, Shaki H, Azar A. & Nezhad M. 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium solani* isolates from agricultural soils in Gorgan, Iran. *Medical Laboratory Journal*, 12(4):17-21 <https://orcid.org/0000-0001-6244-385X>.
235. Portela D, Chaparro A & López S. 2013. *Bacillus thuringiensis*: en el manejo del agente de la pudrición blanda de la papa *Erwinia carotovora*. *NOVA* 11(20): 39-44. <https://doi.org/10.22490/24629448.1024>
236. Potrykus M, Sledz W, Golanowska M, Slawiak M, Binek A, Motyka S, Zoledowska R, Czajkowski M. & Lojkowska. 2014. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Ann Appl Biol* 165: 474-487. <https://doi.org/10.1111/aab.12156>
237. Pradhan N, Nayak R, Kumar A, Behari L. & Kanta B. 2011. *In situ* synthesis of entrapped silver nanoparticles by a Fungus-*Penicillium purpurogenum*. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* 3: 1-7. <https://doi.org/10.1166/nnl.2011.1235>.
238. Priyadarshini E, Priyadarshini S, Cousins B. & Pradhan N. 2021. Metal-fungus interaction: review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere* 274 - 129976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.12997.6>.
239. Qian Y, Yu H, He D, Yang H, Wang W, Wan X. & Wang L. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess Biosyst Eng* 36:1613-1619. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0937-z>.
240. Quester K, Avalos E. & Castro E. 2013. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron* 54 (55): 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
241. Raheman F, Deshmukh S, Ingle A, Gade A. & Rai Silver M. 2011. Nanoparticles: novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus *Pestalotia* sp. isolated from leaves of *Syzygium cumini* (L). *Nano Biomed. Eng.* 3(3):174-178.
242. Rai M, Deshmukh S, Ingle A. & Gade A. 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug- resistant bacteria. *J Appl Microbiol* 112(5):841-852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>.
243. Rai M, Bonde S, Golinska P, Trzcinska J, Gade A, Abd-Elsalam, K, Shende S, Gaikwad S. & Ingle A. 2021. *Fusarium* as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles: mechanism and applications. *J. Fungi* 7 (139). <https://doi.org/10.3390/jof7020139>.
244. Ramalingmam P, Muthukrishnan S, Thangaraj P. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles using an endophytic fungus, *Curvularia lunata* and its antimicrobial potential. *Journal of Nanoscience and Nanoengineering* 1(4): 241-247.
245. Ramos M, dos S. Morais E, Da S, Sena I, Lima A, de Oliveira F, de Freitas C *et al.*, 2020. Silver nanoparticle from whole cells of the fungi *Trichoderma* spp. isolated from Brazilian amazon. *Biotechnol Lett.* 42(5):833-43. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02819-y>.

246. Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Yadav J. 2017. Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles of endophytic fungi *Aspergillus terreus*. J Nanomed Nanotechnol 8: 457. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000457>.
247. Ravindra B. & Rajasab H. 2014. A comparative study on biosynthesis of silver nanoparticles using four different fungal species. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6(1). <http://gukir.inflibnet.ac.in:8080/jspui/handle/123456789/4094>.
248. Reddy B, Mandal R, Chakroborty M, Hijam L. & Dutta P. 2018. A review on potato (*Solanum tuberosum*) and its genetic diversity. Journal of Genetics 10(2): 360-364. <http://dx.doi.org/10.9735/0975-2862.10.2.360-364>.
249. Reinoso Y, Romero, Garcia A, Gutierrez P. & Pasos V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad 10(3): 187-191.
250. Rhim J, Park H. & Ha C. 2013, Bio-nanocomposites for food packaging applications. Prog. Polym. Sci. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>.
251. Riedel S. & Martin K. 2009 The highest oxidation states of the transition metal elements. Coord Chem Rev 253(5-6):606-624. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.014>.
252. Rodríguez S, Guzmán J, Angeles C, Rodríguez V, Ortega J, Ramírez R. *et al.* 2020. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium scirpi* and its potential as antimicrobial agent against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. PLoS ONE 15(3): e0230275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230275>.
253. Roi S, & Kumar T. 2015. Protein capped silver nanoparticles from fungus: X-ray Diffraction Studies with Antimicrobial properties against bacteria. International Journal of ChemTech Research.7(3): 1452-1459.
254. Rojas M, Corzo M, Sánchez Y, Brito D, Montes R, Martínez Y, Pino O. 2014 Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Rev. Protección Veg. 29(39):197-203.
255. Roy A, Bulut O, Some S, Kumar A. & Deniz M. 2019.Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity RSC Adv. 9: 2673. <https://doi.org/10.1039/c8ra08982e>
256. Salem S, Hammad E, Mohamed A. & El-Dougoudg W. 2023. A comprehensive review of nanomaterials: types, synthesis, characterization, and applications. Biointerface Res. Appl. Chem. 13(1): 41. <https://doi.org/10.33263/BRIAC131.041>.
257. Samberg M, Loba E, Oldenburg & Monteiro-Riviere N. 2012. Silver nanoparticles do not influence stem cell differentiation but cause minimal toxicity. Nanomedicine 7(8):1197-1209. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.18>.
258. Sambrook J, Maccallum P. & Russel D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edn. Cold Springs Harbour Press, New York, p 2344.
259. Samson R, Hoekstra E.& Frisvad J. 2004. Introduction to food and airborne fungi. 7 th. Centraalbureau voor Schimmelcultures U, editor. 389 p.
260. Sanghi R. & Verma P. 2009. Biomimetic synthesis and characterization of protein capped silver nanoparticles. Bioresour. Technol. 100: 501-504. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.048>.
261. Saravanan M. & Nanda A. 2010. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Colloids Surf. B 77: 214-218. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.026>.
262. Sarsar V, Selwal M. & Selwal K. 2015. Biofabrication, characterization and antibacterial efficacy of extracellular silver nanoparticles using novel fungal strain of *Penicillium atramentosum* KM. J. Saudi Chem. Soc. 19: 682-688. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.07.001>.
263. Saxena J, Sharma P, Sharma M. & Singh A. 2016. Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial properties. Springer Plus:861. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2558-x>.
264. Sayer J, Raggett S. & Gadd G. 1995. Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. Mycol. Res. 99(8): 987-993. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80762-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80762-4).

265. Shahzad A, Saeed H, Iqtedar M, Hussain S, Kaleem A, Abdullah R, Sharif S, Naz S, Saleem F, Aihetasham A. & Chaudhary A. 2019. Size-controlled production of silver nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely antibacterial and cytotoxic effects. Hindawi Journal of Nanomaterials. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>.
266. Shaligram S, Bule M, Bhambure R, Singhal R, Singh S, Szakacs G. & Pandey A. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain. Process Biochem. 44: 939-943.
267. Shankar S, Ahmad A, & Sastry M. 2003. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. Biotechnol. Prog. 2003, 19, 1627-1631.
268. Sharifi S, Behzadi S, Laurent, M. Forrest L, Stroeve P. & Mahmoudib M. 2012. Toxicity of nanomaterials. Chem Soc Rev 21: 41(6): 2323-2343. <https://doi.org/10.1039/C1CS15188F>.
269. Shelar G. & Chavan A. 2014. *Fusarium semitectum* mediated extracellular synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity. International Journal of Biomedical and Advance Research. <https://doi.org/10.7439/ijbar>.
270. Siddiqi K. & Husen A. 2016. Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application. Nanoscale Res Lett. 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1311-2>.
271. Sima A, Mozafari J, Nader H. & Cobre M. 2015. *In vitro* evaluation of resistant of potato cultivars against black leg disease (*Pectobacterium atrosepticum*). Biologican Forum- An International Journal 7(2):1087-1094.
272. Singh D & Sharma R. 2018. Chapter 1: Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. Postharvest disinfection of fruits and vegetables, 1: 1-52. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812698-1.00001-7>.
273. Singh D, Rathod V, Ninganagouda S, Herimath J. & Kulkarni P. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram negative bacteria. Journal of pharmacy research 7: 448- 453. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.06.003>.
274. Singh D, Rathod V, Ninganagouda S, Hiremath J, Singh A. & Mathew J. 2014. Optimization and characterization of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and application studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. Bioinorg Chem Appl. 2014:408021. <https://doi.org/10.1155/2014/408021>.
275. Singh P, Kim Y, Zhang D. & Yang D. 2016. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. Trends Biotechnol. 34(7):588-599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>.
276. Singh S, Shukla H. & Shukla S. 2017. Biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi: Its mechanism, characterization techniques and antimicrobial potential. Afr. J. Biotechnol. 16(14): 683-698.
277. Sinha S, Pan I, Chanda P. & Sen S. 2009. Nanoparticles fabrication using ambient biological resources. J Appl Biosci 19:1113-1130.
278. Sintubin L, Gusseme B, Van der Meeren P, Pycke B, Verstraete W. & Boon N. 2011. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. Appl Microbiol Biotechnol 91: 153-162. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3225-3>.
279. Sivaranjana P, Nagarajan E, Rajini N, Jawaod M. & Rajulu A. 2017. Cellulose nanocomposite films with in situ generated silver nanoparticles using *Cassia alata* leaf extract as reducing agent. Int. J. Biol. Macromol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbjbiomac.2017.02.070>
280. Sofi S, Singh J, Rafiq S, Ashraf U, Dar B. & Nayik G. 2018. A Comprehensive review on antimicrobial packaging and its use in food packaging. Current Nutrition & Food Science 14: 305-312 <https://doi.org/10.2174/1573401313666170609095732>
281. Sudheer S, Geetha R, Muthoosamy K, Tuvikene R, Kumar V. & Manickam S. 2022. Biosustainable production of nanoparticles via mycogenesis for biotechnological applications: A critical review. Environmental Research 204-111963. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111963>.
282. Suresh A, Pelletier D, Wang W, Moon J, Gu B, Mortensen N, Allison D, Joy D, Phelps T. & Doktycz M. 2010. Silver Nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and evaluation of their comparative toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. Environ. Sci. Technol 44: 5210-5215. <https://doi.org/10.1021/es903684r>.
283. Sutton S. 2011. Accuracy of plate counts. Journal of validation technology 2011: 42-46.

