



**UNIVERSIDAD MICHOACANA SAN
NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**INHIBICIÓN DE COLIFORMES FECALES CON
NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOPORTADAS EN
MATERIALES POROSOS**

por el título de Químico Farmacobióloga presenta:

PQFB LUZ MARÍA RIVERA MOSQUEDA.

ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS ROBERTO GUERRA GONZÁLEZ

CO-ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS RICARDO RANGEL SEGURA.

Morelia, Michoacán, Abril del 2014.



ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	5
2 ANTECEDENTES	7
2.1 Contaminación bacteriana en aguas naturales	7
2.2 Microorganismos indicadores de la calidad del agua	7
2.2.1. Coliformes totales	8
2.2.2. Enterobacter aerogenes	9
2.2.3 Coliformes Fecales	9
2.2.4 Escherichia coli	10
2.3 Métodos de desinfección del agua	12
2.3.1 Desinfección por cloración.	12
2.3.2 Purificación por ozono	12
2.3.3 Desinfección por rayos ultravioleta	13
2.3.4 Desinfección con nanopartículas de plata depositadas en fibras	13
2.4 Interacción bacteria-metal	14
2.4.1 Plata iónica como bactericida	16
2.4.2 Plata como antibiótico	19
2.4.3 Mecanismos de la plata como bactericida	20
2.5 Partículas de Ag soportadas como bactericidas	21
2.5.1 Los soportes tipo zeolita	21
2.5.2 Zeolita clinoptilolita	23
2.6 Técnica de filtración por membrana para detección de coliformes totales y fecales	24
2.6.1. Filtros de membrana	25
2.6.2. Filtros de profundidad	26
3 JUSTIFICACIÓN.	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5 HIPÓTESIS	28
6 METODOLOGÍA Y MATERIALES	29
6.1 Materiales	29
6.1.1 Preparación de la clinoptilolita	30
6.1.2 Clinoptilolita-Ag	30
6.2 Caracterización de los materiales	31



6.2.1 Difracción de rayos-X	31
6.2.2 Dispersión de rayos X a bajos ángulos	31
6.2.3 Microscopia electrónica de transmisión	31
6.3 Materiales biológicos	31
6.3.1 Preparación de caldos nutritivos	31
6.3.2 Preparación de placas de agar	32
6.3.3 Cepas bacterianas	32
6.3.4 Preparación de los inóculos	32
6.4 Evaluación de los materiales como bactericidas	33
6.4.1 Bactericida en medio líquido	33
6.4.2 Bactericida en medio sólido	33
6.5 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales biocidas	35
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1 Materiales	36
7.1.1 ClinoAg-X-Y	36
7.2 Evaluación de materiales como bactericidas	39
7.2.1 Ensayo de concentraciones mínimas Inhibitorias para materiales soporte-Ag como biocida de Coliformes totales	39
7.3 Materiales como inhibidores del crecimiento bacteriano	40
7.3.1 Clinoptilolita-Ag como biocidas de Coliformes totales	42
8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	45
8.1 Conclusiones	45
8.2 Perspectivas	45
9 TERMINOS	47
10 BIBLIOGRAFIA	48
11 GLOSARIO	59



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	5
Figura 2.1	11
Figura 2.2	23
Figura 2.3	24
Figura 2.4	26
Figura 6.1	34
Figura 6.2	35
Figura 7.1	37
Figura 7.2	38
Figura 7.3	41
Figura 7.4	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 6.1	30
Tabla 7.1	40



RESUMEN

La transmisión de patógenos por medio del agua continúa siendo un problema grave, los riesgos epidemiológicos, relacionados con el consumo de agua contaminada por microorganismos virulentos son causales del cólera, de las fiebres tifoideas o de la hepatitis vírica. Por ello, los agentes antimicrobianos son necesarios para inhibir la reproducción de patógenos, amplia variedad de agentes antimicrobianos se han empleado para este fin, cuya eficacia está determinada por varios factores físico-químicos.

Por ello la actividad antimicrobiana de especies de plata, los iones en particular, está bien documentada y se ha utilizado durante mucho tiempo. El área superficial de las partículas metálicas en contacto con las bacterias, está directamente relacionada con su eficiencia bactericida. Por lo tanto, el área superficial de las partículas de Ag será de suma importancia.

Así mismo se conoció que la *clinoptilolita* es una zeolita que puede variar fácilmente sus propiedades físico-químicas y que la plata soportada en zeolitas tipo *clinoptilolita* tiene propiedades bactericidas para los *coliformes fecales*.

La incorporación de la plata a los diferentes soportes se llevo a cabo mediante intercambio catiónico. En una primera serie de experimentos se intercambiaron los cationes de las zeolitas (la mayoría de las veces K^+ , H^+ y Na^+) por cationes Ag^+ presentes en solución acuosa. En esta primera serie se obtuvo una colección de muestras con diferente contenido de Ag^+ . En el caso del sólido mesoporoso, la plata se impregno a partir de sales inorgánicas y evidentemente sobre la superficie también se conto con la presencia de aniones compensadores, aunque no se descarto la posibilidad de preparar un material mesoporoso a base de Si y Al al que pueda incorporarse Ag^+ por intercambio catiónico.

