REVISTA BIO CIENCIAS
http://revistabiociencias.uan.edu.mx
https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1649

ISSN 2007-3380

CC BY NC ND

Artículo original/Original Article

AgNPs rompe la pared celular en *Clorella vulgaris* mediante generación de estrés oxidativo

AgNPs break the wall cell in *Chlorella vulgaris* by oxidative stress generation

Robles-Jarero, E. G.[1], *Gálvez-Gastelum, F. J.*[2], *Velásquez-Ordóñez, C.*[3], *Ojeda-Martínez, M. L.*[3] , *Yañez-Sánchez, I.*[3]*

[1] *Laboratorio de Ecosistemas marinos, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Código Postal 45200, Nextipac, Zapopan, Jalisco México.* [2]*Laboratorio de Patología, Departamento de Microbiología y Patología, CUCS, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, Col. Independencia, Código Postal 44340, Guadalajara, Jalisco, México.* [3]*Centrao de Investigación en Nanociencias y Nanotecnología, Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, CUValles, Universidad de Guadalajara, Carr. Guadalajara-Ameca Km45.5, Código Postal 46600, Ameca, Jalisco,México.*

Please cite this article as/Como citar este artículo:
Robles-Jarero, E. G., Gálvez-Gastelum, F. J., Velásquez-Ordóñez, C., Ojeda-Martínez, M. L., Yañez-Sánchez, I. (2023). AgNPs break the wall cell in Chlorella vulgaris by oxidative stress generation. Revista Bio Ciencias, 11, e1649. https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1649

Article Info/Información del artículo
Received/Recibido: March 1th 2024.
Accepted/Aceptado: October 03th 2024.
Available on line/Publicado: October 18th 2024.

RESUMEN

Las nanopartículas de plata se utilizan ampliamente, en parte, por su actividad antibacteriana. Sin embargo, debido a su tamaño nanométrico, éstas no pueden ser retenidas por los filtros de aguas residuales por ende llegan al medio acuático; lo que podría afectar a microorganismos de las cadenas alimentarias iniciales como las microalgas. El propósito de este estudio fue dilucidar los efectos citotóxicos de las AgNPs (3-7 nm) en *Chlorella vulgaris* ex situ. La síntesis de nanopartículas de plata se realizó mediante reducción química de nitrato de plata; se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión. *C. vulgaris*, recolectada del lago de Chapala, Jalisco, México, fue cultivada en medio Bristol expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (0.01, 0.1 y 1 mg/L) durante 24 horas. Se determinó un importante efecto citotóxico en *C. vulgaris* expuestas a las nanopartículas de plata, manifestado por disminución en el contenido de Clorofila α, cambios morfológicos, perforaciones prominentes en las paredes celulares mediante microscopía electrónica de barrido, disminución importante del contenido de lípidos y generación de estrés oxidativo, correspondiente a la concentración de nanopartículas.

PALABRAS CLAVE: Plata; Nanopartículas; *Clorella-vulgaris*; citotoxicidad, Estrés oxidativo.

***Corresponding Author:**

Dra. en C. Irinea Yañez-Sánchez, Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, CUValles, Universidad de Guadalajara, Carr. Guadalajara-Ameca Km 45.5, Código Postal 46600, Ameca, Jalisco, México; Teléfono: +52 (375) 7580 500. E-mail: irinea.yanez@academicos.udg.mx

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) are widely used due to their antibacterial activity. However, due to their nanometric size, they cannot be retained by wastewater filters and thus reach aquatic environments, which could affect microorganisms in the initial food chains, such as microalgae. This study aimed to elucidate the cytotoxic effects of AgNPs (3-7 nm) on *Chlorella vulgaris* ex situ. The AgNP synthesis was carried out through chemical reduction of silver nitrate and characterized by Transmission Electron Microscopy. *C. vulgaris*, collected from Chapala Lake, Jalisco, Mexico, was cultured in Bristol medium and exposed to different concentrations of silver nanoparticles (0.01, 0.1, and 1 mg/L) for 24 hours. A significant cytotoxic effect was observed in *C. vulgaris* exposed to silver nanoparticles, manifested by a decrease in chlorophyll-α content, morphological changes, prominent perforations in cell walls followed by Scanning Electron Microscopy (SEM), a significant lipid content reduction, and generation of oxidative stress, corresponding to the concentration of nanoparticles.

KEY WORDS: Silver; Nanoparticles; *Chlorella vulgaris*; cytotoxicity; oxidative-stress.

Introducción

Los avances de la nanotecnología, genera aumento en las aplicaciones de los nanomateriales en todos los campos de la ciencia y la tecnología, lo anterior debido a sus propiedades físico-químicas. Así, el incremento en el uso de las nanopartículas conduce a su liberación en el ambiente y pueden ejercer efectos nocivos. Las nanopartículas metálicas son conjuntos ordenados de átomos con un diámetro que oscila entre 1 y 100 nm. Actualmente existe una gran demanda de nanomateriales utilizados en diferentes productos, donde las nanopartículas de plata (AgNPs) por su potencial efecto antibacteriano tienen una variedad de aplicaciones (Helmlinger et al., 2016), como en la industria de detergentes, cosméticos, farmacéutica, alimentaria, electrónica, textiles y pinturas. Estos nanomateriales se han utilizado en actividades agrícolas como pesticidas o fertilizantes. (Anand & Bhagat, 2019) Esta situación ha provocado que ahora estén disponibles alrededor de 1300 productos asociados a nanopartículas (el 24 % de los productos contienen AgNPs). La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) indica que el 50 % de los productos biocidas que contienen plata registrados probablemente contengan AgNP. Por otro lado, cada año se producen alrededor de 230 toneladas de AgNP en países europeos (Pham, 2019). En 2012, la producción mundial de AgNP fue de aproximadamente 60 toneladas

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

y alcanzará las 900 toneladas en 2025 (Zhou et al., 2023). La concentración de AgNP en el agua está aproximadamente en el rango de 1.27 a 2.89 µg/L (Cao et al., 2019)

Respecto a la actividad antimicrobiana de las AgNPs, se han propuesto varios mecanismos de acción, por ejemplo, la generación de radicales libres que alteran estructuras biológicas como membranas celulares, ácidos nucleicos y proteínas. Otro mecanismo es por la unión de nanopartículas o iones de plata a grupos tiol en proteínas comprometiendo su actividad. Además, la quelación de micronutrientes, como fósforo y carbono altera la síntesis de la membrana. Aparentemente, las acciones mencionadas anteriormente dependen de la presencia de Ag^{+} o AgNP, y se ha demostrado que la ionización depende de la presencia de oxígeno y las nanopartículas de menor tamaño son más susceptibles a la ionización que las nanopartículas grandes. (Helmlinger et al., 2016; Meroni et al., 2020; Nguyen et al., 2021; Pal et al., 2007)

