

Biosíntesis de nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana por *Pseudomonas aeruginosa* ambiental

Biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity by environmental *Pseudomonas aeruginosa*

Rafael Jiménez Mejía,^{*,†} Ángel Daniel Ramírez Herrera,^{**} Jesús Alejandro Orozco Ceja^{*} y Martha I. González Domínguez,^{*,†}

ABSTRACT: Silver nanoparticles (NPs-Ag) are of great interest due to the potential applications in different areas. In order to find methodologies that not represent human health risk and also an ecofriendly one, biosynthesis of these nanoparticles has been a viable option. It is known that diverse biomolecules present in microorganisms can function as an oxidative, reductor and/or stabilizer agents, thanks to that silver nanoparticles synthesis could be favored. In this work the main objectives were the biosynthesis, characterization, and evaluation of antibacterial activity of NPs-Ag. Biosynthesis was made using the culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. The NPs-Ag were characterized using UV-Vis spectroscopy, scanning electron microscopy, X-ray diffraction and the antimicrobial effect was evaluated by dilution assays in Muller Hinton broth and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined against Gram-positive and Gram-negative bacteria. A mixture containing 20% of supernatant and 3 mM AgNO₃ was the best way to obtain silver nanoparticles. Nanoparticles with mixed morphology were observed. The NPs-Ag showed antibacterial activity over Gram-positive and Gram-negative bacteria with MIC of 1 to 2 µg/ml and MBC of 2 to 4 µg/ml. In conclusion, culture supernatant of *P. aeruginosa* is a viable pathway for the synthesis of NPs-Ag with antibacterial activity.

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, biosynthesis, nanoparticles, antibacterial activity, Gram positives, Gram negatives.

RESUMEN: Las nanopartículas de plata (NPs-Ag) son de gran interés debido a las aplicaciones potenciales en diferentes áreas. En busca de metodologías que no presenten riesgos a la salud y sean amigables con el ambiente, la biosíntesis de nanopartículas ha sido una opción viable. Se sabe que diversas biomoléculas presentes en los microorganismos pueden tener las funciones de agente oxidante, reductor y estabilizador, favoreciendo la formación de nanopartículas. En el presente trabajo se tuvo como objetivo la biosíntesis, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana de NPs-Ag. La biosíntesis se realizó a partir de sobrenadante de un cultivo de

Recibido: 22 de diciembre, 2020.

Aceptado: 30 de noviembre, 2022.

Publicado: 3 de marzo, 2023.

* Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Genómica Alimentaria. Sahuayo, Michoacán, México.

** Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Ingeniería en Nanotecnología. Sahuayo, Michoacán, México.

† Autores de correspondencia: migonzalez@ucemich.edu.mx y rjimenez@ucemich.edu.mx



Pseudomonas aeruginosa, las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopía UV-VIS, microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos X, y la actividad antibacteriana se evaluó con ensayos de dilución en caldo Mueller Hinton, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) sobre bacterias Gram positivas y negativas. Se encontró que la mejor síntesis fue con una mezcla de 20% de sobrenadante conteniendo 3 mM de AgNO_3 , observando nanoestructuras con morfologías mixtas. Presentaron actividad contra bacterias Gram positivas y negativas con CMI de 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y CMB de 2 a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En conclusión, el sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa* es una alternativa viable para la síntesis de NPs-Ag con actividad antibacteriana.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas aeruginosa*, biosíntesis, nanopartículas, actividad antibacteriana, Gram positivas, Gram negativas.