Y tras pruebas y series de experimentos se observo que la zeolita se conservó después de la deposición de plata. A bajas concentraciones, la plata metálica estuvo bien dispersada en la zeolita. Con el aumento de la



cantidad de plata, las partículas pequeñas se aglomeran para formar otras más grandes, que se localizan principalmente en la superficie externa de la zeolita.

Los materiales clinoptilolita-Ag son agentes antibacterianos para *coliformes totales*.

Su eficacia, reflejada por un radio CMB/CMI menor a 1.2, indica que los materiales son bactericidas y no bacteriostáticos.

La CMI de los materiales varía en función de los soportes, la cantidad de plata soportada en el material y la distribución de ésta en la superficie. El tamaño de las partículas es un parámetro crucial en su eficiencia antibacteriana. El tratamiento de aguas industriales, urbanas y de potabilización son algunas de las aplicaciones en las que pueden aplicarse los soportes-Ag para cumplir con las normas mexicanas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-033-SEMARNAT-1997, las cuales aplican en los índices de contaminación orgánica y biológica del agua y con la norma NOM-127-SSA1-1994 relacionada con el consumo de agua.

PALABRAS CLAVES: Clinoptilolita, plata, coliformes.



ABSTRACT

Transmission of pathogens by water remains as a serious problem, epidemiological risks associated with the water intake contaminated by virulent microorganisms are the causes of cholera, typhoid or viral hepatitis. Therefore, the antimicrobial agents are needed to inhibit the replication of pathogens, wide variety of antimicrobial agents have been used for this purpose, which efficiency is determined by various physicochemical factors.

Therefore, the antimicrobial activity of silver species, ions in particular, is well documented and has been used for a long time. The surface area of the metal particles in contact with the bacteria, is directly related to its bactericidal efficiency. Therefore, the surface area of the Ag particles will be quite important.

It also became known that the clinoptilolite is a zeolite that can easily vary their physicochemical properties and silver supported on zeolites clinoptilolite-like has bactericidal properties for fecal coliforms.

The addition of silver to different supports was performed by cationic exchange. In a first series of experiments, the cations of the zeolites (most times K^+ , H^+ and Na^+) were exchanged for Ag^+ cations present in aqueous solution. In this first series it was obtained a collection of samples with different contents of Ag^+ . In the case of mesoporous solid, silver impregnated from inorganic salts and evidently the surface also had the presence of compensating anions, although the possibility of preparing a mesoporous material based on Si and Al that Ag^+ can be incorporated by cation exchange is not discarded.

And after tests and a series of experiments it was observed that zeolite was retained after silver deposition. At low concentrations, the metallic silver was well dispersed in the zeolite. With an increasing in the amount of silver, the small particles agglomerate to form larger regions which are mainly located on the external surface of the zeolite.

Ag-clinoptilolite materials are antibacterial agents for total coliforms.



Its efficacy, as reflected by a CMB/MIC radius less than 1.2 indicates that the materials are bactericidal and not bacteriostatic.

The MIC of materials varies depending on the support, the amount of silver supported on the material and the distribution at the surface. The particle size is a crucial parameter in its antibacterial performance. Treatment for industrial, urban and potable water are some applications where the Ag-supports can be used to satisfy with Mexican Standards like NOM-002-SEMARNAT-1996 and NOM-033-SEMARNAT-1997, which applies in rates of organic and biological water pollution and the standard NOM-127-SSA1-1994 related with water intake.

KEYWORDS: Clinoptilolite, silver, coliforms.



1. INTRODUCCIÓN

La transmisión de patógenos por medio del agua continúa siendo un problema grave. Por ello, los agentes antimicrobianos son necesarios para inhibir la reproducción de patógenos. Una amplia variedad de agentes antimicrobianos se han empleado para este fin, cuya eficacia está determinada por varios factores físico-químicos. Muchos de ellos, sin embargo, son tóxicos, lo que los limita para su aplicación en algunos medios como agua potable, alimentos y productos textiles. En este sentido, la plata es un bactericida no tóxico para el ser humano, que puede reducir significativamente muchas infecciones bacterianas (Yin H., 1999).



Figura 1. Aguas residuales sin tratar.

La actividad antimicrobiana de especies de plata, los iones en particular, está bien documentada y se ha utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento de heridas (Hugo W., 1995; Demling R., 2001). Por ejemplo, las soluciones de AgNO_3 se han utilizado con frecuencia para el tratamiento de quemaduras. En la actualidad, la plata sigue siendo un agente común en el tratamiento de las heridas debido a que en muchos casos la prescripción de antibióticos está limitada (Gemmell C., 2006).