La alta demanda en la producción y eliminación de nanopartículas, además de su gran superficie y movilidad, han aumentado el interés por su comportamiento e impacto en el medio natural y en particular la interacción y toxicidad para los organismos acuáticos. (Courtois et al., 2019; Giese et al., 2018) Varios estudios han demostrado que la toxicidad intrínseca de las AgNP depende de varios factores como el tamaño, la forma, el área superficial, la carga superficial, la solubilidad y el estado de aglomeración, entre otros. (Romero et al., 2020)

Como principal productor primario, las algas juegan un papel crucial en el equilibrio ambiental de los cuerpos de agua, particularmente las algas verdes o clorofitas son un componente importante de estos ecosistemas acuáticos y uno de los microorganismos más representativos es *Chlorella vulgaris* por ser el más abundante y comercialmente importante en la salud o fuente de combustible. (Deng et al., 2022) Además de ser una de las especies más representativas e indicadoras de daño a los ecosistemas acuáticos (Choi & Hu, 2008; Das et al., 2014), por otro lado, las microalgas pueden ser una fuente importante de antioxidantes naturales como alternativa a las plantas superiores para la producción de varios componentes químicos beneficiosos para la salud humana (Das et al., 2014; Dash et al., 2012; Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Hiriart-Baer et al., 2006). El objetivo de este estudio fue determinar las alteraciones morfológicas y oxidativas de *Chlorella vulgaris* expuesta a AgNPs.

Material y Métodos

Síntesis y caracterización de AgNP.

Se sintetizaron nanopartículas de plata disolviendo $AgNO^{3}$ (0.1 g) en 100 ml de etanol y 1 g de polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador (1:10) y un equivalente de virutas metálicas de magnesio. La solución se sometió a reflujo (363 K) con agitación durante un período de 12 h. La caracterización se realizó mediante espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) en un espectrofotómetro Varian Cary 300 con un rango espectral de 200-900nm. Posteriormente para el análisis mediante Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM), las muestras (0.5 ml de solución 5.224x10-3 M Ag^{0}) se disolvieron en concentrado de isopropanol (2

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

ml), luego se depositaron sobre rejillas de malla 300 y se secaron; finalmente, fueron analizados por HR-TEM en un microscopio TECNAI F30 operando a 3000kV.

Cultivo de *Chlorella vulgaris*

C. vulgaris se obtuvo del lago de Chapala, Jalisco, México mediante una red de arrastre de plancton a un metro de profundidad, luego se aisló mediante cultivos seriados y se mantuvo en condiciones de laboratorio, con luz blanca continua y temperatura de 25 ± 1 °C, en caldo Bristol como medio de cultivo. Una vez alcanzado el crecimiento exponencial ($1x10^6$ células m/L, aproximadamente), *C. vulgaris* se sometió a tratamientos: control negativo y tratamiento con AgNPs a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 mg/L; se incubaron en condiciones ambientales del laboratorio en agitación constante (120 rpm). Los experimentos se realizaron por triplicado durante 24 h para determinar las alteraciones de *C. vulgaris* por AgNP. Concomitantemente, en todos los tratamientos se determinó la densidad celular mediante conteo microscópico a las 24, 48, 72 y 96 h utilizando un hematocitómetro Neubauer. Los parámetros cinéticos de crecimiento se calcularon a partir de los datos de densidad celular

Determinación de clorofila-α

La determinación de clorofila-α se realizó en muestras que fueron filtradas con filtro GF/F de poros de 45 µm y 25 mm. El filtro se mantuvo en refrigeración y protegido de la luz en tubos con acetona (90 %), para su extracción. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos y finalmente lecturas a 664, 647 y 630 nm en espectrofotómetro Hach DR 2010.

Alteraciones morfológicas

Para el análisis SEM, las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos para eliminar el medio de cultivo y se enjuagaron con agua baja en sales. Posteriormente, las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5 % durante 2 horas. Se centrifugaron nuevamente 1 minuto a 1000 rpm para eliminar la solución fijadora y se lavaron dos veces con agua destilada. Los sedimentos se dividieron en pequeñas alícuotas para colocarlas sobre una cinta de carbón y una cámara de gel de sílice. Este se mantuvo en una cámara de secado de gel de sílice y finalmente las muestras se recubrieron con oro (99.9 % de pureza) mediante la técnica de pulverización catódica. Fueron observados y analizados en el microscopio electrónico de barrido JSM-6610 LV (Jeol®). Para la determinación del tamaño y cambios de morfología se seleccionaron aproximadamente 50 células de cada tratamiento.

Estrés oxidativo y contenido de lípidos neutros.

La determinación de ROS se realizó mediante la sonda fluorescente diacetato 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H^2DCFDA). Brevemente, células de algas (10 mL) fueron lavadas por centrifugación; el sedimento de cada tratamiento se mezcló en 100 µL de caldo Bristol.

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Posteriormente, se agregaron 250 µL de la mezcla de sonda de reacción compuesta por sonda H^2DCFDA, etanol y PBS (10 µM, 10 µL y 10 mL respectivamente); y se incubó 1 h a 25 °C. La fluorescencia se determinó a 450 nm (longitud de excitación) y de emisión de 595 nm en el lector de microplacas Synergy HT y el software Gen 5 2.0v, Biotek®. Para obtener el índice de formación de ROS/número de células, se contaron las células mediante observación microscópica de células vivas en una cámara de Neubauer, luego se divide la formación de ROS/número de células.

La cuantificación de lípidos neutros se realizó mezclando 3 µL del colorante Rojo Nilo (5 µM) con 290 µL de DMSO (20 %) en 5 mL de microalgas cultivadas; se agitaron con vórtex (120 rpm) y se incuba a 40 °C durante 10 min. Se colocaron 200 µL de esta mezcla individualmente en microplaca de 96 pocillos Las emisiones de fluorescencia se determinaron a longitudes de onda de excitación-emisión de 530-575 nm. Este ensayo se realizó mediante 3 réplicas de cada tratamiento. (Chen et al., 2009; Elsey et al., 2007)

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los grupos de tratamientos de *C. vulgaris*. El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 20v.

