

# Producción de Nanopartículas de Plata a partir de Cultivos de Microalgas sin Cloruro y su Actividad Antimicrobiana

Carlos Pernas Pleite

Máster en Microbiología



MÁSTERES  
DE LA UAM  
2017 - 2018

Facultad de Ciencias

# Máster en Microbiología

## Producción de Nanopartículas de Plata a partir de Cultivos de Microalgas sin Cloruro y su Actividad Antimicrobiana

**Carlos Pernas Pleite**



FACULTAD DE  
CIENCIAS

Director: José Pascual Abad Lorenzo  
Lugar de realización: Universidad Autónoma de Madrid  
(UAM)/Departamento de Biología Molecular

Trabajo Fin de Máster. Curso 2017-2018



# ÍNDICE:

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	<b>Infecciones bacterianas, antibióticos y resistencia a antibióticos:</b> .....	1
1.2	<b>Nanoestructuras y su uso en la medicina</b> .....	2
1.3	<b>Nanopartículas (NPs): tipos, síntesis, características y funcionalidad</b> .....	2
1.4	<b>Nanopartículas de plata (AgNPs): mecanismos de acción antimicrobiana</b> .....	5
1.5	<b>Resultados previos del grupo de investigación</b> .....	5
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
3.1	<b>Reactivos y materiales utilizados</b> .....	6
3.2	<b>Microorganismos utilizados</b> .....	7
3.2.1	Microalgas .....	7
3.2.2	Bacterias.....	7
3.3	<b>Cultivo de microorganismos</b> .....	7
3.3.1	Para microalgas .....	7
3.3.2	Para bacterias.....	7
3.4	<b>Producción y caracterización de AgNPs</b> .....	8
3.4.1	Obtención de caldos de cultivo de las microalgas .....	8
3.4.2	Síntesis de NPs y cinética .....	8
3.4.3	Caracterización físico-química de las AgNPs .....	9
3.4.4	Inhibición del crecimiento de bacterias y de formación de biofilms por AgNPs.....	10
3.4.5	Actividad citotóxica de las AgNPs de pH7 .....	11
3.5	<b>Análisis estadístico</b> .....	11
4.	RESULTADOS.....	11
4.1	<b>Cultivos de algas y producción de AgNPs</b> .....	11
4.2	<b>Caracterización físico-química de las preparaciones de AgNPs</b> .....	14

4.2.1	Cristalinidad de las NPs por Difracción de Rayos X (XRD) .....	14
4.2.2	Morfología y tamaños de las AgNPs mediante TEM .....	14
4.2.3	Diámetro hidrodinámico y potencial eléctrico de las AgNPs mediante DLS .....	16
4.2.4	Componentes asociados a la corona de las AgNPs mediante FTIR .....	16
4.2.5	Composición y concentración de plata en las AgNPs mediante TXRF.....	17
<b>4.3.</b>	<b>Actividades inhibidora del crecimiento y de la formación de biofilms de bacterias Gram- y Gram+ por las AgNPs .....</b>	<b>17</b>
4.3.1	Inhibición del crecimiento de bacterias Gram- y Gram+ por las AgNPs.....	17
4.3.2	Actividad inhibidora de la formación de biofilms de las AgNPs.....	19
<b>4.4</b>	<b>Actividad citotóxica de las AgNPs de pH 7 .....</b>	<b>19</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>26</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>

## RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) de origen biológico se consideran antimicrobianos eficientes que pueden ser útiles en algunos casos de resistencias a antibióticos tradicionales. En el presente estudio se muestra que es posible la obtención de AgNPs a partir de los sobrenadantes de cultivos en un medio sin cloruro de tres especies de microalgas acidotolerantes a pHs 4 y 7 y en dos momentos diferenciados de sus curvas de crecimiento. La síntesis y determinación de las características estructurales y actividad biológica de las AgNPs producidas por los cultivos de una cepa de *Parachlorella* sp. se abordó con más detalle, obteniéndose AgNPs, con sobrenadantes de cultivos realizados en cuatro condiciones diferentes, incluyendo pHs 4 y 7 y dos fases de crecimiento. Se analizaron las estructuras mediante difracción de Rayos-X, (XRD), Microscopía electrónica de transmisión (TEM), Dispersión dinámica de luz (DLS) y Espectroscopía U-Vis y de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR). La actividad antibacteriana se determinó en base a sus capacidades de inhibición del crecimiento de tres bacterias Gram+ y otras tres Gram- y de inhibición de la formación de biofilms. Se observó que las nanopartículas son mayoritariamente esféricas con diámetros medios que varían según las condiciones de cultivo de la microalga tanto en cuanto a pH como a fase de crecimiento, con potenciales eléctricos negativos y con actividades antibacterianas que muestran diferencias tanto en cuanto a las condiciones de cultivo de las microalgas como en cuanto a las bacterias testigo empleadas. Finalmente, un estudio preliminar de la citotoxicidad de las AgNPs producidas a pH 7 muestra un efecto citotóxico sobre células que es dependiente de la fase de crecimiento de la microalga.

Palabras clave: AgNPs, Actividad antibacteriana, Biofilm, Nanopartículas biológicas, *Coellastrella*, *Parachlorella*, *Tetrademus obliquus*.

## SUMMARY

Biological silver nanoparticles (AgNPs) are considered as efficient antimicrobials that can be useful in certain cases of resistances to traditional antibiotics. This study shows that it is possible to obtain AgNPs using supernatants of cultures with pHs 4 and 7 in a medium without Cl<sup>-</sup> of three acidotolerant microalgae species, in two differentiated stages of their growth curves. The synthesis of AgNPs using supernatants of cultures at pHs 4 and 7 and from two growth stages of a *Parachlorella*' strain was performed and their structural and biological characterization addressed. Techniques such as Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and U-Vis and Fourier Transform Infrared Spectroscopies (FTIR) were used for structural analysis. Antibacterial activity was determined based on their capability to inhibit growth and biofilm production of three Gram – and three Gram + bacteria. AgNPs were mainly spherical, with different average diameters depending on the microalgae culture conditions of pH and growth phase, with negative electric potentials and with antibacterial activities showing different biological activities depending on the microalgae culture conditions and the test bacteria used. Finally, a preliminary study on cytotoxicity of pH 7 AgNPs on HaCat cultured cells showed a microalgae growth-phase dependence.

Key Words: AgNPs, Antibacterial activity, Biofilm, Biological nanoparticles, *Coellastrella*, *Parachlorella*, *Tetrademus obliquus*.



# 1. INTRODUCCIÓN

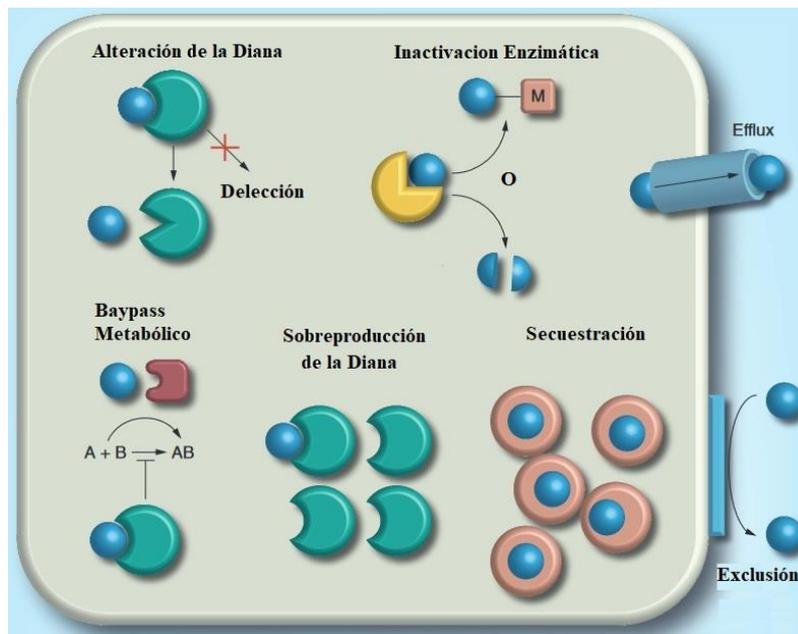
## 1.1 Infecciones bacterianas, antibióticos y resistencia a antibióticos:

El desarrollo de antibióticos ha sido uno de los principales hitos en la medicina, siendo un método efectivo para el tratamiento de la mayor parte de las infecciones bacterianas. No obstante, la funcionalidad de estos antibióticos se ve limitada por la capacidad de las propias bacterias de desarrollar mecanismos de diverso tipo y origen para silenciar o evadir sus efectos antimicrobianos. Estos se conocen como mecanismos de resistencia a antibióticos y su proliferación supone una crisis a nivel mundial que presenta el potencial necesario para alterar los estándares médicos en todo el mundo (1, 2, 3, 4).

La resistencia a antibióticos puede ser innata o intrínseca, la cual se debe a un conjunto de genes que aportan una resistencia inherente a la propia naturaleza de la bacteria o adquirida, la que la bacteria posee como consecuencia de una determinada presión ambiental (5, 6) que fija mutaciones espontáneas que confieren resistencia o es obtenida mediante transferencia horizontal de genes (HGT) (7, 8).

Independientemente de su origen, los mecanismos de resistencia están bien establecidos, y son: la incapacidad del fármaco para entrar en la bacteria o la exclusión por ésta mediante bombas de flujo, la alteración de la molécula diana en su dominio de acción o la sobreproducción de éstas, la degradación o modificación enzimática del fármaco, su secuestro por proteínas de unión o el empleo de baipases metabólicos (Fig. 1); todos ellos pueden actuar de forma sinérgica para aumentar el efecto global de resistencia (9, 10). Paralelamente las bacterias también emplean cambios fisiológicos en estructuras de resistencia como biofilms o esporas para reducir su sensibilidad a antibióticos o resistir su efecto (11, 12, 13). En este aspecto se considera biofilm al agregado de microorganismos embebidos en una matriz extracelular autoproducida y que se encuentran adheridos unos a otros o a una superficie. Este agregado celular presenta cierta complejidad estructural y una cierta diferenciación entre células que componen el biofilm. Estos biofilms son capaces de formarse gracias a que las células pueden comunicarse por mecanismos denominados *Quorum Sensing*, que permiten a las células presentar respuestas coordinadas (14). Además, los biofilms facilitan la transferencia horizontal de genes y el desarrollo de mecanismos de resistencia clásicos en las células que lo componen (11, 12, 13). Todos estos procesos de resistencia se ven favorecidos por el consumo inadecuado de medicamentos antibióticos (15, 16, 17).

Por este motivo se considera necesario aumentar el conocimiento en relación con estos procesos de resistencia para desarrollar estrategias de abordaje más eficientes (8, 18); así como el desarrollo, tanto de nuevos protocolos médicos para reducir el consumo inadecuado de antibióticos, como el de nuevos medicamentos antibióticos no clásicos (5, 15, 16). Uno de estos es el catión ( $\text{Ag}^+$ ), empleado desde hace siglos como mecanismo para tratar infecciones bacterianas. En la actualidad el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) se emplea como profiláctico contra la conjuntivitis neonatal y algunas fórmulas empleadas para el tratamiento de úlceras, heridas crónicas y quemaduras contienen cierta cantidad de  $\text{Ag}^+$  (19, 20, 21). No obstante, su uso se ve limitado debido al potencial citotóxico del catión  $\text{Ag}^+$  (22).



**Figura 1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.** Esquema representativo de los determinantes clásicos de resistencia. Modificado de [9].

## 1.2 Nanoestructuras y su uso en la medicina

La nanotecnología se considera una rama de la ciencia, la ingeniería y la tecnología encargada del desarrollo de nanoestructuras (NSs). Estas NSs son componentes y/o materiales que presentan un tamaño de en torno a 1-100 nm (23).

Las NSs presentan cualidades propias que las diferencian de estructuras de mayor volumen debido fundamentalmente a su pequeño tamaño (23, 24). Entre los campos en los que se hacen distintos usos de NSs se encuentran la electrónica, la cosmética, la biotecnología, la biorremediación, la agricultura y la biomedicina (23, 25, 26). Esta última establece un nuevo campo en la medicina, denominado nanomedicina, la cual incluye metodologías para la detección, prevención y tratamiento de tumores (27, 28), tratamiento y profilaxis de infecciones bacterianas (29), uso en terapia génica (23, 30), etc.

## 1.3 Nanopartículas (NPs): tipos, síntesis, características y funcionalidad

Dentro de la nanotecnología una de las NSs mejor estudiadas y con mejores perspectivas de uso son las nanopartículas (NPs). Las NPs presentan una serie de características que las convierten en herramientas de interés en una gran cantidad de campos, presentando a su vez una gran diversidad de usos. Entre estas características se encuentran una alta relación superficie/volumen lo que facilita una alta capacidad de interacción con otras partículas y estructuras (23) y una fuerte resonancia de plasmón de superficie (SPR), que las hace interesantes en aplicaciones fotovoltaicas (31), entre otras.

Las NPs pueden clasificarse según su composición en orgánicas o inorgánicas. Las NPs orgánicas están formadas únicamente por compuestos orgánicos, mientras que las inorgánicas están compuestas principalmente por metales, como p.ej. oro o plata, compuestos metálicos, frecuentemente óxidos, como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{CuO}$ , o aleaciones (23). Por lo general las NPs inorgáni-

cas presentan unas mejores cualidades antimicrobianas y son más estables a altas temperaturas que las orgánicas, por lo que se suele preferir su uso como antimicrobiano (23, 32, 33).

Las NPs inorgánicas pueden presentar varias utilidades dependiendo de su composición, pero una de sus cualidades más destacables y por la que han despertado gran interés es por sus actividades antimicrobianas. En este aspecto son las derivadas de plata, las más estudiadas debido a su mayor eficacia, habiéndose comprobado su actividad contra bacterias (34), hongos (35), virus (36), parásitos (37) e incluso contra tumores (23, 27). No obstante, para determinadas bacterias, otros tipos de NPs inorgánicas, como por ejemplo las de CuO, han mostrado en ocasiones mayor actividad antimicrobiana que las de Ag (23).

Se ha observado que algunas NPs presentan una actividad antibacteriana inversamente proporcional al tamaño, siendo las más pequeñas las más eficaces tanto *in vitro* como *in vivo* (23, 38). Sin embargo, esta característica no es la única relevante como se demuestra en otros estudios (39, 40, 41).

Paralelamente a la clasificación por su composición también es posible clasificar a las NPs dependiendo de su forma de obtención. Principalmente se emplean métodos de obtención “bottom-up”, a partir de componentes simples, aunque también se pueden emplear métodos “top-down” a partir de estructuras más grandes y complejas que se fragmentan para producir NPs (42, 43). También se pueden clasificar en NPs químicas, físicas o biológicas dependiendo de las metodologías empleadas en su síntesis (23, 42).

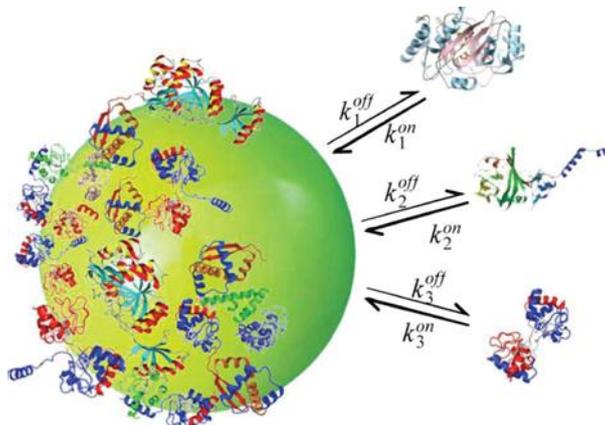
Inicialmente la producción de NPs se basaba en el empleo de métodos físicos y químicos entre los cuales destacan la reducción química de sales de plata, como el AgNO<sub>3</sub>, por borohidruro de sodio o citrato de sodio, así como procesos fotoquímicos de radiación- $\gamma$ , irradiación microondas, ablación láser, etc. (44, 45). Sin embargo, todos estos procesos, además de ser energéticamente caros, emplean componentes de alta toxicidad que convierten la producción de NPs en un riesgo medioambiental. Sistemas alternativos basados en métodos biológicos se han venido desarrollando en los últimos tiempos buscando alternativas más amistosas con el medio ambiente (23, 42, 44).

El empleo de métodos biológicos para la producción de NPs, representa lo que se conoce como biosíntesis o síntesis verde, la cual interconecta la biotecnología y la nanotecnología (46). La biosíntesis de NPs representa un sistema más seguro y ecológico de producción, dado que, además de reducir el gasto energético, no emplean componentes químicos peligrosos, sino compuestos de origen biológico para la reducción de metales a partir de sus sales, lo que permite aumentar el uso de estas NPs en Medicina, y no solo como antimicrobianos (23). Sin embargo, los métodos biológicos de producción presentan aun algunos inconvenientes como la falta de control de los tamaños de las NPs, que es importante para algunas aplicaciones, aspecto que se intenta mejorar empleando compuestos biológicos concretos (41, 44, 47, 48).