Introducción

La síntesis y aplicación de materiales a nanoescala (1-100 nm) es un área emergente de las nanociencias, los nanomateriales representan soluciones tecnológicas y ambientales en áreas como la conversión de energía, catálisis, tratamiento de aguas y medicina (Sharma *et al.*, 2009). Por sus propiedades fisicoquímicas únicas, las nanopartículas (NPs) han mostrado diversas aplicaciones en el área médica, por ejemplo, en la liberación de agentes terapéuticos, detección de patógenos, reparación de tejidos e inmunoensayos, destrucción de tumores, entre otras (Khan *et al.*, 2017; Huq *et al.*, 2022). Además, la creciente resistencia a los antibióticos por diferentes microorganismos patógenos ha impulsado en la comunidad científica la búsqueda de alternativas para su control. Por esto, en los últimos años se ha potenciado el uso de la nanotecnología para el desarrollo de materiales con actividad antimicrobiana. De esos materiales, las nanopartículas han demostrado actividad antimicrobiana efectiva contra una gran gama de bacterias tanto Gram positivas como negativas (Rudramurthy *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Con este propósito, se han sintetizado NPs de varios metales, entre las más estudiadas se encuentran las de plata (Ag), oro (Au) y cobre (Cu); de igual forma, se han sintetizado NPs de óxidos de metales como óxido de plata (Ag_2O), óxido de zinc (ZnO) y óxido de cobre (CuO) (Rudramurthy *et al.*, 2016).

Las nanopartículas de metales se sintetizan generalmente mediante procesos físicos, químicos y biológicos. Entre las ventajas que ofrece la síntesis biológica se encuentran que es amigable con el ambiente, económica y fácilmente escalable, por lo cual, en las últimas décadas, se ha fomentado el desarrollo de nuevos métodos de la llamada “síntesis verde” (Huq *et al.*, 2022). Para ello se han empleado plantas o sus extractos, algas, hongos, levaduras y bacterias (Thakkar *et al.*, 2010). Debido a las ventajas que presentan las bacterias como son abundancia en el ambiente, facilidad para adaptarse, crecimiento rápido, económico y manipulación de las condiciones de crecimiento, esos microorganismos se han utilizado muy frecuentemente con buenos resultados para la síntesis de NPs de diversos metales (Iravani, 2014; Pantidos y Horsfall, 2014). Para el caso particular de la síntesis de NPs de plata (NPs-Ag) se han utilizado bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*

bacter, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Nocardiosis* y *Pseudomonas* (Iravani, 2014). Sin embargo, aunque existen diversos organismos capaces de sintetizar NPs tanto intracelular como extracelularmente, hay interés en la búsqueda de microorganismos y condiciones que permitan obtener las NPs de acuerdo con las características deseadas (Thakkar *et al.*, 2010). Los componentes celulares asociados con la síntesis bacteriana de NPs-Ag son muy variados e incluyen a surfactantes, enzimas, exopolisacáridos, flagelina, ramnolipidos, celulosa, pigmentos, esporas y polisacáridos (Singh *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se describe la síntesis de NPs-Ag utilizando sobrenadantes de cultivos de un aislado ambiental de *P. aeruginosa*. También se describe la caracterización de las NPs-Ag y su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas tanto Gram negativas como positivas.

Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de NPs-Ag se utilizó el sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* J3, la cual fue aislada de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos (Flores-Pantoja *et al.*, 2022). La bacteria se creció a 37 °C por 24 h en estático en 50 ml de caldo nutritivo (BD), después, el cultivo se centrifugó a 7,000 rpm a 4 °C, el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro (Millex®-GV, Merk Millipore). Se mezclaron 20 ml de sobrenadante bacteriano filtrado y 80 ml de agua destilada estéril, a la mezcla se le adicionó 3 mM de AgNO₃ (Sigma Aldrich). La mezcla se incubó a 37 °C en estático por 20 h, transcurrido ese tiempo la síntesis de nanopartículas se monitoreó observando el cambio de coloración y midiendo la absorbancia de 300 a 800 nm en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer). Posteriormente, la purificación se realizó de acuerdo con lo descrito en la literatura, para lo cual la mezcla de síntesis se centrifugó a 8,000 rpm por 15 min, se retiró el sobrenadante, el sedimento se lavó una vez más con agua bidestilada estéril y las nanopartículas resultantes se resuspendieron en agua estéril (Gul *et al.*, 2016). La concentración fue determinada centrifugando por duplicado 2 ml de la mezcla de NPs-Ag a 14,000 rpm por 15 min en un tubo de 2 ml previamente pesado, el sobrenadante fue retirado con ayuda de una micropipeta y la pastilla resultante se secó a 65 °C. Se determinó nuevamente el peso del tubo con las nanopartículas y la concentración se estimó por diferencia de peso del tubo (Huq, 2020).