Resultados y Discusión

Caracterización de AgNP

Durante la caracterización por espectrofotometría UV-Visible. las AgNPs sintetizadas mostraron un pico máximo de absorbancia a 420 nm, esto correspondiente a la presencia de plata (datos no mostrados), así como la forma esférica y el tamaño de partícula de 3-10 nm analizados por HR-TEM, donde los tamaños más representativos fueron 3 y 7 nanómetros (Figura 1a, 1b).

La razón principal por la que las AgNP tienen propiedades diferentes a las de los materiales de mayor escala y las micropartículas, es porque en el estado de nanopartículas tiene una relación masa-superficie relativamente grande debido al alto número de partículas por unidad de masa en sus preparaciones y puede penetrar fácilmente en la pared celular y alterar biomoléculas internas. (Shanab et al., 2019) Esta condición podría afectar la reactividad química de las biomoléculas y tener consecuencias nocivas para las comunidades ecológicas. La regulación de seguridad biológica en algunos países es controvertida y las consecuencias ecológicas con respecto al uso de nanopartículas no se ha documentado completamente. En este sentido, se espera que un número cada vez mayor de AgNP ingresen a los ecosistemas acuáticos donde sus efectos sobre las comunidades naturales de fitoplancton aún no son dilucidados, con riesgos potenciales en niveles tróficos más bajos y alteración de la función del ecosistema. (Deng et al., 2022)

Es conocido ampliamente que las nanopartículas de menos de 10 nm pueden alterar directamente la permeabilidad celular, ingresar a las células bacterianas y causar daño celular.

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

La influencia de la forma y el tamaño de las partículas se describe por la liberación de iones de plata, explicada por la ecuación de Ostwald-Freundlich, donde las AgNP pequeñas con forma esférica o cuasi esférica tienen mayor probabilidad de liberar plata debido a su mayor superficie de contacto. (Yin et al., 2020)

Ensayo de toxicidad

En el presente estudio, mostramos efectos tóxicos de las AgNP en el crecimiento de *C. vulgaris* en función de la dosis y el tiempo; un efecto letal potencial en *C. vulgaris* con el uso de AgNP con tamaño de 7 nm y concentración de AgNP de 1 ppm (96 h de exposición) y a una concentración de 10 ppm, las algas están completamente muertas después de 48 h de exposición ha sido reportado (Phuong Hong Lam, 2020). La cinética de crecimiento de *C. vulgaris* expuesta a AgNP tuvo un impacto importante según el tiempo de exposición, siendo más agresiva a una concentración de 0,1 mg/L (Figura 2a). Los efectos tóxicos de las AgNP en el crecimiento de *C. vulgaris* dependieron de la dosis (Figura 2b), según lo determinado por el contenido de pigmento clorofila-α, donde se observó un efecto importante y significativo después de la exposición a las AgNP, principalmente en las dos concentraciones más altas de AgNP (0,1 y 1 mg/L, $p \leq 0,05$). De manera similar, se documentó un efecto fuertemente tóxico dependiente de la dosis y del tiempo expresado por la cinética de crecimiento y el metabolismo celular en AgNPs de *C. vulgaris* expuestas (46.8 nm) a concentraciones de 90-1440 μl/L. (Romero *et al*., 2020)

Otro estudio indica que, a concentraciones superiores a 12,5 μg/mL existen efectos tóxicos de las AgNPs, sin depender de una morfología particular; además, las partículas con una mayor superficie (esféricas) son más tóxicas en las bacterias que en las células mesenquimales, lo que sugiere que los Ag^{+} son predominantemente tóxicos en las especies bacterianas. (Helmlinger *et al*., 2016)

Una disminución similar en el contenido de clorofila α (51 %) después de 24 h de exposición a AgNP con un diámetro de 50 nm (10 mg/L, respectivamente) ha sido reportada. Nuestros resultados indicaron una disminución significativa del 8 %, 55 % y 95 % (24 h) en los niveles de clorofila-α después del tratamiento con 0,01, 0,1 y 1 mg/L de AgNP (tamaño de 5 a 7 nm), respectivamente. (Burczyk & Hesse, 1981; Oukarroum *et al*., 2012) Por el contrario, otros artículos mostraron el efecto de AgNPs de mayor tamaño (50 nm) en *C. vulgaris* obteniendo resultados en la viabilidad celular relacionada con el incremento en las concentraciones de AgNPs, a efectos fisiológicos subletales y a concentraciones de 0, 10, 50, 100, y 200 mg/L durante 8 días de exposición que los utilizados en el estudio real. (Amal *et al*., 2013; Baky & El-Baroty, 2013) En un estudio, los efectos de las AgNP (tamaño de 10 nm, 1, 5 y 10 μg/L) sobre el crecimiento del fitoplancton (contenido de clorofila) a diferentes niveles de suministro de fósforo (durante 72 h) se reporto una disminución sustancial en el nivel de clorofila relacionada con el aumento de las concentraciones de AgNP y mostró un lento crecimiento del fitoplancton con respecto a un grupo de control. (Panahi *et al*., 2013) Los efectos tóxicos más graves observados en el contenido de clorofila-α por las AgNP, en nuestros experimentos actuales (tratamientos intermedios y altos), se asocian principalmente con el pequeño tamaño de las nanopartículas, como se ha informado en estudios similares (Ayyappan *et al*., 1997; Panahi *et al*., 2013; Perreault *et al*., 2012), pero el

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

efecto tóxico fue menos pronunciado con nanopartículas más grandes (Burczyk & Hesse, 1981; Romero *et al*., 2020).

Existe una estrecha relación entre el tamaño de partícula y su actividad, ya que depende de las condiciones ambientales y de la capacidad de ionización de la plata, donde las AgNP más pequeñas se ionizan más rápido que las más grandes, haciendo que la toxicidad de los iones de plata sea más elevada (Martínez-Castañón *et al*., 2008; Sotiriou & Pratsinis, 2011). Por otro lado, las morfologías esféricas tienen biocompatibilidad y presentan menor toxicidad en comparación con los bastones o triángulos en las células oculares, lo anterior debido a un menor daño genético (presencia de DNA de cometa), generación gradual de ROS y una fuerte internacionalización de nanopartículas (anisotropía). (Nguyen, 2021,) con estos aportes podemos mencionar que las nanoesferas tienen la capacidad de unirse a la membrana de las microalgas y así penetrar gradualmente en las células, para no “golpear”, sino generar poros y provocar un desequilibrio en la membrana, lo que podría inducir la liberación de clorofila α y, posteriormente, la muerte celular.