Cuando se usan extractos biológicos o cultivos complejos los agentes reductores eficaces de iones metálicos presentes nuclean y permiten que las partículas crezcan hasta formar el núcleo o “core” de la NP, mientras que otros componentes proporcionan un revestimiento de este núcleo (Fig. 2) (46, 49). Este revestimiento o corona de naturaleza orgánica, recubre de forma dinámica al “core” de las NPs biosintéticas y les proporcionan una mejora en cuanto a sus cualidades tanto de unión a la célula diana como en cuanto a su estabilidad. La corona se considera cada vez más, un factor de vital importancia para la función de las NPs biosintéticas y puede jugar un papel tanto o igual de importante que la forma o el tamaño de las NPs (41, 50, 51, 52, 53, 54). Algunos estudios sugieren que los componentes principales de la corona son de naturaleza proteica (44, 52), aunque no han sido hasta ahora posibles estudios sobre la naturaleza más

específica de estos componentes por falta de metodologías adecuadas (55). Aun así, existe una gran controversia en cuanto a la composición de las coronas de las NPs sintetizadas, debido a que su composición, varía en cuanto al cultivo o método experimental empleado. Además, no todas las proteínas presentes en un cultivo acaban formando parte de la corona de la NP. Sumado a esto, las diferencias en los procesos experimentales de los distintos estudios, hace que los resultados, se presenten dispersos (56).

Para la producción biológica de NPs se han empleado distintos materiales biológicos entre los que se incluyen extractos de plantas (37, 43), cultivos bacterianos (57, 58), cultivos fúngicos (59), entre otros.



**Figura 2. Formación de la corona de NPs.** Distintos componentes orgánicos se unen y recubren el core de la NP, entrando  $K^{on}$  y saliendo  $K^{off}$  de forma dinámica, hasta que recubren el core. Tomado de [51].

La producción de NPs a partir de cultivos de microorganismos se puede realizar a nivel intracelular a partir de enzimas y componentes del interior de las células o extracelular a partir de sus secreciones al medio de cultivo (43, 46). Este último caso resulta más interesante dado que facilita la metodología al tener únicamente que centrifugar los cultivos y añadir al sobrenadante la sal metálica (43, 44). Por otra parte, el proceso de síntesis de NPs y las cualidades de estas dependen de las condiciones fisicoquímicas del cultivo, como la temperatura y el pH, presencia o no de luz, o de la concentración del sustrato empleado. En este aspecto resulta interesante el empleo de organismos extremotolerantes o capaces de sobrevivir en distintas condiciones ambientales, para estudiar las diferencias estructurales funcionales de las NPs sintetizadas a partir de estos cultivos en las distintas condiciones, como se ha hecho en estudios anteriores (41, 60) y en el presente, e incluso en distinto estado de desarrollo de los cultivos, posiblemente con distinta composición química de los medios de cultivo.

Dentro de los métodos de biosíntesis de NPs, se está prestando gran atención a los cultivos de microalgas como fuente de producción (23). Las algas han despertado gran interés por sus aplicaciones tanto en la industria de los biocombustibles, en la industria alimenticia y en la sanitaria (46). Debido entre otros factores a su amplia diversidad y fácil cultivo, así como su bajo coste de producción (61). En este sentido existen publicaciones recientes en los que se describe el empleo de distintos cultivos de microalgas para la producción de NPs, especialmente AgNPs (23, 44, 47, 60).

#### 1.4 Nanopartículas de plata (AgNPs): mecanismos de acción antimicrobiana

Como se ha comentado anteriormente la plata en forma de nitrato se ha empleado y se sigue empleando como tratamiento en quemaduras, úlceras y conjuntivitis prenatal (19, 20, 21). No obstante, su uso no se extiende a otras infecciones debido a su toxicidad. Una forma de reducir este problema sería la utilización de NPs derivadas de plata, si esto pudiera disminuir la citotoxicidad en células eucariotas (22), a la vez que manteniendo o incluso aumentando la actividad antibacteriana (16).

Las NPs derivadas de plata (AgNPs), se llevan empleando durante los últimos años como una forma eficiente de tratamiento contra infecciones microbianas presentando una mayor eficacia que la mayor parte de las NPs inorgánicas (23, 58). Se han descrito NPs derivadas de Ag conteniendo AgCl, AgO, Ag o mezclas, que pudieran tener distintos efectos antimicrobianos o mecanismos de acción aun por dilucidar (34, 44).

El mecanismo de acción de las AgNPs y de los iones  $Ag^+$ , todavía no se conoce a ciencia cierta considerándose que puede no existir un único mecanismo, sino que se entiende que pueden actuar a varios niveles (Fig. 3). Una vez las AgNPs se han unido y/o penetrado en la bacteria, liberarían cationes de  $Ag^+$  (16, 43), los cuales, debido a su carga positiva, son capaces de unirse al DNA bloqueando la transcripción, causando paralelamente deformaciones en la pared y las membranas. Los iones  $Ag^+$  y las AgNPs pequeñas son capaces de introducirse en las bacterias causando daños intracelulares cuando los  $Ag^+$  interactúan con varios grupos funcionales donadores de electrones. Esto sumado a los daños en las membranas produce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que presentan una importante actividad bactericida (16, 62). También los ribosomas se pueden desnaturar en presencia de  $Ag^+$ , inhibiéndose la traducción, lo cual a su vez ocasiona un aumento de precursores inmaduros de proteínas de membrana, que se acumulan en la membrana externa y la desestabilizan (16, 63).

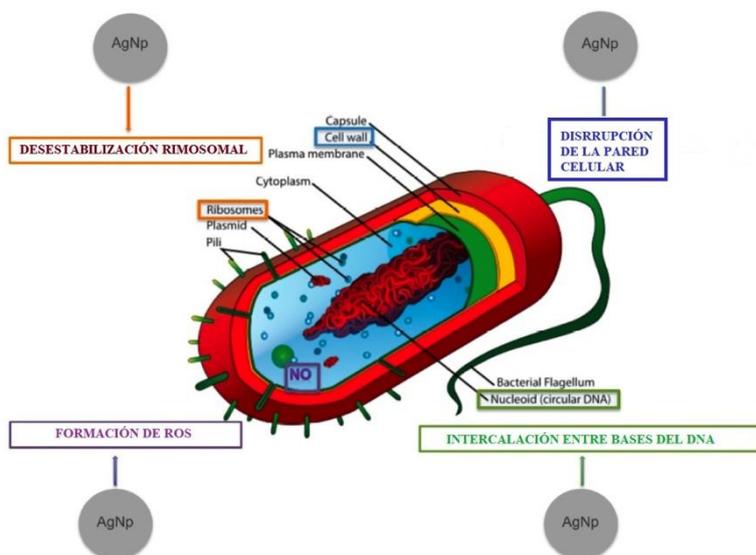


Figura 3. Mecanismos de acción de las AgNPs en bacterias. Modificado de [16].

#### 1.5 Resultados previos del grupo de investigación

Estudios previos del grupo de investigación en los que se enmarca el presente estudio. El grupo de investigación ha trabajado en la síntesis biológica extracelular de NPs de plata por bacterias psicotolerantes (41) y de microalgas acidotolerantes (60). En este último se han

producido NPs que contenían Ag y AgCl y que han sido activas frente a bacterias Gram+ y Gram-. El presente trabajo deriva de la necesidad de estudiar la posibilidad de obtener NPs solo con Ag<sup>0</sup> y determinar sus características fisicoquímicas y de actividad biológica, empleando algunas técnicas no empleadas anteriormente para la caracterización de las AgNPs, ampliando además el número de bacterias utilizadas como testigos de actividad antibacteriana y extendiendo los análisis de actividad al estudio de la capacidad de inhibir la formación de biofilms.

## 2. OBJETIVOS

- 1- Determinar la capacidad de formación de AgNPs por sobrenadantes de cultivos de tres microalgas acidotolerantes, *Parachlorella* sp., *Tetrademus obliquus* y *Coellastrella* sp., a lo largo de sus curvas de crecimiento a pHs 4 y 7 y si las fases de crecimiento determinan las cinéticas de síntesis de las nanopartículas.
- 2- Realizar una caracterización físico-química de las AgNPs que se puedan obtener con sobrenadantes de cultivos de *Parachlorella* sp.
- 3- Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano y de la formación de biofilms de las AgNPs procedentes de *Parachlorella* sp.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos y materiales utilizados

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Ácido clorhídrico	MERCK
Ácido sulfúrico	MERCK
Agar bacteriológico	LABS. CONDA
Amicon Ultra- 2mL 3K	M (Merck-Millipore)
Capillary Cells Zetasizer nano	Malvern
Cristal Violeta	Sigma-Aldrich
Cubetas espectrofotómetro	KARTELL
EDTA (Tritiplex III)	MERCK
Estreptomicina	DUCHEFA
Etanol 96°	VWR Chemicals
Extracto de carne	MERCK
Fosfato disódico	SIGMA
Fosfato monopotásico	SIGMA
Lamina de sellado placas microtítulo	Brand
Metanol	Riedel de Haën
Mueller-Hinton Agar 2	SIGMA-ALDRICH
Mueller-Hinton Broth 2	SIGMA-ALDRICH
Nitrato de plata	MERCK
Peptona bacteriológica	LABORATORIOS CONDA
Placas microtítulo 96 pocillos	Sarstedt
Placas microtítulo 6 pocillos	Falcon
Placas Petri	Thermo-scientific
Sales utilizadas para los medios	MERCK

**Tabla 1. Reactivos y materiales utilizados**

## 3.2 Microorganismos utilizados

### 3.2.1 Microalgas

Se utilizaron tres microalgas previamente aisladas del estuario del río Tinto (Huelva) y cuya asignación filogenética corresponde a *Parachlorella* sp. SJP\_EBP\_1, *Tetrademus obliquus* SJP\_EBO\_3 y *Coelastrella* sp. SJP\_EBO\_4 (60).

### 3.2.2 Bacterias

Las bacterias utilizadas en los test de actividad biológica de las AgNps fueron las Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 y *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 y las Gram positivas: *Staphylococcus aureus* CECT 794 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* 168.

## 3.3 Cultivo de microorganismos

Se emplearon los medios siguientes:

### 3.3.1 Para microalgas

**Medio BG-11:** Según Allen y Steiner 1968 (64). Para medios sólidos o líquidos el pH (4 o 7) se ajustó mediante la adición de HCl. Para medio sólido se añadieron 15 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico.

**Medio BG-11A:** Medio BG-11 alternativo, sin cloruros: CaCl<sub>2</sub> sustituido por Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y en trazas MnCl<sub>2</sub> por MnSO<sub>4</sub>. pHs ajustados con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.3.2 Para bacterias

**Medio Nutritivo:** Peptona bacteriológica 10 g L<sup>-1</sup>; extracto de carne 3 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5 g L<sup>-1</sup>. Para medio sólido se añadieron 15 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico.

**Mueller-Hinton Broth 2 y Mueller-Hinton Agar 2.** Preparados según indicaciones de la casa comercial.

Las microalgas fueron mantenidas en cultivo en placas de 6 pocillos tanto en medio BG-11 como en medio BG-11A en un incubador a 20 °C y con una iluminación en ciclo día/noche de 16/8 h, utilizando 5 tubos fluorescentes Osram-Dulux de 11 W.

Para los ensayos de producción de NPs en distintas etapas de crecimiento de las microalgas se realizaron cultivos con 100 mL de medio BG-11A en erlenmeyers de 250 mL y sin agitación en el régimen de iluminación y temperatura indicado arriba. Para el seguimiento de los cultivos de microalgas éstas fueron visualizadas utilizando un microscopio Axioskop2 plus (Zeiss) con una cámara CCD Coolsnap FX color (Roper Scientific) acoplada al mismo y su densidad determinada mediante el espectro de los cultivos entre 300 y 700 nm, y en particular la densidad óptica a 680 nm (DO<sub>680</sub>).

Las bacterias fueron mantenidas en cultivo en medio sólido nutritivo o cuando fue necesario en Agar Mueller-Hinton. Los ensayos de actividad de las AgNPs o AgNO<sub>3</sub> se hicieron en medios líquidos Mueller-Hinton o nutritivo.

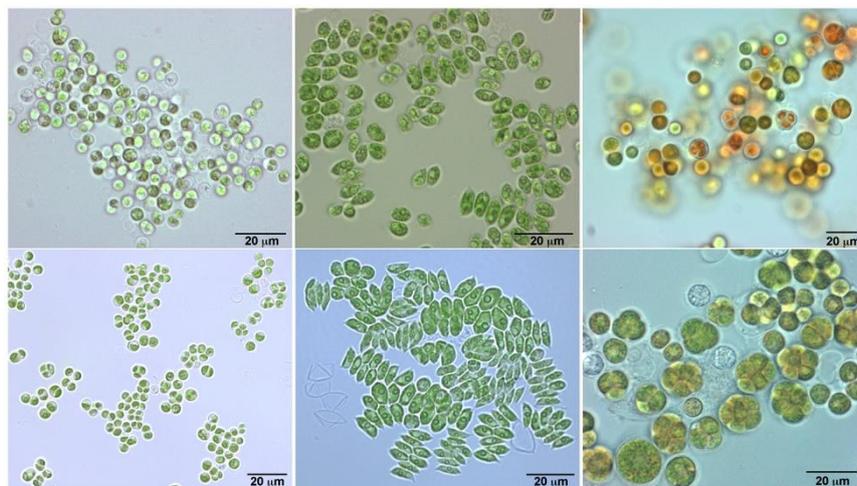
### 3.4 Producción y caracterización de AgNPs

#### 3.4.1 Obtención de caldos de cultivo de las microalgas

Para la producción de las AgNPs se utilizaron los caldos de cultivo de las microalgas a lo largo de su curva de crecimiento. Para separar las células del caldo de cultivo las muestras se centrifugaron 10 min a 2850xg y los sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente o congelados a -20°C hasta su uso. Antes de su utilización en la síntesis preparativa de AgNPs, los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo 10 min a 21.000xg.

En los microensayos de producción de AgNPs se emplearon los tres tipos de algas inicialmente citadas en el apartado 3.2.1.

Para la síntesis de AgNPs a escala preparativa se emplearon los sobrenadantes de los cultivos de *Parachlorella* sp. SJP\_EBP\_1 obtenidos de cultivos a pH 4 y 7 en dos puntos de la curva de crecimiento representativos de producciones temprana y tardía de NPs, según se indica más adelante.



**Figura 4. Visualización al microscopio óptico de las microalgas. *Parachlorella* sp. (izda.), *T. obliquus* (medio) y *Coellastrella* sp. (dcha.); a pH 7 (arriba) y pH 4 (abajo).**

#### 3.4.2 Síntesis de NPs y cinética

A los sobrenadantes se añadió  $\text{AgNO}_3$  hasta una concentración final de 1 mM a partir de una solución madre 20 mM. Las mezclas de reacción se incubaron a 20°C expuestas a la luz de 3 lámparas fluorescentes Sylvania de 13 W colocados a una distancia de aprox. 20 cm de las muestras. Como control negativo se utilizó medio de cultivo suplementado con  $\text{AgNO}_3$  hasta 1 mM, que se incubó en las mismas condiciones. Una muestra idéntica a la mezcla de reacción se mantuvo en la oscuridad en las mismas condiciones.

La formación de AgNPs se monitorizó visualmente por la aparición de coloración amarilla-marrón y se midió mediante espectrofotometría UV-Vis entre 300 y 700 nm. En los microensayos se utilizó un volumen de 200  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción registrándose los espectros en un lector de placas de microtítulo de Biotek. Alternativamente se utilizaron mezclas de reacción de 700  $\mu\text{l}$ , que se midieron en un espectrofotómetro Genesys6 de Thermo-Fisher. Cuando fue necesario se midieron diluciones apropiadas de las muestras en agua MilliQ. Los espectros UV-Vis obtenidos fueron analizados para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de cada nanopartícula y para la construcción de las curvas de la cinética de síntesis, que se realizaron a dicha longitud de onda, utilizando el programa Excel (Microsoft).

En las síntesis de AgNPs a escala preparativa (12 mL de sobrenadante), las reacciones se dejaron proceder hasta que se apreció una estabilización del espectro, indicando que se había llegado al máximo de producción. Las preparaciones de AgNPs se centrifugaron 60 min a 21000xg en tubos eppendorf y los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en 200 µl de agua MilliQ y vueltos a sedimentar en las mismas condiciones, repitiendo una vez más el lavado. El sobrenadante de la primera centrifugación se sometió a un proceso de concentración de las nanopartículas no sedimentadas por centrifugación a 2790xg y a 4 °C a través de la membrana de un Amicon 3K (Millipore). Los 200 µl de nanopartículas concentradas fueron lavadas añadiéndoles 2 mL de agua MilliQ y volviéndolas a concentrar. Este proceso se repitió una vez más antes de juntar las nanopartículas con las procedentes de la centrifugación inicial. La preparación obtenida se sedimentó de nuevo y se sometió a dos lavados con agua MilliQ (200 µl cada vez). Finalmente, el sedimento de nanopartículas se resuspendió en un décimo del volumen original de la reacción de síntesis.

