



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Efectos de nanopartículas de carbono sintéticas y naturales
biotransformadas por *Trichoderma sp* en el desarrollo y fotosíntesis
de *Avena sativa***

Presenta: Nestor Alejandro Muñoz Ruiz

Tesis para obtener el grado de
Químico Farmacobiólogo

Director de tesis: Dr. H. Javier A. Villegas Moreno.

Co-director: Dra. Gladys Juárez Cisneros

Morelia Michoacán. Enero 2022



El presente trabajo de investigación plasmado en esta tesis, se llevó a cabo durante el periodo agosto 2021- enero 2022 en el laboratorio de Interacción Suelo Planta Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el Laboratorio de Análisis y Diagnóstico del Patrimonio, (LADIPA) del Colegio de Michoacán.



Agradecimientos:

El esfuerzo y dedicación dispuesto en este proyecto, no es más que la consecuencia de las personas que estuvieron detrás, impulsando y guiando mi viaje.

Doy gracias a la vida misma, por darme el sostén conferido por mis padres, por los consejos de mi señora madre y las enseñanzas de mi viejo. Agradezco a mi hermano, por su apoyo, confianza y preocupación. Ya que, sin ellos, no se hubiera llegado tan lejos.

A mis amigos y compañeros, que sin esperar nada a cambio compartieron sus alegrías, tristezas y el conocimiento necesario para tener una vida llevadera.

A mi tío Armando y mi tío José, por su infinito apoyo y palabras de aliento.

A esa persona, que nunca dudo de mí, brindándome su comprensión, cariño y amor. Gracias para toda la vida.

Dr. Javier, gracias por su tiempo, confianza y enseñanza otorgados por todo este proceso, ha sido un gusto el conocerle.

Y sin duda alguna, gracias Dra. Gladys por su gran paciencia, dedicación y fortaleza para hacer de mí, una persona más optimista y sobresaliente. Sin usted todo esto no se hubiera logrado.

A mi comité revisor, el Prof. Héctor, al Prof. Rodrigo y el Prof. Eduardo por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su adiestramiento profesional no habría alcanzado este nivel. Al Dr. Salomón y al Dr. Homero por su apoyo brindado en este trabajo de investigación, gracias.

Dedicatoria

A mis padres que han hecho de sus hijos los mejores proyectos de su vida, por forjarnos con valores, reglas y trabajo duro.

Mis logros hasta ahora se los debo a ustedes, dentro del que se incluye este.

Dedicado a los progenitores de mis amados padres, por cuidar y llenar de amor a sus queridos nietos, que, aunque me hubiera encantado tenerlos en el presente y mostrarles mis logros, siempre los llevaré en mi mente.

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
<i>Avena sativa</i>	3
<i>Acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis</i>	3
<i>Trichoderma sp.</i>	4
<i>Nanopartículas</i>	5
Grafeno.....	5
Nanotubos de Carbono (NTC).....	6
Los MWCNTs sintéticos.....	6
MWCNTs de origen natural.....	7
<i>Biotransformación del grafeno y sus derivados</i>	7
JUSTIFICACIÓN	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS:	10
<i>Generales:</i>	10
<i>Específicos</i>	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
<i>Diagrama general</i>	11
<i>Obtención de nanopartículas</i>	12
MWCNTs sintéticos.....	12
MWCNTs naturales.....	12
Grafeno.....	12
Preparación de cultivo fúngico: <i>Trichoderma sp</i>	12
Secado-pulverización de <i>Trichoderma sp</i> -nanopartículas.....	12
<i>Caracterización de nanopartículas</i>	13
• Espectroscopía Raman.....	13
• Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.....	13
• Microscopía electrónica de barrido.....	13
<i>Bioensayos de Avena sativa</i>	13
<i>Diseño experimental:</i>	13
<i>Variables respuesta:</i>	15
<i>Análisis estadístico</i>	15

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
<i>Interacción nanopartícula-Trichoderma sp</i>	16
<i>Caracterización de nanopartículas</i>	17
Análisis de nanopartículas por espectroscopía infrarroja por transformada de Furier (FTIR).....	17
Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman	18
Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	20
<i>Efecto de NPs biotransformadas en la germinación de Avena sativa</i>	22
<i>Efecto de NPs biotransformadas en el crecimiento de Avena sativa</i>	23
<i>Efecto de NPs biotransformadas en la arquitectura radical de Avena sativa</i>	26
<i>Efecto de NPs biotransformadas en la biomasa de Avena sativa</i>	27
<i>Efecto de NPs biotransformadas en el contenido de clorofilas en Avena sativa</i>	29
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
CONCLUSIONES	33
PERSPECTIVAS	33
REFERENCIAS	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Biotransformación de nanopartículas por <i>Trichoderma sp</i> y efecto en el desarrollo de <i>Avena sativa</i>	11
Figura 2 Efecto de nanotubos de carbono y grafeno en la biomasa de <i>Trichoderma sp</i>	16
Figura 3 FTIR de nanotubos de carbono y grafeno, con y sin biotransformación con <i>Trichoderma sp</i> , en un experimento in vitro con agitación continua en shaker a 150 rpm/30°C por 14 días.	18
Figura 4 Espectros Raman de nanotubos de carbono y grafeno, con y sin biotransformación con <i>Trichoderma sp</i> , en un experimento in vitro con agitación continua en shaker a 150 rpm/30°C por 14 días.	19
Figura 5 Micrografías SEM de MWCNTs sintéticos, con y sin biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> obtenidas a 10Kv X10,000 y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 y 1µm.	20
Figura 6 Micrografías SEM de MWCNTs naturales, con y sin biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> obtenidas a 10Kv X10,000 y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 y 1µm.	21
Figura 7 Micrografías SEM de grafeno, con y sin biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> obtenidas a 10Kv X10,000 Y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 y 1µm.	21
Figura 8. Germinación de <i>Avena sativa</i> cultivada con 0, 10 y 20 µg/ml de nanotubos de carbono o grafeno con y sin <i>Trichoderma sp</i>	23
Figura 9 Imágenes que muestran el efecto de A) MWCNTs naturales, B) MWCNTs sintéticos, C) Grafeno y <i>Trichoderma sp</i> en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 25 días.....	24
Figura 11 Imágenes que muestran el efecto de (MWCNTs y grafeno biotransformados) y <i>Trichoderma sp</i> en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 100 días.	25
Figura 10 Imágenes que muestran el efecto de MWCNTs, grafeno y <i>Trichoderma sp</i> en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 100 días.....	25
Figura 12 Imágenes que muestran el efecto de (nanopartículas + <i>Trichoderma sp</i>) y <i>Trichoderma sp</i> en el crecimiento de <i>Avena sativa</i> a los 100 días.	26
Figura 13 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> sobre la arquitectura radicular de <i>Avena sativa</i>	27
Figura 14 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos en biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> sobre la biomasa de <i>Avena sativa</i>	28
Figura 15 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos en biotransformación por <i>Trichoderma sp</i> sobre las clorofilas A, B y total en plántulas de <i>Avena sativa</i>	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tratamientos para bioensayos con <i>Avena sativa</i> expuesta a grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación con <i>Trichoderma sp</i>	14
--	----

ACRÓNIMOS

Acrónimo	Significado
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier
GO	Óxido de grafeno
MnP	Manganeso peroxidasa
MWCNTs	Nanotubos de carbono de capa múltiple
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de carbono
RGO	Óxido de grafeno reducido
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SWCNTs	Nanotubos de carbono de capa simple

RESUMEN

En la actualidad *Avena sativa* es una fuente de alimento importante para el ganado y consumo humano en México. En la producción de *A. sativa* se emplean de forma indiscriminada insumos químicos que contaminan el ambiente. Una alternativa para reducir el uso de agroquímicos es mediante nanopartículas como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) naturales o sintéticos y el grafeno, nanopartículas (NPs) promotoras del crecimiento vegetal, sin embargo, no se han elucidado los efectos de estas nanopartículas, en otros procesos fisiológicos del desarrollo vegetal. Por otro lado, se ha documentado que procesos biosintéticos a base de hongos pueden modificar las propiedades físico-químicas de los nanotubos de carbono (NTC). Por lo que, en este trabajo el objetivo fue evaluar los efectos de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación por *Trichoderma sp* en la estimulación del crecimiento de *Avena sativa*. Se han estudiado ampliamente los basidiomicetes, sin embargo, con hongos como *Trichoderma sp*, poco se sabe de su capacidad para biotransformar MWCNTs. Para ello, se expuso grafeno, MWCNTs sintéticos y naturales al crecimiento de *Trichoderma sp* en bioensayos *in vitro* dosis respuesta. Se caracterizaron los nanomateriales mediante Espectroscopía IR y Raman, y microscopía electrónica para evaluar los cambios estructurales causados por la exposición al hongo. Posteriormente se inoculó la semilla de *A. sativa* con este material (Nanopartículas-*Trichoderma sp*). Las variables respuesta a evaluar fueron germinación, en plántulas se evaluó biomasa, variables fenotípicas de la parte aérea, arquitectura radical y clorofila. *Trichoderma sp* biotransformó la estructura y características de los nanomateriales a base de carbono, demostrando una degradación parcial de la nanopartícula. Las NPs biotransformadas por *Trichoderma sp* promovieron el desarrollo y crecimiento en *Avena sativa*.

Palabras clave: MWCNTs, biotransformación, *Trichoderma sp*, promoción del crecimiento vegetal, grafeno

ABSTRACT

Currently *Avena sativa* is an important food source for livestock and human consumption in Mexico. Chemical inputs that pollute the environment are used indiscriminately in the production of *A. sativa*. An alternative to reduce the use of agrochemicals is through nanoparticles such as natural or synthetic multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphene, nanoparticles (NPs) that promote plant growth, however, the effects of these nanoparticles have not been elucidated, in other physiological processes of plant development. On the other hand, it has been documented that fungal-based biosynthetic processes can modify the physical-chemical properties of carbon nanotubes (CNTs). Therefore, in this work the objective was to evaluate the effects of graphene, natural and synthetic MWCNTs with and without biotransformation by *Trichoderma sp* on the growth stimulation of *Avena sativa*. Basidiomycetes have been extensively studied, however, with fungi such as *Trichoderma sp*, little is known about their ability to biotransform MWCNTS. For this, graphene, synthetic and natural MWCNTs were exposed to the growth of *Trichoderma sp* in *in vitro* dose-response bioassays. Nanomaterials were characterized by IR and Raman spectroscopy, and electron microscopy to assess the structural changes caused by exposure to the fungus. Subsequently, *A. sativa* seed were inoculated with this material (Nanoparticles-*Trichoderma sp*). The response variables to be evaluated were germination, biomass, phenotypic variables of the aerial part, root architecture and chlorophyll were evaluated in seedlings. *Trichoderma sp* biotransformed the structure and characteristics of carbon-based nanomaterials, showing a partial degradation of the nanoparticle. NPs biotransformed by *Trichoderma sp* promoted development and growth in *Avena sativa*.

Keywords: MWCNTs, biotransformation, *Trichoderma sp*, plant growth promotion, graphene

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Avena sativa

La avena (*Avena sativa*) está dentro de la familia Poaceae con más de 820 géneros y cerca de 12100 especies descritas, estando en el primer lugar de importancia económica mundial, con una distribución cosmopolita, la avena en México es ampliamente utilizada como forraje para la alimentación de animales, como lo es el ganado por sus grandes concentraciones de carbohidratos fermentables (almidones) (Torres et al., 2016) y como grano entero para el consumo humano por sus componentes nutricionales. El forraje de esta gramínea es de buena calidad estando presente en todo el año, en México su producción ascendió en 1990 de 311,218 ha a 942,823 para el 2011 (Ramírez et al., 2013).

Actualmente, para mejorar la producción de *A. sativa* se emplean de forma indiscriminada insumos químicos que causan grave daño al ambiente. Por ejemplo, existen plaguicidas muy potentes como lo son los organoclorados y los organofosforados, estos últimos son los más tóxicos y menos estables, lo que puede causar más daño al medio ambiente (Del Puerto Rodríguez et al., 2014). Además, en la actualidad se conocen varias causas del cambio climático, alguna de ellas es el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, los cuales emiten óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera contribuyendo al efecto invernadero siendo este gas 298 veces mayor potencializador del calentamiento global que el CO_2 (Garzón & Cárdenas, 2013).

La disponibilidad de nutrientes en el suelo, y otros factores abióticos como la temperatura, intensidad de la luz, disponibilidad de agua. En conjunto regulan procesos metabólicos como la fotosíntesis, clave para el desarrollo vegetal y que es crítico para la producción del cultivo de *A. sativa* (Hermans et al., 2006).

Acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis

La vida fotoautótrofa fue uno de los eventos más importante para la existencia de la vida en la tierra como hoy la conocemos, dando origen a la vida aeróbica y todo lo que ello representa. Los primeros organismos fotosintéticos que se han identificado fueron las cianobacterias, capaces de asimilar la luz solar, y que contenían la maquinaria específica para generar materia orgánica a partir de CO_2 y H_2O con la liberación de oxígeno, lo que representó la evolución para diferentes organismos, como las primeras algas y plantas. Existen dos tipos de fotosíntesis, la anoxigénica que es la producción

de materia orgánica a partir de materia inorgánica sin la producción de oxígeno y la oxigénica realizada por cianobacterias y plantas, respectivamente (Blankenship, 2014).

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos, organelos que contienen pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y b que están ubicados en las membranas de los tilacoides (Nelson & Junge, 2015). Estos pigmentos fotosintéticos absorben una longitud de onda de luz azul y rojo anaranjado, que son indicados por los picos en el espectro de absorción de aproximadamente 450-475 nm y 650-675 nm, estos pigmentos fotosintéticos son esenciales para la obtención de energía, necesaria para fijar el CO₂ atmosférico en carbohidratos (en el estroma del cloroplasto) con liberación de O₂, que garanticen la síntesis y mantenimiento de biomoléculas durante el desarrollo vegetal. Por lo que la contribución al estudio y conocimiento sobre estos pigmentos en cultivos de como la *Avena sativa* podría tener importantes beneficios (Nelson & Junge, 2015).

Con el pasar del tiempo las técnicas de agricultura se han modificado para alcanzar la demanda de cultivos agrícolas para la población, sin embargo, debido al aumento exponencial de la población cada vez se requiere una mayor producción de alimentos para la sociedad. Por ello, se plantean alternativas que minimicen riesgos ambientales y mejoren el rendimiento de las plantas en procesos como la fotosíntesis.

Trichoderma sp

Para reducir el uso de insumos químicos para la agricultura sostenible de cultivos de interés agrícola como *Avena sativa*, se estudia fuertemente el desarrollo de biofertilizantes y biopesticidas a base de hongos capaces de promover el crecimiento vegetal o servir como control biológico.

Trichoderma sp es un hongo saprófito que se encuentra en una gran variedad de ecosistemas. Se ha documentado ampliamente que este hongo es un simbiote de diversas especies de plantas, capaz de estimular el crecimiento vegetal (Andrade et al., 2019) y que además juega un rol competitivo con hongos fitopatógenos, impidiendo su establecimiento en la planta, por lo cual, ampliamente se ha estudiado el uso de *Trichoderma sp* como un microorganismo usado para control biológico en plantas (Ghazanfar et al., 2018). *Trichoderma sp* tiene una actividad antagonista y micoparasita, lo que reduce las enfermedades al inhibir los patógenos en plantas. Aparte, con la investigación recabada de las últimas décadas, se sabe que *Trichoderma sp* interactúa directamente con las raíces de las plantas, confiriéndoles un desarrollo acelerado, una tolerancia al estrés abiótico e inmunidad a diversas enfermedades (Hermosa et al., 2012). La acción micoparásita de *Trichoderma sp* se asocia con la producción de enzimas extracelulares como las

quitinasas y β -1,3 glucanasas, producidas por este hongo, y proveer ventajas competitivas sobre hongos patógenos por el espacio y nutrientes, en la planta y rizósfera. Por lo que el estudio de la expresión de genes que codifican estas enzimas extracelulares son útiles para la elaboración de plantas transgénicas resistentes a enfermedades (Harman, 2006).

Nanopartículas

Por otro lado, también se está estudiando ampliamente el uso de nanopartículas para el desarrollo de nuevos insumos que mejoren la producción agrícola, la aplicación de nanomateriales, diseñados para la producción agrícola sostenible, confieren una retención de nutrientes, suprimen enfermedades y tienen un mejor rendimiento en plantas (Khan et al., 2017).

Existen diversos tipos de nanopartículas, entre ellas, las nanopartículas a base de carbono, las cuales se han clasificado de acuerdo a su forma estructural en varias categorías: fullerenos, grafeno, nanohorns, nanobeads, dots, nanofibras, nanodiamonds y los nanotubos de carbono (Kumar et al., 2018). Las nanopartículas de óxido de grafeno al igual que los nanotubos de carbono también se están estudiando ampliamente, debido a que se les ha atribuido efectos positivos en la promoción del crecimiento y la producción de biomasa en plantas (He et al., 2018) en diversos estadios del desarrollo vegetal, desde la germinación de la semilla, el crecimiento de la plántula, el inicio de las raíces, fotosíntesis y en la floración (Khan et al., 2017). Sin embargo, aún no es claro cuáles son los mecanismos que participan en la regulación del crecimiento vegetal al interactuar con las nanopartículas.

Grafeno

El grafeno es una nanopartícula orgánica de interés multidisciplinario ampliamente estudiada, debido a sus propiedades físico-químicas únicas. El grafeno sirve de base estructural para generar otras nanopartículas como los nanotubos de carbono. Sin embargo, el estudio del grafeno en cultivos vegetales ha sido poco explorado, y la poca información documentada es controversial, ya que los efectos documentados son contrastantes, al atribuírseles efectos benéficos en el crecimiento vegetal, pero también efectos fitotóxicos dependiendo de la especie, los genotipos de la planta, el tiempo de exposición a la nanopartícula y las concentraciones de grafeno administradas (Anjum et al., 2014).

En el trabajo reportado por Lu et al., (2020), encontraron que al acumularse el grafeno en hojas de arroz se intensificó la fluorescencia de los cloroplastos con un aumento de 2,4 veces mayor producción de trifosfato de adenosina con respecto al de los controles. Por otra parte (Anjum et al., 2014) en su investigación con haba (*Vicia faba L.*) obtuvieron que, a concentraciones de 100, 200 y 600 mg de óxido de grafeno (GO) L^{-1} , la germinación de la semilla y la longitud de la raíz disminuyeron, en cambio mejoraron significativamente con 400 y 800 mg de GO L^{-1} en comparación con el control.

Nanotubos de Carbono (NTC)

Los nanotubos de carbono tienen una forma tubular, constituidos principalmente por capas de grafeno, están unidos por enlaces covalentes entre carbono y carbono en forma hexagonal, pueden contener una o varias capas de grafeno en su estructura (Saifuddin et al., 2012), dando origen a los nanotubos de carbono de pared simple y los nanotubos de carbono de paredes múltiples o multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) por sus siglas en inglés, de los cuales, estos últimos tomaron una gran importancia en el estudio en plantas, al conferirles diversos beneficios (Kumar et al., 2018). Se han propuesto diversos mecanismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal inducido por los MWCNTs, por ejemplo, se les atribuye una mayor captación de agua al interior de las semillas, mejorando y acelerando el proceso de germinación (Lahiani et al., 2017).

Los MWCNTs sintéticos

En su investigación Tiwari et al., (2014) demostraron que los MWCNT sintéticos mejoraron el crecimiento germinativo en semillas de maíz (*Zea mays*) a concentraciones bajas, pero a concentraciones altas lo reducen. Estos investigadores sugieren que la mejora del crecimiento vegetal fue principalmente causada por un mayor suministro de agua inducida por los MWCNTs. Joshi, Kaur, Dharamvir, et al., (2018) en cultivo de trigo (*Triticum Aestivum L.*) encontraron que la adición de MWCNTs indujo una germinación temprana de la semilla, se estimuló la formación de pelos en la raíz y mayor engrosamiento radical, dando como resultado un crecimiento vegetal mayor comparado con las plantas control sin MWCNTs, además, aportaron el primer reporte documentado en donde se demuestra que los MWCNTs en esta gramínea modifican los haces vasculares, al incrementar los diámetros de las células del xilema-floema, a lo que se le puede atribuir la mayor absorción de agua y nutrientes al interior de la planta.

En un trabajo científico independiente, en cultivo de plantas de *Avena sativa* Joshi, Kaur, Singh, et al., (2018) reportaron que los MWCNTs son asimilados por las plantas de *Avena sativa L.* en semilla y raíz, una vez adsorbidos estimularon la germinación de las semillas y el crecimiento de la planta, y lo atribuyeron a que los MWCNTs estimularon la síntesis de clorofila y en consecuencia la función fotosintética.

MWCNTs de origen natural

Por otro lado, Lara et al., (2017) demostraron la presencia de MWCNTs de origen natural, hasta entonces desconocidos. Al explorar por primera vez sus efectos de estos MWCNTs naturales en plantas se reportaron efectos similares a los causados por los MWCNTs de síntesis química, los cuales estimularon el desarrollo foliar y radical de plantas forestales como *Eysenhardtia polystachya* (Juárez et al., 2020).

Los efectos de las nanopartículas de carbono en plantas son dependientes de las propiedades físico-químicas de los nanomateriales. Se ha documentado que diversos hongos, especialmente basidiomicetos tienen la capacidad de modificar o biotransformar estas características estructurales haciéndolos más reactivos, más solubles, o modificando la afinidad de estos nanomateriales por los distintos tejidos vegetales, y, en consecuencia, los efectos en el desarrollo vegetal pueden ser distintos a los ya documentados.

Biotransformación del grafeno y sus derivados

Yang et al., (2018) incubaron óxido de grafeno reducido (RGO) con interacción de *Phanerochaete chrysosporium* durante 4 semanas, en tal estudio se investigó la transformación del RGO por diversas técnicas, se obtuvo que *P. chrysosporium* agregó oxígeno al RGO de esta manera se disminuyó el contenido de carbono. Esta transformación se atribuye a la degradación enzimática por parte de *P. chrysosporium*, dando con ello un método para el control de los derivados de grafeno en el medio ambiente. En otro estudio Lalwani et al., (2014) trabajaron con nanocintas de óxido de grafeno oxidadas y reducidas en interacción con lignina peroxidasa producida por *P. chrysosporium*, en presencia y ausencia de alcohol veratrílico. Se mostró en la microscopía electrónica de transmisión grandes defectos en la hoja de grafeno, los cuales aumentan al estar más tiempo en contacto.

Zhang et al., (2014) en su trabajo compararon la transformación de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) con la interacción de tres enzimas lignolíticas: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa (MnP) provenientes de *P. chrysosporium* y lacasa obtenida de *Trametes versicolor*, de las cuales solo MnP fue capaz de biotransformar los SWCNTs. En un trabajo similar, (Ma et al., 2019) evaluaron la degradación de MWCNTs prístinos y oxidados, por *P. chrysosporium* los resultados arrojaron que hubo una degradación parcial de los MWCNTs en un corto periodo de tiempo.

En su investigación Juárez et al., (2021) evaluaron la capacidad de dos especies de hongos (*Penicillium chrysogenum* y *Pleurotus ostreatus*) para biotransformar MWCNTs mediante la interacción de lacasas y peroxidases provenientes de estos dos hongos, los resultados indican modificaciones estructurales en la superficie de los MWCNTs.

Por lo anterior, algunas enzimas fúngicas pueden modificar o biotransformar la estructura y propiedades físico-químicas de los nanomateriales a base de grafeno, y en consecuencia sus efectos sean distintos en plantas a los documentados.

JUSTIFICACIÓN

Los MWCNTs naturales y sintéticos, así como el grafeno son nanopartículas capaces de estimular el crecimiento vegetal. Sin embargo, también pueden tener efectos fitotóxicos dependiente de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, la concentración y el modelo biológico evaluado. Así mismo, se ha documentado que diversos hongos son capaces de modificar la morfología y propiedades físico-químicas de los nanomateriales. Sin embargo, no se ha documentado si *Trichoderma sp* modifica la estructura del grafeno o de los MWCNTs naturales o sintéticos y si estas modificaciones tienen un efecto en el desarrollo de la planta. Por otro lado, no es claro cuál es el efecto que desempeñan dichas nanopartículas en la fotosíntesis, proceso clave durante el desarrollo vegetal. Por lo que es de gran importancia evaluar si estos nanomateriales naturales o sintéticos expuestos a una biotransformación controlada pueden aumentar sus efectos sobre la concentración de clorofila de la planta y mejorar su habilidad de estimular el crecimiento vegetal, en plantas de interés agrícola como *Avena sativa*.

HIPÓTESIS

El grafeno, los MWCNTs naturales y sintéticos biotransformados por *Trichoderma sp* promueven el crecimiento y el desarrollo de *Avena sativa*

OBJETIVOS:

Generales:

Evaluar la capacidad de *Trichoderma sp* para biotransformar nanopartículas de carbono.
Evaluar los efectos de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos biotrasformados por *Trichoderma sp* en la síntesis de clorofila.