Alteraciones morfológicas

C. vulgaris puede crecer en condiciones heterotróficas y mixotróficas exhibiendo morfologías celulares esferoidales de 2 a 15 µm de diámetro. (Romero et al., 2020) En el análisis SEM, las células de algas de control mostraron un tamaño de 7,9 µm aproximadamente, con formas relativamente redondas y superficies lisas (Figura 3). Respecto al tamaño celular, se observó una diferencia significativa durante los tratamientos, principalmente a una concentración de 0,1 mg/L (tamaño 7,0 µm). Las nanopartículas de plata tuvieron severos impactos en la pared de la microalga, con una importante presencia de poros en la superficie celular después exposición con nanopartículas. Curiosamente, las concentraciones más altas de AgNPs (0.1 y 1 mg/L) mostraron los efectos nocivos más visibles en las células, manifestados por surcos prominentes y una morfología altamente distorsionada.

En el análisis SEM se observaron varios daños significativos en la morfología de *C. vulgaris*, como se observó en otros estudios de Chlorophyta filamentosa. (Seyfabadi et al., 2010); cambios muy similares a los nuestros (perforaciones en la pared celular) han sido reportados al exponer cepas de *C. pyrenoidosa* y *Daphnia* magna al verde de malaquita (un colorante utilizado en la industria alimentaria), y también cambios significativos a nivel genético. (Kanhere et al., 2014) La rigidez de la pared celular conserva la integridad de la célula y puede conferir una ventaja evolutiva al ofrecer una protección estable contra invasores y entornos hostiles. La pared celular varía en cada fase de crecimiento, según las condiciones ambientales; las células hijas contienen una capa microfibrilar similar al quitosano compuesta de glucosamina (lo que explica su rigidez) y por la presencia de una capa de esporopollenina (Das et al., 2014; Turner et al., 2012; van Beelen et al.,2009). El daño tóxico a *C. vulgaris* podría ser el resultado de la acumulación de AgNP dentro de las células, la fijación a las paredes celulares, la protección física de la luz necesaria para el crecimiento de las algas por las nanopartículas (recubrimiento de la superficie) que dificultan la fotosíntesis, o por la quelación de varios elementos como P y C, necesarios para el crecimiento de *C. vulgaris*, especialmente para la formación de membranas de cloroplastos que constan de una bicapa de fosfolípidos (Das et al., 2014).

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la ruptura de la membrana, destacan: a) ruptura de la pared y membrana bacteriana por iones de plata (Ag^{+}); b) desnaturalización de los ribosomas; c) ruptura de producción de ATP; d) ruptura de membrana por producción de ROS; e) interferencia con la replicación del ADN; f) desnaturalización de la membrana por AgNPs y g) perforación de la membrana por AgNPs; lo cual se explica con la adhesión de AgNPs que atraviesan la membrana citoplasmática generando la liberación o salida de orgánulos y eventualmente la lisis celular. (Yin, 2020) En nuestros resultados (Figura 3), podemos ver este último mecanismo, mediante la generación de “poros” que pueden producirse por la presencia de AgNP adheridas a la membrana de la microalga.

Estrés oxidativo y contenido de lípidos neutros.

En la actualidad, se cree que el estrés oxidativo es el principal mecanismo de toxicidad de los nanomateriales diseñados. En nuestro estudio, el índice ROS/Número de células aumentó de manera dosis dependiente en respuesta a la exposición a AgNPs con respecto al número de células (Figura 4a), en estos resultados observamos una manifestación importante de generación de radicales libres a 0.1 mg/L de exposición a AgNPs.

La tinción con rojo Nilo es un excelente método para la determinación de lípidos en microalgas debido a su rapidez, simplicidad y menor biomasa. Como colorante lipófilo, el rojo Nilo tiene propiedades espectrales determinadas por la polaridad de su entorno. Emite fluorescencia intensa en disolventes orgánicos hidrofóbicos y al tener contacto con cuerpos lipídicos. En nuestro estudio, se observó una disminución importante (dependiente de la dosis) en los lípidos neutros (Figura 4b) utilizando AgNP (tamaño de 3-7 nm).

Como se mencionó anteriormente, se cree que el estrés oxidativo es el principal mecanismo de toxicidad de los nanomateriales diseñados. Nuestro análisis observamos incrementos en ROS en las tres concentraciones, pero los niveles más altos fueron de 0,1 mg/L de exposición a AgNP. Los mecanismos de esta toxicidad pueden, a su vez, verse influenciados por el tamaño de las partículas o por la formación de ROS (Burczyk & Hesse, 1981; Rodriguez-Garcia & Guil-Guerrero, 2008). La interacción con ROS podría haber jugado un papel en el presente estudio, ya que incubamos nuestros cultivos tratados en condiciones de luz natural. Por el contrario, se ha reportado que estos cambios en ROS podrían depender del número de células o cloroplastos (clorofila) y de las actividades de esterasas y peroxidasas (Safi et al., 2014).

Los seres humanos obtienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) Ω-3 a través de múltiples niveles de esta red alimentaria: microalgas, que se utilizan directamente para productos alimenticios o como alimento para animales; Las microalgas son la fuente de AGPI Ω-3 para diversos consumidores, como rotíferos, copépodos, dafnias y artemia, que, a su vez, sirven de alimento a las larvas tardías y juveniles de peces y crustáceos (estos peces luego los transmiten a los consumidores) (Kohen & Nyska, 2002; Lee, 2011); y el ganado, que se alimenta con alimentos producidos a partir de diversos organismos de la red alimentaria.

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Como se mencionó anteriormente, la tinción con rojo del Nilo es un método eficaz para la determinación de lípidos de microalgas; en soluciones acuosas, la fluorescencia del rojo del Nilo se apaga por completo y se puede cuantificar fácilmente (Priyanka et al., 2020). En nuestro estudio, se observó una importante disminución (dosis dependiente) de los lípidos neutros utilizando AgNP (tamaño de 3-7 nm). Al contrario de nuestros resultados, en una publicación se indica un aumento significativo (87 % a 489 %) en el contenido total de lípidos en las microalgas expuestas a AgNP (pero con tamaño superior, 46,8 nm) de una manera dependiente de la concentración (Romero et al., 2020). Resultados similares reportan que utilizando 5 mg/L de AgNP (tamaño de 6-12 nm) que promovieron el contenido de lípidos (14,3 %), pero cuando se elevó la concentración de AgNP, el contenido de lípidos se redujo (Shanab et al., 2019).