### **3.4.3 Caracterización físico-química de las AgNPs**

#### **3.4.3.1 Composición de las AgNPs y concentración de plata en las preparaciones mediante Fluorescencia de Rayos-X con Reflexión Total (TXRF)**

Los análisis mediante TXRF se realizaron en el servicio de Fluorescencia de Rayos-X del SIDI de la UAM, con un espectrómetro S2 PicoFox TXRF de Bruker Nano (Alemania), equipado con una fuente de Rayos-X de Mo trabajando a 50 kV y 600 µA, un monocromador multicapa con 80% de reflectividad a 17.5 keV (Mo K $\alpha$ ) y un detector XFlash SDD con un área efectiva de 30 mm<sup>2</sup> y una resolución de energía mejor que 150 eV para 5.9 keV (Mn K $\alpha$ ). Para la deconvolución y la integración se utilizó el paquete de software comercial Spectra v. 7.5.3 de Bruker.

#### **3.4.3.2 Cristalinidad de las AgNPs por Difracción de Rayos X (XRD)**

Las suspensiones de AgNPs se depositaron sobre cubreobjetos de vidrio de 2x2 cm, dejándose secar a temperatura ambiente. Estas preparaciones se conservaron a 4 °C y en oscuridad hasta su análisis, que fue realizado por el servicio de difracción de Rayos-X de policristal del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la UAM, utilizando un difractómetro X'Pert PRO theta/2theta de Panalytical, con monocromador primario de germanio (monocromador Johansson) y detector rápido X'Celerator.

#### **3.4.3.3 Morfologías y tamaños y potenciales eléctricos medios de las AgNPs**

El tamaño y la morfología de las AgNPs producidas se determinaron gracias a dos estudios complementarios. Por un lado, se realizó una determinación de las morfologías y de los tamaños medios de los "core" de las AgNPs mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), gracias a la cual es posible distinguir fácilmente las zonas más electrodensas, correspondientes al "core". Por otro, se determinaron los diámetros hidrodinámicos medios de las AgNPs, que incluyen las coronas de las AgNPs, mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS). También por esta técnica se determinaron los potenciales eléctricos medios de las AgNPs.

##### **3.4.3.3.1 Morfología y tamaño medio del "core" de las AgNPs mediante TEM**

Se prepararon diferentes diluciones en agua MilliQ de cada muestra de nanopartículas y 5 µL de cada una fueron depositados y dejados secar a temperatura ambiente sobre una rejilla de cobre para TEM, colocada sobre parafilm. Las rejillas fueron guardadas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su uso.

Las observaciones se realizaron en el servicio de TEM del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CBMSO en un microscopio Jeol JEM1010 a 80 kV. Las fotos se tomaron con una cámara TemCam F416 (TVIPS, Gauting, Alemania) con un sensor 4Kx4K. Se contaron entre 1500-500 nanopartículas por cada preparación de AgNPs, excluyendo toda zona electrodensa con radio  $\leq 1$  nm, por su posible confusión con el fondo de la rejilla. Para la determinación de los tamaños se utilizó el programa ImageJ64 (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU), analizándose posteriormente los datos utilizando el programa Excel (Microsoft).

Se determinó el índice de poli-dispersión (PDI) de las nanopartículas analizadas utilizando la ecuación:  $PDI = (\sigma/\gamma)^2$  en la que  $\sigma$  representa la media de los diámetros de las AgNPs y  $\gamma$   $\sigma$  su desviación estándar (41).

#### **3.4.3.3.2 Diámetro hidrodinámico y potencial eléctrico de las AgNPs mediante DLS**

Diluciones en agua MilliQ de las muestras de AgNPs fueron analizadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (ICTMM) utilizando un aparato Zetasizer nano (Malvern). Para la determinación del potencial se emplearon cubetas especiales con electrodos internos (Malvern). Los datos fueron registrados con el programa provisto por la compañía fabricante del aparato y posteriormente analizados utilizando Excel (Microsoft).

#### **3.4.3.4 Componentes asociados a la corona de las AgNPs mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros se obtuvieron en el rango espectral 4000-550  $\text{cm}^{-1}$  con una apertura de 0.05 x 0.05 mm y una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$  en un equipo Spectrum Two (Perkin-Elmer) a nivel macro y Spotlight 200 (Perkin-Elmer) a nivel micro, sobre muestras de nanopartículas goteadas sobre pastillas de KBr y secadas a vacío en el servicio de FTIR del SidI.

#### **3.4.4 Inhibición del crecimiento de bacterias y de formación de biofilms por AgNPs**

Se emplearon dos ensayos de actividad antibacteriana de las AgNPs, una determinación de la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias testigo, y un ensayo de la capacidad de inhibir la formación de biofilms sobre la superficie de los pocillos de las placas de microtítulo de las mismas bacterias. Las bacterias se mantuvieron en placas de Petri con medio sólido y a 4°C y fueron cultivadas en medio líquido, Mueller-Hinton comercial o nutritivo, a 37 °C y con agitación a 250 rpm para los ensayos de actividad. A partir de las suspensiones de AgNPs obtenidas se realizaron generalmente diluciones seriadas 1/2 en agua MilliQ. Las diluciones de estreptomycin (Sm) y  $\text{AgNO}_3$  se realizaron con concentraciones de 100-0,39  $\mu\text{g/ml}$  en diluciones 1/2.

##### **3.4.4.1 Inhibición del crecimiento de bacterias Gram- y Gram+ por las AgNPs**

Los cultivos de bacterias testigo realizados durante la noche fueron diluidos con medio fresco hasta el estándar MacFarland 0.5 antes de ser inoculados en las placas de microtítulo. Las diluciones de AgNPs se añadieron a los cultivos de los distintos microorganismos a razón de 10-20  $\mu\text{L}/200 \mu\text{L}$  finales en los pocillos de placas de microtítulo de fondo plano (Sarstedt) y por duplicado. En cada placa se incluyeron controles correspondientes al medio de cultivo, cultivos bacterianos sin AgNPs y de AgNPs a las distintas concentraciones empleadas sin microorganismos. Una vez rellena la placa se cubrió con una tapa transparente adhesiva (marca) para evitar la evaporación y la contaminación de las muestras.

Las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo de 12-14 horas, siguiendo el crecimiento de las bacterias por medida de la DO a 660 nm a intervalos de 1 h, con agitación mediana (según especificaciones del incubador) durante 20 s programada previamente a cada medición. Los ensayos se hicieron alternativamente en un Multilector FLUOstar OPTIMA

(BMG-LABTECH) o en un Multi-mode Microplate Reader Synergy HT (Biotek) según la disponibilidad. Los datos fueron analizados utilizando el programa Excel (Microsoft).

En base a los datos obtenidos se determinaron las concentraciones inhibitorias del 50% (IC<sub>50</sub>) de cada tipo de AgNP, para cada una de las bacterias testigo empleadas, utilizando un modelo de dosis respuesta logarítmico mediante el programa GraphPad Prism (V 6.0). Para la determinación de la curva de inhibición se emplearon los datos correspondientes a las 7 horas de incubación según lo descrito previamente (41).

#### **3.4.4.2 Inhibición de la formación de biofilms por las AgNPs**

Las placas de microtítulo inoculadas con bacterias testigo en presencia o ausencia de AgNPs, e incubadas por un periodo de 12-14 horas, se utilizaron posteriormente para la cuantificación de la formación de biofilms mediante tinción con cristal violeta (65, 66). Para ello, el contenido de cada pocillo se retiró, y las bacterias adheridas al plástico se fijaron con 200 µL de metanol. Tras 20 min a temperatura ambiente (TA) el metanol se retiró, los pocillos se lavaron con metanol fresco, dejándose luego secar durante al menos 20 min a TA. Para la tinción se añadieron 200 µL por pocillo de una solución al 0.5% de cristal violeta dejándose actuar durante 20 min a TA. Tras este tiempo, el colorante sobrante se retiró y los pocillos se lavaron 2 o 3 veces con agua destilada. Finalmente, el colorante unido al biofilm se disolvió en 200 µL de etanol al 96 %, durante al menos una hora antes de medir la absorbancia a 570 nm. El análisis de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism (V 7.04).

#### **3.4.5 Actividad citotóxica de las AgNPs de pH7**

Se llevó a cabo un estudio preliminar de citotoxicidad de las AgNPs de pH 7 tempranas y tardías. Se emplearon concentraciones (1/2X; 1X y 2X) de las preparaciones stock, que se añadieron a cultivos de células HaCat (queratinocitos humanos), cultivándose durante 24 h. Tras este periodo se determinó la viabilidad celular mediante dos ensayos en paralelo, uno metabólico utilizando Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (67) y otro de integridad de membrana/lisosoma utilizando rojo neutro (RN) (68). Tanto la realización de los ensayos de citotoxicidad, como el análisis de los resultados fue realizado en colaboración con el grupo de la Dra. M<sup>o</sup> José Hazen del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

### **3.5 Análisis estadístico**

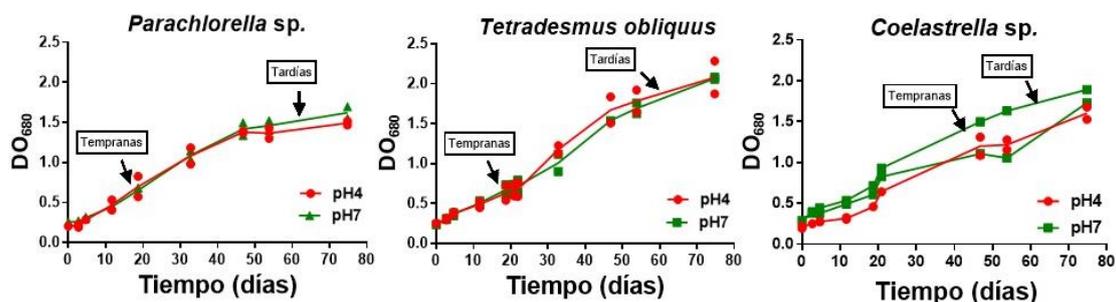
Para el análisis de la formación de biofilms se realizó un test Anova de una cola, con una comparación múltiple de Dunnette, basada en comparaciones con respecto a los controles, y para la comparación de los CI<sub>50</sub>, de las AgNPs según su procedencia un ANOVA de dos colas con una comparación múltiple de Sidak. Se consideró un intervalo de confianza del 95% (P-valor = 0,05).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Cultivos de algas y producción de AgNPs**

Las tres microalgas utilizadas en este trabajo crecen en el medio BG11-A de forma progresiva a lo largo de las diez semanas durante las que se han seguido los cultivos, si bien durante este tiempo no se ha observado una clara fase estacionaria para los cultivos de *Coelastrella* sp (Fig. 5). La DO<sub>680</sub> de los cultivos de *Parachlorella* sp. y *Coelastrella* sp. llegan,

en el tiempo indicado, a 1.5 mientras que *T. obliquus* llegan al entorno de 2.0. No se encuentran diferencias relevantes en el crecimiento en relación con el pH del medio.



**Figura 5. Curvas de crecimiento de las algas utilizadas.** Se muestran los valores correspondientes a los dos cultivos de cada pH realizados en paralelo. Las flechas indican los puntos de recogida de sobrenadantes, para la producción preparativa de AgNPs.

Se realizaron pruebas de síntesis de AgNPs a partir de muestras tomadas de los cultivos de forma periódica, siguiendo la formación de éstas espectrofotométricamente (Fig. 6). Se observó que la formación de AgNPs es casi nula con sobrenadantes de cultivos en la primera semana de crecimiento, empezando a obtenerse NPs con cultivos algo más desarrollados. A los valores más bajos de crecimiento de los cultivos, cuyos sobrenadantes son capaces de producir NPs, también se observa una producción menor de estas, que además son más inestables al producirse su precipitación al poco tiempo de haberse formado. Según va aumentando la DO<sub>680</sub> de los cultivos se obtienen sobrenadantes con mayor capacidad de formación de AgNPs (mayor DO a la  $\lambda_{\max}$  obtenida para la mezcla de reacción antes de que la formación de NPs se pare o éstas se precipiten). Por otra parte el tiempo necesario para obtener la máxima producción de NPs también depende del desarrollo del cultivo del que se obtiene el sobrenadante de forma que, dejando aparte los tiempos de cultivo cortos en los que los sobrenadantes no producen o producen cantidades muy pequeñas de AgNPs, se pueden considerar dos tipos de cinéticas, uno en las que la máxima producción se alcanza alrededor de las 70-90 h de reacción de síntesis, correspondiente a cultivos en fase exponencial de crecimiento de las microalgas y a la que hemos llamado cinética temprana, y otra en la que la cinética tiene su máximo a tiempos de síntesis mayores, en torno a 10 días, y que corresponden a tiempos de cultivo más avanzados (fase exponencial tardía y estacionaria) y a la que hemos llamado cinética tardía. Este comportamiento es similar para las distintas microalgas cultivadas tanto a pH 4 como a pH 7, aunque se observan diferencias entre las distintas algas en cuanto a los rangos de DO<sub>680</sub> en las que estos dos tipos de cinética de síntesis de NPs se produce. Así por ejemplo para los cultivos de *Coelastrella sp.* los dos tipos de cinética se retrasan con respecto a las de las otras dos algas, requiriéndose mayor tiempo de cultivo tanto para el inicio de la producción de NPs como para alcanzar cada uno de los tipos de cinética. Se ha observado que el muestreo de los cultivos de *Coelastrella sp.* afecta notablemente el crecimiento posterior del alga, tardándose más tiempo en su recuperación a niveles de crecimiento equivalentes a los de los demás cultivos. La  $\lambda_{\max}$  de las AgNPs obtenidas depende del alga y del desarrollo del cultivo empleado en la síntesis de éstas.

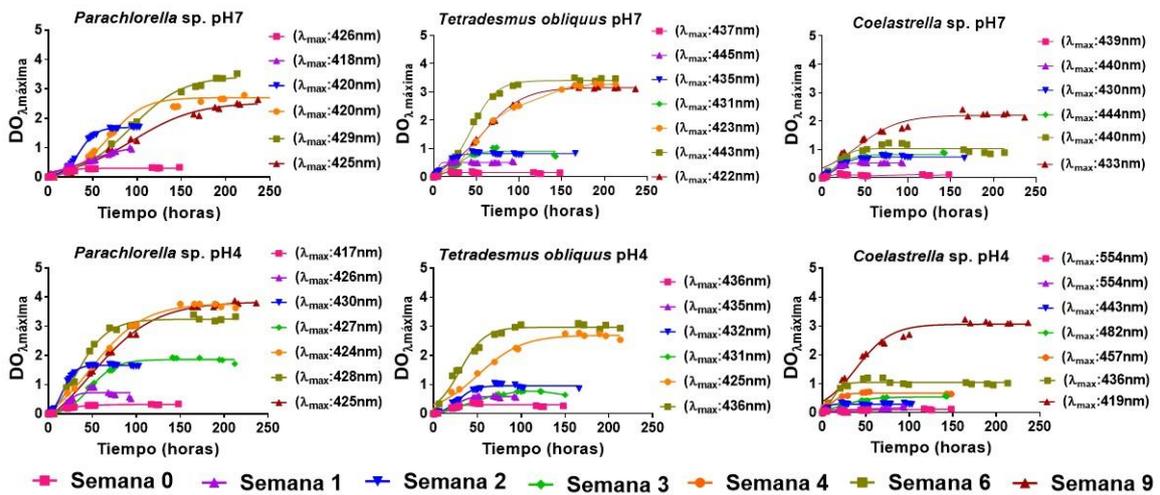


Figura 6: Cinéticas de síntesis de AgNPs con sobrenadantes de microalgas a distintas semanas.

Para la caracterización de la actividad antibacteriana de las AgNPs se procedió a tomar el volumen necesario de sobrenadante en tiempos representativos de los cultivos de *Parachlorella* sp. correspondientes a cinéticas tempranas y tardías y se procedió a la producción de AgNPs. Durante la síntesis se tomaron muestras con el fin de asegurar que las reacciones seguían las cinéticas previstas, observándose que efectivamente así era (Fig. 7).

