

17. Ciencia, Tecnología e Innovación

BIOSINTEIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR ACTINOBACTERIAS METALO-RESISTENTES

Pereyra, Julián; Paterlini, Paula, Noblega, Luciana; Álvarez, Analía; Romero Cintia M.

pereyra.julian.71@gmail.com; paula_paterlini@hotmail.com

luciananoblega@gmail.com; alvanalia@gmail.com; cinromero78@gmail.com

Facultad de Biquímica, Química y farmacia

Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

La nanobiosíntesis es una “tecnología verde” con numerosos beneficios por la que se obtienen NPs por procesos biológicos. Las AgNPs tienen una gran importancia debido a sus aplicaciones en medicina para el revelado de imágenes tumorales, liberación controlada de drogas, y fundamentalmente, excelentes propiedades antimicrobianas

El objetivo fue evaluar la capacidad de biosíntesis de AgNPs por *Streptomyces* M7 y caracterizar las mismas y determinar su efecto antimicrobiano.

La actinobacteria metalo-resistente *Streptomyces* M7 fue cultivada durante 72 hs en caldo Tripteína-Soja. Las células separadas del sobrenadante por centrifugación, fueron inoculadas en agua tridestilada (100gL^{-1}) incubadas con agitación 72 hs. Mediante centrifugación se recuperó el sobrenadante (fuente de biomoléculas reductoras) con el que se preparó una solución de AgNO_3 de 0,5 y 1 mM. Las soluciones se incubaron con agitación, 72 hs y se tomaron muestras cada 24 hs, realizando controles apropiados. Se evaluó la síntesis de AgNPs por medición de absorbancia (espectrofotómetro UV-visible, 200-800 nm) y por microscopía electrónica de barrido (MEB). La composición elemental de las AgNPs se evaluó mediante Espectroscopia de Energía Dispersada (EDS).

La muestra tomada a las 72 hs, con una concentración 1 mM AgNO_3 presentó el pico más alto de absorbancia (DO: 1,48) en comparación a las demás muestras. Esta absorbancia coincide con la reportada para AgNPs. Las imágenes de MEB revelaron la presencia de NPs agregadas, de tamaño heterogéneo entre 17,71 nm (min) y 94,44 nm (max) en el caso de AgNPs. El espectro EDS presentó una fuerte señal para Ag y otros picos más débiles correspondientes a otros elementos. Además, se evaluó la capacidad antimicrobiana de las AgNPs frente a *cándida*.

Palabras clave: Nanotecnología, Nanopartículas, Síntesis biogénica.

Introducción

La nanotecnología es un campo emergente de las ciencias que incluye la síntesis y desarrollo de nanomateriales, cuyo componente fundamental son las NPs (Golinska, et al., 2016). Se utilizan una gran variedad de métodos para la síntesis de NPs con propiedades físico-químicas tales, que pueden ser empleadas en vastos sectores productivos para la obtención de medicamentos, cosméticos, encapsulación de fármacos, biosensores, bioinsecticidas, bioinoculantes, entre otras (Siddiqi, et al., 2016). Las inusuales propiedades de las NPs, se deben fundamentalmente a su pequeño tamaño (<100 nm) por lo que poseen una relación superficie/ volumen mayor que las partículas de su material precursor (Anasame *et al.* 2015).

De acuerdo con su naturaleza química, las NPs pueden ser orgánicas o inorgánicas (Siddiqi, *et al.*, 2016) entre estas últimas, se destaca la importancia de las AgNPs debido a sus aplicaciones en medicina para el revelado de imágenes tumorales, liberación controlada de drogas, y fundamentalmente, excelentes propiedades antimicrobianas, lo que despierta grandes expectativas en la búsqueda de nuevas fuentes de AgNPs debido al incremento drástico de la resistencia microbiana a antibióticos informada por la Organización Mundial de la Salud, recientemente (WHO, 2015).