284. Sweet M, Chesser A. & Singleton I. 2012. Review: metal-Based Nanoparticles; size, function, and areas for advancement in applied microbiology. In Sima Sariaslani, Geoffrey M. Gadd, editors: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 80, Burlington: Academic Press, 2012, pp. 113-142. ISBN: 978-0-12-394381-01.
285. Thakkar K, Mhatre S. & Parikh R. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 6: 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>.
286. UPRA: 2021. Unidad de planificación rural agropecuaria. Costos de producción agrícola. Sistemas productivos de papa, yuca y caña panelera. Disponible en chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.upra.gov.co/documents/10184/175395/20211007\_BolCOSTOS\_2021.pdf/f27507e8-f99b-4727-8c3e-67191318eefb?version=1.0 Consultado 10 de mayo de 2022.
287. Vahabi K, Mansoori A. & Karimi S. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (A Route for Large-Scale Production of AgNPs) *Insciences J.* 1(1): 65-79. <https://doi.org/10.5640/insc.010165>.
288. Varshney R, Mishra A, Bhadauria S. & Gaur M. 2009. A novel microbial route to synthesize silver nanoparticles using fungus *Hormoconis resiniae*. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 4(2): 349-355.
289. Velhal S, Kulkarni S. & Latpate R. 2016. Fungal mediated silver nanoparticle synthesis using robust experimental design and its application in cotton fabric. *Int Nano Lett* 6:257-264. <https://doi.org/10.1007/s40089-016-0192-9>.
290. Verma V, Kharwar R. & Gange A. 2010. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Nanomedicine.* 5(1): 33-40. <https://doi.org/10.2217/nnm.09.77>.
291. Vigneshwaran N, Ashtaputre N, Varadarajan P, Nachane R, Paralikar K. & Balasubramanya R. 2006. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett.* 61:1413-1418. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.042>.
292. Vilvert E, Stridh L, Andersson B, Olson A, Aldén L. & Berlin A. 2022. Evidence based disease control methods in potato production: a systematic map protocol. *Environ. Evid.* 11:6. <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00259-x>.
293. Wakelin S, Warren R, Harvey P. & Ryder M. 2014. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol Fertil Soils.* 40: 36-43. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0750-6>.
294. Wadell, H. 1935. "Volume, shape, and roundness of quartz particles". *Journal of Geology* 43(3), 250-280.
295. Wang C, Amon B, Schulz K. & Mehdi B. 2021. Factors that influence nitrous oxide emissions from agricultural soils as well as their representation in simulation models: A Review. *Agronomy* 11, 770. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040770>.
296. Winn W, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenbergew P, Woods G. 2006. *Koneman Diagnóstico microbiológico. Textos y Atlas en color.* Editorial Panamericana. ISBN 9789500608954.
297. Xiu Z, Zhang Q, Puppala H, Colvin V. & Alvarez P. 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett.* 8:12(8):4271-4275. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>.
298. Xu Y, Li S, Yue X. & Lu W. 2018. Review of silver nanoparticles (AgNp's)-cellulose antibacterial composites. *BioResources* 13(1): 2150-2170. <https://doi.org/10.15376/BIORES.13.1.XU>.
299. Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K. & Wang L. 2016. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Nanomedicine* 11: 1899-1906. <https://doi.org/10.2147/IJN.S98339>.
300. Yadav A, Kon K, Kratosova G, Duran N, Ingle A. & Rai M. 2015. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research *Biotechnol Lett* 37, 2099-2120. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1901-6>.
301. Yi L, Liu X, Qi T, Deng L. & Zeng K. 2021. A new way to reduce postharvest loss of vegetables: Antibacterial products of vegetable fermentation and its controlling soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum*. *Biol Control.* 161. 104708. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104708>.
302. Yuen J. 2021. Pathogens which threaten food security: *Phytophthora infestans*, the potato late blight pathogen. *Food Secur.* 13(2):247-53. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01141-3>.