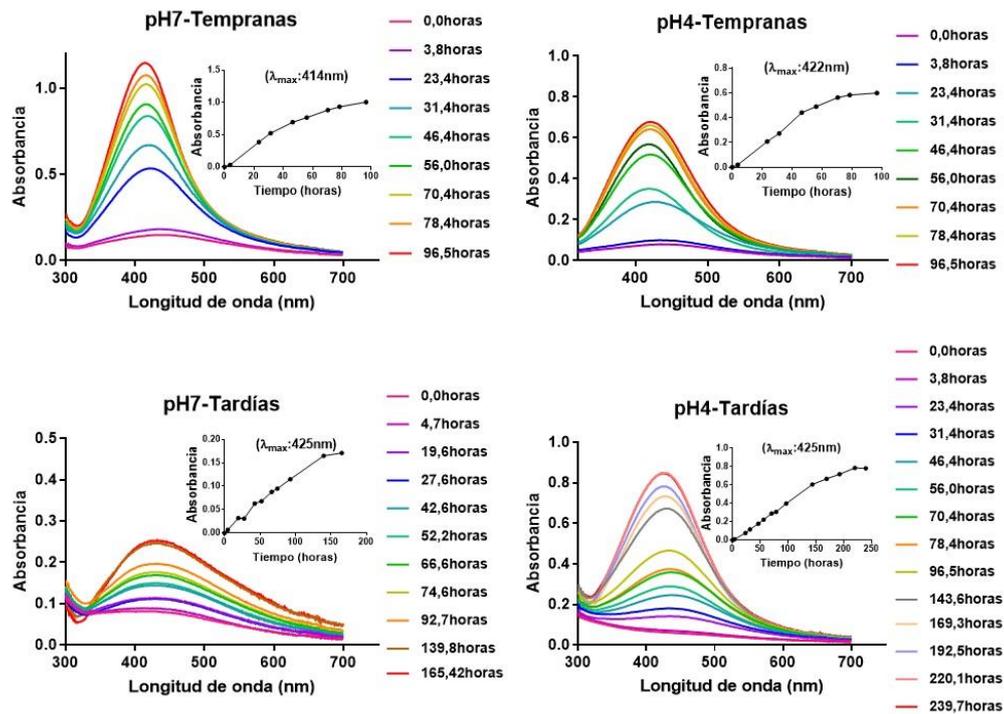


Figura 7: Espectros y cinéticas de síntesis preparativa de AgNPs con sobrenadantes de *Parachlorella* sp. Los insertos corresponden a la cinética de síntesis a la  $\lambda_{max}$  de cada tipo de AgNP.

## 4.2 Caracterización fisico-química de las preparaciones de AgNPs

### 4.2.1 Cristalinidad de las AgNPs por Difracción de Rayos X (XRD)

Los difractogramas obtenidos de las cuatro preparaciones de AgNPs a utilizar en los ensayos de actividad antibacteriana (Fig. 8), muestran un patrón similar con ángulos  $2\theta$  (en grados) en torno a 38.22, 44.01, 64.58, 77.53 y 81.33, correspondiendo a los planos (111), (200), (220), (311), y (222) respectivamente de una estructura cristalina cúbica centrada en las caras de  $\text{Ag}^0$  (JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) ficha 04-0783).

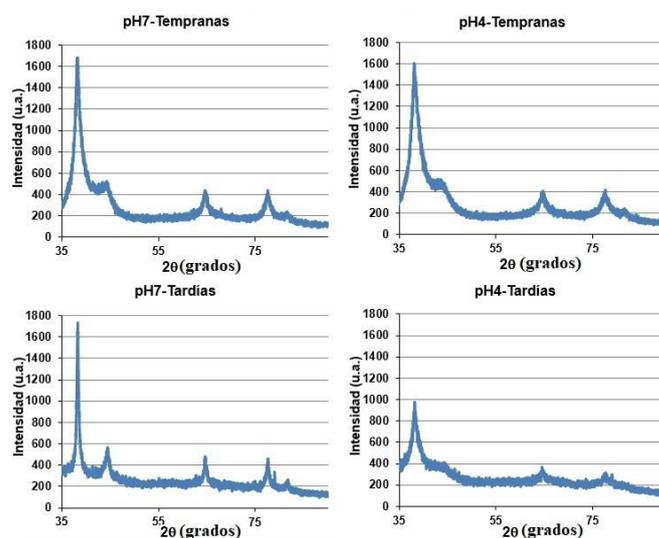
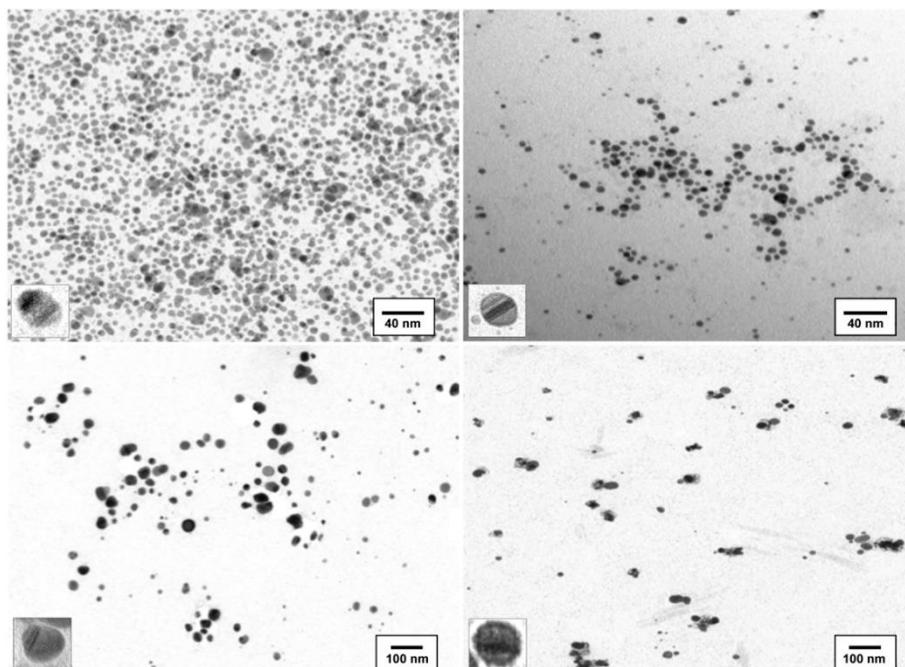


Figura 8: XRD de las AgNPs obtenidas a partir de cultivos de *Parachlorella* sp.

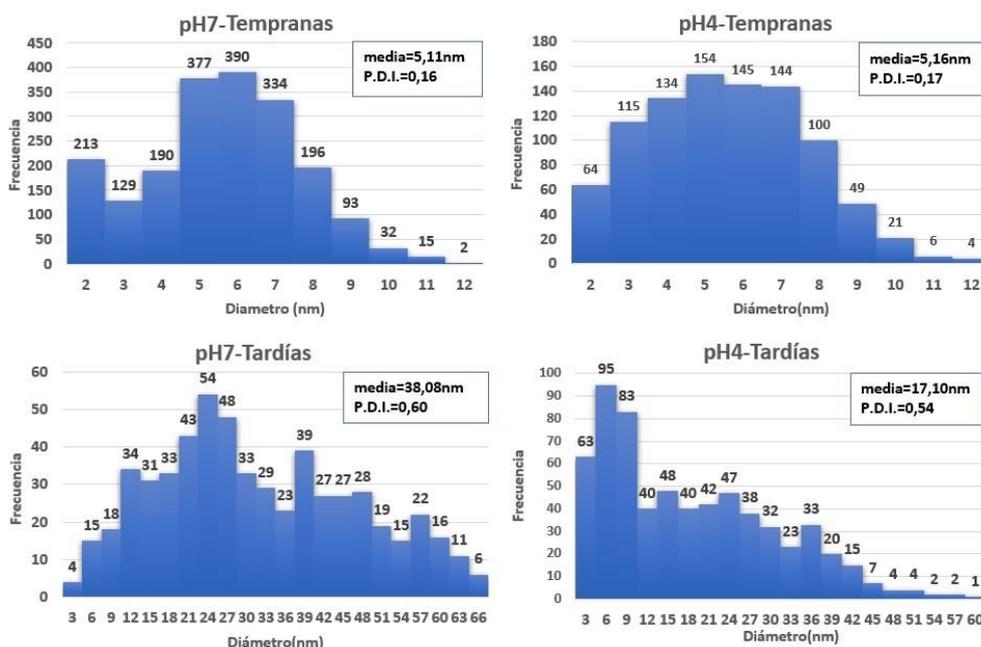
### 4.2.2 Morfología y tamaños de las AgNPs mediante TEM

Las imágenes de TEM (Fig. 10), permitieron determinar la presencia de partículas electrodensas en las preparaciones de AgNPs con estructuras aparentemente esféricas en la mayoría de los casos. En algunas AgNPs se observan estructuras internas más electrodensas que se deben a la estructura cristalina de las mismas observable según la posición y tamaño de éstas.



**Figura 10: Micrografías electrónicas representativas de las AgNPs.** AgNPs de pH 7 tempranas (superior izdo.), pH 7 tardías (inferior izdo.), pH 4 tempranas (superior dcho.) y pH 4 tardías (inferior izdo.). Los insertos en cada panel muestran zonas de distinta densidad observados a mayor aumento y debidos a la cristalinidad de las AgNPs.

Mediante el uso del software Image J se ha determinado el área de las partículas lo que ha permitido calcular su diámetro medio en la preparación. La distribución de tamaños observada se ha representado en forma de histogramas (Fig. 11). En general los histogramas realizados a partir de las imágenes muestran la formación de AgNPs de pequeño tamaño, en torno a 5 nm en los cultivos tempranos tanto de pH 4 como de pH 7. En ambos casos los valores de PDI son relativamente bajos ( $<0,4$ ) lo cual indican un valor moderadamente bajo de polidispersión. Los cultivos tardíos muestran AgNPs de mayor diámetro que los de tempranos, siendo esto más patente en las de pH 7 que en las de pH 4. Los valores del PDI de las AgNPs tardías son altos ( $>0,4$ ) lo que indican una gran polidispersión de sus diámetros, en particular las de pH 4 presentan una distribución bimodal de los diámetros en torno a 6 nm y a 24 nm.



**Figura 11:** Histograma de la distribución de diámetros de las AgNPs según micrografías de TEM. Se incluye en los insertos de cada gráfica el diámetro medio y PDI. calculados.

#### 4.2.3 Diámetro hidrodinámico y potencial eléctrico de las AgNPs mediante DLS

Los resultados de la DLS (tabla 2), proporcionan datos complementarios en cuanto al diámetro hidrodinámico de las AgNPs producidas, observándose valores medios de éste superiores a los del core obtenidos por TEM ya que incluye la corona. Se observa que los diámetros de AgNPs tempranas de pH 4 presentan valores ligeramente diferentes a los de las de pH 7, 28,7 nm y 36,1 nm respectivamente y en ambos casos menores que con respecto a las correspondientes tardías, las cuales a su vez presentan entre sí, valores muy parecidos (45,3 nm y 47,4 nm respectivamente).

Con respecto a los potenciales, se observan valores muy similares entre AgNPs tempranas y tardías del mismo pH, alrededor de los -17 mV para las de pH 7, con una diferencia apreciable con respecto a las de pH 4, igualmente muy similares entre si las tempranas y tardías (alrededor de -9 mV y -8 mV, respectivamente) (tabla 2).

AgNPs	Diámetro (nm)	Potencial (mV)
pH 7 tempranas	36,1	-17,8
pH 7 tardías	47,4	-17,0
pH 4 tempranas	28,7	-9,0
pH 4 tardías	45,3	-7,7

**Tabla 2.** Diámetros y potenciales medios de las AgNPs. medidos mediante DLS.

#### 4.2.4 Componentes asociados a la corona de las AgNPs mediante FTIR

En los resultados correspondientes al FTIR (Anexo I) se observa poca diferencia de componentes entre las AgNPs. En general se detecta la presencia de grupos N-H (alrededor de 3400 cm<sup>-1</sup>) y C=O (1600-1700 cm<sup>-1</sup>), correspondientes a funciones amida, que indicarían la presencia de proteínas.

Las principales diferencias, observables mediante FTIR, entre la composición de las coronas de las AgNPs son, por una parte, un pico asignable a C-O ( $1064\text{ cm}^{-1}$ ), posiblemente procedente de lípidos, que aparece en las AgNPs de pH 7 tardías y no está en las tempranas. Por otra parte, las diferencias observadas entre las tempranas y tardías de pH 4 son mayores, en particular la importante presencia en las AgNPs tempranas en relación a las tardías de grupos  $\text{-CH}_2\text{-}$  y  $\text{-CH}_3$  ( $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ), y de señales de alquil-ésteres ( $1200\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ ) y metilos asociados a grupos carboxilo ( $1500\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ), más intensas que las características de proteínas (N-H alrededor de  $3400\text{ cm}^{-1}$  y C=O en  $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ). Esto podría indicar una mayor presencia de lípidos en la corona de las tempranas que en las tardías. Las diferencias entre las de pH 4 y las de pH 7 se darían principalmente en cuanto a que las de pH 7 tienen principalmente proteínas mientras que las de pH 4 contienen mayor proporción relativa de lípidos, en particular las tempranas en las que podrían ser predominantes.

#### **4.2.5 Composición y concentración de plata en las AgNPs mediante TXRF**

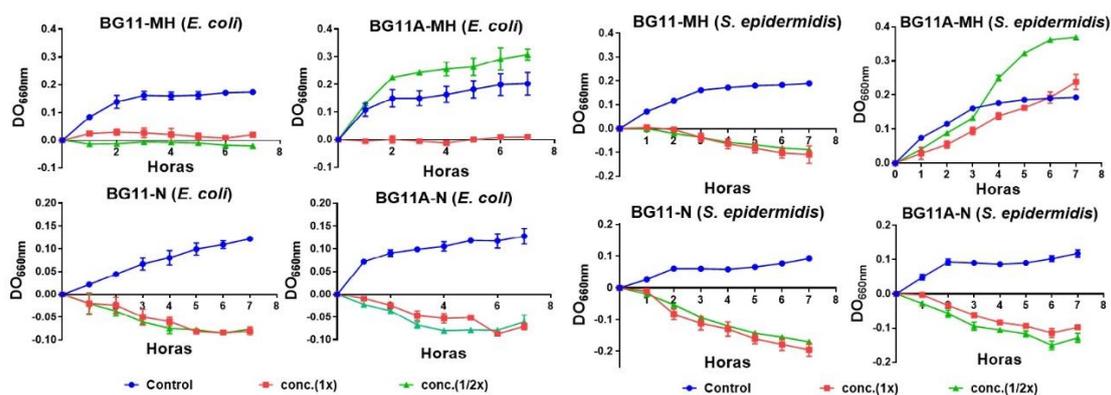
Los análisis de TXRF cualitativos mostraron principalmente 2 picos de intensidad elevada alrededor de los 3 keV, que corresponden a plata (Anexo II). Las concentraciones de las preparaciones de nanopartículas utilizadas en los ensayos de actividad biológica fueron determinados utilizando los correspondientes análisis cuantitativos.

### **4.3. Actividad inhibidora del crecimiento y de la formación de biofilms de bacterias Gram- y Gram+ por las AgNPs**

#### **4.3.1 Inhibición del crecimiento de bacterias Gram- y Gram+ por las AgNPs**

Inicialmente se procedió a realizar los experimentos de actividad antibacteriana de las AgNPs en placas de microtítulo empleando medio Mueller-Hinton (MH), pero no se observaron efectos apreciables sobre el crecimiento de las cepas bacterianas de estudio. Puesto que en estudios previos se había observado que AgNPs obtenidas con sobrenadantes de cultivos en BG11 (con  $\text{Cl}^-$ ), si que mostraban actividad en medio nutritivo (N) (60), se procedió a probar la actividad de AgNPs de pH 4 tempranas producidas en medio BG11A (sin  $\text{Cl}^-$ ) (AgNPs-Cl-) en medios N y MH en paralelo, incluyendo también en el análisis AgNPs producidas en medio BG11 (con  $\text{Cl}^-$ ) (AgNPs-Cl+).

Los resultados mostraron por un lado que las AgNPs-Cl+ en general inhibían más en medio N que en MH. Las AgNPs-Cl- presentaban datos poco congruentes en MH dado que el crecimiento bacteriano en este medio parecía aumentar en presencia de las NPs, sin embargo, en medio N si se observaba un efecto inhibitorio (Fig. 12). Paralelamente se observó que la adición de  $\text{AgNO}_3$  al medio MH producía, al cabo del tiempo, una coloración marrón oscura que presentaba un espectro similar al producido por AgNPs (no mostrado). Todos estos datos nos llevaron a realizar los estudios de actividad antibacteriana en medio N.



**Figura 12: Comparación de las inhibiciones por AgNPs observadas en medios MH y N. Se indica la procedencia de las AgNPs en cuanto al medio de cultivo de las algas (BG11/BG11A) y el medio (MH/N) en que su actividad antibacteriana fue analizada frente a las bacterias indicadas.**

Se determinó en el medio N elegido la inhibición del crecimiento de las distintas AgNPs producidas con cultivos de *Parachlorella* sp. y de los resultados obtenidos se determinaron los valores de concentración inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>) (Tabla 3). En estos análisis se incluyeron dos controles uno de AgNO<sub>3</sub> y otro de estreptomicina (Sm).

Al analizar los valores de CI<sub>50</sub> (Tabla 3), se observó la baja actividad inhibitoria de SM sobre las dos especies de estafilococos empleadas como testigo, no detectándose inhibición de *S. epidermidis* a ninguna de las concentraciones de SM probadas y baja frente a *S. aureus*. La actividad frente a las Gram- fue similar en base a sus CI<sub>50</sub>, para *E. coli* y *K. pneumoniae* y muy alta frente *P. aeruginosa*, que fue inhibida por todas las concentraciones probadas. En el caso de la otra Gram+ empleada, *B. subtilis*, SM mostró una actividad mayor con respecto a las demás Gram + y menor frente a cualquiera de las Gram -. El AgNO<sub>3</sub> mostró los valores de CI<sub>50</sub> más bajos a excepción de para *P. aeruginosa*, contra la que fue menos eficaz que la SM. La máxima actividad fue contra *B. subtilis*, siendo capaz de inhibir también a los estafilococos. No se observaron grandes diferencias entre los CI<sub>50</sub> frente a las distintas bacterias. Los valores de CI<sub>50</sub> de las AgNPs fueron todos mayores que los medidos para Sm y AgNO<sub>3</sub>.