Los métodos químicos convencionales para la síntesis de NPs presentan ciertas

limitaciones ya que se usan tóxicos y altos niveles de energía lo que encarece su producción. Por su parte, la nanobiosíntesis, es una “tecnología verde” por la que se obtienen NPs mediante procesos biológicos tales como la reducción de una sal metálica por acción de biomoléculas. En este contexto, biomoléculas (en su gran mayoría, proteínas) provenientes de plantas, algas, bacterias, hongos y virus, pueden actuar como agentes reductores y/o estabilizadores para la formación de NPs (Siddiqi, *et al.*, 2016). Las NPs desarrolladas por síntesis biogénica presentan ventajas sobre las producidas por síntesis química debido a la simplicidad de los métodos de producción ya que no requiere altas temperaturas o presión. Además, se trata de procesos de bajo costo, de relativamente fácil escalamiento y en su mayoría inocuos (Borase, *et al.*, 2014).

Las NPs biogénicas son sintetizadas por procesos simples de reducciones metálicas intra o extracelulares propias de mecanismos de detoxificación (Siddiqi y Husein, 2016; Dahoumane, *et al.*, 2016). Las enzimas microbianas pueden seleccionar el ión metálico de la solución precursora y acumularlo en forma elemental, o pueden reducirlo sintetizando NPs. Estas pueden asociarse con proteínas lo que favorece su estabilidad, previene su agregación y le confiere a las NPs propiedades bioquímicas excepcionales (Golinska, *et al.*, 2016).

Los extractos libre de células/sobrenadantes de cultivo microbiano se utilizan como reductores (Gade, *et al.*, 2008; Bawaskar, *et al.*, 2010) para la producción de NPs, siendo el método extracelular el más popular, debido a que facilita el proceso de *downstream* de recuperación de las NPs. Las actinobacterias constituyen uno de los principales y más diversos phyla del Dominio Bacteria. Los miembros del grupo se destacan por sus propiedades fisiológicas y metabólicas (Goodfellow, *et al.*, 2012). De hecho, el género *Streptomyces* es considerado la principal fuente microbiana de biomoléculas con aplicaciones biotecnológicas incluyendo enzimas extracelulares, antibióticos, NPs, agentes antitumorales, inhibidores enzimáticos, inmunosupresores, fitotoxinas, biopesticidas, biosurfactantes, probióticos, entre otros (Alvarez, *et al.*, 2017). Con relación a la síntesis de NPs el género *Streptomyces* sp ha demostrado presentar capacidad de síntesis de NPs. Alani, *et al.*, (2012) demostrada en una cepa de *Streptomyceshygroscopicus* (Sadhashivam *et al.* 2010) y de AuNPs por una cepa de *Thermomonosporasp.* (Hulkoti, *et al.*, 2014). A pesar de lo mencionado, son pocos los trabajos que exploten el potencial de las actinobacterias como productoras de NPs metálicas (Alani, *et al.*, 2012; Khot, *et al.*, 2012).

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de biosíntesis de AgNPs por la cepa *Streptomyces* M7 y analizar propiedades físico-químicas y biológicas de las NPs obtenidas.

Materiales y Métodos

1-Evaluación de la capacidad de biosíntesis AgNPs por actinobacterias

Se emplearon las cepas de actinobacterias pertenecientes a los géneros *Streptomyces* sp. y disponibles en el cepario del laboratorio de "Biotecnología de Actinobacterias" (PROIMI). La obtención NPs se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Alani *et al.* (2012), con modificaciones. Se cultivaron los microorganismos en medio TSB (Alvarez, *et al.*, 2012), con agitación, durante 72 hs. La biomasa desarrollada fue recuperada mediante centrifugado y luego lavada con agua tridestilada estéril. Posteriormente se suspendieron 10 g de biomasa en 100 mL de agua tridestilada estéril, y se incubó durante 72 hs con agitación. Transcurrido el tiempo mencionado, la suspensión fue centrifugada para separar la biomasa del sobrenadante. Los sobrenadantes se incubaron con al menos dos concentraciones (1 y 0,5) de AgNO₃ en ensayos independientes. Los frascos se incubaron en la oscuridad, con agitación y se tomaron muestras cada 24 hs durante 72 hs. Se emplearon como controles el sobrenadante proveniente del cultivo de la

biomasa sin AgNO_3 y agua tridestilada con AgNO_3 .

La síntesis de NPs fue evaluada mediante los siguientes parámetros: **a)** Aparición de un precipitado en las muestras: mediante centrifugaciones fraccionadas usando ultracentrífuga. La aparición de un precipitado en cada fracción fue interpretada como la síntesis de NPs. Los precipitados (NPs) fueron resuspendidos en agua tridestilada estéril y conservados a -4°C hasta el momento de estudio. **b)** Medición de absorbancia por UV-vis (200-800 nm).