Caracterización de las NPs por difracción de rayos X (DRX)

El producto de la síntesis fue centrifugado a 8,000 rpm durante 15 min y el precipitado obtenido se colocó a 65 °C hasta la completa eliminación del agua. Los difractogramas se obtuvieron utilizando un difractómetro de rayos X (D8 Avance A25, Bruker) con radiación CuKα (0.15405 nm), con ángulo de inicio de 20°, ángulo final de 100°, paso de 0.04°, voltaje de 40 kV e intensidad de

corriente de 35 mA. La calibración del equipo se efectuó mediante la medición de un patrón estándar de alúmina.

Caracterización de las NPs-Ag por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las NPs-Ag en polvo se colocaron sobre un portamuestra de aluminio y fueron recubiertas con oro durante 40 segundos. Después, se les realizó el análisis de microscopía electrónica en el equipo JEOL 66-10LV, equipado con espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS) para observar la morfología y conocer la composición elemental de la muestra. Las imágenes se obtuvieron a distintas magnificaciones utilizando una potencia de 20 kV y una distancia de trabajo (WD) de 10 mm.

Actividad antibacteriana de las NPs-Ag

Para determinar la actividad antibacteriana de las NPs-Ag se hicieron curvas de crecimiento con diferentes concentraciones en caldo Mueller Hinton (CMH) contra bacterias Gram positiva y negativas, representantes de los principales grupos de patógenos de humanos y animales. Las bacterias que se estudiaron fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* 183, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. Para ello, se crecieron cultivos bacterianos en CMH por 4 h en agitación constante de 150 rpm a 37 °C, a partir de esos cultivos se prepararon diluciones equivalentes al tubo 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). De cada cultivo diluido se mezclaron 10 μ l con 190 μ l de CMH conteniendo 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μ g/ml de NPs-Ag. Las placas de Elisa se incubaron por 20 h a 35 °C. Después, se midió la densidad óptica a 630 nm en un lector de placas de Elisa (H reader 1, HLab). Los valores de densidad óptica obtenidos se transformaron a porcentajes, tomando como 100% el valor de la concentración cero de NPs-Ag. El experimento se repitió tres veces por triplicado y con los datos obtenidos se calcularon los promedios y desviaciones estándar para cada bacteria y se construyeron las gráficas correspondientes en Excel®.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Para este experimento se crecieron las bacterias en las mismas condiciones que en el apartado anterior y la CMI se consideró como aquella concentración en la que ya no se observó crecimiento de bacterias en el medio de cultivo.

Para la determinación de la CMB, se sembraron 5 μ l de cada uno de los pozos de la placa de Elisa en cajas Petri con AMH. Se incubaron a 37 °C por 24 h y la CMB fue aquella concentración a la que no se obtuvo crecimiento sobre el agar. Los experimentos tanto para la CMI como para la CMB se repitieron tres veces de forma independiente.