Considerando las AgNPs, se observa que las más activas son las de pH 7 tardías, mostrando un CI<sub>50</sub> para *B. subtilis* ligeramente inferior al de SM, y siendo capaz de inhibir el crecimiento de *S. epidermidis* para el cual Sm no se mostró activa. La mayor actividad de cualquiera de las AgNPs fue frente a *P. aeruginosa* mientras que en casi todos los casos la menor actividad se observó frente a los estafilococos. Con la excepción de las de pH 7 tempranas, la actividad fue mayor frente a *S. epidermidis* que frente a *S. aureus*. Las significativamente menos activas fueron las de pH 7 tempranas con valores de CI<sub>50</sub> notablemente superiores a los de las correspondientes tardías. Para las AgNPs de los dos pHs las tardías fueron generalmente más activas que las correspondientes tempranas si bien las diferencias fueron menores entre las de pH 4. Las tempranas de pH 4 fueron más activas que las correspondientes de pH 7, mientras que ocurrió al contrario con las tardías. Las bacterias Gram- presentan una mayor sensibilidad a AgNPs especialmente *P. aeruginosa*. Las mayores resistencias a AgNPs las presentan los estafilococos al igual que para Sm. Paralelamente, la cepa de *B. subtilis* presenta una gran sensibilidad para todos los antimicrobianos testados.

Entre las distintas AgNPs las únicas que presentan diferencias significativas generales en la inhibición de los distintos tipos de bacterias, son las correspondientes a pH 7 tempranas, siendo menos eficaces que el resto de las AgNPs. No obstante, las diferencias son menos

notables entre estas y las de pH 4 tempranas que con respecto a las de pH 7 tardías, las cuales presentan los valores más bajos de  $CI_{50}$  y por tanto la mayor actividad inhibitoria.

Bacterias	Sm	AgNO <sub>3</sub>	pH 7 tempranas	pH 4 tempranas	pH 7 tardías	pH 4 tardías
<i>E. coli</i>	1,13	0,78	32,46***/###	15,27**####	5,99***/#	10,34**/#
<i>K. pneumoniae</i>	0,95	1,04	34,64***/##	14,84##	4,68***	8,56
<i>P. aeruginosa</i>	ND (<<<<)	0,79	7,88***/#	3,51#	2,47**	3,83
<i>S. aureus</i>	17,98	0,91	66,48*	33,45	9,31*	17,07
<i>S. epidermidis</i>	ND (>>>>)	0,79	93,32***/####	15,85####	5,43***	12,05
<i>B. subtilis</i>	4,98	0,66	30,86***/####	5,55####	4,11***/#	5,97#

Tabla 3.  $IC_{50}$  de las AgNPs frente a las distintas bacterias testigo. Se incluyen controles de AgNO<sub>3</sub> y Sm. ND (<<<<) inhibición superior al 50% en todas las concentraciones; ND (>>>>) inhibición inferior al 50% en todas las concentraciones. Diferencias estadísticamente significativas indicadas con \* entre pHs y # entre fases de crecimiento de las algas, con P-valor: <0,05 (\*) o (#); <0,01(\*\*) o (##); y <0,001(\*\*\*) o (###).

#### 4.3.2 Actividad inhibitoria de la formación de biofilms de las AgNPs.

Los datos de formación de biofilms bacterianos en los pocillos de las placas de microtítulo se determinaron mediante tinción con cristal violeta (Anexo III) y mostraron una inhibición creciente con la concentración de AgNPs. En algunos casos se observó un mayor crecimiento de biofilms en las muestras con las concentraciones bajas de AgNPs que en los propios controles, sobre todo en las cepas que presentan mayor resistencia a AgNPs. Para la comparación de estos datos se determinaron las concentraciones que inhiben un 50% la formación de biofilms ( $CI_{fb50}$ ) con respecto a los controles sin inhibidores (Tabla 4). Los valores obtenidos son aproximadamente proporcionales al crecimiento total de las bacterias, aunque tienden a ser ligeramente más elevados, incluidos los correspondientes a AgNO<sub>3</sub>.

En general se observaron mayores inhibiciones de la formación de biofilms por AgNPs tardías que por tempranas sobre todo en el caso de las de pH 7. Sin embargo, las diferencias parecen ser también muy dependientes de la bacteria testigo. En algunos casos las diferencias son muy notables, por ejemplo, frente a *S. epidermidis* y frente a *E. coli* entre las de pH 7 tempranas y tardías.

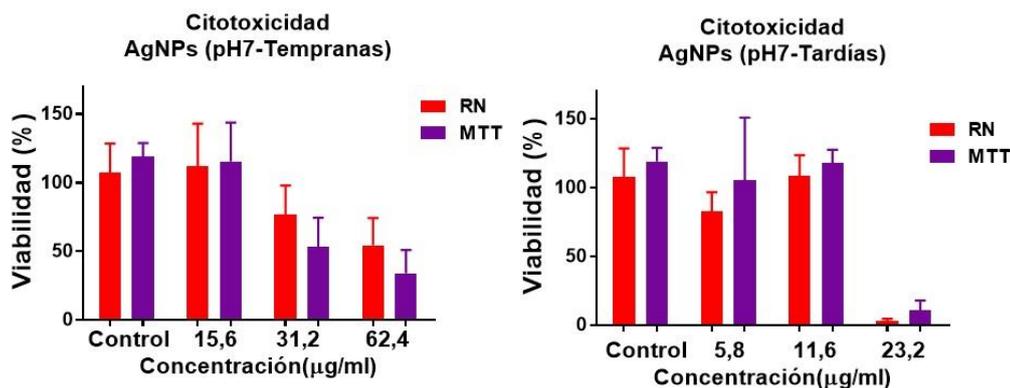
Bacterias	AgNO <sub>3</sub>	pH 7 tempranas	pH 4 tempranas	pH 7 tardías	pH 4 tardías
<i>E. coli</i>	1,57	22,20*	16,30	3,09*	12,50
<i>K. pneumoniae</i>	ND	57,07#	6,13#	49,53#	6,41#
<i>P. aeruginosa</i>	1,45	9,42	4,94	4,43	4,00
<i>S. aureus</i>	1,83	ND	30,00	6,27	13,52
<i>S. epidermidis</i>	1,39	113,80***/####	27,94####	5,67***	15,73
<i>B. subtilis</i>	2,92	1,00	12,34	3,06	5,01

Tabla 4:  $IC_{fb50}$  de las AgNPs frente a las distintas bacterias testigo. Se incluyen controles de AgNO<sub>3</sub> ND no determinado. Diferencias estadísticamente significativas indicadas con \* entre pHs y # entre fases de crecimiento de las algas con P-valor: <0,05 (\*) o (#); <0,01(\*\*) o (##); y <0,001(\*\*\*) o (###).

#### 4.4 Actividad citotóxica de las AgNPs de pH 7

Los resultados preliminares de citotoxicidad en células HaCat (Fig. 13), muestran una reducción de la viabilidad celular en las células tratadas con AgNPs pH 7 tempranas a concentraciones de 31,2  $\mu$ g/ml (77% RN y 53,5 % MTT) y de 62,4  $\mu$ g/ml (54 % RN y 34 % MTT). Por otro lado, las AgNPs pH 7 tardías reducen la viabilidad celular a un 3 % en RN y a

10,6 % en MTT a concentraciones de 23,2  $\mu\text{g/ml}$ , no apreciándose efectos a concentraciones inferiores.



**Figura 13: Viabilidad de células HaCat en presencia de AgNPs de pH 7.** Se representan la viabilidad de las células en distintas concentraciones crecientes de las NPs, en rojo se representa el ensayo de rojo neutro (RN) y en morado de MTT.

## 5. DISCUSIÓN

Puesto que uno de los objetivos era determinar si es posible producir AgNPs con cultivos de estas algas en ausencia de  $\text{Cl}^-$ , e impedir de esta forma la producción de AgNPs mixtas con AgCl observada anteriormente (60), era imprescindible utilizar un medio de cultivo que no lo contuviera. Se diseñó y utilizó así un medio derivado del clásico medio BG11 utilizado en el aislamiento y mantenimiento de estas algas. El medio se denominó BG11A y en él fueron sustituidos todos los cloruros por sales de los mismos cationes, pero utilizando aniones como nitrato o sulfato.

El crecimiento de las algas en medio BG11A a pH 7 y pH 4, fue más lento que lo descrito para el medio BG11, si bien el nivel de crecimiento fue aceptable con valores de  $\text{DO}_{680}$  máximos entre 1.5 y 2. No se han observado diferencias significativas entre los cultivos a uno u otro pH, presentando los cultivos duplicados de cada alga, y en cada condición, curvas de crecimiento similares. Alguna mayor diferencia en el crecimiento de los duplicados se observó para el caso de los cultivos a pH 7 de *Coelastrella*. Estas diferencias no fueron importantes y pueden deberse a que esta microalga pueda ver afectado su crecimiento por el propio proceso de muestreo en mayor medida que las otras. Aunque todas las algas utilizadas tienden a depositarse en el fondo de los frascos de cultivo, en el caso de *Coelastrella* sp. la suspensión de las células en el medio de cultivo antes de la toma de muestra ocasiona una cierta ralentización posterior del crecimiento mayor que en los otros casos. En cualquier caso, estos resultados muestran que es posible cultivar estas microalgas de forma eficaz, en un medio carente de  $\text{Cl}^-$ .

Las muestras de los cultivos tomadas aproximadamente cada semana fueron utilizadas para determinar la capacidad de formación de AgNPs de los sobrenadantes correspondientes durante el desarrollo de los cultivos algales. Como se ha indicado en la sección de resultados, se pudo determinar que la formación de NPs era prácticamente nula en las primeras semanas y que posteriormente se observaban dos tipos de cinéticas de formación según el desarrollo de los cultivos: 1º) cultivos con desarrollo relativamente temprano que generaban AgNPs con cinéticas que alcanzaban un máximo de producción entre 3 y 4 días y 2º) cultivos más tardíos cuyos sobrenadantes necesitaban más tiempo para llegar al máximo de producción de AgNPs entre 10

y 12 días. Esta diferenciación era menos clara en el caso de los cultivos de *Coelastrella* sp., necesitándose en este caso valores de  $DO_{680}$  de los cultivos mayores que para las demás microalgas, para poder formar NPs.

Un comportamiento similar se había descrito previamente para cultivos de las mismas microalgas en medio BG11 (60), si bien en este caso el crecimiento de las algas era más rápido como ya se ha indicado, y también las cinéticas de formación de AgNPs eran más rápidas, pero existiendo una diferenciación según el desarrollo de los cultivos con cinéticas tempranas con máxima producción en torno a las 3-5 horas y tardías a los 2-3 días. Esto sugiere, que no solo el crecimiento del cultivo se ha ralentizado al utilizar medio BG11A sino que también la síntesis de AgNPs, indicando que la producción de los componentes químicos presentes en los sobrenadantes no solo se ralentiza durante el cultivo en este medio sino que quizás también su concentración podría ser menor. Una posible explicación sería que la formación de núcleos de cristalización de las NPs sobre precipitados de AgCl, en el caso de las reacciones con sobrenadantes de cultivos en medio con  $Cl^-$ , podría acelerar las cinéticas de formación de AgNPs. Estudios de la composición de los sobrenadantes podrían llevarse a cabo en el futuro, para arrojar luz sobre este comportamiento. Sumado a esto, cuanto más tardaba en estabilizarse la síntesis de AgNPs menor era la  $\lambda_{max}$ , sugiriendo cambios en la distribución de tamaños de las nanopartículas generadas.

Para realizar una caracterización estructural más detallada y determinar la actividad biológica se eligieron las AgNPs producidas por sobrenadantes de *Parachlorella* sp., realizando síntesis preparativas de las AgNPs de cultivos a pH 7 y pH 4, tanto tempranas como tardías. Se comprobó espectrofotométricamente que las cinéticas de las síntesis cumplían con las características definitorias de los dos tipos de AgNPs definidos previamente.

Una vez obtenidas las distintas AgNPs se procedió a su caracterización tanto fisico-química como biológica. Para ello primero se obtuvieron los datos de XRD, los cuales establecieron un patrón de cristalización en estructuras cúbicas centradas en las caras, como se había observado en otros ensayos de producción biológica de AgNPs (29, 41). Paralelamente, los datos de TXRF no muestran la presencia apreciable de picos característicos de AgCl, tal como sería de esperar al utilizar el medio BG11A (sin  $Cl^-$ ), pero si se los dos picos en torno a 3 KeV, característicos de Ag, en todas las muestras analizadas por TXRF. De esta forma se cumple uno de los objetivos del trabajo al demostrar que es posible producir AgNPs sin contaminación con AgCl, a partir de sobrenadantes de los cultivos de *Parachlorella* sp.

Para determinar la morfología, tamaño medio y dispersión de tamaños de las AgNPs se empleó la TEM. Esta técnica permite visualizar el núcleo o "core" de la AgNP, que aparece oscuro al paso de los electrones por la presencia de plata. Se observaron morfologías generalmente circulares, aunque en algunos casos otras morfologías pudieron ser apreciadas en algunas de las AgNPs más grandes. Estos resultados concuerdan con estudios similares de producción de AgNPs en cultivos de microalgas (46). También se pudieron observar en algunas AgNPs que el core no es homogéneo apareciendo zonas más o menos electrodensas debido a la estructura cristalina de los mismos dispuesta en determinadas orientaciones sobre la rejilla, como se ha visto en otros casos (p. ej. 29, 41). Las AgNPs, de cultivos tempranos de ambos pHs presentaban tamaños pequeños, en torno a 5 nm, con valores relativamente pequeños de PDI (0,16-0,17). Estos tamaños son muy similares a los de NPs producidas a partir de sobrenadantes de *Chlorella vulgaris* (44) y más pequeñas que las obtenidas con sobrenadantes con  $Cl^-$  (60) de *Parachlorella* sp. Para las de cultivos tardíos los diámetros de las AgNPs son mayores, aunque con una gran dispersión (PDI=0,63-0,54). En el caso de las AgNPs tardías de pH 4 se detecta

una distribución en torno a diámetros de aproximadamente 6 nm y 24 nm. Las de tamaño pequeño podrían ser similares a las producidas con cultivos tempranos parte de las cuales pueden haber crecido durante un proceso de maduración más largo. En algunos estudios para la producción de AgNPs con tamaños controlados se emplean preparaciones de NPs muy pequeñas, que son tratadas con compuestos químicos a distintas concentraciones para generar AgNPs de tamaños diversos (69, 70). Es posible que en la situación de la síntesis de las NPs de pH 4 tardías se haya producido una situación similar, aunque no todas las NPs pequeñas hayan podido llegar a crecer. Estas diferencias en el tamaño, forma y dispersión de las NPs biológicas producidas en distintas condiciones se ha descrito en estudios previos (41, 71, 72).

Al analizar los resultados de las medidas de los diámetros hidrodinámicos por DLS se observa que éstos son superiores a los determinados por TEM, lo que sugiere la presencia de una corona desarrollada en las AgNPs producidas. Igualmente se observan tamaños mayores en las AgNPs tardías con respecto a las tempranas. Por otro lado, el DLS también ha permitido determinar el potencial eléctrico de las AgNPs producidas. Los potenciales medios, que son todos negativos, son muy similares para las tempranas y tardías del mismo pH, pero bastante diferentes entre las de pH 7 (en torno a -17 mV) y las de pH 4 (en torno a -9 mV). Se suele considerar que la estabilidad de las NPs en suspensión, que permite que no se agreguen, depende del valor del potencial eléctrico de las mismas considerándose que valores elevados ( $\pm 30$  mV) dificultan la agregación y facilitan el mantenimiento en estado coloidal de las NPs (73), si bien esto ha sido considerado para NPs químicas con composiciones bien definidas y comparables, pero no ha sido estudiado para NPs de origen biológico y con estructuras y composiciones posiblemente más complejas.

Una aproximación frecuentemente utilizada para intentar tener un cierto conocimiento de los componentes de la corona es la obtención de espectros de FTIR (p.ej. 74, 75) los cuales muestran distintos tipos de vibraciones de los distintos tipos de enlaces presentes en la muestra asociados a ciertos grupos funcionales (76), en particular, en el caso de AgNPs obtenidas con extractos biológicos o sobrenadantes de cultivos, de aquellos presentes en biomoléculas (77). En los espectros de las AgNPs obtenidas a pH 7 se han observado a  $3400\text{ cm}^{-1}$  y en la región  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ , que son característicos de grupos N-H y C=O respectivamente, los cuales están asociados a proteínas (78). Este dato concuerda con lo observado para otras AgNPs biológicas (29, 44, 53), lo cual sugiere que los componentes más comunes de la corona de las AgNPs obtenidas en este trabajo, podrían ser proteínas, aunque no se puede determinar cuáles son o si son o no las mismas en las distintas NPs. Estudios posteriores con el fin de dilucidar este tema podrían hacerse en el futuro con técnicas complementarias. En el caso de las AgNPs obtenidas a pH 4, parece que las coronas podrían contener sustancias lipídicas en mayor o menor proporción, dependiendo de si son AgNPs tempranas o tardías, al aparecer bandas características de grupos metilo y/o metilenos alquílicos y de alquil-ésteres. Al poder existir distintos tipos de biomoléculas en la corona se produce un solapamiento de señales que puede interferir en la determinación de todos los componentes presentes, ya que algunas señales pueden proceder de distintos tipos de biomoléculas y solaparse en el espectro. Al igual que las características físicoquímicas del core, los componentes de la corona afectan a la funcionalidad de las AgNPs. El estudio de la composición de la corona y de las proteínas que pueden interaccionar con ellos resulta importante a nivel de la actividad antibacteriana y de la toxicidad sobre células del hospedador, pudiendo también afectar a la farmacodinámica y la farmacocinética de las AgNPs (53, 79, 80).