El área superficial de las partículas metálicas en contacto con las bacterias, está directamente relacionada con su eficiencia bactericida. Por lo tanto, el área superficial de las partículas de Ag será de suma importancia. Por ejemplo, la alta superficie específica y alta proporción de átomos de la superficie de las partículas de plata da lugar a una gran actividad bactericida, si se compara con el metal de plata a granel (Chmielewska D., 2006). Además, la plata, cuando se usan en cantidades razonables, no tienen efectos negativos en el cuerpo humano. Por tanto, esta estrategia podría utilizarse para preparar partículas de plata soportadas, capaz de inhibir el crecimiento de patógenos. Los iones de plata soportada, pueden usarse para inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolos directamente en agua o incorporándolos en varios materiales, por ejemplo textiles.



2. ANTECEDENTES

Uno de los mayores problemas asociados con la contaminación del agua es la descarga de organismos patógenos, provenientes de aguas negras sin tratar, en corrientes de aguas naturales. Para evitar las consecuencias del uso del agua contaminada con coliformes se han ideado mecanismos de control temprano para su tratamiento. En la actualidad existen normas que establecen los rangos permisibles de este tipo de contaminación, que buscan asegurar que el agua que se utiliza no sea nociva .

2.1 Contaminación bacteriana en aguas naturales.

Las enfermedades transmitidas por el agua, que siguen siendo uno de los problemas de salud más importantes en el mundo, están asociadas con la contaminación producto de la descarga de compuestos tóxicos y patógenos en ríos y acuíferos. En términos generales, el mayor riesgo microbiológico está asociado con la ingestión de agua contaminada con heces humanas o animales. Las heces son una fuente de organismos patógenos como bacterias, virus y parásitos (protozoos y helmintos). Las enfermedades contagiosas causadas por estos organismos son las más comunes y endémicas.

Los microorganismos patógenos pueden causar en el ser humano enfermedades crónicas como la gastroenteritis severa y eventualmente fatales como la disentería, el cólera y la fiebre tifoidea. La presencia de estos microorganismos en el agua se debe principalmente a sistemas de abastecimiento de agua potable y sanitario inadecuado y/o ineficiente, así como de la falta de conciencia en el uso y preservación de los recursos hídricos.

2.2. Microorganismos indicadores de la calidad del agua

Los métodos indicadores para detectar microorganismos potencialmente patogénicos en aguas naturales se basan en el cultivo y enumeración de



indicadores fecales de bacterias por ejemplo Coliformes totales, Coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Streptococcus fecales* (Ocasio y Lopez, 2004).

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo corto Gramnegativo que existe normalmente como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas.

Este microorganismo se considera el indicador más representativo de las fuentes de patógenos de origen fecal por su habilidad de indicar la contaminación fecal del agua.

La presencia de coliformes totales en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de aguas, sin embargo, aunque se reconoce que la determinación de la concentración de estas bacterias en el agua es un elemento crítico para determinar el riesgo de enfermedades relacionadas al consumo de la misma, no existe una relación simple entre el nivel de coliformes en el agua con la presencia de patógenos en la misma y el riesgo de enfermedades. (Perdomo C.H. et al. 2001)

2.2.1. Coliformes Totales

El grupo coliformes totales son bacterias Gramnegativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37 °C, produciendo ácido y gas (CO₂) en 24 horas, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la B-galactosidasa. Entre ellos se encuentran los diferentes *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

La prueba más relevante utilizada para la identificación del grupo Coliformes totales, es la hidrólisis de la lactosa. El rompimiento de este disacárido es catalizado por la enzima B-D-Galactosidasa. Ambos monosacáridos (la galactosa después es transformada en glucosa por reacciones bioquímicas) posteriormente son metabolizados a través del ciclo glicolítico y ciclo del citrato. Los productos metabólicos de estos ciclos son ácidos y/o CO₂. Para



la determinación de la B- Galactosidasa se utilizan medios cromógenos tales como chromocult. (MANAFI, 1998).

2.2.2. Enterobacter aerogenes

Genero de bacterias Gramnegativas, anaerobias facultativas, de la familia de Enterobacterias, muchas son patógenas y son causa de infecciones oportunistas en huéspedes comprometidos generalmente hospitalizados, causa infección del tracto urinario y de tracto respiratorio. (Loessner M, et al. 1993)

Se encuentra en el tracto digestivo humano, aunque también libremente en el suelo y agua; sus colonias son grandes y mucosas, algunas cepas llegan a formar cápsula, como fuente de carbono pueden utilizar glucosa y lactosa, no forman sulfato de hidrogeno. (Shekhar N.C et al. 2007)

Escherichia coli y Enterobacter aerogenes, son dos bacterias idénticas en muchas formas superficiales, ambas fermentan lactosa produciendo ácido y gas, son bacilos Gramnegativos pero en agar EMB, E.coli produce un subproducto del metabolismo de dicho azúcar que reacciona produciendo un brillo metálico en la luz reflejada y Enterobacter aerogenes no lo hace.