Resultados y discusión

Síntesis de NPs-Ag

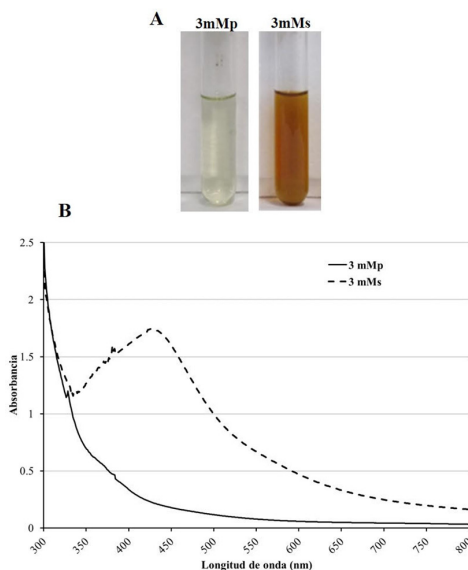
La síntesis biológica de nanopartículas se ha descrito mediante el uso de bacterias, hongos y extractos de plantas, lo cual genera nanomateriales biocompatibles con diversas aplicaciones (Singh *et al.*, 2016). Para el caso de bacterias se ha reportado la síntesis de NPs-Ag tanto por Gram negativas como positivas, dependiendo de la localización de la síntesis se puede considerar como intracelular o extracelular. Para el caso de la síntesis extracelular se ha logrado sintetizar NPs con diferentes morfologías, para lo cual se han usado células completas, sobrenadante de cultivos o extractos acuosos libres de células (Singh *et al.*, 2016; Siddiqi *et al.*, 2018). La síntesis de nanopartículas por bacterias de forma extracelular o mediante el uso de sobrenadantes de cultivos tiene varias ventajas respecto a la síntesis intracelular, entre las que se destacan la facilidad de recuperación de las nanopartículas, bajo costo y, por lo tanto, representa una buena opción para la síntesis a mayor escala (Singh *et al.*, 2016; Siddiqi *et al.*, 2018). También, se ha observado que la síntesis por este método produce nanopartículas de menor tamaño, más estables, tamaño más uniforme y mayor eficiencia de producción (Rabiee *et al.*, 2022).

Aunque los mecanismos de síntesis de NPs pueden variar entre las diferentes bacterias, se ha sugerido que las nanopartículas pueden formarse principalmente por la reducción enzimática de los iones metálicos. De acuerdo con esto, se ha propuesto que una de las principales enzimas involucrada en la síntesis de NPs-Ag es la de nitrato reductasa, aunque también se ha descrito que participan otras enzimas y diversas moléculas como polisacáridos, aminoácidos y vitaminas (Singh *et al.*, 2016; Naganthran *et al.*, 2022). Para el caso particular de *P. aeruginosa* se sabe que contiene varios sistemas de secreción, a través de los cuales la bacteria secreta al exterior proteínas con funciones diversas que incluyen lipasas, proteasas, fosfatasa, toxinas, entre otras (Filloux, 2011).

En este trabajo para la biosíntesis de nanopartículas de plata se utilizó sobrenadante de un cultivo de un aislado ambiental de *P. aeruginosa* J3. Inicialmente, se probaron varias concentraciones de AgNO_3 como material de partida, proporciones variables de sobrenadante en la mezcla de reacción y tiempos de incubación. Derivado de lo anterior, se encontró que una solución acuosa con concentraciones de 3 mM de AgNO_3 , mezclada con 20% de sobrenadante del cultivo bacteriano crecido a 37 °C en condiciones estáticas e incubación de 20 h, mostró los mejores resultados en la síntesis de NPs. Por lo cual, se decidió continuar el trabajo en esas condiciones, en la figura 1A se muestran las mezclas de reacción previa (3mMp) y 20 h después de iniciada la síntesis de NPs (3mMs). En donde se puede apreciar el cambio en la tonalidad de verde claro a café, lo cual es debido a la reducción de la plata y es característica distintiva de la síntesis de NPs-Ag (Singh *et al.*, 2018). También se muestran los espectros de absorción UV-visible antes y después de la sín-

tesis (figura 1B). En estos espectros se puede apreciar el pico de absorción característico para el plasmon de resonancia superficial de las NPs de Ag alrededor de los 420 nm (Amendola *et al.*, 2010); asimismo, se puede distinguir un pico cercano a los 380 nm después de la síntesis que es característico para las NPs de AgCl (Kim *et al.*, 2010), lo cual indica que la formación de estas NPs se lleva a cabo a partir de la interacción del precursor y el sobrenadante.

FIGURA 1. Síntesis de nanopartículas con sobrenadante bacteriano. A) Mezclas de reacción previo a la síntesis (3mMp) y después de la síntesis (3mMs). B) Espectro de absorción de 300 a 800 nm de las mezclas de reacción antes (línea continua) y después de la síntesis de las nanopartículas de plata (línea punteada).



Fuente: Elaboración de los autores.