La actividad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas se ha estudiado determinando la inhibición del crecimiento bacteriano en medio líquido, y de la formación de biofilms. La actividad antibacteriana se determinó inicialmente en medios MH y N observándose que en medio MH se producían unos resultados poco claros en cuanto al efecto antibacteriano, por lo que los experimentos posteriores se realizaron en medio N. Estudios de la actividad antibacteriana realizados en medio MH y descritos en la literatura con anterioridad habían detectado una diferencia considerable en la susceptibilidad a  $\text{Ag}^+$  dependiendo del medio empleado, lo que se atribuyó a la posible interacción de los iones  $\text{Ag}^+$  con  $\text{Cl}^-$  y proteínas con grupos tiol del medio (21, 81, 82). Puesto que iones  $\text{Cl}^-$  y proteínas o péptidos podrían estar presentes en ambos medios probados (N y MH), se requerirían estudios más detallados para determinar las causas de los efectos observados. Para el estudio de la actividad antibacteriana de AgNPs en diferentes estudios se han empleado distintos medios alternativos, como el medio Luria-Bertani (LB) (83), medio de soja y triptona (TSB) (84), medio MH (21, 29), y también el medio N empleado en este trabajo, al igual que en trabajos anteriores de nuestro grupo (41, 60), y en otros (44). Los resultados obtenidos por nosotros en este trabajo sugieren que se debería hacer un estudio específico sobre el medio más apropiado para el estudio de la actividad antibacteriana de las AgNPs de forma que además los resultados de distintos estudios pudieran ser comparables.

Las AgNPs producidas en este estudio, presentan una menor eficacia que el  $\text{AgNO}_3$ , que se tomó como control. El  $\text{AgNO}_3$  mostró  $\text{CI}_{50}$  similares para las distintas cepas con valores bajos. Por tanto, las diferencias entre los  $\text{CI}_{50}$  observados entre AgNPs se pueden atribuir o a la propia capacidad inhibitoria de cada tipo de AgNPs o a la diferente sensibilidad de cada bacteria a las mismas, sin que su efecto se pueda atribuir exclusivamente a la plata presente en los ensayos. Las AgNPs producidas por la misma cepa de *Parachlorella* sp. en BG11 en un estudio anterior de nuestro grupo (60) se mostraron más activas que las obtenidas en este trabajo, lo que puede ser debido a diversos factores complejos difíciles de analizar como p.ej. la ausencia de  $\text{AgCl}$  en estas últimas, diferencias en tamaño, etc.

La actividad antibacteriana de las AgNPs o sales de plata puede deberse a diferentes causas y diversos autores han mostrado o sugerido que la unión de las AgNPs a la superficie celular es de gran importancia para su efecto antibacteriano (85, 86, 87, 88), así como que la presencia de porinas facilita la entrada de los iones  $\text{Ag}^+$  (89) y que estos interfieran en la cadena respiratoria, bloqueando la fuerza protón motriz (90), o mediante la producción de ROS como se ha visto en *S. epidermidis* (91). En condiciones anaerobias el efecto antibacteriano de la plata se reduce (92). Todos estos estudios en su conjunto se podrían interpretar como que es posible que el efecto de las AgNPs pueda ser diferente sobre distintos tipos de bacterias según las características estructurales y funcionales de las mismas. Según los resultados de nuestro estudio las cepas de bacterias Gram- tienden a ser más susceptibles a las AgNPs, especialmente *P. aeruginosa*, que las Gram+ utilizadas, lo que concuerda con otros estudios (29, 93, 94). *K. pneumoniae* y *E. coli* no son tan susceptibles a las AgNPs como *P. aeruginosa*, quizás porque estas especies no posean las porinas OmpF/C para la entrada de  $\text{Ag}^+$  según se ha descrito (89). Tampoco se ha descrito ningún mecanismo de resistencia a plata en *P. aeruginosa* (21, 89). Entre las Gram+ utilizadas en este estudio se observan diferencias en susceptibilidad a las AgNPs, con los estafilococos (*S. aureus* y *S. epidermidis*) siendo menos sensibles que *B. subtilis*, lo que pudiera estar relacionado con diferencias estructurales y/o funcionales de estos dos tipos de Gram+, dado que se ha descrito que cepas con distinta estructura de pared presentan distinta sensibilidad a las AgNPs (85).

Las AgNPs que mejor inhiben el crecimiento de bacterias en medio líquido fueron las producidas a partir de sobrenadantes de cultivos más desarrollados (AgNPs tardías). Estas AgNPs tardías presentan los diámetros medios más altos, lo cual no concuerda con la relación tamaño-eficacia antes citada, aunque hay que tener en cuenta que la eficacia de las NPs no solo se debe a sus características de tamaño y forma (39, 40, 41). Por otro lado, las AgNPs tardías producidas a partir del sobrenadante de cultivos de pH 7 son las que presentan mayor actividad, seguidas por las de pH 4 tardías, a pesar de que sus tamaños medios al TEM son de 38 nm y 17 nm respectivamente, si bien la alta dispersión de tamaños observada no permite relacionar adecuadamente tamaños y actividades. Es necesario tener en cuenta que las características de la corona pueden modificar la acción antibacteriana de las AgNPs, afectando la correlación entre tamaño y eficacia inhibidora. Esta funcionalidad de la corona en las NPs biológicas ya fue descrita en otros estudios (50). En nuestro estudio los datos de diámetro hidrodinámico parecen igualarse en el caso de las nanopartículas tardías disminuyendo las diferencias observadas entre los tamaños de los correspondientes core de las AgNPs. La relevancia de las diferencias en las características físico-químicas de las distintas AgNPs con respecto a su actividad indican un comportamiento muy complejo de estos materiales que dificulta la extracción de información estructura-actividad.

Los ensayos de inhibición de la formación de biofilms mostraron que las AgNPs se comportaron, en líneas generales, de forma similar a como lo hicieron en la inhibición del crecimiento discutida anteriormente. Se observó una mayor inhibición de los biofilms de las bacterias Gram- con respecto a las Gram+, con un menor efecto sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*. Para una mejor comparación de los resultados se determinaron, cuando fue posible, las CI<sub>fb50</sub>. En general los valores determinados fueron superiores a los obtenidos para la inhibición del crecimiento, posiblemente debido a que por motivos metodológicos los datos de CI<sub>fb</sub> corresponden a 12-14 h de incubación en vez de a las 7 h a las que se determinaron los CI<sub>50</sub>. Además, el proceso de tinción con cristal violeta exige una mayor manipulación de la muestra, lo que provoca que las diferencias entre duplicados aumenten y reduce la significación estadística (66). En algunas de las medidas correspondientes a las concentraciones más bajas de AgNPs se observa de forma consistente un aumento de la producción de biofilm con respecto a los controles sin ellas. Aunque esto podría ser debido a errores experimentales, también es posible que la presencia de AgNPs, a concentraciones subinhibitorias del crecimiento, no fuese lo suficientemente elevada como para inhibir el crecimiento, pero sí lo suficiente como para inducir la formación de biofilm en la muestra. Esto se explicaría porque, como se ha sugerido, la formación de biofilms puede ser un mecanismo de defensa frente a medios potencialmente agresivos (11, 13). Este efecto debería estudiarse en el futuro ya que, de poder demostrarse, podría suponer la existencia de algún mecanismo de quorum sensing afectado por plata que indujera la formación de biofilms en estas condiciones.

Los resultados preliminares de viabilidad celular utilizando queratinocitos humanos en cultivo mostraron que concentraciones de 31,2 µg/ml y 62,4 µg/ml de AgNPs tempranas de pH 7, en el rango de sus valores de IC<sub>50</sub> frente a bacterias, mostraban efectos en la reducción de la viabilidad de los queratinocitos. Este efecto no se apreciaba a la concentración 15,6 µg/ml, lo cual sugiere que la única bacteria en la que podría haber un efecto antibacteriano sin poner en peligro la viabilidad celular eucariota es en *P. aeruginosa*, la cual presenta una gran sensibilidad a las AgNPs producidas. Paralelamente las AgNPs tardías de pH 7 únicamente presentan efectos citotóxicos a la concentración más alta probada, 23,2 µg/ml, la cual es superior a los IC<sub>50</sub> frente a bacterias y, en general, superior a los de formación de biofilms. Otros autores han obtenidos

resultados similares, en cuanto a la baja citotoxicidad de las AgNPs en fibroblastos de embriones de ratón, a concentraciones correspondientes a las concentraciones mínimas inhibitorias frente a bacterias (95). También se ha descrito datos de citotoxicidad en los que AgNPs de menor tamaño presentan efectos citotóxicos y respuesta proinflamatoria a concentraciones más bajas que las de mayor tamaño (96), lo que no está de acuerdo con nuestros resultados, si bien como ya se ha indicado el tamaño no siempre correlaciona con las actividades biológicas de NPs complejas como las obtenidas por métodos biológicos y también la metodología de determinación de la toxicidad y las líneas celulares empleadas podrían influir.

Aunque los datos de citotoxicidad son aún preliminares, abren una posibilidad para investigar la posible utilidad de estas AgNPs contra bacterias a concentraciones que pudieran no mostrar efectos citotóxicos relevantes, solas o como coadyuvantes de la actividad antimicrobiana de otros antibióticos compatibles con las AgNPs, como se ha visto con NPs de oro (97, 98).

## 6. CONCLUSIONES

La ausencia de  $\text{Cl}^-$ , o la presencia de sales alternativas, en el medio BG11 modifica el crecimiento de las microalgas empleadas en este estudio, ralentizando su crecimiento con respecto a un medio BG11 estándar con  $\text{Cl}^-$ . A partir de los sobrenadantes obtenidos de dichos cultivos es posible obtener AgNPs a lo largo de la curva de crecimiento, habiéndose observado que a mayor desarrollo del cultivo mayor era la producción de AgNPs. A lo largo del crecimiento del cultivo se han observado dos tipos de cinéticas de producción, rápida con máximo de producción en tiempos de alrededor de 4 días y más lenta con máximo a alrededor de los 10 días, correspondiendo a fases tempranas, 2 semanas, y tardías, 9 semanas, de desarrollo de los cultivos.

Las AgNPs producidas por sobrenadantes de cultivos de *Parachlorella* sp. presentan distintas características fisico-químicas dependiendo del pH del medio de cultivo y de la fase de crecimiento del alga. Los core de las AgNPs, que están compuestos básicamente por plata metálica cristalizada en forma cúbica centrada en las caras, son de pequeño tamaño, con diámetros en torno a 5 nm para las tempranas, y mayores y más dispersos para las tardías. Las coronas de las AgNPs hacen que tengan diámetros hidrodinámicos que varían entre los 28-36 nm de las tempranas a los 45-47 nm de las tardías y están compuestas fundamentalmente por moléculas con grupos N-H y C=O de amidas, que se asignan a proteínas, aunque en las de pH 4 la presencia de lípidos es relevante. El potencial eléctrico de las AgNPs es negativo en todos los casos y es mayor en las de pH 7 (alrededor de -17 mV) y alrededor de la mitad en las de pH 4 (-8 a -9 mV).

Se han determinado los valores de  $\text{IC}_{50}$  de las diferentes AgNPs que presentan distintas actividades antibacterianas, siendo las AgNPs tardías las que presentan mayor actividad inhibitoria del crecimiento y de formación de biofilm, con respecto a las tempranas. Entre las tempranas la única que presenta una actividad significativamente diferente y drásticamente menor a sus homólogas tardías son las de pH 7, mientras que las de pH 4, presentan valores más parecidos entre tempranas y tardías. A nivel general las distintas AgNPs han producido un efecto antibacteriano mayor frente a Gram- que a Gram+, siendo especialmente sensible *P. aeruginosa* y las más resistentes los estafilococos.

En un estudio preliminar de citotoxicidad de las AgNPs de pH 7 sobre queratinocitos humanos, se ha observado para las AgNPs tardías una cierta toxicidad a una concentración

inferior a los IC<sub>50</sub> frente a bacterias. Para las tempranas esto solo se observa para los IC<sub>50</sub> de algunas de las bacterias más sensibles.

Finalmente se deduce que es posible producir AgNPs con actividad antibacteriana en medios sin Cl y que tanto el pH como el tiempo de cultivo de las microalgas en este medio, influyen en las características físico-químicas detectadas. Todos estos factores posiblemente influyan de forma compleja en la actividad antibacteriana y en la citotoxicidad de las AgNPs, producidas, necesiéndose posteriores estudios que intenten diferenciarlos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 74(3), 417-433.
2. Lushniak, B. D. (2014). Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health reports*, 129(4), 314-316.
3. Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*, 2, 145.
4. Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529(7586), 336-343.
5. Ghannad, M. S., & Mohammadi, A. (2012). Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iranian journal of basic medical sciences*, 15(2), 693-701.
6. Kester, J. C., & Fortune, S. M. (2014). Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2), 91-101.
7. Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolfs, P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173.
8. Schroeder, M., Brooks, B. D., & Brooks, A. E. (2017). The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes*, 8(1), 39.
9. Schweizer, H. P. (2012). Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiology*, 7(12), 1389-1399.
10. Vranakis, I., Goniou, I., Psaroulaki, A., Sandalakis, V., Tselentis, Y., Gevaert, K., & Tsiotis, G. (2014). Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *Journal of Proteomics*, 97, 88-99.
11. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
12. Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*, 121, 1-58.
13. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
14. Hawver, L. A., Jung, S.A., & Ng, W.L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology reviews*, 40(5), 738-752.
15. Dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., & Rai, M. (2014). Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(7), 1931-1944.
16. Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874.
17. Obeid, A., Maliha, P., Abdallah, S., Akl, E., Deeb, M., El Moussawi, H., Salem-Sokhn, E., Matar, G., & Daoud, Z. (2018). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in two major Lebanese hospitals: molecular epidemiology and correlation with consumption. *Journal of infection in developing countries*, 12(2S), 16S.
18. Rhodes, K. A., & Schweizer, H. P. (2016). Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug resistance updates*, 28, 82-90.
19. Dunn K, Edwards-Jones V. (2004). The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns*, 30 (Suppl 1): S1-9.
20. Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek, S. N., & Dibo, S. A. (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 33(2), 139-148.