2.2.3 Coliformes Fecales

Los coliformes fecales también denominados coliformes termotolerantes, llamados así porque soportan temperaturas hasta de 45°C, comprenden un grupo muy reducido de microorganismos los cuales son indicadores de calidad, ya que son de origen fecal. En su mayoría están representados por el microorganismo E. coli pero se pueden encontrar, entre otros menos frecuentes, Citrobacter freundii y Klebsiella pneumoniae estos últimos hacen parte de los coliformes termotolerantes, pero su origen se asocia normalmente con la vegetación y solo ocasionalmente aparecen en el intestino. (HAYES; 1993)



Los coliformes fecales integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de los demás microorganismos que hacen parte de este grupo, en que son indol positivo, su rango de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45°C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y en aguas, la presencia de estos indica presencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen dichos microorganismos, presentes en la flora intestinal y de ellos entre un 90% y un 100% son coliformes totales mientras que en aguas residuales y muestras de agua contaminadas este porcentaje disminuye hasta un 59%. (GOMES; 1999).

2.2.4 Escherichia coli

Originalmente llamada Bacterium comune, fue aislada por primera vez en 1985 a partir de heces de niños; son bacilos estrechos de 1,1 a 1,5 μm de diámetro y de 2 a 6 μm de longitud, se encuentran solos o en parejas, Gramnegativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, anoxigénicos facultativos, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo. (LEMINOR, 1994).

Perteneciente a la familia Enterobariaceae, son coliformes capaces de producir indol a partir de triptófano, en 21 +/- 3 horas a 44 +/- 0.5°C. También poseen la enzima B- Galactosidasa, que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo con cianuro de potasio (KCN). (MILLIPORE; 2005).

E. coli es la única especie dentro de las Enterobacterias que presenta la enzima B-D-Glucoronidasa, que degrada el sustrato 4-metilumberiferil- β -D-glucorónico (MUG), formando 4-metilumbeliferona, este producto tiene la propiedad de emitir fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta. (MANAFI, 1998).



E. coli presenta características bioquímicas importantes que permiten la diferenciación con otros coliformes, como ser positivo para la prueba de indol.

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovac's descrito más adelante. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano (HOPKINS, K.L y HILTON, A.C. 2000).

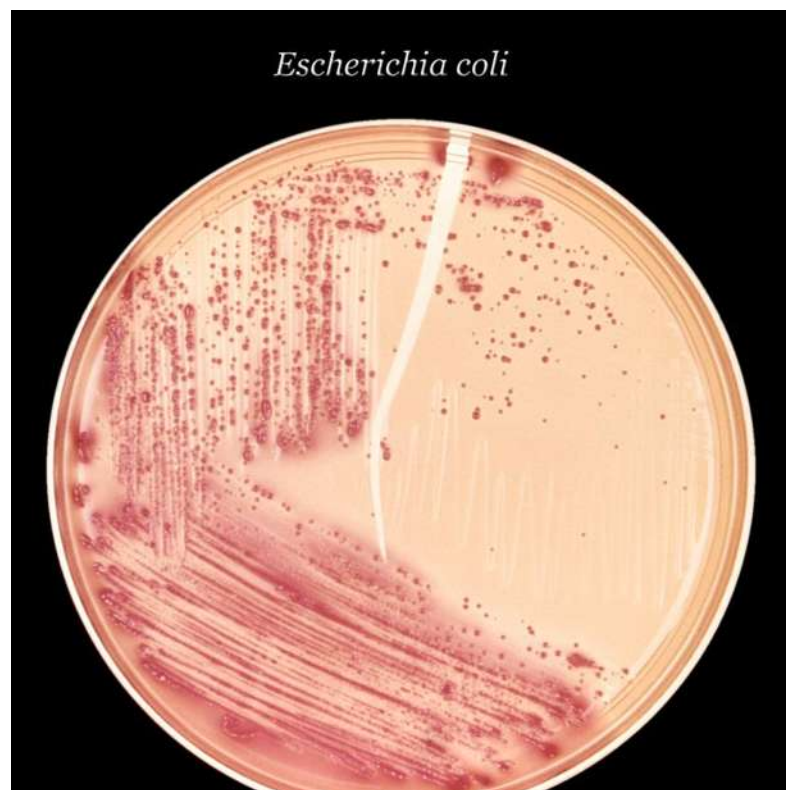


Figura 2.1 vista de *E. coli*.



2.3 Métodos de desinfección del agua

La desinfección es la destrucción de los microorganismos patógenos del agua ya que su presencia en el líquido es perjudicial para la salud. Existen diferentes desinfectantes, que pueden eliminar o desactivar los microorganismos patógenos. Entre estos están el cloro o sustancias que contienen cloro, ozono y rayos UV y plata entre otros.

