

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli*.

Raisa Barrios Castellanos, Maibel Hernández Arencibia², Dayana Doce Sosa³

1. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria de la Habana.
rbarrios@unah.edu.cu
2. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria de la Habana.
maib@unah.edu.cu
3. Departamento de Microbiología. Centro de Inmunología Molecular.
dayanad@cim.sld.cu

Resumen

En la actualidad son numerosas las aplicaciones de las nanopartículas de plata (AgNPs), basadas en sus propiedades antibacterianas, dentro de las más comunes se encuentran su uso en piezas de ortopedia, vendajes para heridas e incluso en la depuración de las aguas. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto bactericida de AgNPs a siete concentraciones sobre la bacteria *E.coli*. Para su realización se utilizó la cepa O157:H7 la cual fue expuesta a concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/mL de AgNPs. En el estudio se pudo apreciar un efecto bactericida a partir de la concentración de 10 µg/mL donde hubo una inhibición total del crecimiento bacteriano. A la concentración de 5 µg/mL se observó un pequeño crecimiento de 9×10^2 UFC. Los resultados tuvieron una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 99.9% entre los grupos tratados con respecto al control; asimismo se encontraron diferencias entre los grupos expuestos a menores concentraciones (1.25 a 5 µg/mL) con respecto a los de mayores concentraciones (10 a 80 µg/mL). Los resultados evidencian un efecto bactericida de las AgNPs a partir de la concentración de 10 µg/mL.

Palabras claves: nanopartículas de plata, bacterias patógenas, bactericida.

Abstract

Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*.

Currently there are numerous applications of silver nanoparticles (AgNPs), based on its antibacterial properties, the most common uses are in pieces of orthopedics, wound dressings and even in water purification. So the aim of this research was to determine the bactericidal effect of AgNPs on *E. coli* bacteria O157:H7 strain in seven concentrations: 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 and 80 µg/mL of AgNPs. These results showed bactericidal effect from the 10 µg/mL concentration, in which was observed total inhibition of bacterial growth. In the 5 µg/mL concentration was observed a slight bacterial growth of 9×10^2 UFC. The results were statistically significant difference with a confidence level of 99.9% between the treated groups compared to the control. Also differences between groups exposed to lower concentrations (1.25 to 5 µg/mL) compared to higher concentrations (10 to 80 µg/mL) were found. The results show a bactericidal effect of AgNPs from the concentration of g 10 µg/mL.

Keywords: silver nanoparticles, pathogenic bacteria, bactericidal.

Introducción

El descubrimiento de los antibióticos en 1940 constituyó uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina, su uso ha permitido el tratamiento de las enfermedades infecciosas desde aquel tiempo hasta nuestros días (Pidcock, 1990). Sin embargo a lo largo de los años muchos factores principalmente la capacidad de adaptación de las bacterias y el uso indiscriminado o incompleto de los agentes antimicrobianos han conducido al desarrollo de resistencia y al surgimiento de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos que ya no responden a las terapias con antibióticos comunes (Murray, 2009). Este hecho constituye un problema de salud pública de distribución mundial el cual además tiene implicaciones importantes desde el punto de vista económico y social (Flores, 2014).

Actualmente se está incursionando en la obtención de nuevos productos nanotecnológicos que permitan combatir la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos. Dentro de la amplia gama de nanomateriales existentes se encuentran las nanopartículas de plata (AgNPs), compuestos cuya forma y tamaño han permitido su aplicación en diferentes ramas de las Ciencias Biológicas (Ayala, 2010).

Por lo tanto el objetivo de nuestro trabajo es evaluar el efecto bactericida de las AgNPs de 20 nm sobre la bacteria *E.coli* O157: H7.

Materiales y métodos

Se procedió a la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a partir del método de dilución en caldo. Este método de microdilución fue realizado en placas multipocillos de ELISA (Martínez et al., 2010).