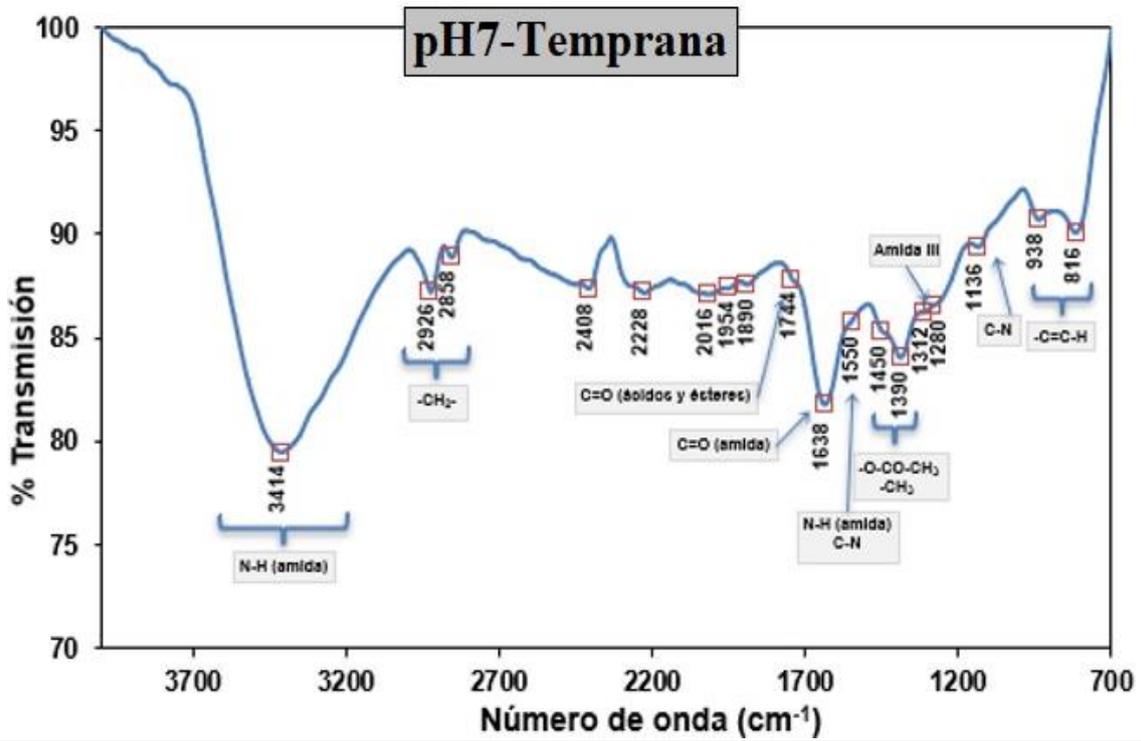
21. Randall, C. P., Oyama, L. B., Bostock, J. M., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2012). The silver cation (Ag<sup>+</sup>): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 131-138.
22. Connolly, M., Fernandez-Cruz, M. L., Quesada-Garcia, A., Alte, L., Segner, H., & Navas, J. M. (2015). Comparative cytotoxicity study of silver nanoparticles (AgNPs) in a variety of rainbow trout cell lines (RTL-W1, RTH-149, RTG-2) and primary hepatocytes. *International journal of environmental research and public health*, 12(5), 5386-5405.
23. LewisOscar, F., Vismaya, S., Arunkumar, M., Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., & Nithya, C. (2016). Algal nanoparticles: synthesis and biotechnological potentials. In *Algae-Organisms for Imminent Biotechnology*. Cap. 7, pp 157-182.
24. Gleiter, H. (2000). Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta materialia*, 48(1), 1-29.
25. Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., & Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the total environment*, 408(5), 999-1006.
26. Schröfel, A., Kratošová, G., Šafařík, I., Šafaříková, M., Raška, I., & Šor, L. M. (2014). Applications of biosynthesized metallic nanoparticles—A review. *Acta biomaterialia*, 10(10), 4023-4042.
27. Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical Oncology*, 7(11), 653-664.
28. Mousavi, B., Tafvizi, F., & Zaker Bostanabad, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, Jan 23, 1-12.
29. Salari, Z., Danafar, F., Dabaghi, S., & Ataei, S. A. (2016). Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(4), 459-464.
30. Soleimani, M., Al Zaabi, A. M., Merheb, M., & Matar, R. (2016). Nanoparticles in Gene Therapy. *International journal of integrative Biology*, 17(1), 7.
31. Peng, S., McMahon, J. M., Schatz, G. C., Gray, S. K., & Sun, Y. (2010). Reversing the size-dependence of surface plasmon resonances. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(33), 14530-14534.
32. Looma, L., & Scarabelli, T. (2013). Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates. *Therapeutic delivery*, 4(9), 1179-1196.
33. Jain, A., Duvvuri, L. S., Farah, S., Beyth, N., Domb, A. J., & Khan, W. (2014). Antimicrobial polymers. *Advanced healthcare materials*, 3(12), 1969-1985.
34. Durán, N., Nakazato, G., & Seabra, A. B. (2016). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6555-6570.
35. Khatami M, Zafarnia N, Heydarpoor Bami M, Sharifi I & Singh H. (2018). Antifungal and antibacterial activity of densely dispersed silver nanospheres with homogeneity size which synthesized using chicory: An in vitro study. *Journal de Mycologie Médicale S1156-5233*(18): 30054-4. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.07.007.
36. Gaikwad, S., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., Falanga, A., Incoronato, N., Russo, L., Galdiero, S., & Galdiero, M. (2013). Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International journal of Nanomedicine*, 8, 4303-4314.
37. Zahir, A. A., Chauhan, I. S., Bagavan, A., Kamaraj, C., Elango, G., Shankar, J., Arjaria, N., Roopan, S. M., Rahuman, A. A. & Singh, N. (2015). Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia prostrata* extract showed shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4782-4799.
38. Poulouse, S., Panda, T., Nair, P. P., & Theodore, T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(2), 2038-2049.
39. Matzke, M., Jurkschat, K., Backhaus, T. (2014). Toxicity of differently sized and coated silver nanoparticles to the bacterium *Pseudomonas putida*: risks for the aquatic environment? *Ecotoxicology* 23, 818-829.
40. Naraginti, S., & Sivakumar, A. (2014). Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalyzed reduction of 4-nitrophenol. *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular Spectroscopy*, 128, 357-362.
41. Javani, S., Marín, I., Amils, R. & Abad, J.P. (2015). Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*. 483, 60-69.

42. Pacioni, N. L., Borsarelli, C. D., Rey, V., & Veglia, A. V. (2015). Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles. In *Silver nanoparticle applications*, pp. 13-46. Springer, Cham.
43. Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 14.
44. Da Silva Ferreira, V., ConzFerreira, M. E., Lima, L. M. T., Frases, S., de Souza, W., & Sant'Anna, C. (2017). Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Enzyme and microbial technology*, 97, 114-121.
45. Leela, A., & Vivekanandan, M. (2008). Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles. *African journal of Biotechnology*, 7(17), 3162-3165.
46. Shankar, P. D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., Arvindnarayan, S., & Kumar, G. (2016). A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme and microbial technology*, 95, 28-44.
47. El-Sheekh, M. M., & El-Kassas, H. Y. (2016). Algal production of nano-silver and gold: Their antimicrobial and cytotoxic activities: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2), 299-310.
48. Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H. & Yang, W. (2010) Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 372(1-3), 172-176.
49. Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M. B., & Mohamad, R. (2013). Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*, 18(5), 5954-5964.
50. Drescher, D., Guttman, P., Büchner, T., Werner, S., Laube, G., Hornemann, A., Tarek, B., Schneider, G., & Kneipp, J. (2013). Specific biomolecule corona is associated with ring-shaped organization of silver nanoparticles in cells. *Nanoscale*, 5(19), 9193-9198.
51. Sahneh, F. D., Scoglio, C., & Riviere, J. (2013). Dynamics of nanoparticle-protein corona complex formation: analytical results from population balance equations. *PLoS one*, 8(5), e64690.
52. Barbero, F., Russo, L., Vitali, M., Piella, J., Salvo, I., Borrajo, M. L., Busquets-Fité, M., Grandori, R., Bastús, N. G., Casals, E., & Puentes, V. (2017). Formation of the protein corona: The interface between nanoparticles and the immune system. *Seminars in Immunology*, 34, 52-60.
53. Walkey CD; Olsen JB; Song F; Liu R; Guo H; Olsen DW; Cohen Y; Emili A; Chan WC. (2014). Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 8(3): 2439-2455.
54. Albanese, A., Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., & Chan, W. C. (2014). Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. *ACS Nano*, 8(6), 5515-5526.
55. Wang, C., Wang, Z., Dong, L. (2018). Translating Current Bioanalytical Techniques for Studying Corona Activity. *Trends in Biotechnology* 36(7): 661-672.
56. Lynch, I., Cedervall, T., Lundqvist, M., Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., & Dawson, K. A. (2007). The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in colloid and interface science*, 134, 167-174.
57. Pourali, P., & Yahyaei, B. (2016). Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *Journal of trace elements in Medicine and Biology*, 34, 22-31.
58. Peiris, M. M. K., Fernando, S. S. N., Jayaweera, P. M., Arachchi, N. D. H., & Guansekara, T. D. C. P. (2018). Comparison of antimicrobial properties of silver nanoparticles synthesized from selected bacteria. *Indian journal of Microbiology*, 58(3), 301-311.
59. Qian, Y., Yu, H., He, D., Yang, H., Wang, W., Wan, X., & Wang, L. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(11), 1613-1619.
60. Vizioli, C. (2017). Diversidad bacteriana asociada a la zona intermareal del estuario del río Tinto. Aislamiento y propiedades biotecnológicas de aislados microalgales ácido-tolerantes. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
61. Kannan, R. R. R., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* PC Silva (Chlorophyceae). *South African journal of Botany*, 86, 1-4.
62. Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789-799.
63. Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A., & Esmaeili, M. A. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*, 162(5), 542-549.

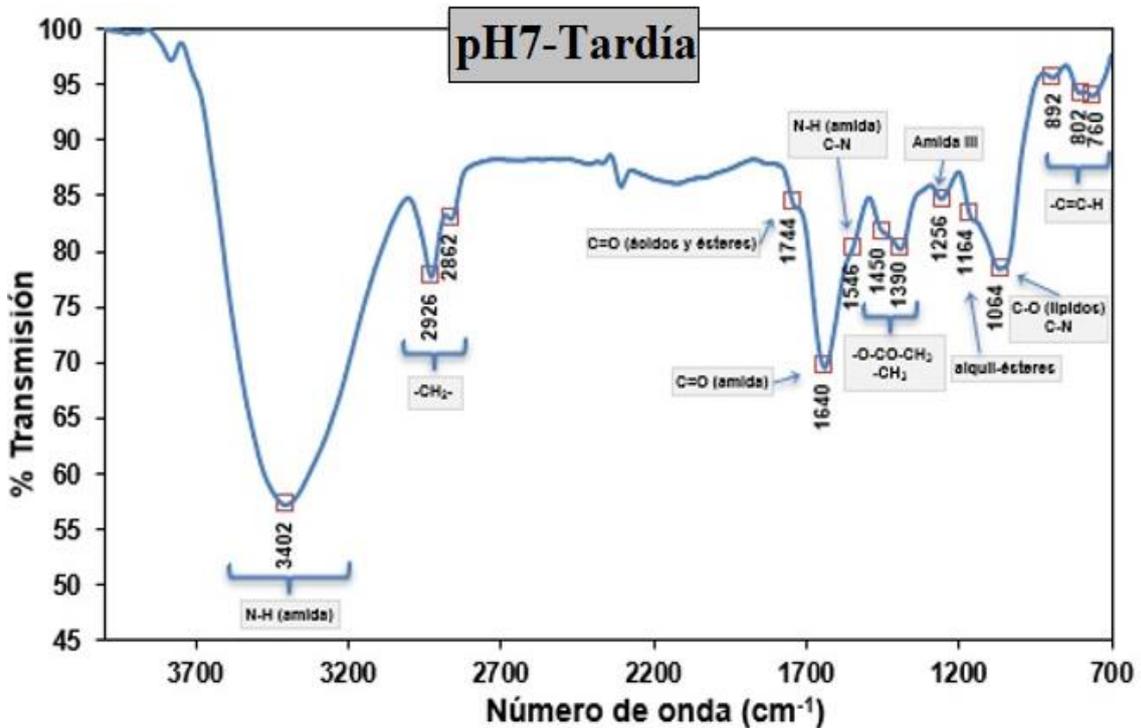
64. Allen, M. M., & Stanier, R. Y., (1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *Journal of general Microbiology*, *51*, 203-209
65. Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods*, *72*(2), 157-165.
66. Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, Bonaventura, M, D., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Kačániová, M. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*, *43*(3), 313-351.
67. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, *114*(8), 785-796.
68. Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, *3*(7), 1125.
69. Bastús, N. G., Merkoçi, F., Piella, J., & Puntès V. (2014). Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic control and catalytic properties. *Chemistry of materials*, *26*(9), 2836-2846.
70. Bai, T., Lu, P., Guo, Z., Lu, X., & Liu, L. (2018). A simple approach towards citrate-stabilized Ag nanoparticles with widely tunable sizes. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* *540*, 143-149.
71. Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, *54*, 1-27.
72. Lu, W., Yao, K., Wang, J., & Yuan, J. (2015). Ionic liquids–water interfacial preparation of triangular Ag nanoplates and their shape-dependent antibacterial activity. *Journal of colloid and interface science*, *437*, 35-41.
73. Shamel, K., Ahmad, M. B., Jazayeri, S. D., Shabanzadeh, P., Sangpour, P., Jahangirian, H., & Gharayebi, Y. (2012). Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chemistry central journal*, *6*: 73.
74. Shaligram, N. S., Bule, M., Bhambure, R., Singhal, R. S., Singh, S. K., Szakacs, G., & Pandey, A. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain. *Process Biochemistry*, *44*(8), 939-943.
75. Elumalai, D., Hemavathi, M., Deepaa, C. V., & Kaleena, P. K. (2017). Evaluation of phytosynthesised silver nanoparticles from leaf extracts of *Leucas aspera* and *Hyptis suaveolens* and their larvicidal activity against malaria, dengue and filariasis vectors. *Parasite Epidemiology and control*, *2*(4), 15-26.
76. Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2<sup>a</sup> Ed. CRC Press. ISBN 9781420069297.
77. Gregoriou, V. G., & Braiman, M. S. eds. (2005). *Vibrational spectroscopy of biological and polymeric materials*. CRC Press. ISBN 9781574445398.
78. Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *37*(2), 271-279.
79. Durán, N., Silveira, C. P., Durán, M., & Martinez, D. S. T. (2015). Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of Nanobiotechnology* *13*, 55.
80. Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., Landfester, K., Schild, H., Jahn, O., Tenzer, S., & Mailänder, V. (2015). Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules*, *16*(4), 1311-1321.
81. Liao, S. Y., Read, D. C., Pugh, W. J., Furr, J. R., & Russell, A. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, *25*(4), 279-283.
82. Gupta, A., Maynes, M., & Silver, S. (1998). Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *64*(12), 5042-5045.
83. Chojniak, J., Biedroń, I., Mendrek, B., & Płaza, G. (2017). The effect of biologically and chemically synthesized silver nanoparticles (AgNPs) on biofilm formation. In *E3S Web of Conferences* Vol. 22, p. 00029. EDP Sciences.
84. Koreňová, J., Lopašovská, J., & Kuchta, T. (2008). Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *Journal of food & nutrition research*, *47*(2), 100-104.

85. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C-Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., & Cho, M. H., (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
86. Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kurvet, I., & Kahru, A. (2013). Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. *Plos One*, 8(5), e64060.
87. Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käiden, A., Titma T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., & Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *Plos one*, 9(7), e102108.
88. Perveen, S., Safdar, N., & Yasmin, A. (2018). Antibacterial evaluation of silver nanoparticles synthesized from lychee peel: individual versus antibiotic conjugated effects. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 118.
89. Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O'Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1037-1046.
90. Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. *Biochemistry*, 44(39), 13214-13223.
91. Gordon, O., Slenters, T. V., Brunetto, P. S., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E., Otto, M., Landmann, M., & Fromm, K. M. (2010). Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 54(10), 4208-4218.
92. Park, H. J., Kim, J. Y., Kim, J., Lee, J. H., Hahn, J. S., Gu, M. B., & Yoon, J. (2009). Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water research*, 43(4), 1027-1032.
93. Ravishankar Rai, V., & Jamuna Bai, A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Méndez-Vila, s A. Ed. Mysore: Formatex..* pp. 197-209.
94. Kubo, A. L., Capjak, I., Vrček, I. V., Bondarenko, O. M., Kurvet, I., Vija, H., Ivask, A., Kasemets, K., & Kahru, A. (2018). Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 170, 401-410.
95. Prucek, R., Tuček, J., Kilianová, M., Panáček, A., Kvítek, L., Filip, J., Kolár, M., Tomanková, K., & Zbořil, R. (2011). The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(21), 4704-4713.
96. Trickler, W. J., Lantz, S. M., Murdock, R. C., Schrand, A. M., Robinson, B. L., Newport, G. D., Schlager, J. J., Oldenburg, S. J., Paule, M. G., SliKker, W. Jr., Hussain, S. M & Ali, S.F. (2010). Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicological Sciences*, 118(1), 160-170.
97. Chen, W. Y., Lin, J. Y., Chen, W. J., Luo, L., Wei-Guang Diau, E., & Chen, Y. C. (2010). Functional gold nanoclusters as antimicrobial agents for antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine*, 5(5), 755-764.
98. Varisco, M., Khanna, N., Brunetto, P. S., & Fromm, K. M. (2014). New antimicrobial and biocompatible implant coating with synergic silver–vancomycin conjugate action. *ChemMedChem*, 9(6), 1221-1230.