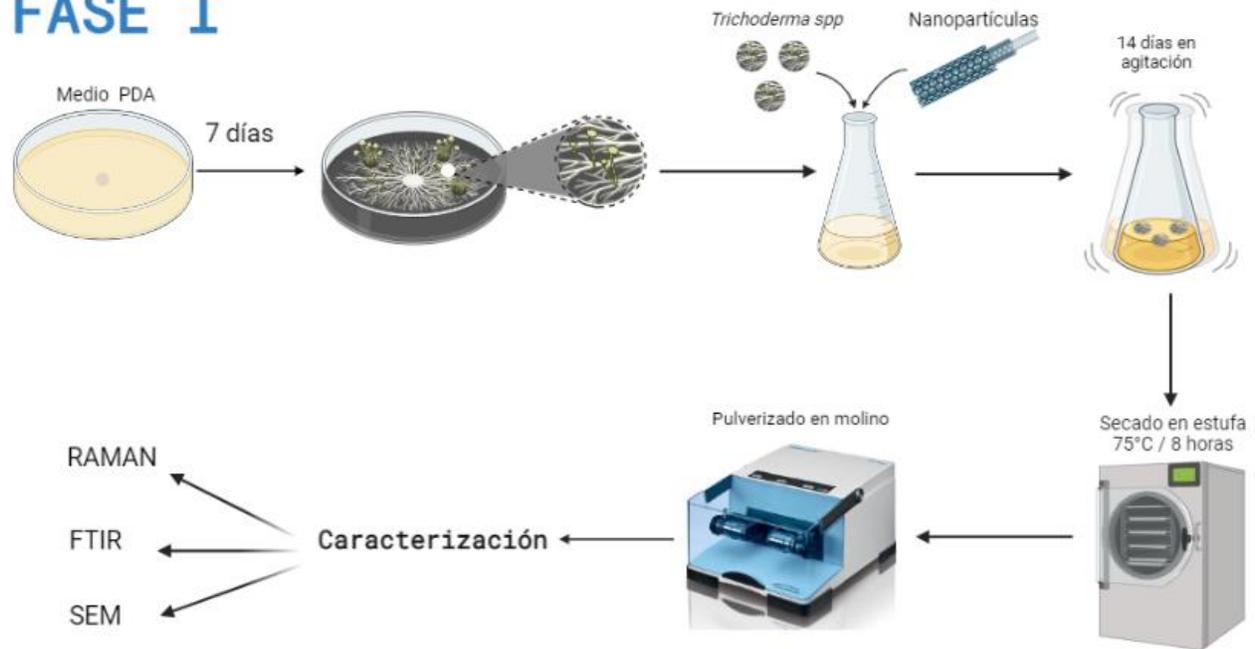
Específicos

1. Evaluar la capacidad de *Trichoderma sp* para modificar la morfología de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos.
2. Evaluar el efecto del grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos sobre el crecimiento de *Trichoderma sp*
3. Evaluar los efectos de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos en interacción con *Trichoderma sp* en la promoción de crecimiento y desarrollo de *Avena sativa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama general

FASE I



FASE II

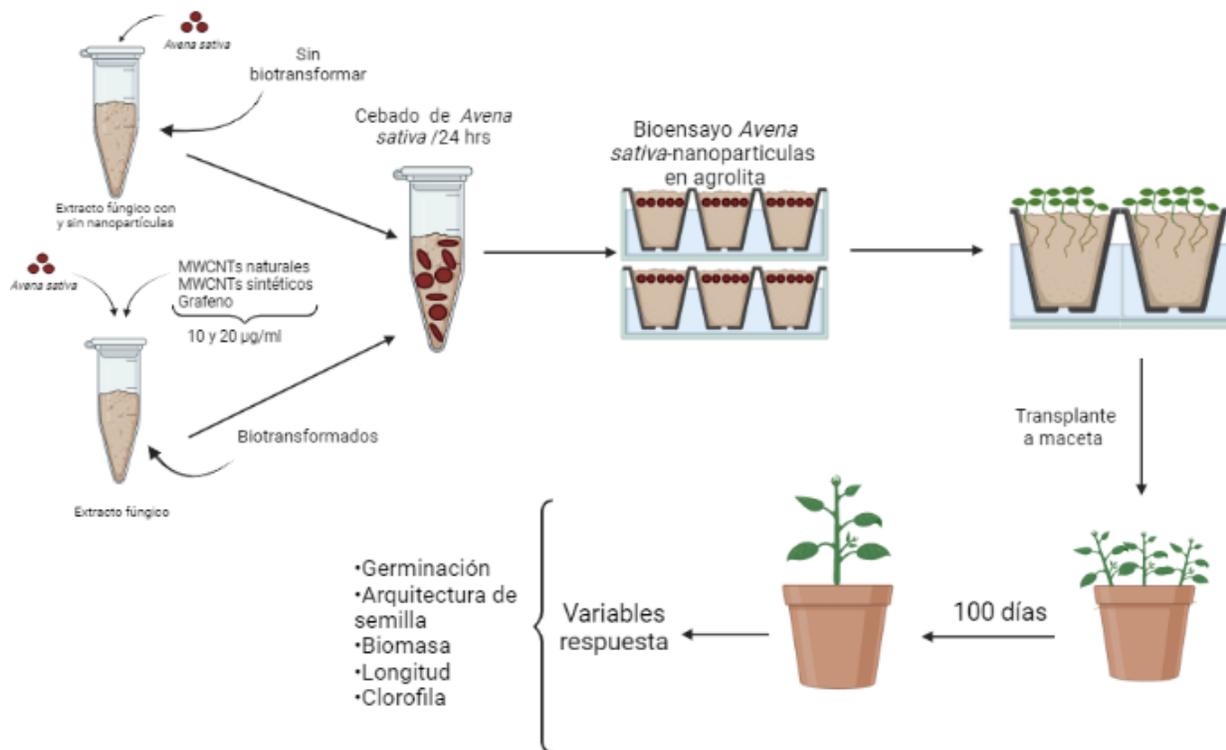


Figura 1 Biotransformación de nanopartículas por *Trichoderma sp* y efecto en el desarrollo de *Avena sativa*.

Obtención de nanopartículas

MWCNTs sintéticos

Se utilizaron para este estudio MWCNTs de origen sintético con las siguientes características: diámetro externo de 6 a 13 nm, diámetro interno de 2,0 a 4,0 nm, longitud de 2,5 a 20 μm , un espesor de pared medio de 7 a 13 capas de grafeno y una pureza > 98% (Aldrich, Cat 698849).

MWCNTs naturales

Se utilizaron MWCNTs de origen natural obtenidos de muestras de madera quemada de *Pinus oocarpa* de bosques en Michoacán, centro-oeste de México. Los MWCNTs fueron recolectados y purificados de acuerdo con Lara-Romero et al., (2017) y presentaron las siguientes características estructurales: ~10 capas de grafeno, con diámetros interior y exterior de 2,52 nm y 12 15 nm, respectivamente.

Grafeno

Se obtuvo del raspado fino de la mina de un lápiz #2 utilizando un bisturí, recolectando solo el material más fino.

Preparación de cultivo fúngico: *Trichoderma sp*

Se inoculó *Trichoderma sp* en caja Petri en un medio de Potato Dextrose Agar (PDA) por 7 días a una temperatura de 25° C. Posteriormente se tomaron 3 discos de ~0.5cm² y se cultivaron en medio líquido papa dextrosa. Se suplementó a cada matraz con medio líquido suplementado con MWCNTs naturales, sintéticos y grafeno en concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron a 30°C con 150 rpm en shaker durante 14 días.

Secado-pulverización de *Trichoderma sp*-nanopartículas

Después de 14 días de crecimiento de *Trichoderma sp* en medio líquido, se eliminó el total de H₂O en estufa a una temperatura de 75° C por 8 hrs. Posteriormente en balanza analítica se obtuvo el peso seco total fúngico para evaluar el efecto de las diferentes nanopartículas en el crecimiento de *Trichoderma sp*. Finalmente se pulverizó el material seco con el hongo-nanomateriales en molino orbital para homogenizar y reducir el tamaño de partícula.

Caracterización de nanopartículas

Los MWCNTs y el grafeno con y sin exposición al crecimiento de *Trichoderma sp* (pulverizado) fueron caracterizados por los siguientes métodos analíticos:

Las muestras se calcinaron a 1000 ° C por 3 hrs, posterior se realizó la caracterización de nanomateriales para evaluar el efecto de *Trichoderma sp* sobre los cambios estructurales de los nanomateriales.

- Espectroscopía Raman
- Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
- Microscopía electrónica de barrido

Bioensayos de *Avena sativa*

Semillas de *Avena sativa* cebadas durante 24 hrs con el inóculo nanopartículas- *Trichoderma sp* (pulverizado-secado) correspondientes a cada tratamiento, fueron cultivadas en semilleros con agrolita previamente esterilizada 40min a 121°C y 1atm de presión, después de 30 días posteriores a la siembra, las plántulas se trasplantaron a macetas con agrolita y se mantuvieron en casa sombra a temperatura de 25° C hasta los 100 días de crecimiento después de la siembra.

Diseño experimental:

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorio, con controles y 19 tratamientos, cada uno con sus correspondientes concentraciones de nanopartículas y extracto fúngico, dispuestos de la siguiente manera:

Tabla 1 Tratamientos para bioensayos con *Avena sativa* expuesta a grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos con y sin biotransformación con *Trichoderma sp*

Tratamiento	Nanopartícula	Concentración de nanopartícula suplementada (µg/semilla)	Interacción nanopartícula- <i>Trichoderma sp</i>
Control	NO	0	NO
Tratamiento 1	<i>Trichoderma sp</i> sin NPs	0	NO
Tratamiento 2	MWCNTs naturales	10	NO
Tratamiento 3	MWCNTs naturales	20	NO
Tratamiento 4	MWCNTs sintéticos	10	NO
Tratamiento 5	MWCNTs sintéticos	20	NO
Tratamiento 6	Grafeno	10	NO
Tratamiento 7	Grafeno	20	NO
Tratamiento 8	MWCNTs naturales	10	Biotransformación
Tratamiento 9	MWCNTs naturales	20	Biotransformación
Tratamiento 10	MWCNTs sintéticos	10	Biotransformación
Tratamiento 11	MWCNTs sintéticos	20	Biotransformación
Tratamiento 12	Grafeno	10	Biotransformación
Tratamiento 13	Grafeno	20	Biotransformación
Tratamiento 14	MWCNTs naturales	10	Hongo+ Nps
Tratamiento 15	MWCNTs naturales	20	Hongo+ Nps
Tratamiento 16	MWCNTs sintéticos	10	Hongo+ Nps
Tratamiento 17	MWCNTs sintéticos	20	Hongo+ Nps
Tratamiento 18	Grafeno	10	Hongo+ Nps
Tratamiento 19	Grafeno	20	Hongo+ Nps

*Biotransformación= las nanopartículas se incubaron con *Trichoderma sp* por 14 días para biotransformación de NPs

*Hongo+ NPs= NPs fueron mezcladas con micelio de *Trichoderma sp* pulverizado.

Nota: Los tratamientos se trataron con una solución mineral reducida en 50% de los minerales.

Variables respuesta:

Se evaluó la biomasa seca de *Trichoderma sp* cultivado en medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos.

Se realizó una caracterización parcial de los nanomateriales expuestos al crecimiento *Trichoderma sp* durante 14 días.

Se evaluó la germinación de las semillas de *Avena sativa* durante los primeros 20 días después de la siembra, se determinó el porcentaje y velocidad de germinación de las semillas.

Plántulas de 100 días de crecimiento se analizaron con WhinRhizo software para determinar la arquitectura radical y aérea; asimismo, se evaluó la biomasa de las plántulas (peso fresco y seco).

Se midió la concentración de clorofila A, B y total en plántulas de 100 días de crecimiento mediante espectrofotometría.

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las medias se compararon mediante las pruebas de Tukey con $p < 0.05$, en el software JMP Pro Statistical Discovery.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción nanopartícula-*Trichoderma sp*

Para evaluar la capacidad de *Trichoderma sp* en presencia de nanopartículas se evaluó el peso seco fúngico de este hongo, cultivando en medio PDA líquido con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas, con agitación continua a 150 rpm/30°C por 14 días. Los resultados mostraron que los MWCNTs promovieron un aumento de la biomasa fúngica de *Trichoderma sp*. Se registró un aumento significativo de biomasa fúngica en los ensayos tratados con MWCNTs naturales y sintéticos en comparación con el control, mientras que en los ensayos tratados con grafeno no se detectaron diferencias significativas (Fig 2).