2.3.1 Desinfección por cloración.

Este proceso de higienización, el más utilizado en la actualidad debido a su bajo costo, emplea como agente desinfectante cloro o compuestos clorados que causan alteraciones físicas, químicas y bioquímicas en la pared celular, de esta forma se destruye la barrera protectora de la célula dejándola indefensa y disminuyendo sus funciones vitales hasta llevarla a la muerte. Una de las principales desventajas del uso de cloro y derivados es que reacciona con mucha materia orgánica y da lugar a trihalometanos (THM) muchos de los cuales se ha demostrado son tóxicos o carcinogénicos. Otro inconveniente es la formación de clorofenoles en aguas que contienen fenoles, lo que daría lugar a malos olores.

2.3.2 Purificación por ozono.

En este método de purificación se emplea como agente inhibidor el oxígeno enriquecido (O_3). Debido a que es la forma más activa del oxígeno es capaz de destruir virus, bacterias, parásitos, priones, hongos, mohos, esporas y muchos otros contaminantes por oxidación en pocos segundos. Una ventaja del ozono es que no deja residuos en la sustancia a desinfectar, ya que al ser muy reactivo, rápidamente se descompone en oxígeno. No obstante la desventaja del ozono es que, dada su inestabilidad, es muy difícil almacenarlo, por lo que se tiene que producir justo en el lugar donde se aplica lo cual resulta un método costoso.



2.3.3 Desinfección por rayos ultravioleta.

En este método se utilizan ondas cortas de radiación ultravioleta que inciden sobre el material genético (ADN) de los microorganismos y los virus, destruyéndolos en corto tiempo, sin producir cambios físicos o químicos notables en el agua tratada, sin embargo tiene como desventaja que la luz ultravioleta no proporciona residuales. Esto quiere decir que después de la desinfección por este sistema hay que aplicar un compuesto químico para garantizar la seguridad microbiológica.

2.3.4 Desinfección con nanopartículas de plata depositadas en fibras.

La plata ha sido conocida desde tiempos inmemoriales como un efectivo agente antimicrobial, los compuestos que la contienen se han usado para prevenir el ataque de microorganismos en catéteres, tejidos humanos, entre otros. Las diferentes propiedades que presentan las nanopartículas de plata son bactericidas, coloración, reactividad y relación área/volumen, las cuales dependen de su forma y tamaño.

Los Bionanocompositos representan un grupo de nanoestructuras que son formados por la combinación de polímeros naturales y de sólidos inorgánicos.

La síntesis in situ de nanopartículas de metales nobles (Ag, Au, Pt, Pb), se lleva a cabo bajo condiciones ambientes; usando los poros de las fibras como nanoreactores. Este método consiste básicamente en la deposición de iones metálicos sobre la matriz, que en este caso corresponde a las fibras de fique, seguido por la reducción de estos iones metálicos, generando las nanopartículas que iniciarán a depositarse sobre los nanoporos de las fibras. El proceso de síntesis de las fibras de fique se realiza mediante la impregnación por reducción de nitrato de plata (AgNO_3). Este se reduce en solución acuosa desionizada de borohidruro de sodio (NaBH_4), para evitar reacciones secundarias con las sales del agua común.



2.4 Interacción bacteria-metal

La plata y otros metales pesados pueden llegar a ser muy efectivos en la inhibición del crecimiento bacteriano y son preferibles a otros agentes antibacterianos, ya que no representan un riesgo alto ni cambian las características físicas del agua, minimizando la formación de subproductos durante el proceso de desinfección (Tortora G., 2007).

Para llevar a cabo sus funciones metabólicas, los microorganismos requieren de la presencia de algunos iones inorgánicos esenciales, como los iones de los metales calcio, magnesio, sodio, potasio y manganeso. Algunos metales presentes en el ambiente son intrínsecamente tóxicos y carecen de actividad biológica (como los metales pesados: plomo, mercurio, cadmio, cobre, plata, etc.), o bien son esenciales pero presentan toxicidad cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas, es el caso de cobre, zinc, cobalto, níquel, etc. aunque los mecanismos de toxicidad de los metales son diversos, los sistemas más comunes involucran una interferencia con el transporte y la función de los iones fisiológicos esenciales, o la integración como las macromoléculas celulares tales como las enzimas y los ácidos nucleicos.

Los iones que interactúan con las células bacterianas pueden clasificarse en tres grupos:

- a) Iones esenciales. Se refiere a aquellos iones que son indispensables para desarrollo bacteriano, como Mg^{2+} , K^{+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , que son considerados como nutrientes; en este grupo están también aquellos que la célula requiere en menores cantidades como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} , que son considerados como micronutrientes o minerales traza.
- b) Iones no esenciales. Son iones que, a pesar de su abundancia natural, no son indispensables para el metabolismo bacteriano; entre ellos están Na^{+} y Cl^{-} . Las bacterias los utilizan en procesos regulatorios o en funciones de las proteínas accesorias de las células (filamentos del citoplasma).
- c) Iones tóxicos. Son iones que, dada su interacción con las macromoléculas celulares, son altamente nocivos para el desarrollo



bacteriano; incluyen los iones: Hg^{2+} , AsO_4^{3-} , AsO_3^{2-} , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , CrO_4^{2-} , TeO_3^{2-} , SbO^+ , BiO^+ y otros (Silver S., 1983). Las células bacterianas han elaborado mecanismos de resistencia a iones tóxicos; estos mecanismos son muy específicos, codificados por genes que se encuentran en plásmidos o en transposones (Silver S. et al., 1989).