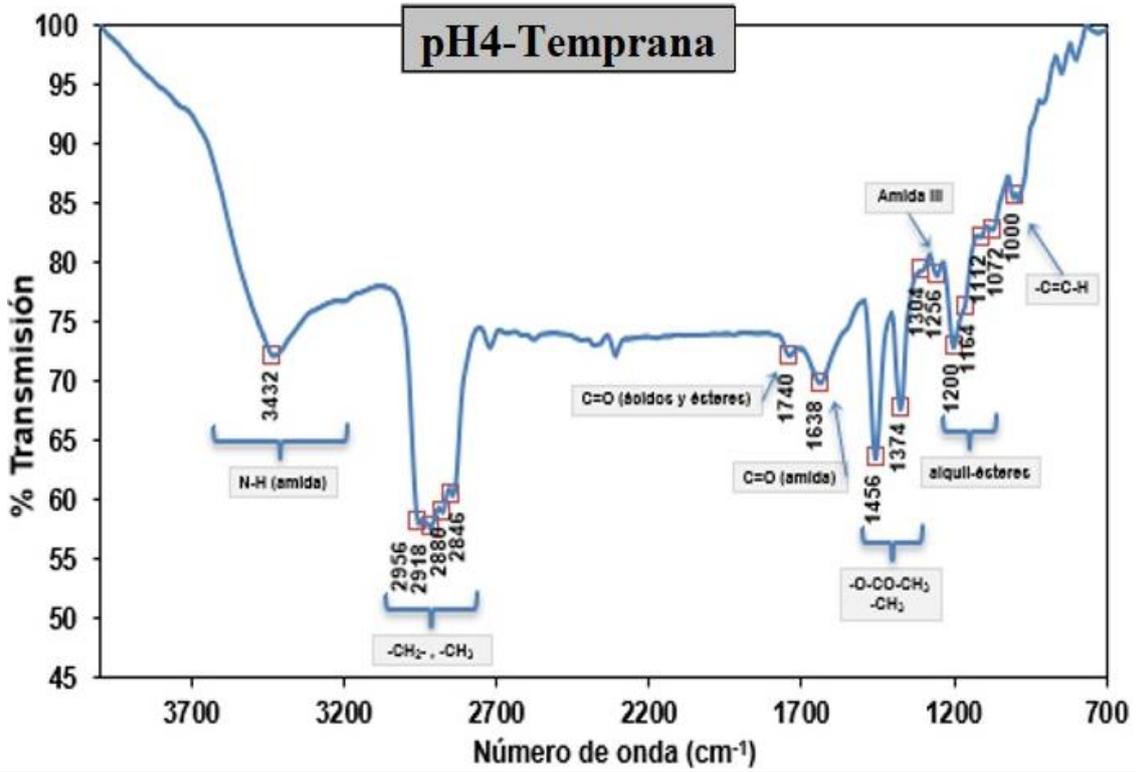
## 8. ANEXOS



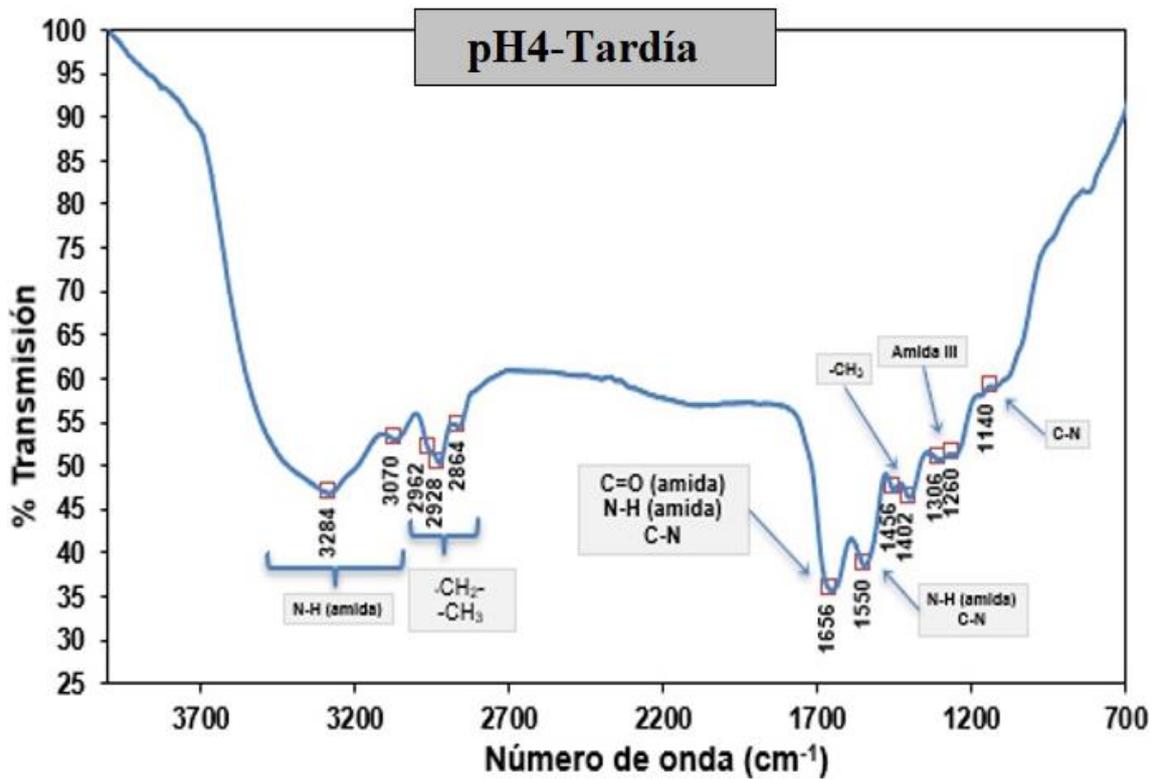
Anexo I: (FTIR): de AgNPs pH 7 tempranas



Anexo I: (FTIR): de AgNPs pH 7 tardías.

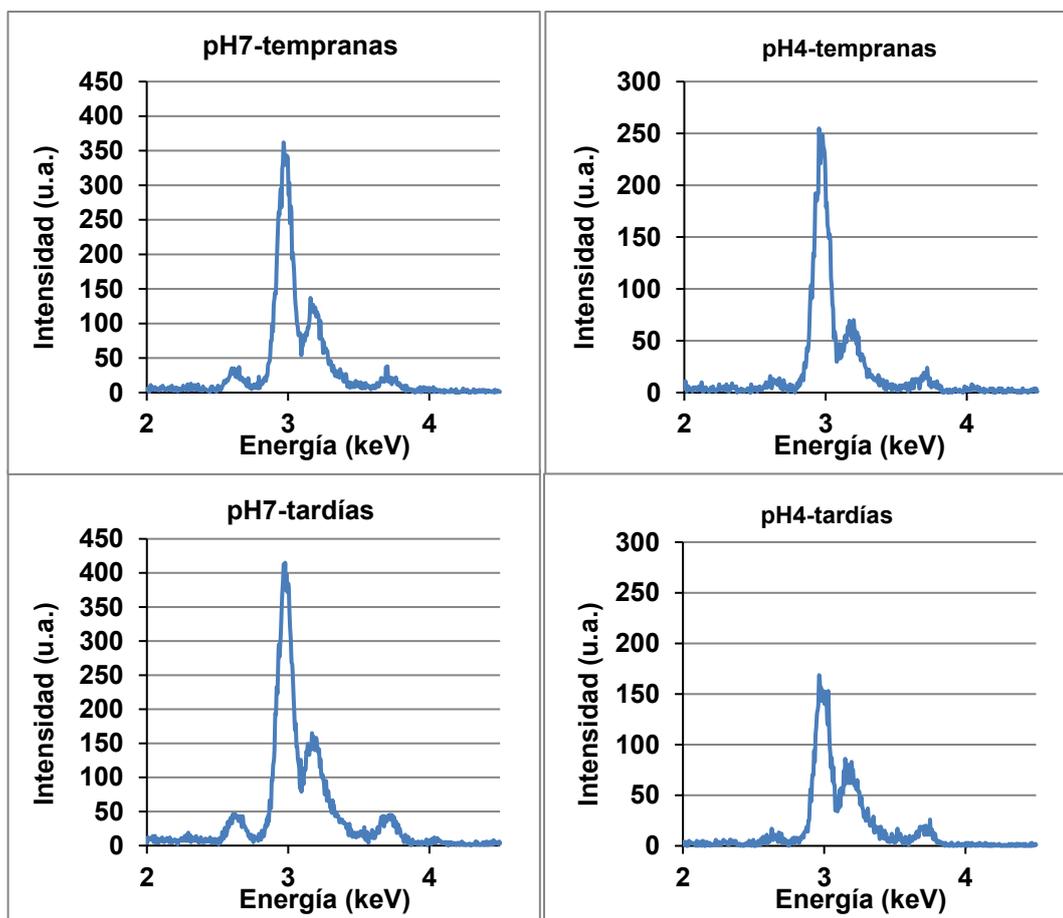


Anexo I: (FTIR): de AgNPs pH 4 temprana



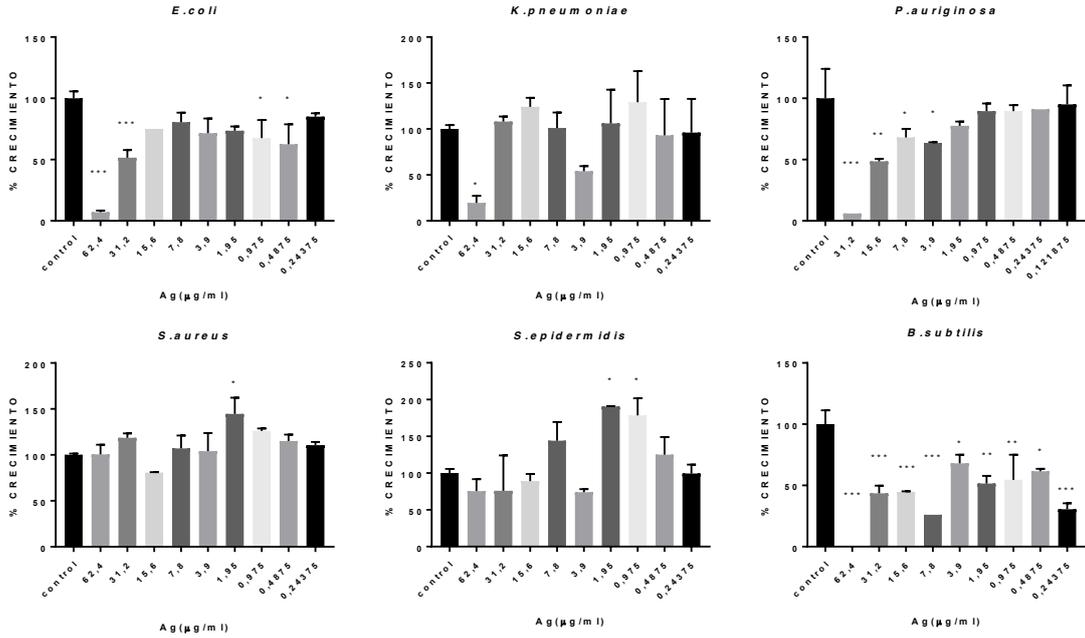
Anexo I: (FTIR): de AgNPs pH 4 tardía

## Anexo II:

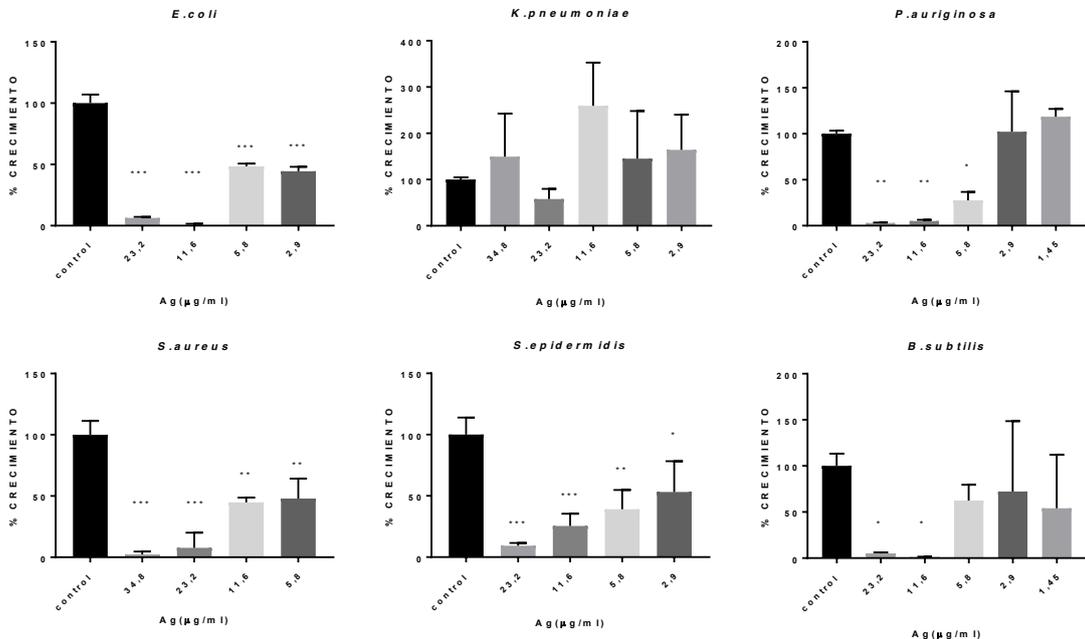


Anexo II: TXRF de AgNPs. Resultados del TXRF cualitativo para las distintas AgNPs producidas desde el sobrenadante de *Parachlorella sp.*

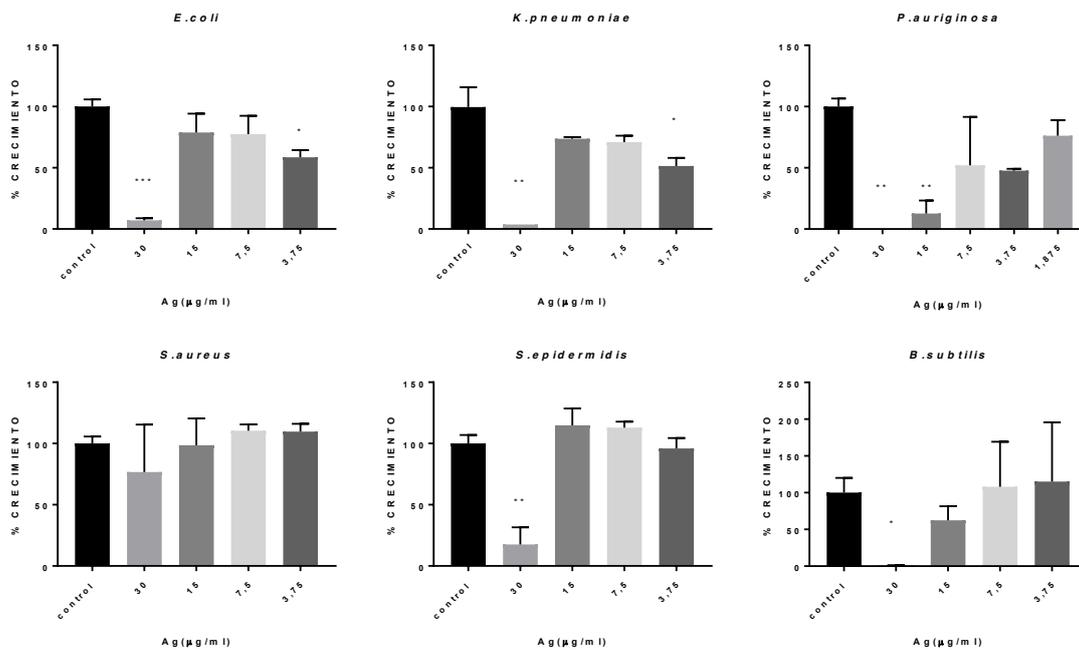
### Anexo III:



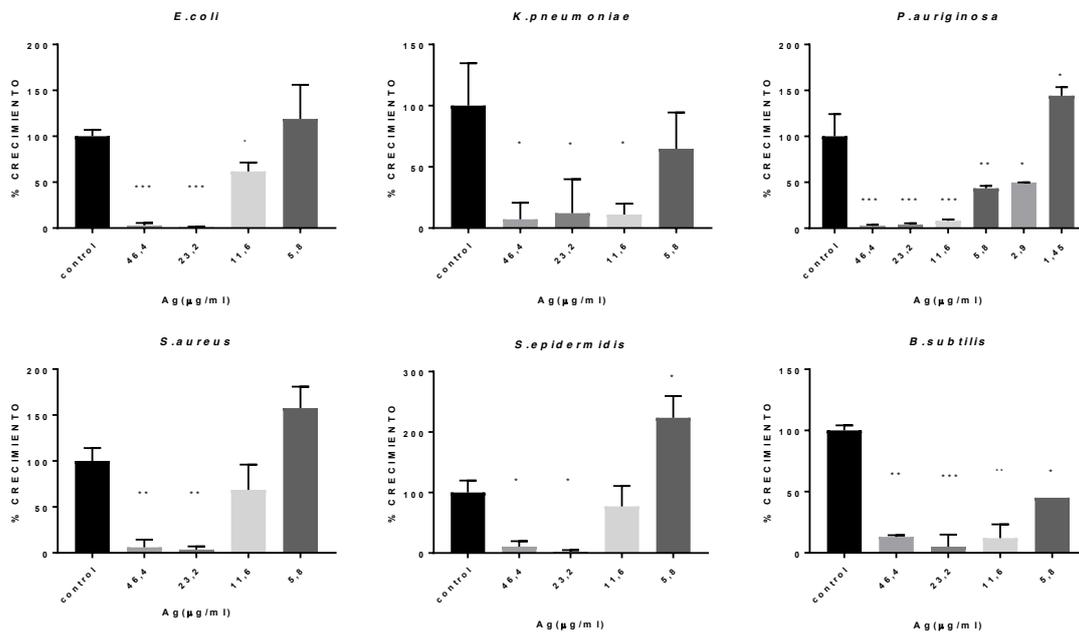
**Anexo III: Inhibición de la formación de biofilms por AgNPs pH7 tempranas.**



**Anexo III: Inhibición de la formación de biofilms por AgNPs pH7 tardías.**



**Anexo III: Inhibición de la formación de biofilms por AgNPs pH4 tempranas.**



**Anexo III: Inhibición de la formación de biofilms por AgNPs pH4 tardías.**