2- Caracterización físico-química de las NPs obtenidas.

La forma, tamaño y estructura de las NPs obtenidas fueron estudiadas mediante Microscopía Electrónica de barrido (SEM), Espectroscopia de Energía Dispersada (EDS) y Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). SEM y EDS se realizaron en CIME-CONICET. Los espectros FTIR fueron obtenidos en un equipo Perkin Elmer, (EUA). Previo al análisis, las nanopartículas de plata fueron separadas por centrifugación a 12,000 rpm y secadas.

3- Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs

Se realizó la evaluación de la capacidad antimicrobiana de AgNPs sobre un cultivo de *Candida parapsilosis*. Para ello se utilizó el método de difusión en agar. Las AgNPs

fueron evaluadas en una concentración de 0,1 mg/mL.

Resultados y Discusión

1-Evaluación de la capacidad de biosíntesis AgNPs por actinobacterias

La biosíntesis de AgNPs se evidenció por el cambio de color de transparente a pardo (**Fig. 1**). La producción de las NPs fue confirmada mediante espectroscopía UV visible. Las muestras presentaron un aumento en la absorbancia entre 400 y 450 nm (**Fig. 2a**). La muestra de AgNPs tomada a las 72 hs, obtenida a partir de una concentración 1 mM de AgNO_3 , presentó el pico más alto de Absorbancia_{433 nm} de 1,48 (**Fig. 2b**) en comparación a las demás muestras. Resultados similares fueron reportado por Abdel-Hadi, et al. (2014) para AgNPs sintetizadas a partir del hongo *Aspergillus terreus*.

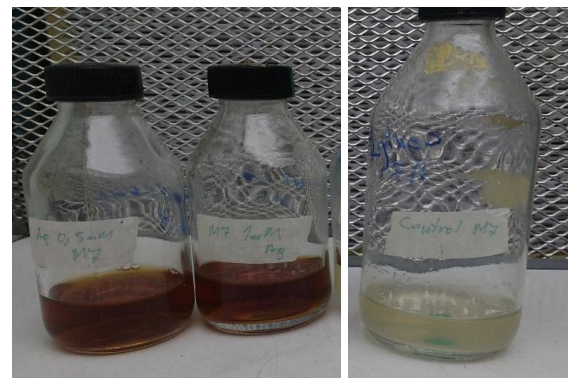


Figura 1. Producción de AgNPs por *Streptomyces* evidenciada por el cambio de color. A) Muestras de AgNPs 0,5 y 1 mM. B) Control: Sobrenadante sin AgNO_3 .

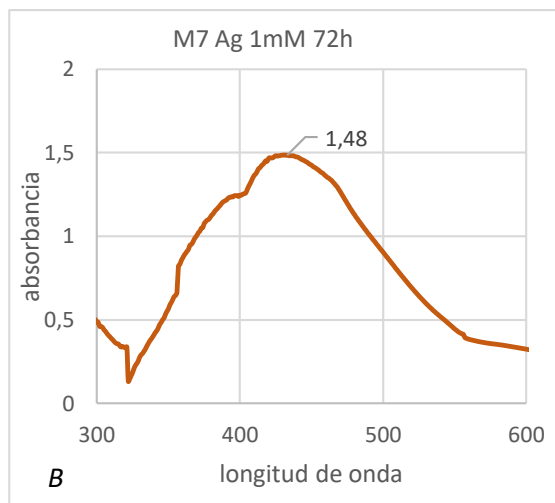
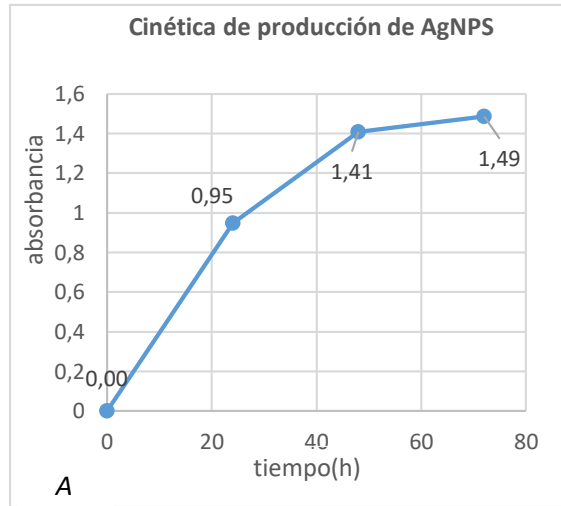