303. Zeng F, Hou C, Wu S, Liu X, Tong Z. & Yu S. 2007. Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their anti-microbial activities. *Nanotechnology* 18-055605. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/5/055605>.
304. Zhang D, Chen L, Zang C, Chen Y. & Lin H. 2013. Antibacterial cotton fabric grafted with silver nanoparticles and its excellent laundering durability. *Carbohydrate Polymers* 92: 2088-2094. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.100>.
305. Zhang M, Zhang K, Gusseme B, Verstraete W. & Field R. 2014. The antibacterial and anti-biofouling performance of biogenic silver nanoparticles by *Lactobacillus fermentum*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 30:3, 347-357, <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.873419>.
306. Zhang X, Yan S, Tyagi R. & Surampalli R. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* 82: 489-494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.023>.
307. Zheng Y, Cai Ch, Zhang F, Monty J, Linhardt R. & Simmons T. 2016. Can natural fibers be a silver bullet? antibacterial cellulose fibers through the covalent bonding of silver nanoparticles to electrospun fibers. *Nanotechnology* 27: 1-8. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/5/055102>.
308. Zielonka A. & Klimek M. 2017. Fungal synthesis of size-defined nanoparticles. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 8 043001. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa84d4>.
309. Zomorodian K, Pourshahid S, Sadatsharifi A, Mehryar P, Pakshir K, Rahimi M. & ArabiMonfared A. 2016. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by *Aspergillus* species. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Article ID 5435397, 6 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5435397>.

## Anexos

### Contrato de acceso a recurso genético



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y  
SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO  
ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