Todos estos resultados podrían ser favorecidos por varios factores propios de las nanopartículas como la forma, el tamaño, la agregación o la carga superficial; de manera similar la presencia de oxígeno influye en la liberación de iones Ag^{+}. Varios estudios han indicado que la liberación de iones de plata es más eficiente en partículas de plata más pequeñas, lo que lleva a una mayor toxicidad. Se ha propuesto una importante participación de la adsorción de AgNPs (5nm) y los iones de plata liberados en la superficie celular (efectos de sinergia) (Zouzelka et al., 2016), lo mismo ocurre con la superficie específica (Martínez-Castañón et al., 2008; Sotiriou & Pratsinis, 2011). Aparentemente existe una fuerte correlación entre la cinética de disolución/área de superficie específica en nanopartículas de plata. Las nanopartículas de plata con una superficie específica más pequeña se disuelven menos que aquellas con una superficie específica más alta, lo que lleva a suponer que la oxidación de Ag a Ag^{+}, en la superficie de la partícula, es el paso determinante de la velocidad de disolución (Helmlinger et al., 2016).

La citotoxicidad de AgNPs/Arcilla en bacterias mediada por la pared celular ha sido publicada, estimulando la señal citotóxica mediante un soporte similar a una placa e indican que altas concentraciones de AgNPs en cada unidad de silicato pueden alterar la integridad de la membrana, aumentar la producción intracelular de ROS, e inactivar el metabolismo dependiente de energía. (Su, 2009) En nuestro estudio prácticamente no existe diferencia significativa en la generación de ROS intracelulares (Figura 4), sin embargo, la producción de ROS fue suficiente para producir alteraciones en la membrana e interferir en la generación de ATP con el eflujo de clorofila α (Figura 2b).

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

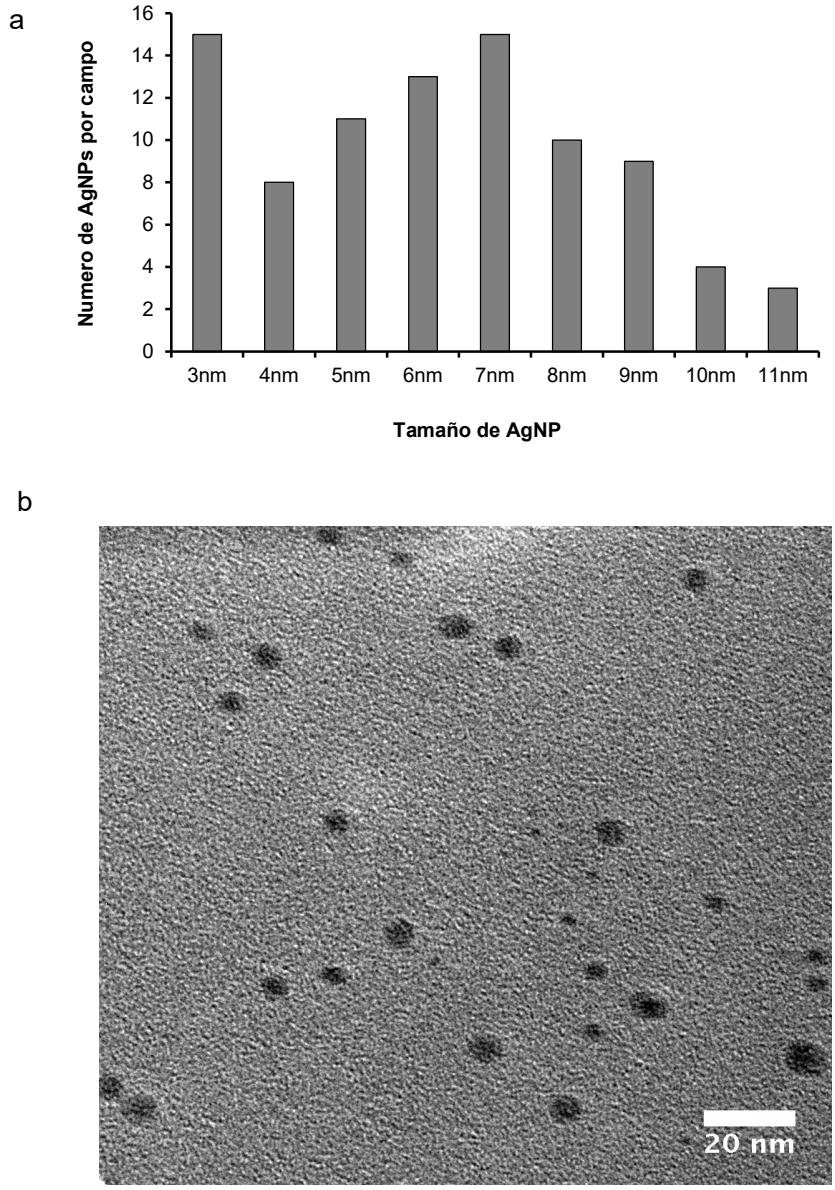


Figura 1. Caracterización de AgNPs. En a) rango de tamaños de partículas y en b) Microfotografías por HR-TEM.