FIGURA 2 . A Producción de AgNPs en función del tiempo. B Espectro UV-visible de muestra AgNPs de 72h

2- Caracterización físico-química de las NPs obtenidas

Las imágenes de SEM revelaron la presencia de NPs agregadas de forma y tamaño heterogéneo entre 17,71 y 94,44 nm (Fig. 3). El espectro EDS presentó una fuerte señal para Ag otros picos más débiles correspondientes a otros elementos en las muestras también fueron detectados (Fig. 4)

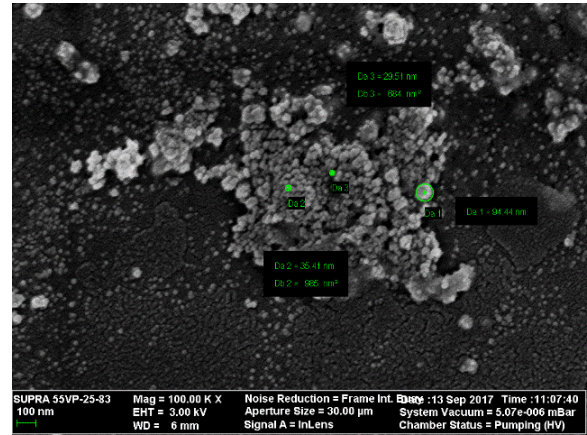


Figura 3. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de AgNPs

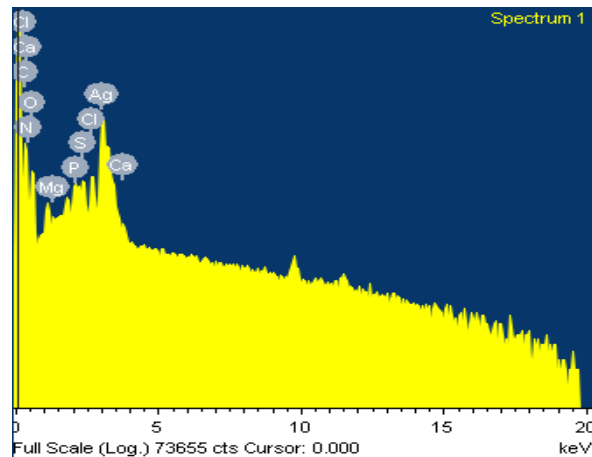


Figura 4. Espectro EDS de AgNPs

El espectro FTIR presentó picos a 1420 y 3400 cm^{-1} previamente reportado por otros autores para AgNPs (Aguilar Méndez, *et al.*, 2010; V.Gopinath, *et al.*, 2012). Se observó un pico cercano a 1650 cm^{-1} (Fig.5) Una señal de absorción en esta región puede estar asociada a la presencia de grupos Amida I presente en proteínas. Se sabe las NPs sintetizadas por biogénesis suelen estar asociadas a proteínas producidas en este caso por el mismo microorganismo. Esto podría otorgarle a las NPs propiedades biotecnológicas distintas a las obtenidas por síntesis química.

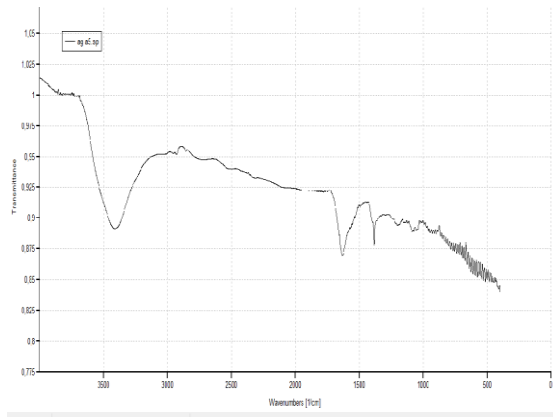


Figura 5. FTIR de AgNPs

3- Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPs

La Fig. 5 muestra el efecto de la incorporación de nanopartículas de plata en el crecimiento de *Cándidas parasilopsis*. Se observó un halo de inhibición de 36 mm de diámetro. El efecto antimicrobiano de las AgNPs ha sido reportado por diferentes autores, frente a hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Aguilar Méndez et al. 2010; Saxena, et al. 2016).