La presente adición de proyecto mediante el otrosí No. 30 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No.121 de 2016, se suscribe, de una parte, por **MARÍA DEL MAR MOZO MURIEL**, identificada con cédula de ciudadanía No. 38.565.370, quien actúa en calidad de Directora de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, de acuerdo con la Resolución No. 0320 y el acta de posesión No. 38 del 5 de abril de 2021, documentos conforme con los cuales se encuentra facultada para suscribir el presente documento de adición, de conformidad con lo establecido en el numeral 14 del artículo 16 del Decreto Ley 3570 de 2011, quien para todos los efectos del presente documento se denominará el **MINISTERIO**; y por otra parte, la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**, identificada con NIT. 899.999.063-3, representada legalmente por **CAMILO YOUNES VELOSA**, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.627.660 de Bogotá D.C, obrando en calidad de Vicerrector de Investigación, de conformidad con la Resolución No. 317 del 27 de mayo de 2021 y acta de posesión No. 067 del 1 de junio de 2021 expedida por la Rectora y Representante Legal de la Universidad Nacional, quien para todos los efectos se denominará **LA UNIVERSIDAD**, y **CONSIDERANDO** que: **1)** El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, a través de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos, suscribió con **LA UNIVERSIDAD** el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016, para el programa de investigación "**Estudio de la Biodiversidad Colombiana para su uso y aprovechamiento sostenible**", que tiene por objeto la búsqueda, identificación y caracterización de la biodiversidad colombiana. **2)** Dicho contrato fue perfeccionado mediante la Resolución No. 0140 del 28 de enero de 2016, por la cual se otorgó el acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados para el programa señalado. **3)** La cláusula tercera del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016 establece la posibilidad de adicionar líneas de investigación y/o proyectos a través de la suscripción de otrosí al contrato principal. **4)** Mediante comunicación enviada a este Ministerio con radicado No. E1-2021-26268 del 2 de agosto del 2021, el Vicerrector de Investigación Camilo Younes Velosa, solicitó a la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos de este Ministerio, la adición del proyecto titulado: "**Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos**"



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

*y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.*”, al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 otorgado mediante Resolución 140 del 28 de enero de 2016.5) Que Mediante concepto técnico No. 288 del 16 de noviembre de 2021, el Grupo de Recursos Genéticos de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos recomendó al director aceptar la solicitud de adición del proyecto titulado: **“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.”** 6) **LAS PARTES**, en ejercicio de la autonomía de la voluntad, acuerdan adicionar otrosí No. 30 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016, de conformidad con las siguientes:

**CLÁUSULA PRIMERA. Adición de proyecto.** En ejecución del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 2016, se adicionan las actividades de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados para el proyecto de investigación denominado **“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.”**. En consecuencia, para su desarrollo y en ejecución de este, se autoriza el acceso a los recursos genéticos a sus productos derivados en los términos establecidos en el presente otrosí y de acuerdo con lo consignado en el concepto técnico No. 288 del 16 de noviembre de 2021. **PARÁGRAFO.** Para todos los efectos se entenderá adicionado al contrato marco el proyecto de investigación **“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.”**.

**CLÁUSULA SEGUNDA. Objetivos propuestos en el proyecto de investigación.** Para las actividades de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados en desarrollo del proyecto de investigación **“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.”**. **LA UNIVERSIDAD** propuso como **Objetivo General:** Desarrollar una metodología de



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

biosíntesis de AgNp's para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *P. carotovorum* mediante el aprovechamiento de la capacidad enzimática de hongos rizosféricos aislados de cultivos de papa e inmovilizarlas en una fibra natural para limitar su lixiviación y su alcance está determinado por los siguientes objetivos específicos: **a)** Desarrollar un estudio de bioprospección con el fin de seleccionar aislamientos fúngicos de origen rizosférico que resulten promisorios para la síntesis biológica de AgNp's. **b)** Obtener y optimizar la producción de AgNp's con acción antibacterial a nivel in vitro contra *P. carotovorum* utilizando un extracto enzimático aislado de hongos rizosféricos. **c)** Inmovilizar las AgNp's biosintetizadas con acción antibacterial a nivel in vitro contra *P. carotovorum* sobre una fibra natural para limitar su lixiviación al ambiente.

**CLÁUSULA TERCERA. Identificación del proyecto.** El presente otrosí al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016, hará parte del expediente RGE0152 y para efectos de archivo se identificará como el expediente **RGE0152-30**.

**CLÁUSULA CUARTA. Obligaciones de LA UNIVERSIDAD.** Para las actividades de acceso a recursos genéticos, sus productos derivados autorizadas en desarrollo del proyecto de investigación ***“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*.”*** además de cumplir con las obligaciones establecidas en la cláusula cuarta del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016, **LA UNIVERSIDAD** deberá: **1)** Este otrosí de adición al contrato marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero del 2016, solamente autoriza a la Universidad Nacional de Colombia para acceder al recurso genético a sus productos derivados y para llevar a cabo actividades de colecta relacionadas, este no autorizaría a entidades e Instituciones diferentes para tal fin. Es decir que, si en desarrollo del proyecto de investigación titulado ***“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*”***, alguna institución o persona jurídica o natural, nacional o extranjera que pretenda acceder al recurso genético propiedad de la