Los principales mecanismos mediante los cuales las bacterias interactúan con los metales tóxicos son (Cervantes C., 1992): a) la precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancia excretadas por las bacterias; b) la unión de los cationes metálicos con las cubiertas celulares, por lo general con las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular; c) la acumulación intracelular mediante la unión de los metales a componentes citoplásmicos; d) las reacciones redox que convierten a algunos iones en especies químicas menos tóxicas; y, e) los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones nocivos.

En las bacterias, los genes se hallan agrupados en los cromosomas. La reproducción de las bacterias puede inhibirse por los iones de los metales pesados tóxicos, pero, a la vez, las bacterias pueden desarrollar resistencia al efecto tóxico del metal. Los genes que confieren esta resistencia a los metales pesados generalmente se localizan en los plásmidos, fuera del cromosoma bacteriano. Las estrategias bacterianas más eficientes para resistir a los metales tóxicos, son probablemente las que provocan la expulsión del metal (en su forma de ion) desde el interior de las bacterias hacia el medio externo; de esta forma disminuye la concentración del ion dentro de la célula y, por lo tanto, se reduce su toxicidad (Cervantes C., 1992).

Varios metales pesados, como la plata, el mercurio y el cobre, son germicidas o antisépticos. Cantidades muy pequeñas de metales pesados, en especial de plata y cobre, son capaces de ejercer actividad antimicrobiana, lo que se conoce como acción oligodinámica. Este efecto se produce por la acción de los iones de los metales pesados sobre los microorganismos. Cuando estos iones interaccionan con los grupos



sulfhidrilo existentes en las proteínas, así como en el ADN, se produce su desnaturalización por la inhibición de los procesos respiratorios (Tortora G., 2007).

La plata es tóxica para las bacterias a concentraciones tan bajas como 0.5 μ M (Tuovinen O. et al, 1985).

Los niveles de tolerancia a iones metálicos dependen de la cepa y del estado fisiológico del organismo, de su historia previa a la exposición del metal tóxico y de las condiciones ambientales (Cooper R., 2004). La efectividad de los agentes antimicrobianos depende de la especie de bacteria. Las paredes de las células Grampositivas contienen de 3 a 20 veces más peptidoglucano que una especie Gramnegativa, siendo las paredes Grampositivas capaces de asimilar protones y cuentan con un carbohidrato semejante a la glucosa. Debido a que los peptidoglucanos pueden asimilar protones, las bacterias Grampositivas son generalmente menos sensibles a agentes antimicrobianos que contienen iones de metales pesados que las especies Gramnegativas (Kawahara K., 2000).

2.4.1 Plata iónica como bactericida

La plata se usa actualmente en filtros de carbón activado para purificar el agua o evitar su contaminación. Las sales de plata poseen efectos bactericidas y fungicidas, además son efectivas como agente antiviral. Tienen afinidad por los grupos sulfhidrilos de los sistemas enzimáticos de la pared celular bacteriana, a través de la cual interfieren en la transferencia de energía transmembrana y en el transporte de electrones (Murray R., 2010). Las sales de plata, como el nitrato, se usan como antiséptico y astringente dermatológico; el sulfato de plata, por su parte, se usa en el tratamiento de quemaduras y heridas abiertas (Landeem K., 1989). La plata iónica ha demostrado una actividad antimicrobiana muy alta frente a bacterias Gramnegativas y moderada frente a bacterias Grampositivas. La sulfadiazina de plata, un compuesto polimérico insoluble que libera plata lentamente,



actúa como bactericida a la mayoría de las bacterias Grampositivas, Gramnegativas y levaduras, por lo que se aplica en forma de crema como fungicida y antimicrobiano en quemaduras severas (Sadler P., 1991).

De manera general, las sales de plata tienen como sitio de acción los constituyentes citoplasmáticos y la interacción con grupos sulfhidrilo y amino, mediante mecanismos de coagulación general, ataque a los ácidos nucleicos, y a los ribosomas (Maillard J., 2002).