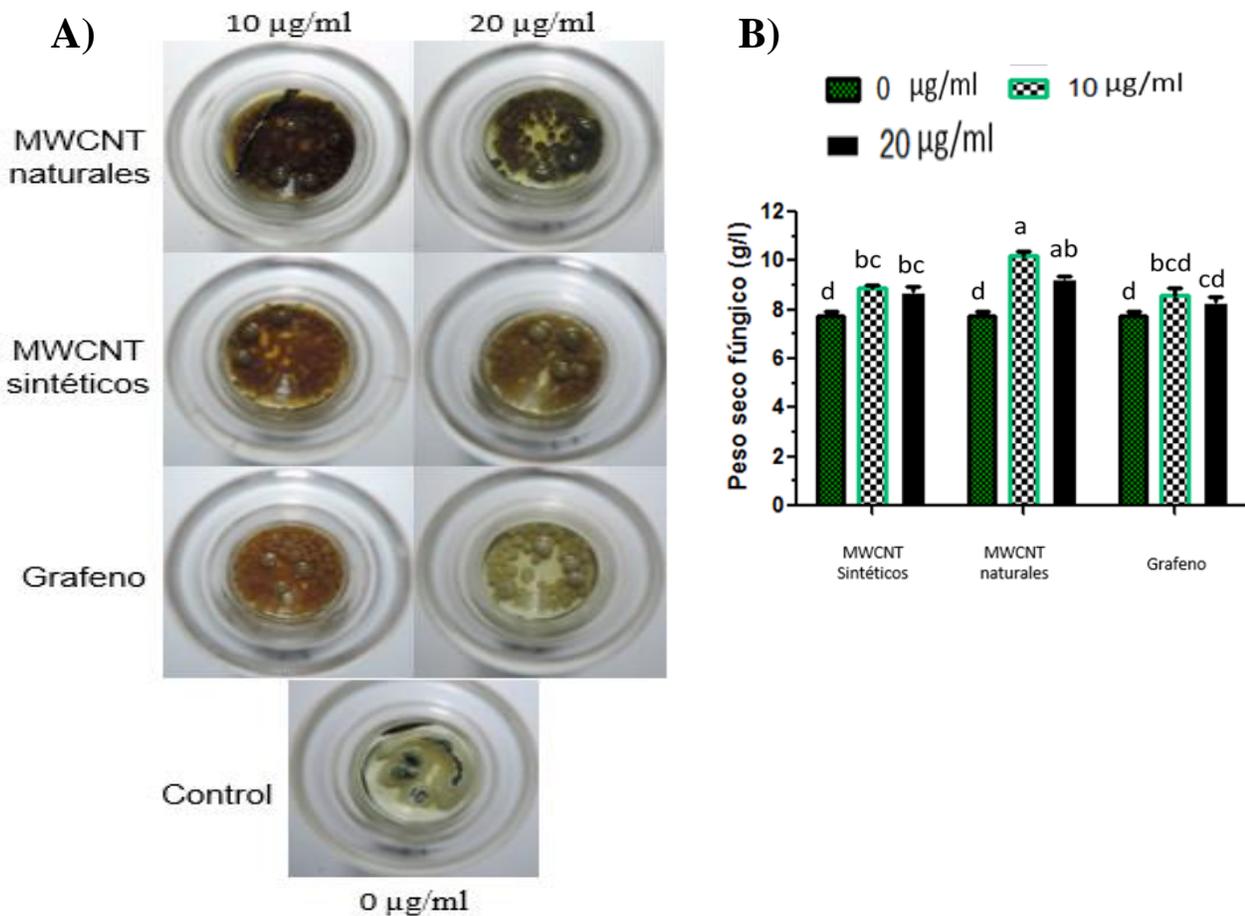


Figura 2 Efecto de nanotubos de carbono y grafeno en la biomasa de *Trichoderma sp*.

1A=Imágenes representativas de crecimiento del hongo; 1B= Peso fúngico de *Trichoderma sp* en bioensayo *in vitro* con agitación continua a 150 rpm/30°C por 14 días. n=3, los datos fueron analizados con ANOVA-tukey, letras distintas son significativamente distintos.

Caracterización de nanopartículas

Para identificar y confirmar la biotransformación del grafeno y MWCNTs naturales y sintéticos a la exposición de *Trichoderma sp*, las muestras fueron analizadas por distintos métodos:

Análisis de nanopartículas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los resultados obtenidos por FTIR mostraron en MWCNTs sintéticos los grupos funcionales C=C a 1522, OH a 3675 y 2295 cm^{-1} , mientras que en los MWCNTs naturales se identificaron los grupos funcionales C-H a 2975 cm^{-1} , C-O a 2165 y 1441 cm^{-1} , C=C 1597 cm^{-1} , al comparar estas nanopartículas con los FTIR de los MWCNTs naturales y sintéticos expuestos a *Trichoderma sp*, se observó la pérdida de grupos funcionales como C=C y OH, mientras que se detectaron otros como C-H a 617, 1397, 304 cm^{-1} . Por el contrario, en las muestras de grafeno no se observó un cambio en sus grupos funcionales (Fig.3).

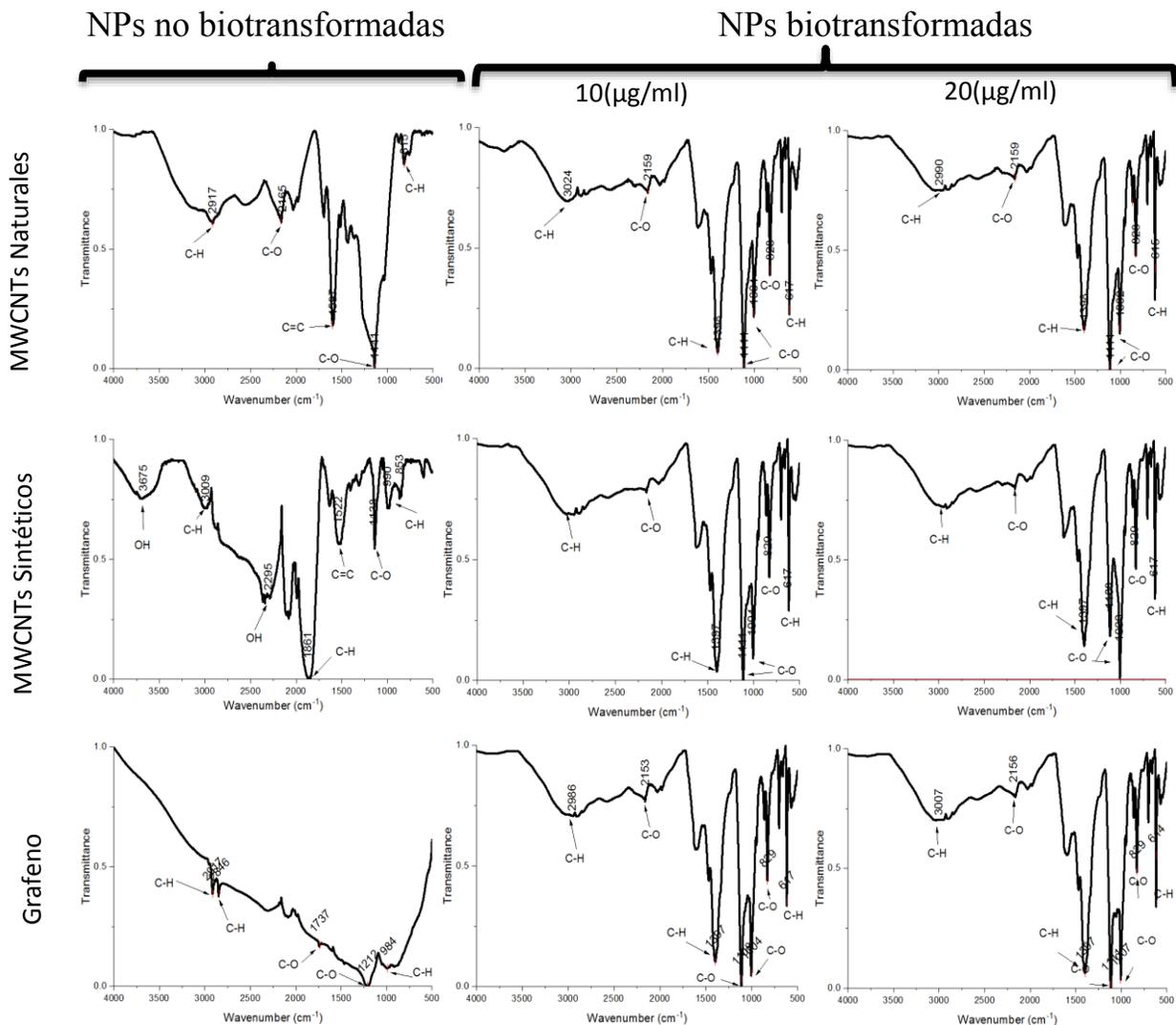


Figura 3 FTIR de nanotubos de carbono y grafeno, con y sin biotransformación con *Trichoderma sp*, en un experimento in vitro con agitación continua en shaker a 150 rpm/30°C por 14 días.

Análisis de nanopartículas por Espectroscopía Raman

Los análisis por espectroscopia Raman se efectuaron a nanotubos de carbono y grafeno, con y sin biotransformación con *Trichoderma sp*, para su caracterización. En la figura 4 se muestran los espectros de análisis Raman para las nanopartículas a base de carbono. Se observan picos ~ 1350 y 1600 cm^{-1} que corresponden a las bandas ID e IG respectivamente. Con esto obtenemos a relación ID/IG en los que valores de $ID/IG < 1$ indican que los nanomateriales son más cristalinos o presentan menos defectos en su estructura (Wang et al., 2005). Los valores ID/IG de los MWCNTs mostraron que la interacción de *Trichoderma sp* con esta nanopartículas disminuyeron la cristalinidad, donde

se detectaron valores de 1.14 en los NTC sin el hongo comparado con 1.47 y 1.24 con los MWCNTs con el hongo. Mientras que en el grafeno y en los MWCNTs naturales no se detectaron diferencias significativas en la relación ID/IG.

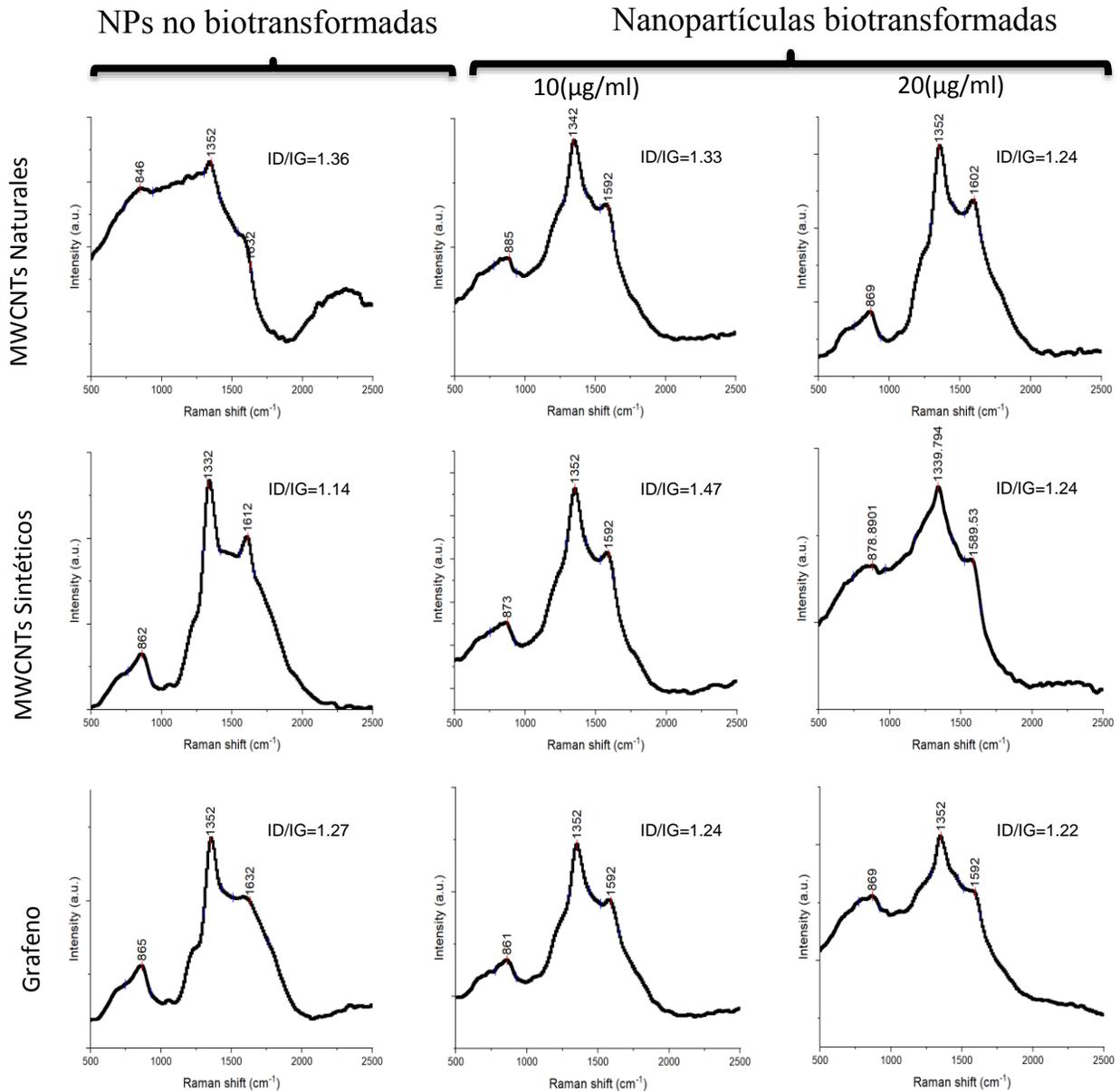


Figura 4 Espectros Raman de nanotubos de carbono y grafeno, con y sin biotransformación con *Trichoderma sp.*, en un experimento *in vitro* con agitación continua en shaker a 150 rpm/30°C por 14 días.

Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM mostraron una clara biotransformación de las nanopartículas (Figs. 5-7). Se observan cambios tanto en la morfología, como en el tamaño de los nanomateriales. Además, diferencias dependientes de la concentración de NPs que se aplicó. Cabe señalar que en los MWCNTs se observa una degradación parcial dada por *Trichoderma sp* (Figs. 5 y 6).

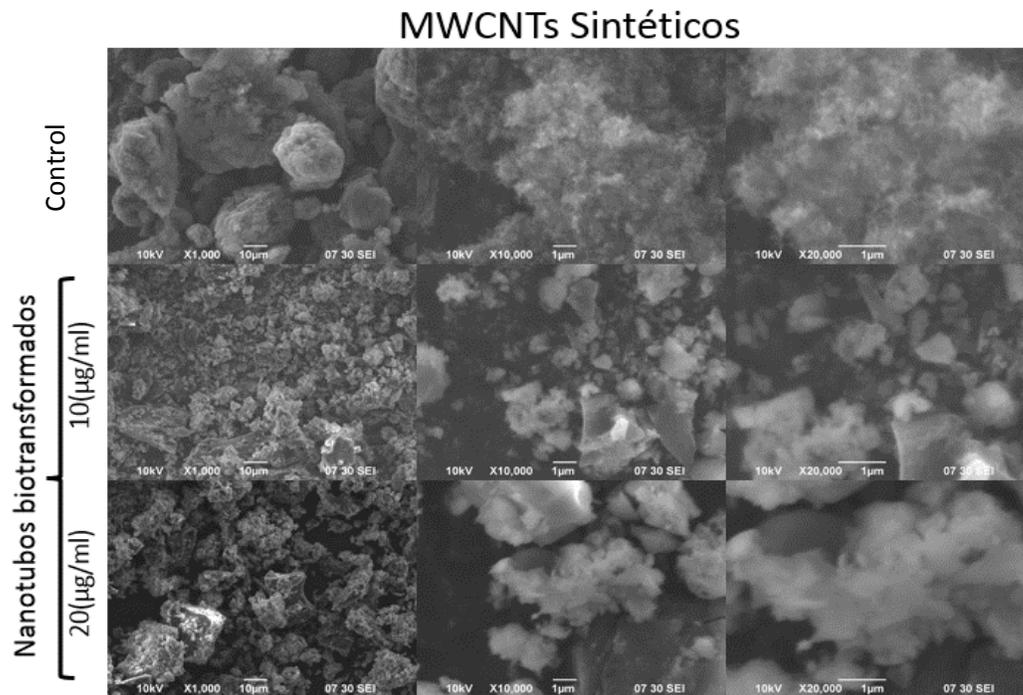


Figura 5 Micrografías SEM de MWCNTs sintéticos, con y sin biotransformación por *Trichoderma sp* obtenidas a 10Kv X10,000 y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 v 1µm.

MWCNTs Naturales

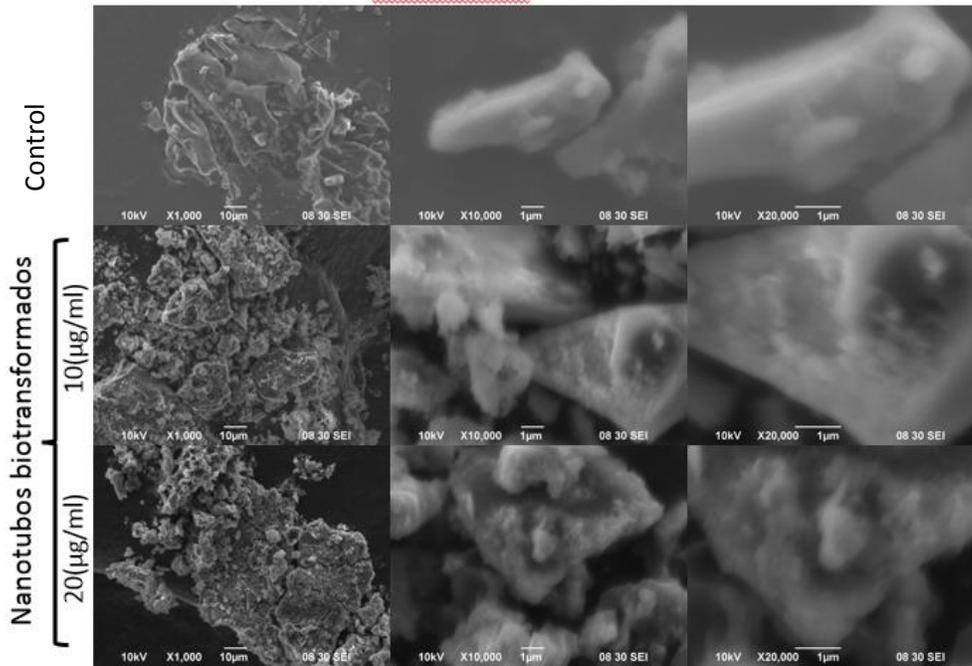


Figura 6 Micrografías SEM de MWCNTs naturales, con y sin biotransformación por *Trichoderma sp* obtenidas a 10Kv X10,000 y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 y 1µm.

Grafeno

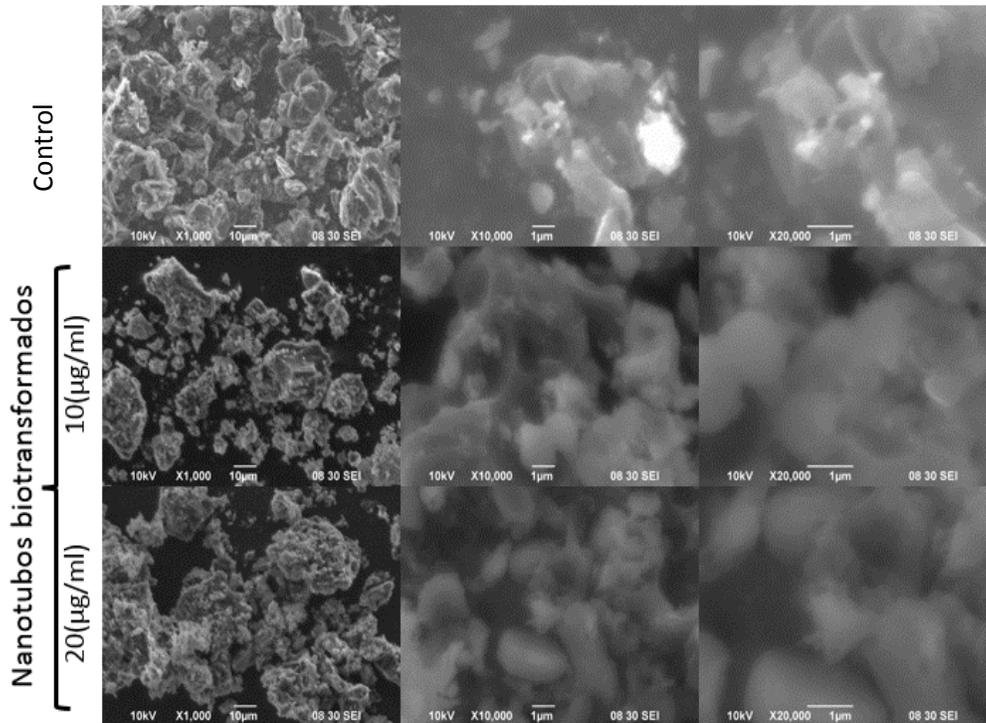


Figura 7 Micrografías SEM de grafeno, con y sin biotransformación por *Trichoderma sp* obtenidas a 10Kv X10,000 Y 20,000 08 30 SEI, la línea representa escala 10 y 1µm.

Efecto de NPs biotransformadas en la germinación de *Avena sativa*

Los resultados de germinación de semillas mostraron que la adición de MWCNTs naturales y grafeno a concentración de 20 µg/semilla junto con *Trichoderma sp* tuvo un efecto en la emergencia temprana de la semilla, comparado con el control, y el porcentaje de germinación alcanzado fue del 100%. En contraste, los tratamientos causaron una inhibición en el porcentaje de semillas germinadas en comparación al control (Figura 8).

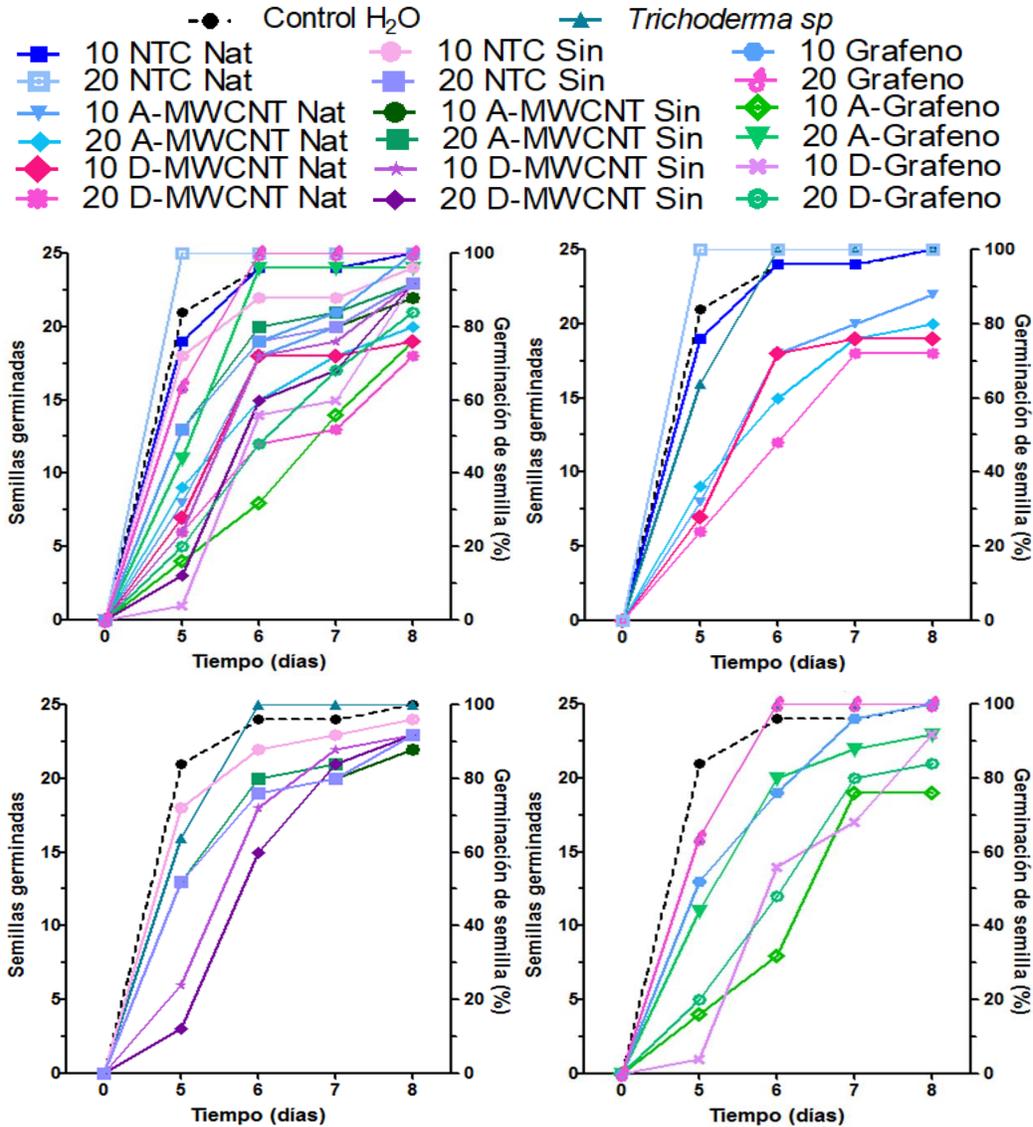


Figura 8. Germinación de *Avena sativa* cultivada con 0, 10 y 20 µg/ml de nanotubos de carbono o grafeno con y sin *Trichoderma sp*

*A= Biotransformadas

*D= Nanopartículas + *Trichoderma sp*

Efecto de NPs biotransformadas en el crecimiento de *Avena sativa*

En la figura 9 se muestra el crecimiento de *Avena sativa* cultivada con MWCNTs naturales o sintéticos, grafeno a concentración de 10 y 20 µg/semilla con y sin biotransformación por *Trichoderma sp* conservadas para su desarrollo en condiciones de casa de sombra, veinticinco días después de la siembra.