Caracterización por DRX de las NPs

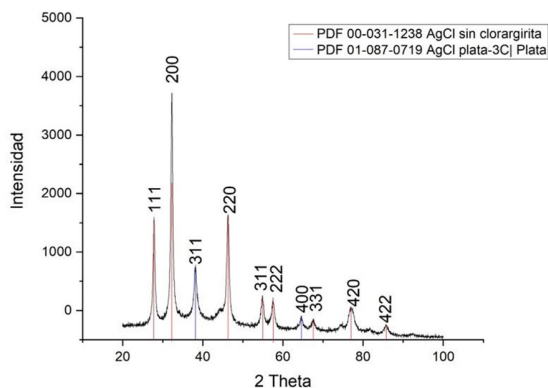
En el análisis de DRX se obtuvo una mezcla de fases siendo el patrón de difracción principal el cloruro de plata y el patrón secundario la plata metálica, los cuales concuerdan con los patrones de difracción indexados en las cartas cristalográficas. Para la fase cúbica de AgCl pura (JCPDS: 31-1238) se obtuvieron las reflexiones de Bragg en valores de 2θ de 27.8° , 32.2° , 46.2° , 54.8° , 57.4° , 67.4° , 74.4° y 76.7° pertenecientes a los planos (200), (220), (311), (222), (400), (331) y (420), por su parte, la fase cúbica de Ag pura (JCPDS: 65-2871) mostró valores en las reflexiones de Bragg de 38.2° , 44.4° , 64.7° y 77.7° correspondientes a los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1) (figura 2).

Una vez identificados los compuestos que conformaban las NP's mediante el difractograma de acuerdo con la ecuación de Debye Scherrer (Tada *et al.*, 2017) se calculó el tamaño de cristalito:

$$D = (k \lambda) / \beta \cos \theta \quad \text{eq. (1)}$$

Donde k es una constante asumida de ser esférica ($k = 0.9$), λ es la longitud de onda de los rayos X ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), β es la anchura a media altura del pico de mayor intensidad y θ es el ángulo de difracción de Bragg, para ello se eligieron los planos (111) de Ag y (200) de AgCl para realizar el cálculo. El tamaño de cristalita fue de 8.5 nm para la Ag y de 11.9 nm para el AgCl.

FIGURA 2. Difractograma de rayos X de las NPs de plata y cloruro de plata.

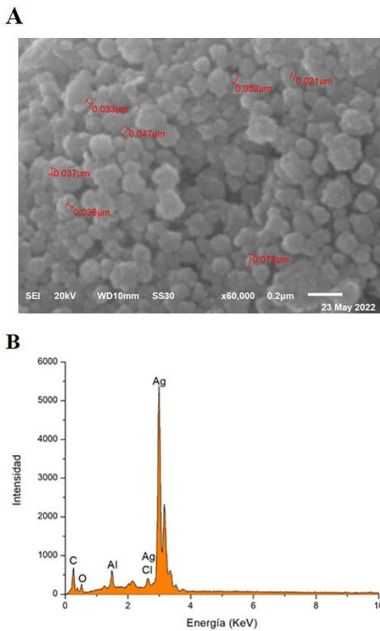


Fuente: Elaboración de los autores.

Caracterización microscópica de las NPs-Ag

Mediante el análisis de microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas sintetizadas se observó que formaron aglomerados de partículas con morfologías cuasi esféricas, cúbicas y algunas más amorfas. Los tamaños estimados oscilaron entre los 50 y 100 nm (figura 3A). La diversidad de morfologías de las NPs puede ser atribuida a la gran variedad de moléculas presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano, pues estas biomoléculas interactúan a nivel fisicoquímico de diversas formas para la reducción de los iones de plata, su agregación y estabilización, generando que las NPs-Ag no tengan un crecimiento equiaxial otorgando diferentes características morfológicas (Kumar *et al.*, 2010). Por otra parte, la pureza de las nanopartículas se verificó mediante el análisis de EDS validando la presencia de plata (Ag) como componente principal de las nanopartículas, también se puede observar cloro (Cl) confirmando la presencia de NPs de AgCl, corroborando lo observado en el DRX, así como también se encontraron elementos como, magnesio (Mg), oxígeno (O) y carbono (C), de los cuales algunos pueden ser parte de las biomoléculas presentes en el sobrenadante del cultivo utilizado para la síntesis (Kumar *et al.*, 2010), mientras que el aluminio (Al) corresponde al portamuestra utilizado (figura 3).