La plata coloidal (suspensión de partículas de plata metálica) y la plata iónica (disolución de iones de plata) tienen poder bactericida, pero su comportamiento y efectos como inhibidor de bacterias son muy distintos. La plata coloidal inactiva las enzimas de las células bacterianas y hongos que usan oxígeno para su metabolismo, aunque en tiempos muy variables y dependientes de la temperatura. A temperaturas inferiores a 10° C se requieren tiempos muy largos, lo que hace difícil determinar el poder germicida con exactitud. La plata coloidal no elimina a los virus, pero es eficaz para destruir diversas bacterias (E. Coli, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas, Aspergillus, fecales). El efecto de la actividad bactericida de la plata coloidal no se puede generalizar a una amplia variedad de microorganismos y tampoco se puede utilizar una dosis única. Se ha demostrado que el efecto bactericida de la plata coloidal es reducido cuando se le compara con el efecto de la cal o hipoclorito de sodio (Muñoz R., 1995) y que tiende a ser eficiente en la reducción de cargas bacterianas de coliformes (García J., 2004).

Los iones de plata se introducen en el interior de la célula a través de transportadores de metales presentes en su membrana, compitiendo con ellos por los lugares de captación. Actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana y, una vez en el interior de la célula, alteran su sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo y producción de energía y modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y reproducirse.



Los iones de plata eliminan a la mayoría de las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque son menos activos frente a las esporas (Russell A., 2003), tienen afinidad por el ADN tanto bacteriano como eucariótico, donde interactúan preferentemente con las bases nitrogenadas más que con los grupos fosfato (McDonell G., 1999).

En altas concentraciones, los iones Ag^+ reaccionan con los grupos donadores de electrones, e inhiben la mayoría de las reacciones enzimáticas. El intercambio de sodio (Na^+) en la enzima oxidoreductasa ubiquinona ha sido reconocido como uno de los primeros blancos de los iones de plata. La adición de concentraciones micromolares de Ag^+ fuera de la membrana induce un colapso total de una amplia variedad de bacterias (Dibrov P., 2002).

Los iones de plata actúan sobre los microorganismos a pH cercanos a 7, ya sea en el exterior o interior de la célula. En el exterior de la célula, los cationes de plata son atraídos electrostáticamente por la carga negativa de la membrana, en la que causan alteraciones drásticas en la pared celular y en la membrana citoplasmática (Goodman A., 1982). En el interior de la célula, la inactivación se produce por su interacción con las proteínas y en los ácidos nucleicos. La interacción de la plata con grupos sulfhídricos y las enzimas es uno de los orígenes de su capacidad biocida. Al parecer puede romper los enlaces N-H de las aminas purinas y pirimidinas causando la desnaturalización, evitando de este modo la replicación.

La forma soluble de la plata es la más tóxica para las bacterias. Sin embargo, tanto el medio ambiente como los medios de cultivo pueden inducir la formación de complejos con SO_4^{2-} , PO_4^{3-} o Cl^- , disminuyendo así la forma activa que inhibe el crecimiento bacteriano. La plata iónica mata células bacterianas sensibles por efectos en la superficie de la membrana celular, inhibiendo la respiración celular y desacoplando la síntesis de ATP (Belliveau B., 1987).

Se ha reportado que la eficiencia del material bactericida depende del tipo de microorganismo. En estudios con coliformes totales (Gramnegativa) y



Staphylococcus aureus (Grampositiva), se reportó que la elevada eficiencia bactericida de las partículas de plata para coliformes totales se debe a la diferencia de las estructuras de la pared de la célula en microorganismo Gramnegativo y Grampositivo (Sondi I., 2004). Sin embargo, no hay suficiente evidencia para soportar dichas conclusiones debido a que la mayoría de las investigaciones sobre el efecto bactericida de nanopartículas sólo se ha hecho en un número muy limitado de cepas (Sondi I., 2004; Cho K., 2005).

2.4.2 Plata como antibiótico

El incremento en el número de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos ha promovido el interés del uso de plata como agente antibacteriano (Stobie N., 2008).

En los hospitales, uno de los compuestos que se usa con frecuencia es el nitrato de plata en soluciones diluidas, aplicándolo, por ejemplo, en los ojos de recién nacidos para evitar posibles infecciones (Rai M., 2009).

El uso de apósitos es muy útil cuando las bacterias resistentes a los antibióticos representan un problema. Una combinación de plata con sulfadiazida, se utiliza como crema tópica para uso en quemaduras graves (Tortora G., 2007). Los catéteres recubiertos con sulfadiazina de plata, proporcionan una protección contra el crecimiento de una amplia gama de microorganismos Grampositivos y Gramnegativos. Este recubrimiento no parece causar la aparición de resistencia bacteriana (Esteban A., 2005). El uso de manguitos de colágeno impregnados en plata iónica disminuye la carga microbiana en el lugar de aplicación, protegiendo mediante dos vías la actividad antimicrobiana y es una barrera física que dificulta la migración de las bacterias (Torres M., 2002).



2.4.3 Mecanismos de la plata como bactericida

Aunque el mecanismo de la actividad antimicrobiana de la plata no se conoce, se ha propuesto que en disolución acuosa interfiere en el transporte electrónico, en la unión al ADN cromosómico, e interacciona con la membrana celular y con el grupo tiol de ciertas enzimas, inhibiéndolas (Thurman R., 1989). Se asume que la plata tiene efecto bactericida por los cambios morfológicos y estructurales observados en la bacteria después de exponerse a sus compuestos. La plata reacciona con los grupos azufrados de las membranas de las enzimas, provocando que la membrana pierda permeabilidad; la bacteria no es capaz, entonces, de efectuar procesos de respiración y muere (Feng Q., 2000).