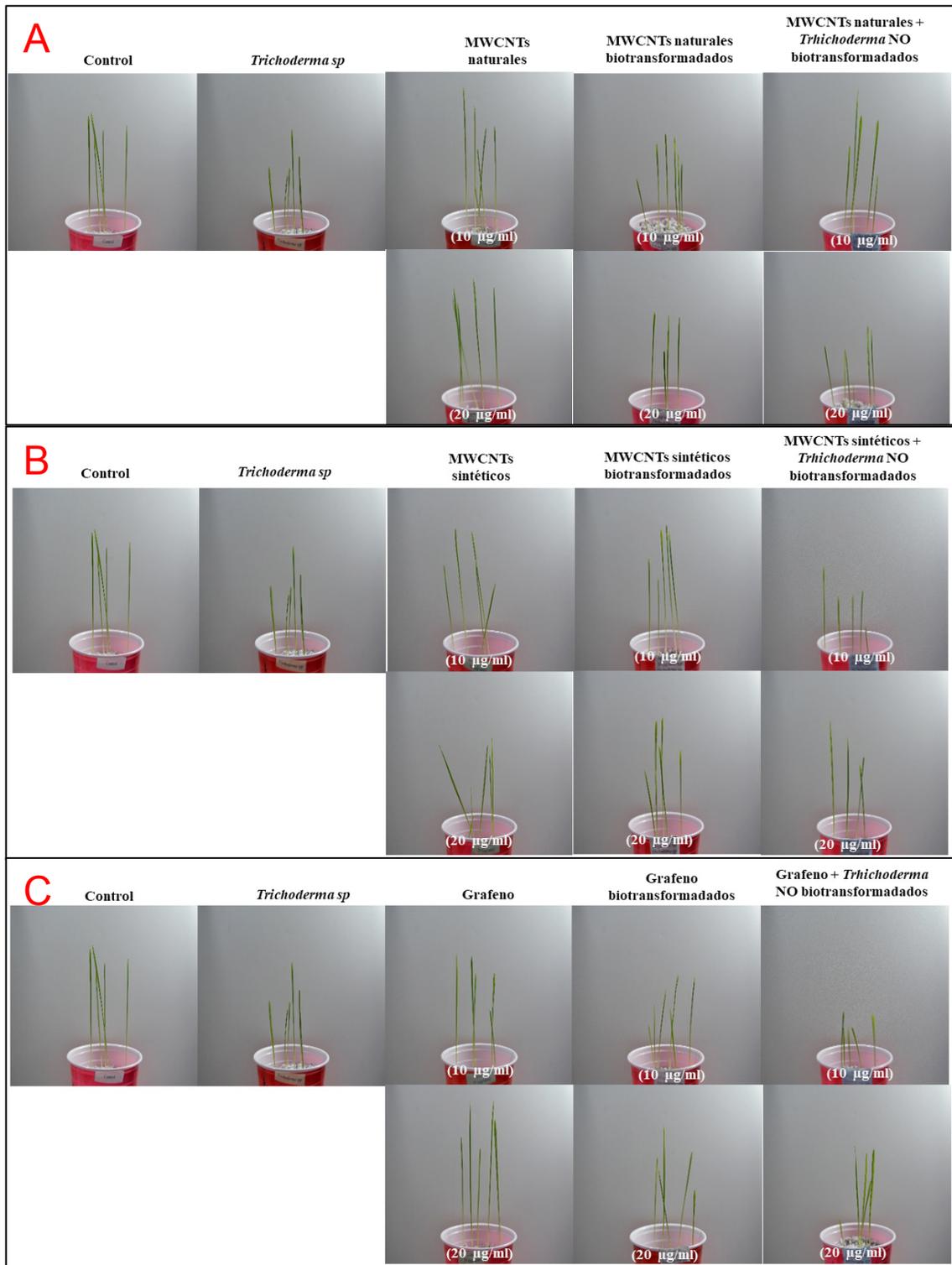


Figura 9 Imágenes que muestran el efecto de A) MWCNTs naturales, B) MWCNTs sintéticos, C) Grafeno y *Trichoderma sp* en el crecimiento de *Avena sativa* a los 25 días.

Efecto de MWCNTs, grafeno a concentración de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ y *Trichoderma sp* en el crecimiento de *Avena sativa* cultivadas en condiciones de casa de sombra cien días después de la siembra se muestran en las (Figs. 10-12)

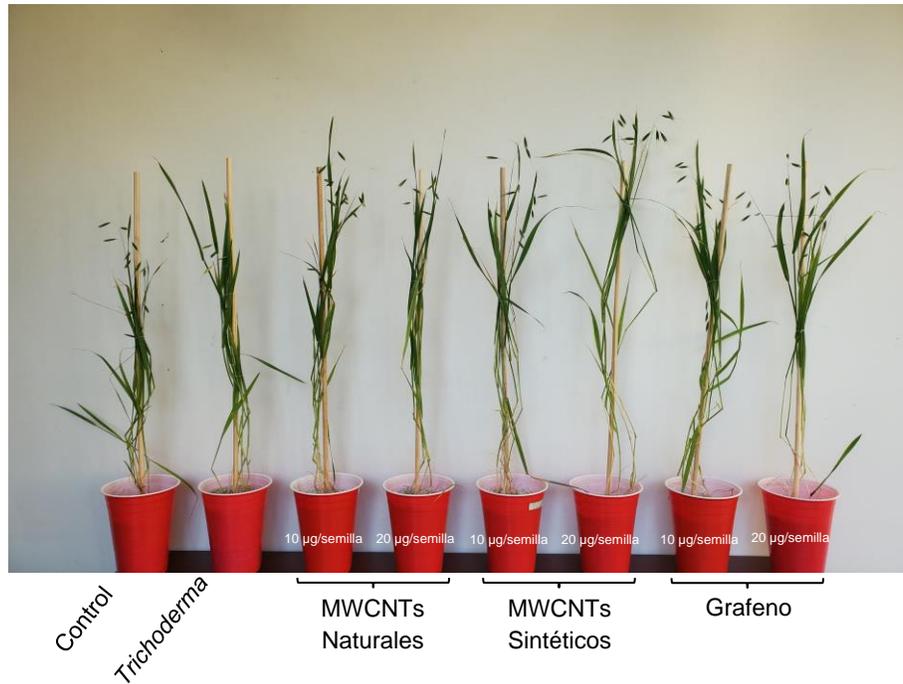


Figura 11 Imágenes que muestran el efecto de MWCNTs, grafeno y *Trichoderma sp* en el crecimiento de *Avena sativa* a los 100 días.

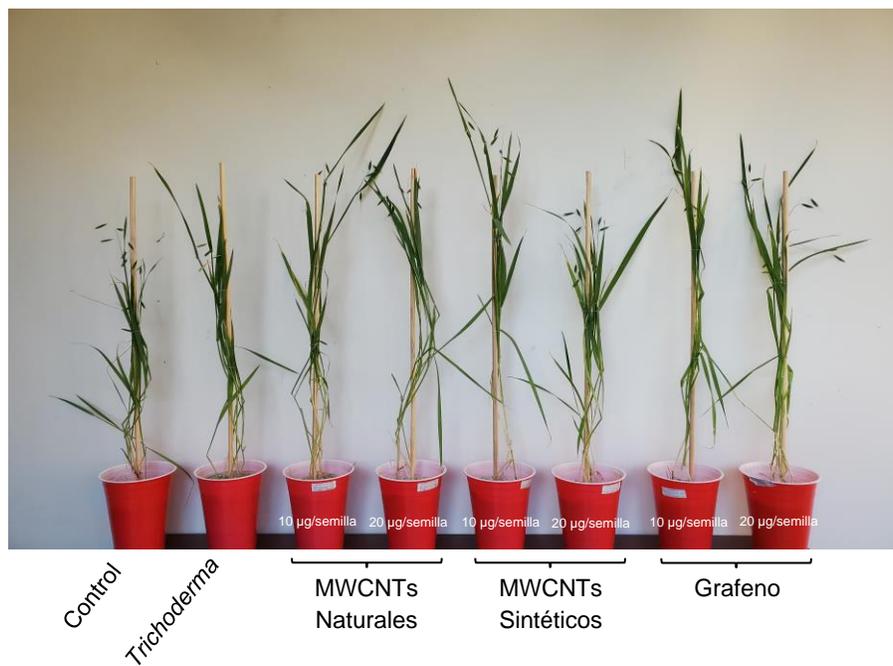


Figura 10 Imágenes que muestran el efecto de (MWCNTs y grafeno biotransformados) y *Trichoderma sp* en el crecimiento de *Avena sativa* a los 100 días.

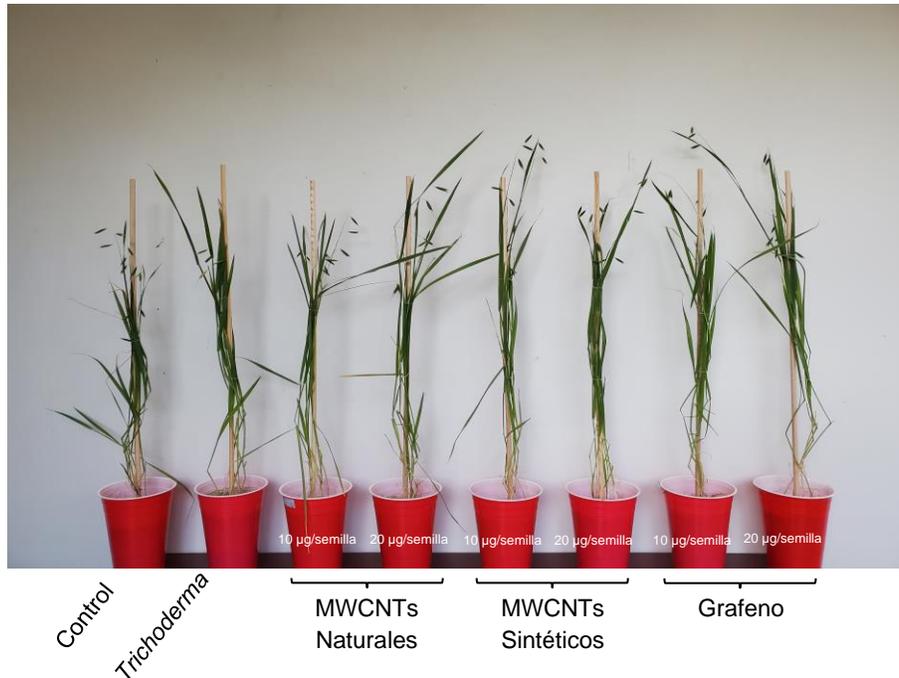


Figura 12 Imágenes que muestran el efecto de (nanopartículas + *Trichoderma sp*) y *Trichoderma sp* en el crecimiento de *Avena sativa* a los 100 días.

Efecto de NPs biotransformadas en la arquitectura radical de *Avena sativa*

Los efectos de MWCNTs naturales o sintéticos y grafeno en la arquitectura radical de *A. sativa* se evaluaron 100 días después de la siembra (Fig. 13). Se observó que la adición de NPs sin *Trichoderma sp* en *A. sativa*, al adicionarse en concentraciones de 10 µg/ml de MWCNTs naturales y 20 µg/ml de grafeno estimularon la longitud radical comparado con las plantas control; mientras que la exposición de estas NPs durante el crecimiento de *Trichoderma sp* con 10 µg/ml de MWCNTs sintéticos y 20 µg/ml de MWCNTs naturales, sintéticos y grafeno estimularon la longitud de raíz, comparado con el control sin NPs; Asimismo, la mezcla de las NPs con micelio fúngico en *Avena sativa*, generó efectos significativos con MWCNTs naturales en ambas concentraciones, y con 20 µg/ml de MWCNTs sintéticos comparado con las plantas control (Fig.13A).

Por otro lado, al evaluar el volumen radical, se observó que en el tratamiento con 20 µg/ml de grafeno sin *Trichoderma sp* generó un volumen radical significativamente mayor que el control, mientras que los otros tratamientos no mostraron diferencias significativas. Por el contrario, se observó que la exposición de las NPs al crecimiento del hongo favoreció el volumen radical en los

tratamientos con MWCNTs naturales en ambas concentraciones y con MWCNTs sintéticos con 10 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente, con la adición de micelio fúngico con NPs favoreció el volumen radical de *A. sativa* con MWCNTs naturales, pero no se detectaron diferencias significicas en los otros tratamientos, comparado con las plantas control (Fig 13B).