FIGURA 3. A) Micrografía de SEM de las NPs-Ag sintetizadas a partir 3 mM de AgNO_3 , y, B) espectro de EDS las nanopartículas de plata sintetizadas con sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa*.



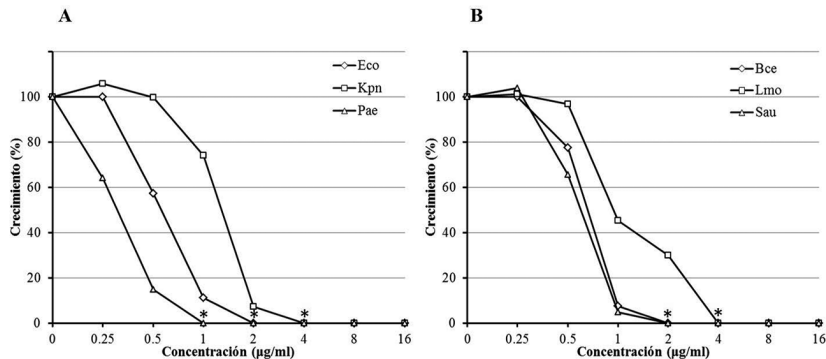
Fuente: Elaboración de los autores.

Actividad antibacteriana

En los últimos años las NPs-Ag han atraído la atención ya que por sus propiedades tienen aplicación en biomedicina y agricultura, así como en áreas ambientales y fisicoquímicas (Singh *et al.*, 2016). En este sentido, las NPs-Ag son consideradas muy atractivas para el desarrollo de nuevos antibacterianos, al mostrar actividad contra una gran variedad de bacterias Gram positivas y negativas, tanto susceptibles como multirresistentes a los antibióticos (Rai *et al.*, 2012; Franci *et al.*, 2015).

De acuerdo con lo anterior, se realizó el análisis de actividad antibacteriana de las NPs-Ag sintetizadas en este trabajo, contra tres bacterias Gram negativas y tres Gram positivas, representativas de patógenos de humanos y animales. Como se puede observar en la figura 4, se obtuvo inhibición del crecimiento para las seis bacterias en forma dependiente de la concentración. Por ejemplo, *P. aeruginosa* fue la más susceptible, reduciendo su crecimiento en 36% a 0.25 $\mu\text{g/ml}$ e inhibiéndose completamente en 1 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4A), mientras que *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus* se inhibieron 42%, 22% y 36% a 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y no se observó crecimiento en concentraciones de 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4A y 4B). Las bacterias que mostraron mayor tolerancia a las NPs-Ag fueron *K. pneumoniae* y *L. monocytogenes*, las cuales redujeron su crecimiento en 26% y 55% a 1 $\mu\text{g/ml}$ de NPs-Ag y no crecieron a 4 $\mu\text{g/ml}$ (figuras 4A y 4B).

FIGURA 4. Determinación de la actividad antimicrobiana de las NPs-Ag. A) *E. coli* (Eco), *K. pneumoniae* (Kpn) y *P. aeruginosa* (Pae); B) *B. cereus* (Bce), *L. monocytogenes* (Lmo) y *S. aureus* (Sau). En el eje y se indica el crecimiento bacteriano expresado como porcentaje (%) y en el eje x las concentraciones de NPs-Ag probadas. Los asteriscos indican las CMI para cada una de las bacterias. Las gráficas representan el promedio de tres repeticiones.