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

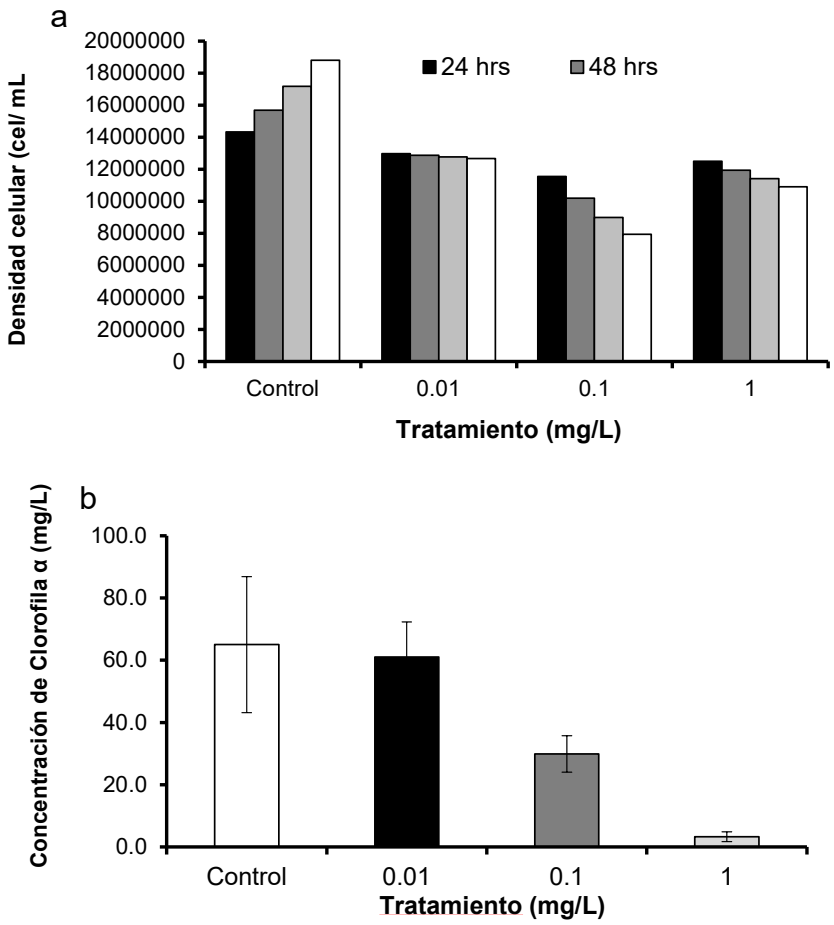
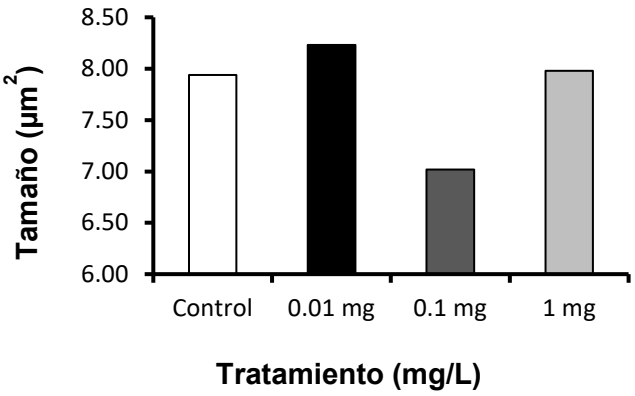


Figura 2. *Toxicidad de AgNPs en C. vulgaris. a) Ensayo de proliferación celular y en b) Contenido de clorofila a en cada grupo experimental*

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380



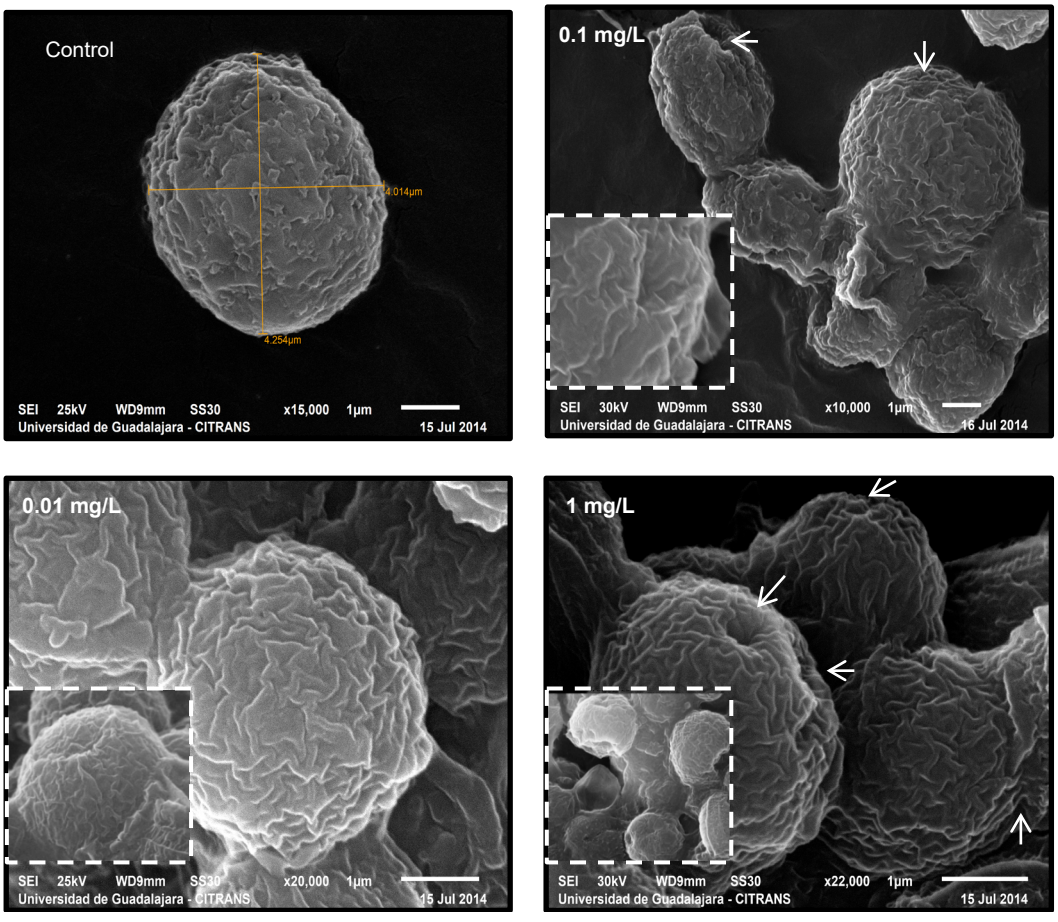


Figura 3. Alteraciones morfologicas de C. vulgaris. Análisis de C. vulgaris por SEM expuestas a AgNPs