**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y  
SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO  
ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

Nación, se encuentra obligada a suscribir el correspondiente contrato. La participación de otras entidades o instituciones, sólo será válida si ésta tiene la finalidad de prestación de servicios o si dichas entidades o instituciones facilitarán sus instalaciones para que el responsable técnico, en este caso el Doctor César Augusto Sierra Ávila y su equipo de trabajo de la Universidad Nacional de Colombia, realicen las actividades de acceso al recurso genético y a sus productos derivados que en este documento se mencionan. **2)** En la medida de lo posible, un ejemplar de cada especie de hongo aislado, deberá ser depositado en alguna de las colecciones biológicas registradas ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". En caso de que la colección biológica no acepte la recepción del material, deberá allegar un comunicado de esta, en el cual se evidencien los motivos por los cuales no fue aceptada. **3)** La Universidad deberá entregar a este Ministerio en cada uno de los informes de avance y final (según sea el caso), la descripción de los aislados obtenidos, indicando la especie o el taxón. **4)** Durante la ejecución del otrosí, la Universidad deberá informar de manera previa cualquier cambio que se considere en la metodología relacionada con la colecta y el acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados en el marco del proyecto para su correspondiente evaluación y aprobación. **5)** La Universidad deberá suministrar la información asociada al Sistema de Información en Biodiversidad de Colombia – SiB y enviar evidencia del proceso con los informes de avance o con el informe final que se presenten al Ministerio. **6)** Por las características y naturaleza del proyecto de investigación, es posible que la Universidad requiera solicitar confidencialidad sobre algunos documentos e información, para lo cual la Universidad deberá elevar en escrito independiente solicitud de confidencialidad en los términos que se establezcan en el contrato. **7)** Se recomienda que, si se pretende realizar análisis fuera del país de todo o parte del recurso biológico, genético y sus productos derivados, la Universidad adelante los respectivos permisos de exportación no CITES ante la autoridad competente en esta materia. **8)** La Universidad deberá entregar, en cualquiera de los informes a que se obligue, el listado de las publicaciones que se hagan en desarrollo y como resultado del proyecto y durante la ejecución del contrato que se llegue a suscribir. Este Ministerio podrá solicitar que dichas publicaciones sean allegadas al expediente o al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible según lo considere en su calidad de Autoridad Nacional Competente en materia de acceso a recursos



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

genéticos y sus productos derivados. **9)** En el evento en el que la Universidad publique, a cualquier título, deberá hacer referencia al origen colombiano de las muestras y en la medida en que las exigencias de carácter legal, científico y académico lo permitan, incluir el número del contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados, de acuerdo con los lineamientos técnicos dados por el editor o quien haga sus veces para cada publicación. **10)** Para la liberación de información genética y/o química entendida como secuencias genéticas y estructuras químicas o cualquier otra que se relacione, en bases de datos nacionales e internacionales, obtenida del acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados, la Universidad estará obligada a señalar el origen colombiano de las muestras y a indicarlo en los respectivos informes. En todo caso, La Universidad procurará que en la medida en que las exigencias de carácter legal, científico y académico lo permitan, se consigne la identificación del eventual contrato de acceso. **11)** La Universidad no podrá transferir, intercambiar, vender ni transar con terceros a ningún título, ni por dinero ni por especie, ni todo, ni parte de los recursos genéticos o sus productos derivados autorizados, sin previa autorización de la Autoridad Nacional competente en materia de recursos genéticos, y tampoco podrá obtener beneficios económicos de ningún tipo a partir de recursos genéticos o sus productos derivados sin que medie autorización expresa para fines comerciales y/o industriales. **12)** Caso en el cual, en ejecución del contrato, la Universidad pretenda solicitar patentes a partir de las actividades de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados que sean autorizadas en desarrollo del proyecto "*Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena (*Pectobacterium carotovorum*)*.", o cualquier tipo de aprovechamiento comercial e industrial que se vaya a obtener a partir de dichas actividades, deberá informarse de manera previa a este Ministerio. **13)** En caso que la Universidad realice actividades de transformación genética de algún organismo durante el desarrollo del presente proyecto, deberá adelantar los trámites pertinentes ante la Autoridad Nacional Competente en la materia. **14)** En caso que el proyecto pretenda pasar a una fase comercial de los productos que se generen de la investigación, se deberá presentar una nueva solicitud de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados con fines comerciales ante este Ministerio, anexando el plan de negocios, estudio de mercado o documentos similares que contengan la