Inicialmente se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo Luria-Bertani (LB), durante 14 horas a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de 7×10^7 UFC/mL. Posteriormente se realizó un seguimiento de la cinética del crecimiento empleando 100 µL de este inóculo bacteriano durante 12 horas en microplacas que previamente contenían AgNPs a diferentes concentraciones (1.25; 2.5; 5; 10; 20; 40 y 80 µg/mL). La CMI fue definida como la menor concentración de AgNPs que produce una inhibición en el crecimiento bacteriano. El experimento se realizó con tres réplicas para cada concentración analizada.

Se procesaron los datos en el paquete estadístico Statgrafic plus 5.1 d realizándose un ANOVA simple para comparar los grupos experimentales con un $p \leq 0.05$.

Resultados y discusión

En la figura 1 podemos observar el crecimiento de las bacterias expuestas a las diferentes concentraciones de AgNPs donde se evidencia una CMB a partir de los 10 µg/mL con una inhibición total del crecimiento de las UFC/mL.

Las bacterias expuestas a las concentraciones más bajas tuvieron crecimiento de UFC/mL relacionada directamente con la concentración de forma inversamente proporcional ya que a medida que aumentaban las concentraciones de las AgNPs disminuían en número desde 10^4 hasta 10^2 UFC (1.25 a 5 µg/mL) respectivamente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control (agua) y las concentraciones usadas, además también se vio diferencias entre las concentraciones mínimas (1.25 a 5 µg/mL) y las máximas utilizadas (10 a 80 µg/mL) con un nivel de confianza del 95%.

Estudios realizados mostraron actividad antibacteriana de las AgNPs con resultados semejantes relacionados con la concentración (Ruparelia *et al.*, 2007).

Greulich *et al.* (2012) utilizando AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), informaron valores de CMB de 50 µg/mL para cepas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.

Martínez *et al.* (2018) determinaron la CMI de AgNPs recubiertas con ácido gálico de tres tamaños distintos (7, 29 y 89 nm) mediante diluciones en caldo. Los valores encontrados fueron de 6,25 a 11,8 µg/mL para *E. coli* y 7,5 a 33,7 µg/mL para *S. aureus*.

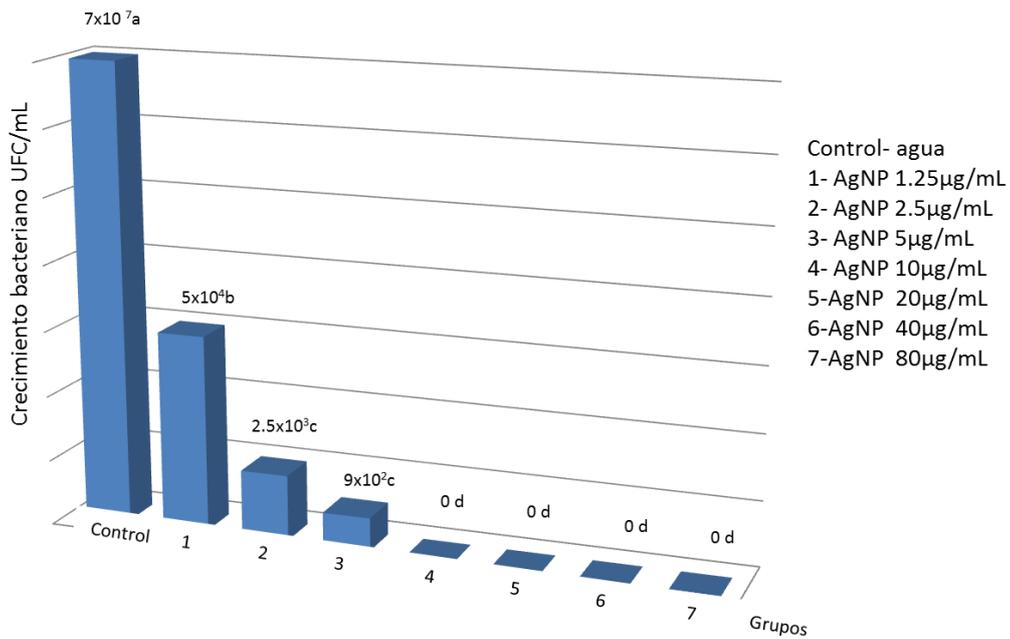
Sin embargo, otros autores obtuvieron valores de 60 a 220 µg/mL para varias cepas de *E. coli* usando AgNPs de aproximadamente 3 nm (bastante más pequeñas que las usadas en este trabajo) (Ruparelia *et al.*, 2008).