Fuente: Elaboración de los autores.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB)

La actividad antimicrobiana de nanopartículas sintetizadas por bacterias o sobrenadante de cultivos bacterianos pertenecientes al género *Pseudomonas* ha sido documentada en la literatura (Kumar *et al.*, 2011). En este sentido, Kumar y Mamidyala, (2011) encontraron que NPs-Ag sintetizadas con sobrenadante de *P. aeruginosa* mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y positivas en concentraciones de 4 a 32 µg/ml. En otro estudio, se describió que la CMI de NPs-Ag biosintetizadas con sobrenadante de *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 contra *P. aeruginosa* fue de 6.25 µg/ml y para *S. aureus* de 100 µg/ml, de igual forma en ese trabajo se encontró que la CMB fue de 50 µg/ml y 200 µg/ml para esas bacterias (Huq, 2020). También se ha descrito que las NPs-Ag sintetizadas a partir de ramnolípidos de *P. aeruginosa* BS-161R fueron activas contra bacterias Gram positivas y negativas con CMI de entre 7.81 y 15.62 µg/ml (Kumar *et al.*, 2010). De acuerdo con lo anterior, las NPs-Ag sintetizadas en este trabajo fueron muy efectivas contra bacterias Gram negativas y positivas con valores de CMI de entre 1 y 4 µg/ml (figura 4). Por otro lado, la CMB fue de 2 µg/ml *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* y 4 µg/ml para las restantes bacterias (figura 5). Tanto los valores de la CMI como de la CMB son menores a los mencionados anteriormente, lo cual indica que las NPs-Ag sintetizadas en este trabajo tienen mayor actividad antimicrobiana que las obtenidas en esos trabajos. La razón específica de las diferencias en la actividad antimicrobiana no está clara, ya que las nanopartículas sintetizadas en este trabajo tienen un tamaño mayor (50-100 nm), con diferentes morfologías, mientras que las NPs-Ag descritas en los estudios previamente mencionados tienen tamaños entre 8 y 24 nm y morfología monodispersa y esférica, principalmente. Sin embargo,

FIGURA 5. A) Determinación de la CMB de las nanopartículas de plata contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los guiones (-) indican la concentración mínima bactericida (CMB).

µg/ml	Ec	Kp	Pa	Bc	Lm	Sa
0						
0.5						
1						
2	-		-			-
4		-		-	-	
8						

Fuente: Elaboración de los autores.

las diferencias en la actividad antimicrobiana pueden deberse a las variaciones en los métodos de síntesis o a la composición de los sobrenadantes utilizados como agentes reductores, los cuales pueden influir en la composición de la cubierta, carga y estabilidad de las nanopartículas y, por tanto, variar su actividad (Restrepo y Villa, 2021; Madani *et al.*, 2022). Por otro lado, en la literatura algunos autores han encontrado que las bacterias Gram positivas presentan mayor tolerancia que las Gram negativas a las nanopartículas de plata y ese efecto se ha atribuido a diferencias en la pared celular (Huq, 2020). Sin embargo, en este estudio no se encontró diferencia en la CMI o de la CMB entre los dos grupos de bacterias.

El mecanismo específico de actividad antimicrobiana se desconoce aún, pero en la literatura se ha descrito que las NPs-Ag presentan actividad variable contra una gran diversidad de bacterias tanto Gram positivas como negativas. En este sentido, se ha descrito que por sus propiedades físicas y químicas, las NPs-Ag se adhieren a la superficie bacteriana y, debido a que constantemente liberan iones Ag⁺, inducen cambios en la estructura y función de la membrana y pared celular de las bacterias. Además, las nanopartículas de tamaño más pequeño pueden ingresar a la célula e inducir la formación de especies reactivas de oxígeno, que provocan daños en el ADN, así como otras biomoléculas importantes para el funcionamiento celular (Durán *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2020).

En conclusión, los datos descritos en este trabajo indican que el uso de sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa* J3 es una alternativa viable para la síntesis verde de nanopartículas de plata, las cuales tienen actividad antibacteriana contra bacterias tanto Gram positivas como negativas patógenas de humanos y animales.