F-E-SIG-26-V3. Vigencia 18/12/2018

Calle 37 No. 8 - 40  
Conmutador (571) 3323400

[www.minambiente.gov.co](http://www.minambiente.gov.co)



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

proyección general sobre las ventas y costos de producción en desarrollo del proyecto, y una propuesta de distribución de beneficios monetarios y no monetarios derivados del acceso. **15)** Si la Universidad, estando en ejecución del contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados, suscribe contratos accesorios deberá allegar copia de estos al expediente.

**CLAUSULA QUINTA. Duración del proyecto:** El plazo para la ejecución de actividades de acceso a recursos genéticos, sus productos derivados en desarrollo del proyecto de investigación ***“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena Pectobacterium carotovorum”***, será de cuatro años (4), contados a partir de la suscripción del presente Otrosí por las partes, tiempo que se encuentra dentro del plazo de ejecución del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No.121 de 2016. **LA UNIVERSIDAD** podrá solicitar prórroga del tiempo de duración del proyecto cuyas actividades de acceso a recursos genéticos, sus productos derivados se están adicionando y autorizando mediante el presente otrosí, su solicitud se hará en los términos establecidos en la Cláusula Octava del Contrato Marco correspondiente.

**CLAUSULA SEXTA. Informes:** En coherencia con el tiempo de duración solicitado para la ejecución de actividades de acceso a recursos genéticos, sus productos derivados en desarrollo del proyecto de investigación denominado ***“Biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de hongos rizosféricos y su inmovilización en una fibra natural para el control in vitro de la bacteria fitopatógena Pectobacterium carotovorum”***, **LA UNIVERSIDAD** deberá entregar a este Ministerio: tres (3) informes, que serán entregados dentro de los treinta (30) días hábiles siguientes cumplida cada anualidad y un informe final, entregado dentro de los treinta (30) días anteriores al término de la ejecución del respectivo Otrosí de adición de proyecto que se suscriba. Los informes deben contener los avances realizados en el plazo de ejecución del Otrosí suscrito y la descripción detallada de los resultados obtenidos en el proyecto, discriminando igualmente las actividades que se lleguen a desarrollar para cada uno de los objetivos específicos planteados en el proyecto. En caso de terminación anticipada, **LA UNIVERSIDAD** tiene la



**OTROSÍ No. 30 AL CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y  
SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121 DEL 22 DE ENERO DE 2016 SUSCRITO  
ENTRE EL MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Y LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

obligación de presentar el correspondiente informe final como anexo de su solicitud de terminación.

**CLAUSULA SÉPTIMA. Perfeccionamiento.** El presente otrosí se entiende perfeccionado con la firma de las partes. **PARÁGRAFO:** Con este documento se entienden autorizadas las actividades de acceso y este contrato autoriza la movilización de especímenes descritos en este contrato en el territorio nacional, siempre que las muestras colectadas correspondan a los especímenes y cantidades autorizados en el presente Otrosí.

**CLAUSULA OCTAVA. Vigencia de Estipulaciones.** Las demás cláusulas y términos del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 que no fueron modificados por el presente otrosí, conservan su vigencia y alcance. Para constancia, se firma en Bogotá, D.C. a los

**MARIA DEL MAR MOZO MURIEL**  
Directora de Bosques, Biodiversidad y  
Servicios Ecosistémicos  
MINISTERIO DE AMBIENTE Y  
DESARROLLO SOSTENIBLE

**CAMILO YOUNES VELOSA**  
Representante legal  
UNIVERSIDAD NACIONAL

Proyectó: Daniel Humberto Idarraga Ocampo – Abogado Grupo de Recursos Genéticos contratista DBBSE  
Revisó y Aprobó: Nathalia Roció Casas Ortiz – Coordinador Grupo de Recursos Genéticos DBBSE  
Exp: RGE0152-30.