Figura 6. Halo de inhibición de AgNPs frente a *C.parasilopsis*

Conclusiones

Se sintetizaron AgNPs a partir de AgNO_3 mediante una tecnología económica y ambientalmente segura a utilizando las biomoléculas producidas por *Streptomyces* M7

Las nanopartículas mostraron importantes propiedades físico-químicas y fundamentalmente mostró actividad antifúngica frente a cepas patógenas del género *Candida*. Estas nanopartículas tienen potenciales propiedades para su aplicación biotecnológica.

Bibliografía

- A. Alvarez, JM. Saez, J. Dávila Costa, VL. Colín, MS. Fuentes(2016). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals Chemosphere Amsterdam, 166, 41 – 62.
- A. Álvarez, ML. Yanez, CS. Benimeli, MJ. Amoroso. (2012) Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains Int biodeterioration & biodegradation, 66, 14–18.
- A. Alvarez, SA. Catalano, MJ. Amoroso. (2013). Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny, Mol. Phylogenet. Evol, 66, 1083–1088.
- Aguilar Méndez M.A., San Martín Martínez, E., Ortega Arroyoa, L., Cobián Portillo, G. (2010). EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE

Ahmed Mustafa Abdel-Hadi-, Mohamed Fadl Awad, Nageh Fathy Abo-Dahab and Marwa Farok ElKady. (2014). Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by AK. Gade, SR. Bonde, AP. Ingle, PD. Marcato, N. Durán and MK. Rai.(2008). Exploitation of *Aspergillus niger* for Synthesis of Silver Nanoparticles, *J Biobased Mater Bioenergy*, 2, 243–245.

Aspergillus terreus: Biosynthesis, Characterization and Biological Activity

F.Alani, MY. Murray, A. William.(2012). Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*, *World J Microbiol Biotechnol*,28, 1081–1086.

Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., MeeraPriyadharsshini, N., Thajuddin, N., Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96 (1), 69-74.

HP. Borase, BK. Salunke, RB. Salunkhe, CD. Patil, JE. Hallsworth, BS. Kim, SV. Patil. (2014). Plant Extract: A Promising Biomatrix for Ecofriendly, Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles *Appl Biochem Biotech*, 173(1), 1–29.

Juhi Saxena, Prashant Kumar Sharma, Madan Mohan Sharma and Abhijeet Singh. (2016). Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and

evaluation of its antibacterial Properties. Saxena *et al. SpringerPlus*. 5:861.

KS. Siddiqi and A. Husen. 2016. Fabrication of Metal Nanoparticles from Fungi and Metal Salts: Scope and Application. *Nano Res Lett*, 11, 98.

LR. Khot, S. Sankaran, J. MariMaja, R. Ehsani(2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review, EW. Schuster. *Crop Prot*, 35, 64–70.

M. Bawaskar, S. Gaikwad, A. Ingle, D. Rathod, A. Gade, N. Duran, PD. Marcato and M. Rai.(2010). A New Report on Mycosynthesis of Silver Nanoparticles by *Fusarium culmorum*, *Curr Nanosci*, 6, 376–380.

N. Anasane, P. Golinska, M. Wypij, D. Rathod, H. Dahm and M. Rai (2016),. Acidophilic actinobacteria synthesised silver nanoparticles showed remarkable activity against fungi-causing superficial mycoses in humans. *Mycoses*, 59, 157–166.

N. I. Hulkoti and T. C. Taranath.(2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483.

NANOPARTICULAS DE PLATA. Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ.

PM. Mishra, SK. Sahoo, GK. Naik, K. Parida. (2015) Biomimetic synthesis, characterization and mechanism of formation of stable silver nanoparticles using *Averrhoa carambola* L. leaf extract *Mater Lett*,160, 566-71.

S. Sadhasivam, P. Shanmugam, K. Yun.(2010). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 358–362.

SA. Dahoumane, C. Yéprémian, C. Djédiat, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin, R. Brayne. (2016). Improvement of kinetics, yield, and colloidal stability of biogenic gold nanoparticles using living cells of *Euglena gracilis* microalga, *J Nanopart Res*, 18, 79.

W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, HJ. Busse, (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

World Health Statistic. World Health Organization (WHO), 2015. ISBN 978 92 4 156488 5.

Financiamiento

Beca CIUNT 2018