Referencias

- Amendola, V., Bakr, O. M. y Stellacci, F. (2010) A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: Effect of shape, size, structure, and assembly. *Plasmonics*, 5: 85-97. <https://doi.org/10.1007/s11468-009-9120-4>.
- Durán, N., Durán, M., De Jesús, M. B., Seabra, A. B., Fávoro, W. J. y Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3): 789-799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.
- Filloux, A. (2011). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function. *Frontiers in Microbiology*, 2, 155.x. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00155>.
- Flores-Pantoja, L. E., Briseño-Silva, E, Loeza-Lara, P. D. y Jiménez-Mejía, R. (2022). Actividad antifúngica y características de promoción de crecimiento vegetal de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp. degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelo contaminado. *Acta Biológica Colombiana*, 27(3). <https://doi.org/10.15446/abc.v27n3.92758>.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G. y Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5): 8856-8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>.
- Gul, S., Ismail, M., Khan, M. I., Khan, S. B., Asiri, A. M., Rahman, I. U., Kahn, M. A. y Kamboh, M. A. (2016). Novel synthesis of silver nanoparticles using melon aqueous extract and evaluation of their feeding deterrent activity against housefly *Musca domestica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(4): 311-316. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61036-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61036-2).
- Huq, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4): 1510. <https://doi.org/10.3390/ijms21041510>.
- Huq, M. A., Ashrafudoulla, M., Rahman, M. M., Balusamy, S. R. y Akter, S. (2022). Green synthesis and potential antibacterial applications of bioactive silver nanoparticles: a review. *Polymers*, 14(4), 742. <https://doi.org/10.3390/polym14040742>.
- Iravani, S. (2014). Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects. *International Scholarly Research Notices*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/359316>.
- Khan, I., Saeed, K. y Khan, I. (2017). Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12: 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- Kim, S. W., Chung, H. E., Kwon, J. H., Yoon, H. G. y Kim, W. (2010) Facile synthesis of silver chloride nanocubes and their derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society*; 31: 2918-22. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.10.2918>.
- Kumar, C. G. y Mamidyala, S. K. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B*:

- Biointerfaces*, 84(2): 462-466. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.042>.
- Kumar, C. G., Mamidyala, S. K., Das, B., Sridhar, B., Devi, G. S. y Karuna, M. S. (2010). Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(7): 1061-8. <https://doi.org/10.4014/jmb.1001.01018>.
- Madani, M., Hosny, S., Alshangiti, D. M., Nady, N., Alkhursani, S. A., Alkhalidi, H., Al-Gahtany, S. A., Ghobashy, M. M. y Gaber, G. A. (2022). Green synthesis of nanoparticles for varied applications: Green renewable resources and energy-efficient synthetic routes. *Nanotechnology Reviews*, 11(1): 731-759. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0034>.
- Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkhar-nain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Che Abdullah, C. A. y Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. *Materials*, 15(2): 427. <https://doi.org/10.3390/ma15020427>.
- Pantidos, N. y Horsfall, L. E. (2014). Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 5(5): 1. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000233>.
- Rabiee, N., Ahmadi, S., Akhavan, O. y Luque, R. (2022). Silver and gold nanoparticles for antimicrobial purposes against multi-drug resistance bacteria. *Materials*, 15(5): 1799. <https://doi.org/10.3390/ma15051799>.
- Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P. y Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5): 841-852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>.
- Restrepo, C. V. y Villa, C. C. (2021). Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents and dependence on size and shape: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100428. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100428>.
- Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R. y Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*, 21(7): 836. <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. y Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2): 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>.
- Siddiqi, K. S., Husen, A. y Rao, R. A. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1): 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
- Singh, H., Du, J., Singh, P. y Yi, T.H. (2018). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1.4 and their antimicrobial application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8: 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.04.004>.
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D. y Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7): 588-599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>.
- Tada, S., Watanabe, F., Kiyota, K., Shimoda, N., Hayashi, R., Takahashi, M., Nariyuki, A., Igarashi, A., Satokawa, S. (2017). Ag addition to CuO-ZrO₂ catalysts promotes

- methanol synthesis via CO₂ hydrogenation. *Journal of Catalysis*, 351 (2017): 107-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcat.2017.04.021>.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. y Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2): 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>.
- Wang, L., Hu, C. y Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12: 1227. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q. y 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>.