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

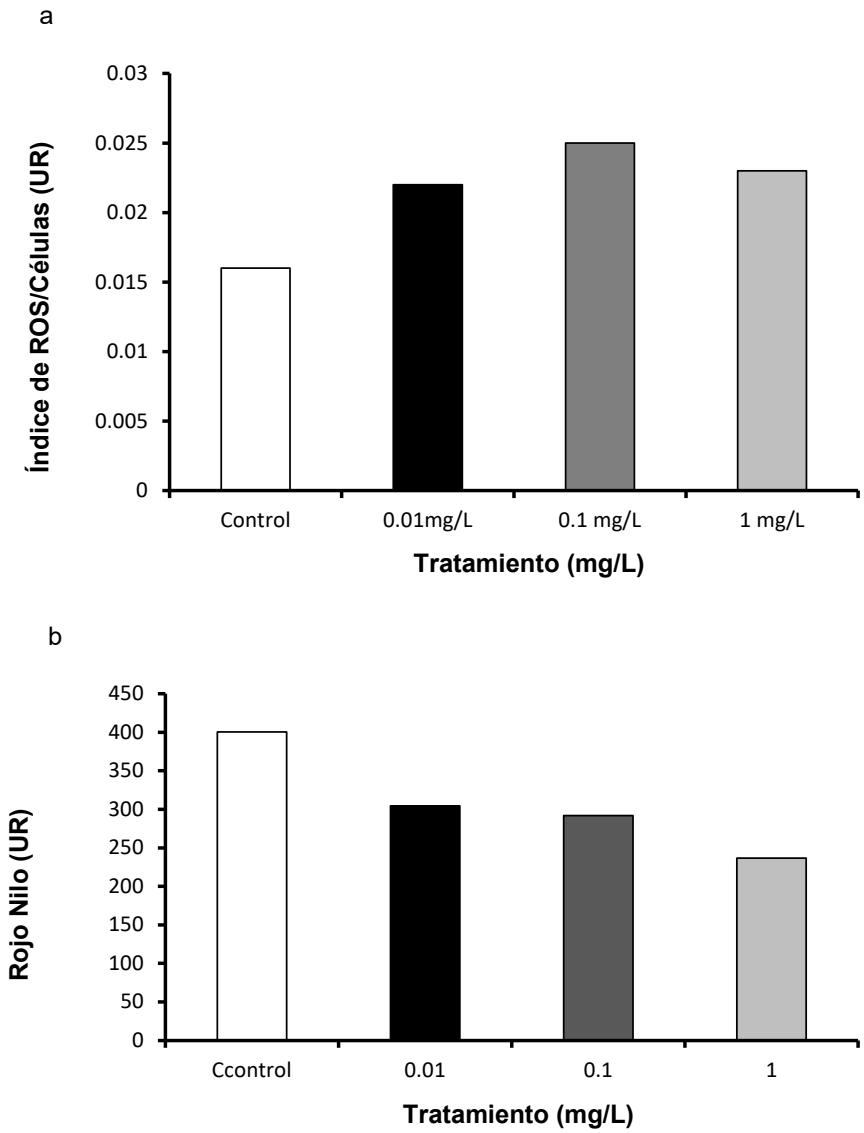


Figura 4. Impacto bioquímico de las AgNPS. A) Indice ROS/número de células y en b) Contenido de lípidos neutros de C. vulgaris expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs.

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Conclusiones

Concluimos que las AgNP se acumulan en la pared celular de C. vulgaris. Esta acumulación de nanopartículas permite la liberación de iones Ag+, induciendo estrés oxidativo en la pared celular, produciendo un pequeño poro, de aproximadamente 0,5 µm de diámetro, en la pared celular, como se muestra en la imagen SEM. Finalmente, los efectos de las AgNP en la microalga C. vulgaris dañan de manera inespecífica la clorofila-α y la morfología de sus paredes. Es importante continuar estudiando los efectos de las NP en los organismos, ya que se desconoce su comportamiento y biodisponibilidad en los ecosistemas, así como su persistencia y potencial impacto por bioacumulación en las cadenas alimentarias.

Contribuciones de los autores

EGRJ, FJGG, IYS: Diseño, definición de contenidos, búsqueda bibliográfica; EGRJ, CVO: Desarrollo de metodologías; FJGG: software; IYS, MLOM, FJGG: Validación experimental, adquisición y análisis de datos; FJGG, IYS: redacción y edición del artículo, supervisión, IYS, CVO: recursos, administración del proyecto. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Este estudio fue patrocinado por el Programa de Apoyo al Mejoramiento de las Condiciones Productivas de los Miembros del SNI y SNCA (PROSNI), de la Universidad de Guadalajara.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a los profesores Martha Lara y Eduardo Juárez del CUCBA (Universidad de Guadalajara) por su apoyo en los cultivos de *C. vulgaris* durante la exposición AgNPs. Se agradece al Cuerpo Académico de Ciencias de Nanomateriales y Materia Condensada de PROMEP UDG-CA-583, a Patricia Castillo por su hábil asistencia técnica durante los experimentos TEM-EDS.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

Amal, M., Awuah, G. B., Raboch, H., & Andersson, S. (2013). Differences and similarities of the internationalization processes of multinational companies from developed and emerging countries. *European Business Review*, *25*, 411-428. https://doi.org/10.1108/EBR-08-2012-0048

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Anand, R., & Bhagat, M. (2019). Silver nanoparticles (AgNPs): as nanopesticides and nanofertilizers. *MOJ Biology and Medicine*, *4*(1), 19-20. https://doi.org/10.15406/mojbm.2019.04.00107

Ayyappan, S., Gopalan, R. S., Subbanna, G. N., & Rao, C. N. R. (1997). Nanoparticles of Ag, Au, Pd, and Cu produced by alcohol reduction of the salts. *Journal of Materials Research*, *12*(2), 398-401. https://doi.org/10.1557/JMR.1997.0057

Baky, H. H. A. E., & El-Baroty, G. S. (2013). Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. *Journal of Aquatic Science*, *1*(1), 11-22. http://pubs.sciepub.com/jas/1/1/3

Burczyk, J., & Hesse, M. (1981). The ultrastructure of the outer cell wall-layer ofChlorella mutants with and without sporopollenin. *Plant Systematics and Evolution*, *138*(1), 121-137. https://doi.org/10.1007/BF00984613

Cao, C., Huang, J., Guo, Y., Yan, C. N., Xiao, J., Ma, Y. X., Liu, J. L., & Guan, W. Z. (2019). Long-term effects of environmentally relevant concentration of Ag nanoparticles on the pollutant removal and spatial distribution of silver in constructed wetlands with Cyperus alternifolius and Arundo donax. *Environmental Pollution*, *252*(Pt A), 931-940. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.144

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiologic Methods*, *77*(1), 41-47. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001

Choi, O., & Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, *42*(12), 4583-4588. https://doi.org/10.1021/es703238h

Courtois, P., Rorat, A., Lemiere, S., Guyoneaud, R., Attard, E., Levard, C., & Vandenbulcke, F. (2019). Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: A review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environmental Pollution*, *253*, 578-598. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.053

Das, P., Metcalfe, C. D., & Xenopoulos, M. A. (2014). Interactive effects of silver nanoparticles and phosphorus on phytoplankton growth in natural waters. *Environmental Science & Technology*, *48*(8), 4573-4580. https://doi.org/10.1021/es405039w

Dash, A., Singh, A. P., Chaudhary, B. R., Singh, S. K., & Dash, D. (2012). Effect of Silver Nanoparticles on Growth of Eukaryotic Green Algae. *Nano-Micro Letters*, *4*(3), 158-165. https://doi.org/10.1007/BF03353707

Deng, N., Li, H., Li, Y., Mo, F., Wang, M., Li, Z., Chen, X., Xu, J., Chai, R., & Wang, H. (2022). Physiological homeostasis alteration and cellular structure damage of Chlorella vulgaris exposed to silver nanoparticles with various microstructural morphologies. *Environmental Science Pollution and Research*, *29*(17), 26011-26020. https://doi.org/10.1007/s11356-022-19193-z

Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, *68*(3), 639-642. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.008

Giese, B., Klaessig, F., Park, B., Kaegi, R., Steinfeldt, M., Wigger, H., von Gleich, A., & Gottschalk, F. (2018). Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Scentifici Reports*, *8*(1), 1565. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19275-4

Helmlinger, J., Sengstock, C., Groß-Heitfeld, C., Mayer, C., Schildhauer, T. A., Köller, M., &

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Epple, M. (2016). Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects *RSC Advances*, *6*(22), 18490-18501. https://doi.org/10.1039/C5RA27836H

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, *49*, 157-173.