Se han planteado diversos mecanismos por los que las AgNPs actúan sobre las bacterias, desde la pérdida de la integridad de la pared bacteriana hasta la generación de especies ROS. Varios autores han encontrado que la interacción de las AgNPs con la pared celular provocaría la pérdida de integridad de la misma por generación de poros (Sondy y Salopek-Sondi, 2004; Mirzajani *et al.*, 2011) y/o por la interacción con las proteínas de membrana, lo que al mismo tiempo genera un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, estrés oxidativo y la posterior muerte celular (Upendra *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2008).

En este sentido, se ha encontrado que *E. coli* (Gram (-)) es susceptible al tratamiento con AgNPs atribuido a los mayores daños y cambios morfológicos de la pared celular en *E. coli* (Jung *et al.*, 2008). Estos resultados se pueden interpretar teniendo en cuenta que las bacterias Gram (-) poseen una pared celular que está formada por una membrana

celular, una delgada capa de peptidoglicano y por fuera de ella una capa de liposacáridos, la que podría generar una menor resistencia al ingreso de las NPs (Amato *et al.*, 2011).

Figura 1. Número de UFC/mL de E. coli luego de 12 horas de exposición a dispersiones de AgNPs a diferentes concentraciones. ANOVA simple ($p \leq 0.05$)



Bibliografía

1. Amato, E., Diaz-Fernandez, Y.A., Taglietti, A., Pallavicini, P., Pasotti, L., Cucca, L., Milanese, C., Grisoli, P., Dacarro, C., Fernandez-Hechavarria, J.M. y Necchi, V. 2011. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity against Gram Positive and Gram Negative Bacteria of Biomimetically Coated Silver Nanoparticles, *Langmuir*, (27), 9165-9173.
2. Ayala, Nilda V.2010. Nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología. Pdf. p 125-130.
3. Flores, Constanza Y. 2014. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida. Tesis para opción al grado de Doctor en Ciencia. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Pdf. p:100-110.
4. Greulich, C., Braun, D., Peetsch, A., Diendorf, J., Siebers, B., Epple, M. y Koller, M.2012. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range, *RSC Advances*, (2), 6981-6987.
5. Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B.-I. y Gu, M.B.2008. Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria, *Small*, (4), 746-750.
6. Martínez, G. A., Niño, N. ; Martínez, F., Martínez, J.R. y Ruiz, F.2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, (10), 1343-1348.
7. Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A. y Esmaili, M.A., Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*, *Research in Microbiology*, 2011, (162), 542-549.
8. Murray, P.R., Rosenthal, K.S. y Tenover, M.A. 2009. *Microbiología médica*, 6ta ed., Elsevier.
9. Paredes, Daissy J. 2011. Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de químico. Pdf. escuela de química de Bucaramanga. P 34-38.
10. Piddock, L.J.V., Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 1990, (68), 307-318.

- 11.** Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P. y Mukherji, S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomaterialia*, (4), 707-716.
- 12.** SonDI, I. y Salopek-SonDI, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science*, (275), 177-182.
- 13.** Upendra Kumar, P., Vinod, K., Tanmay, B., Preeti, S.S., Gopal, N., Sunil, K.S., Rajiv, G. y Anchal, S. 2007. Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, (22), 415104.

Recibido: 27/06/16

Aceptado: 06/07/16