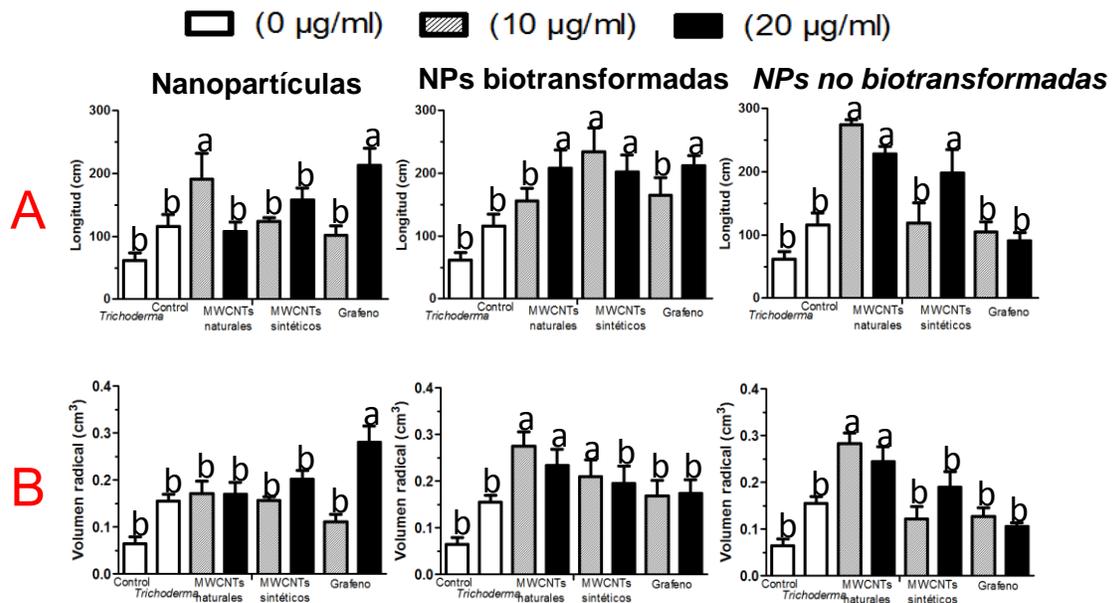


Figura 13 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos biotransformación por *Trichoderma sp* sobre la arquitectura radicular de *Avena sativa*.

La arquitectura fue analizada 100 días después de la siembra con Software WhinRhizo y los datos fueron analizados con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Efecto de NPs biotransformadas en la biomasa de *Avena sativa*

Se observó que la adición de NPs sin *Trichoderma* en *Avena sativa*, estimuló el peso fresco, con excepción del tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ de grafeno, comparado con el control sin NPs; mientras que la exposición de estas NPs durante el crecimiento de *Trichoderma sp* también estimularon el peso fresco a excepción del tratamiento con grafeno 20 $\mu\text{g/ml}$ que no mostró diferencias significativas a las plantas control. Asimismo, la mezcla de las NPs con micelio fúngico en *Avena sativa* generó incrementos significativos en el peso fresco de esta gramínea con MWCNTs naturales en ambas concentraciones, y con 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNTs sintéticos comparado con las plantas control (Fig.14A).

Por otro lado, se observó que el peso seco con la adición de NPs fue superior que las plantas control, a excepción de las plántulas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de grafeno; con la exposición de las NPs al crecimiento de *Trichoderma sp* se favoreció significativamente la biomasa seca de esta gramínea, en los tratamientos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de MWCNTs naturales, ambas concentraciones de MWCNTs sintéticos y *Trichoderma sp* sin NPs, sin embargo, con el grafeno no se detectaron diferencias significativas comparado con las plantas control. Finalmente, al mezclar la biomasa fúngica con las NPs se observó que en los tratamientos con solo el micelio de *Trichoderma sp*, en los tratamientos con MWCNTs naturales y sintéticos en ambas concentraciones tuvieron incrementos significativos en el peso seco, comparado con las plantas control (Fig. 14B).

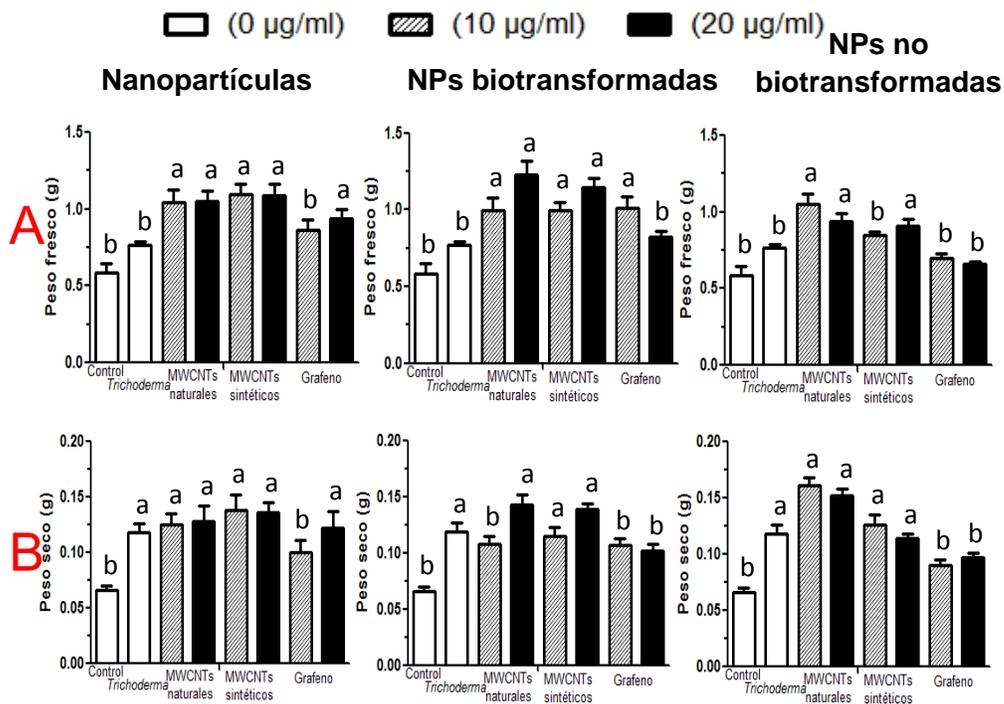


Figura 14 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos en biotransformación por *Trichoderma sp* sobre la biomasa de *Avena sativa*.

Los datos fueron analizados 100 días después de la siembra con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

Efecto de NPs biotransformadas en el contenido de clorofilas en *Avena sativa*

La concentración de clorofila A en los distintos tratamientos de *A. sativa* suplementados 10 o 20 $\mu\text{g}/\text{semilla}$ de los nanomateriales a base de carbono se observó un aumento significativo en la concentración de clorofila en comparación a *Trichoderma sp* y el control (Fig. 15 A). Para la concentración de clorofila B, se mostró aumentos significativos en la concentración de este pigmento (Fig. 15 B), al compararlas con las plantas del control. Por lo tanto, en la concentración de clorofila total, todos los tratamientos excepto *Trichoderma sp* tuvieron aumentos significativos en la concentración de clorofila total con respecto al control (Fig. 15 C).

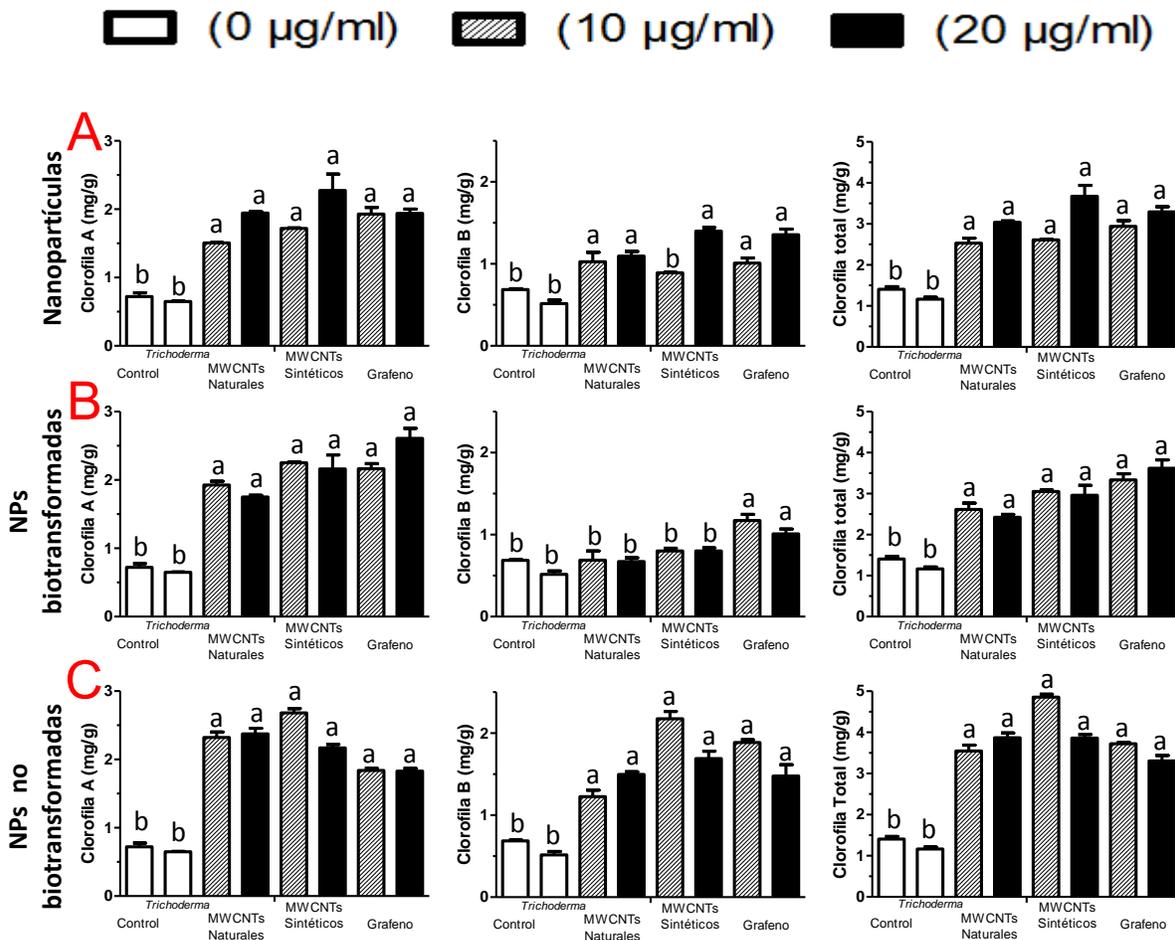


Figura 15 Efecto de grafeno, MWCNTs naturales y sintéticos biotransformación por *Trichoderma sp* sobre las clorofilas A, B y total en plántulas de *Avena sativa*.

Los datos fueron analizados 100 días después de la siembra con ANOVA-Tukey con $p \leq 0.05$. $n=5$. Letras distintas representan diferencias significativas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se han documentado estudios en los que se evalúa la biotransformación de MWCNTs por acción oxidativa de diversas especies de hongos, en el que las enzimas fúngicas modifican la estructura y composición de las nanopartículas a base de grafeno (Yang et al., 2018; Lalwani et al., 2014; Zhang et al., 2014; Ma et al., 2019; Juárez et al., 2021), lo que sugiere que al modificar su estructura y composición, colateralmente modificaran sus propiedades físico-químicas, por lo que los efectos en los sistemas biológicos como las plantas serán distintos a los ya documentados. Por lo que, en nuestro trabajo, al llevar a cabo la caracterización de los nanomateriales a base de carbono expuestos a la interacción con *Trichoderma sp*, observamos por FTIR, espectroscopia Raman y microscopia electrónica de barrido se confirmó que las nanopartículas a base de carbono fueron modificadas al encontrar defectos estructurales, reducción en el tamaño de las NPs y modificación en los grupos funcionales presentes. Por ejemplo, en espectroscopia Raman, la banda D que representa el enlace sp^3 del carbono alrededor de los 1350 cm^{-1} muestra los defectos en las capas de grafeno presentes en las nanopartículas a base de carbono; la banda G que representa el enlace sp^2 del carbono alrededor de los 1600 cm^{-1} que corresponde a la cristalinidad del material (Huang et al., 2003). La (fig. 4) mostró pérdida de cristalinidad de los MWCNTs sintéticos al estar en interacción con *Trichoderma sp*, asimismo, se observó que la pérdida de cristalinidad es dependiente de la concentración de NPs sintéticas, siendo los de más baja concentración los más susceptibles a la oxidación fúngica en cambio con los MWCNTs naturales el efecto fue contrario al igual que con grafeno.

Los MWCNTs sintéticos se han utilizado en las últimas décadas, como promotoras del crecimiento en distintos sistemas vegetales, con las cuales se han documentado efectos tanto positivos como negativos (Tiwari et al., 2014; Joshi et al., 2018; Khan et al., 2017). Por otro lado, se encuentran los MWCNTs naturales, de los cuales hay poca información, pero investigaciones pioneras han documentado que presentan características similares a los MWCNTs sintéticos y en bioensayos comparativos en plantas, en las que se evaluaron los efectos de los MWCNTs naturales y sintéticos, se reportó que las nanopartículas naturales presentan efectos similares o mejores a los MWCNTs sintéticos (Lara et al., 2017; Juárez et al., 2020). Sin embargo, el estudio del grafeno en sistemas vegetales aún no es muy explorado, se tiene poca información en los que se atribuyen efectos benéficos en el crecimiento vegetal, pero también efectos fitotóxicos (Anjum et al., 2014). En este trabajo, se presentó los resultados sobre los efectos de las nanopartículas a base de carbono

biotransformadas por *Trichoderma sp*, la nanopartícula por sí sola, la combinación del extracto fúngico y la nanopartícula en bioensayos dosis-respuesta en plantas de *Avena sativa*.