Hiriart-Baer, V. P., Fortin, C., Lee, D. Y., & Campbell, P. G. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, Chlamydomonas reinhardtii and Pseudokirchneriella sub-capitata, grown under continuous culture conditions: influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology*, *78*(2), 136-148. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.027

Kanhere, J., Gopinathan, R., & Banerjee, J. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of malachite green on non-target aquatic organisms: Chlorella pyrenoidosa and Daphnia magna [Article]. *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(9). https://link.gale.com/apps/doc/A384098085/AONE?u=anon~a029db01&sid=googleScholar&xid=77f70b11

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, *30*(6), 620-650. https://doi.org/10.1080/01926230290166724

Lee, S. B. (2011). Nanotoxicology: toxicity and biological effects of nanoparticles for new evaluation standards. *Nanomedicine (Lond)*, *6*(5), 759-761. https://doi.org/10.2217/nnm.11.97

Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, *10*(8), 1343-1348. https://doi.org/10.1007/s11051-008-9428-6

Meroni, G., Soares Filipe, J. F., & Martino, P. A. (2020). In Vitro Antibacterial Activity of Biological-Derived Silver Nanoparticles: Preliminary Data. *Veterinary Sciences*, *7*(1), 12. https://www.mdpi.com/2306-7381/7/1/12

Nguyen, D. D., Luo, L. J., & Lai, J. Y. (2021). Toward understanding the purely geometric effects of silver nanoparticles on potential application as ocular therapeutics via treatment of bacterial keratitis. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, *119*, 111497. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111497

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., & Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, Chlorella vulgaris and Dunaliella tertiolecta. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *78*, 80-85. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012

Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1712-1720. https://doi.org/10.1128/aem.02218-06

Panahi, Y., Mostafazadeh, B., Abrishami, A., Saadat, A., Beiraghdar, F., Tavana, S., Pishgoo, B., Parvin, S., & Sahebkar, A. (2013). Investigation of the effects of Chlorella vulgaris supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers. *Clinical Laboratory*, *59*(5-6), 579-587. https://doi.org/10.7754/clin.lab.2012.120110

Perreault, F., Bogdan, N., Morin, M., Claverie, J., & Popovic, R. (2012). Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (Chlamydomonas reinhardtii) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology*, *6*(2), 109-120. https://doi.org/10.3109/17435390.2011.562325

Revista Bio ciencias
ISSN 2007-3380

Pham, T.-L. (2019). Effect of Silver Nanoparticles on Tropical Freshwater and Marine Microalgae. *Journal of Chemistry*, *2019*, 1-7. https://doi.org/10.1155/2019/9658386

Phuong Hong Lam, M. T. L., Dung My Thi Dang, Nguyen Phuc Cam Tu, Dinh The Nhan and Tin Chanh Duc Doan. (2020). Effects of silver nanoparticles on the growth, mortality rate and morphology of Chlorella vulgaris and Thalassiosira weissflogii algae. *International Journal of Nanotechnology*, *17*(7-10), 722-739. https://doi.org/10.1504/ijnt.2020.111336

Priyanka, P., Kinsella, G. K., Henehan, G. T., & Ryan, B. (2020). Nile Red assay development for the estimation of neutral lipids in and. *The EuroBiotech Journal*, *4*(4), 216-222. https://doi.org/doi:10.2478/ebtj-2020-0025

Rodriguez-Garcia, I., & Guil-Guerrero, J. L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, *108*(3), 1023-1026. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.059

Romero, N., Visentini, F. F., Marquez, V. E., Santiago, L. G., Castro, G. R., & Gagneten, A. M. (2020). Physiological and morphological responses of green microalgae Chlorella vulgaris to silver nanoparticles. *Environmental Research*, *189*, 109857. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109857

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *35*, 265-278. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Amini Khoeyi, Z. (2010). Protein, fatty acid, and pigment content of Chlorella vulgaris under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, *23*, 721-726. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8

Shanab, S. M. M., Partila, A. M., Ali, H. E. A., & Abdullah, M. A. (2019). Characterization and Impact of Silver nanoparticles on cell growth, lipid, carbohydrate and fatty acids of Chlorella vulgaris and Dictyochloropsis splendida. *Beilstein Archives*. https://doi.org/10.3762/bxiv.2019.91.v1

Sotiriou, G. A., & Pratsinis, S. E. (2011). Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. *Current Opinion in Chemical Engineering*, *1*(1), 3-10. https://doi.org/10.1016/j.coche.2011.07.001

Turner, A., Brice, D., & Brown, M. T. (2012). Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, Ulva lactuca. *Ecotoxicology*, *21*(1), 148-154. https://doi.org/10.1007/s10646-011-0774-2

van Beelen, V. A., Spenkelink, B., Mooibroek, H., Sijtsma, L., Bosch, D., Rietjens, I. M., & Alink, G. M. (2009). An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, *47*(2), 316-320. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.014

Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry.*International Journal of Nanomedicine*, *15*, 2555-2562. https://doi.org/10.2147/ijn.S246764

Zhou, G., Xu, L., Wang, H., Sun, A., Wang, Y., Li, X., & Jiang, R. (2023). Different responses of Chlorella vulgaris to silver nanoparticles and silver ions under modulation of nitric oxide. *Environmental Science and Pollution Research Int*, *30*(23), 64536-64546. https://doi.org/10.1007/s11356-023-26846-0

Zouzelka, R., Cihakova, P., Rihova Ambrozova, J., & Rathousky, J. (2016). Combined biocidal action of silver nanoparticles and ions against Chlorococcales (Scenedesmus quadricauda, Chlorella vulgaris) and filamentous algae (Klebsormidium sp.). *Environental Science and Pollution Research Int*, *23*(9), 8317-8326. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6361-6