Nuestros hallazgos mostraron que en semillas germinadas de *Avena sativa* la adición de MWCNTs naturales y grafeno a concentración de 20 µg/ml junto con *Trichoderma sp* se obtuvo un efecto en la emergencia temprana de la semilla al compararla con el control y con un porcentaje del 100 % de semillas germinadas al igual que el control. Hubo una inhibición del porcentaje de semillas germinadas causada por los demás tratamientos en comparación con el control. Por otra parte, en investigaciones recientes obtuvieron efectos en los que se mejoró y aceleró el proceso de germinación de la semilla en distintos sistemas vegetales, dependientes de las concentraciones agregadas de las nanopartículas utilizadas, al compararlas con las plantas control, por óxido de grafeno en *Vicia faba L.* (Anjum et al., 2014); MWCNTs sintéticos en *Zea mays* (Tiwari et al., 2014); MWCNTs sintéticos en *Triticum aestivum L.* (Joshi, et al., 2018); MWCNTs naturales en *Eysenhardtia polystachya* (Júarez et al., 2020). Estos efectos se atribuyen a una mejor captación de agua por parte de la raíz, en donde se estimuló la formación de pelos de la raíz y el engrosamiento radical. Además, en los MWCNTs naturales o sintéticos y grafeno se detectó la promoción y desarrollo en la arquitectura radicular de *A. sativa*, al adicionar MWCNTs naturales y grafeno sin *Trichoderma sp*, estimularon la longitud radical; mientras que la exposición de MWCNTs sintéticos o naturales, y grafeno a distintas concentraciones estimularon la longitud de raíz durante el crecimiento de *Trichoderma sp*; de igual manera, la mezcla de MWCNTs naturales y sintéticos con micelio fúngico en *Avena sativa*, tuvo efectos contrastantes. Diversos autores han documentado efectos similares con el uso de NPs en el desarrollo de la arquitectura radical, lo cual le confiere beneficios a la planta para la absorción de agua, nutrientes, establecimiento de la planta, interacción con microorganismos benéficos, etc, (Joshi, Kaur, Dharamvir, et al., 2018; Rahmani et al., 2020; Verma et al., 2019).

Finalmente, con la adición de micelio fúngico con NPs favoreció el volumen radical de *A. sativa* con MWCNTs naturales. Esto sugiere que, la planta se beneficia al tener un área de contacto mayor, para la obtención de agua y nutrientes al interior de la planta (Joshi, et al., 2018). Además, las plantas tratadas con las NPs ya mencionadas mostraron un efecto significativo en el peso fresco y seco de la planta de *A. sativa*, las nanopartículas de óxido de grafeno al igual que los nanotubos de carbono se están estudiando ampliamente, debido a que se les ha atribuido efectos positivos en la

promoción del crecimiento y la producción de biomasa en las plantas (He et al., 2018). Este efecto puede estar asociado a la mayor concentración de clorofila que se está produciendo en las plantas que evaluamos, donde la concentración de clorofila total, en todos los tratamientos excepto *Trichoderma sp* tuvo aumentos significativos. Resultados similares se han reportado, por ejemplo, Lu et al., (2020) encontró que al acumularse grafeno en las hojas de arroz se intensificó la fluorescencia de los cloroplastos con un aumento de 2.4 veces mayor producción de trifosfato de adenosina con respecto al de los controles. En otro trabajo Joshi et al., (2018) reportaron que los MWCNTs son asimilados por las plantas de *A. sativa* en semilla y raíz, una vez adsorbidos estimularon el desarrollo y crecimiento de la planta, lo cual fue atribuido a que los MWCNTs estimularon la síntesis de clorofila y en consecuencia la función fotosintética.

Sin embargo, a la fecha no hay evidencia documental o es escasa, en donde se evalúan los efectos de nanomateriales expuestos a biotransformación y sus posibles efectos en la promoción del crecimiento vegetal. Esto es de gran relevancia, debido a que en condiciones naturales las nanopartículas están expuestas a microorganismos como los hongos, con una capacidad potencial de biodegradarlos y generar efectos colaterales en las plantas nativas. Algunos reportes que han documentado los efectos de nanomateriales biotransformados en sistemas biológicos sugieren que, al biodegradarse los nanomateriales por acción oxidativa de los hongos, estos se pueden hacer más reactivos e inducen estrés oxidativo, ocasionando daños en organismos como los nematos (Chen et al., 2017; Modugno et al., 2016; Vlasova et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la adición de NPs biotransformadas por *Trichoderma sp* estimuló el desarrollo vegetal desde etapas tempranas de desarrollo, hasta etapas de madurez, mediante mecanismos que contribuyen a la formación de biomasa con el incremento en la síntesis de clorofila.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el trabajo muestran la capacidad de *Trichoderma sp* para biotransformar las NPs bajo las condiciones experimentales que evaluamos. Donde estas NPs no causaron inhibición en el desarrollo del hongo. *Trichoderma sp* biotransformó la estructura y características de los nanomateriales a base de carbono, demostrando una degradación parcial de la nanopartícula. Además, estas nanopartículas biotransformadas contribuyeron a la promoción del crecimiento vegetal de las plantas. Este es el primer trabajo en utilizar NPs biotransformadas por *Trichoderma sp* en la promoción y desarrollo en sistemas vegetales como *Avena sativa*. Observamos que los MWCNTs naturales y grafeno más el hongo, aceleraron la germinación, las NPs biotransformadas promovieron el crecimiento tanto de partes aéreas como subterráneas de *Avena sativa*. e incrementaron significativamente de la concentración de clorofila en las plantas, Se requiere de estudios más a fondo para saber cuáles son los mecanismos que están involucrados en estos efectos.

PERSPECTIVAS

Continuar estudios exploratorios en donde se evalúen los efectos de las NPs con y sin biotransformación sobre la fotosíntesis.

REFERENCIAS

- Andrade, P., Luna, A., Osorio, E., Molina, E., Landero, N., & Hebert, B. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *10*(6), 1259–1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Anjum, N., Singh, N., Singh, M., Sayeed, I., Duarte, A., Pereira, E., & Ahmad, I. (2014). Science of the Total Environment Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). *Science of the Total Environment*, *472*, 834–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.018>
- Blankenship, R. E. (2014). Molecular Mechanisms of Photosynthesis. En *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (2nd Edición). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470758472>
- Chen, M., Qin, X., & Zeng, G. (2017). Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives. *Trends in Biotechnology*, *35*(9), 836–846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001>
- Del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, *52*(3), 372–387.
- Garzón, J., & Cárdenas, E. (2013). Emisiones antropogénicas de amoníaco, nitratos y óxido nítrico. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *60*(II), 121–138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639235006>
- Ghazanfar, M., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. (2018). *Trichoderma* as potential biocontrol agent, Its exploitation in agriculture: A review. *Plant Protection*, *02*(03), 109–135. <http://esciencepress.net/journals/PP>
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, *96*(2), 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- He, Y., Hu, R., Zhong, Y., Zhao, X., Chen, Q., & Zhu, H. (2018). *Graphene oxide as a water transporter promoting*. *11*(4), 1928–1937.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., & Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, *11*(12), 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, *158*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Huang, J. H., Chuang, C. C., Tsai, C. H., & Chen, W. J. (2003). Excellent field emission from

- carbon nanotubes grown by microwave-heated chemical vapor deposition. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, 21(4), 1655. <https://doi.org/10.1116/1.1591750>
- Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). *Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (Triticum Aestivum L.)* Anjali Joshi. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>
- Joshi, A., Kaur, S., Singh, P., Dharamvir, K., Nayyar, H., & Verma, G. (2018). Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(6), 1399–1414. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0801-1>
- Juárez, G., Campos-García, J., Díaz-Pérez, S. P., Lara-Romero, J., Tiwari, D. K., Sánchez-Yáñez, J. M., la Cruz, H. R. De, Jiménez-Sandoval, S., & Villegas, J. (2021). Ligninolytic activity of the *Penicillium chrysogenum* and *Pleurotus ostreatus* fungi involved in the biotransformation of synthetic multi-walled carbon nanotubes modify its toxicity. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11127>
- Juárez, G., Villegas, J., & Campos, J. (2020). Evaluación de los efectos de los nanotubos de carbono naturales y sintéticos en la promoción del crecimiento vegetal. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 9(17), 49. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58151>
- Khan, N., Mobin, M., Abbas, Z., AlMutairi, K., & Siddiqui, Z. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.038>
- Kumar, A., Singh, A., Panigrahy, M., Sahoo, P., & Panigrahi, K. (2018). Carbon nanoparticles influence photomorphogenesis and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 37(6), 901–912. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2277-6>
- Lahiani, M., Nima, Z., Villagarcia, H., Biris, A., & Khodakovskaya, M. (2017). Assessment of Effects of the Long-Term Exposure of Agricultural Crops to Carbon Nanotubes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6654–6662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01863>
- Lalwani, G., Xing, W., & Sitharaman, B. (2014). Enzymatic degradation of oxidized and reduced graphene nanoribbons by lignin peroxidase. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(37), 6354–

6362. <https://doi.org/10.1039/c4tb00976b>

- Lara, J., Campos, J., Dasgupta, N., Borjas, S., Tiwari, D., Paraguay, F., Jiménez, S., Alonso, G., Gómez, M., Lindig, R., De la Cruz, H., & Villegas, J. (2017). Biological effects of carbon nanotubes generated in forest wildfire ecosystems rich in resinous trees on native plants. *PeerJ*, 2017(8), 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.3658>
- Lu, K., Shen, D., Dong, S., Chen, C., Lin, S., Lu, S., Xing, B., & Mao, L. (2020). Uptake of graphene enhanced the photophosphorylation performed by chloroplasts in rice plants. 12(1).
- Ma, Q., Yilihamu, A., Ming, Z., Yang, S., Shi, M., Ouyang, B., Zhang, Q., Guan, X., & Yang, S. T. (2019). Biotransformation of pristine and oxidized carbon nanotubes by the white rot fungus *phanerochaete chrysosporium*. *Nanomaterials*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nano9091340>
- Modugno, G., Ksar, F., Battigelli, A., Russier, J., Lonchambon, P., Eleto Da Silva, E., Ménard-Moyon, C., Soula, B., Galibert, A. M., Pinault, M., Flahaut, E., Mayne-L’Hermite, M., & Bianco, A. (2016). A comparative study on the enzymatic biodegradability of covalently functionalized double- and multi-walled carbon nanotubes. *Carbon*, 100, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.01.023>
- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84(February), 659–683. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-092914-041942>
- Rahmani, N., Radjabian, T., & Soltani, B. M. (2020). Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150(February), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.022>
- Ramírez-Ordóñez, S., Domínguez-Díaz, D., Salmerón-Zamora, J. J., Villalobos-Villalobos, G., & Ortega-Gutiérrez, J. A. (2013). Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 395–403. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.4.395>
- Saifuddin, N., Raziah, A., & Junizah, A. (2012). Carbon Nanotubes : A Review on Structure and Their Interaction with Proteins. *Journal of Chemistry*, 2013, 18. <https://doi.org/doi.org/10.1155/2013/676815>
- Tiwari, D., Dasgupta, N., Villaseñor, L., Villegas, J., Carreto, L., & Borjas, S. (2014). Interfacing

- carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 4(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0236-7>
- Torres, E., Ariza, D., Baena-aristizabal, C. D., Cortés-gómez, S., & Riaño-hernández, L. B. C. A. (2016). Efecto de la fertilización en el crecimiento y desarrollo del cultivo de la avena (*Avena sativa*). *Pastos y Forrajes*, 39(2), 102–110.
- Verma, S. K., Das, A. K., Gantait, S., Kumar, V., & Gurel, E. (2019). Applications of carbon nanomaterials in the plant system: A perspective view on the pros and cons. *Science of the Total Environment*, 667, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.409>
- Vlasova, I. I., Kapralov, A. A., Michael, Z. P., Burkert, S. C., Shurin, M. R., Star, A., Shvedova, A. A., & Kagan, V. E. (2016). Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: Mechanisms, significance and applications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.002>
- Wang, Z., Ba, D., Liu, F., Cao, P., Yang, T., Gu, Y., & Gao, H. (2005). Synthesis and characterization of large area well-aligned carbon nanotubes by ECR-CVD without substrate bias. *Vacuum*, 77(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2004.08.012>
- Yang, H., Wu, X., Ma, Q., Yilihamu, A., Yang, S., Zhang, Q., Feng, S., & Yang, S. T. (2018). Fungal transformation of graphene by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 216, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.115>
- Zhang, C., Chen, W., & Alvarez, P. J. J. (2014). Manganese peroxidase degrades pristine but not surface-oxidized (carboxylated) single-walled carbon nanotubes. *Environmental Science and Technology*, 48(14), 7918–7923. <https://doi.org/10.1021/es5011175>