La actividad antimicrobiana de la plata depende de los iones de plata, que se unen fuertemente a grupos donadores de electrones en moléculas biológicas que contienen azufre, oxígeno o nitrógeno (Damm C., 2008). La formación de un complejo entre iones plata y proteínas puede interferir en el metabolismo de las células bacterianas y sus funciones, como permeabilidad y respiración (Panáček A., 2006). Ambos efectos dan camino a la destrucción de la célula. Además, los iones de plata pueden interactuar con el ADN de la bacteria, impidiendo la reproducción de la célula (Damm C., 2008).

El mecanismo probable de la plata como bactericida puede ser el siguiente: Los iones de plata (Ag^+) en contacto con las bacterias penetran la membrana celular, destruyendo la proteína de la bacteria suspendiendo la síntesis del ADN bacteriano. Finalmente, cuando la plata iónica interactúa con los grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}$) de la enzima de los microorganismos, se forma un enlace S-Ag (Ecuación 2.5), bloqueando la actividad enzimática e impidiendo su respiración, provocando la muerte del microorganismo (Yan J., 2005). Las bacterias no pueden propagarse más.



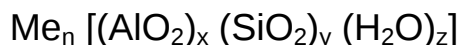
2.5 Partículas de Ag soportadas como bactericidas

El objetivo de utilizar un soporte para dispersar el metal es maximizar la superficie activa. Los soportes, sin embargo, son muchos y muy diferentes con respecto a sus propiedades físico-químicas, que a su vez determinan las propiedades de los metales soportados. Las partículas de plata soportada pueden usarse para inhibir el crecimiento de patógenos, ya sea añadiéndolas directamente en agua o incorporándolas en varios materiales. Teniendo en cuenta estas aplicaciones, realizamos este trabajo con el objetivo de estudiar la eficiencia de plata soportada en zeolitas naturales como un sistema para evitar el desarrollo bacteriano de *coliformes totales*.

Existen antecedentes del uso de zeolitas como soportes de materiales para la desinfección de los efluentes de procesos biológicos aerobios y anaerobios. Se aplican para evitar la propagación de ciertos organismos que producen patologías al hombre. Se han realizado numerosos estudios con zeolitas naturales, demostrándose sus efectos bactericidas sobre aquellos organismos presentes en las aguas residuales y en los efluentes de desechos sólidos. Los metales soportados en zeolitas naturales son elementos que, dependiendo de su naturaleza y su concentración en un medio determinado, pueden ejercer diferentes efectos sobre los microorganismos por ejemplo, en pequeñas cantidades son catalizadores del crecimiento microbiano pero a partir de determinadas concentraciones, son inhibidores microbianos.

2.5.1 Los soportes tipo zeolita

Las zeolitas y los materiales zeolíticos son sólidos cristalinos microporosos que contienen cavidades y canales de dimensiones moleculares (de 3 a 20 Å), que pueden acomodar moléculas en esos poros. Según la definición clásica, las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos cuya celda unitaria tiene por fórmula general (Kesraoui-Ouki, 1994):





siendo n , x , y , z números enteros y Me un catión metálico. No obstante, en general, los materiales zeolíticos pueden contener además de Si y Al otros elementos como V , P y Ti .

Las zeolitas se utilizan a nivel industrial en procesos de adsorción, de separación de gases, de catálisis e intercambio iónico (Bekkum H., 1991). La estructura de las zeolitas se basa en tetraedros covalentes TO_4 en los que el átomo T suele ser Si , Al o Ti . Los tetraedros se unen por los átomos de oxígeno formando una red tridimensional con canales y cavidades lo suficientemente grandes como para albergar cationes y algunas moléculas pequeñas tales como agua o algunos hidrocarburos. La sustitución isomórfica de átomos de silicio por átomos de aluminio genera un exceso de carga negativa que se neutraliza por cationes. Estos cationes ocupan posiciones poco estables y esto le confiere a la zeolita su capacidad de intercambio catiónico. La regla de Löwenstein establece que en una estructura zeolítica no pueden haber uniones $Al-O-Al$, es decir dos tetraedros $[AlO_4]$ vecinos. Por tanto, el valor mínimo de la relación Si/Al es 1. Una relación Si/Al baja implica un elevado número de cationes en los poros de la zeolita que originan fuertes campos electrostáticos locales e interaccionan fuertemente con los adsorbatos más polares. El intercambio iónico en las zeolitas depende de la naturaleza del catión (tipo, tamaño y carga), de la temperatura, de la concentración de especies catiónicas en disolución, del tipo de anión asociado a la disolución catiónica, del disolvente y de las características estructurales de la zeolita.

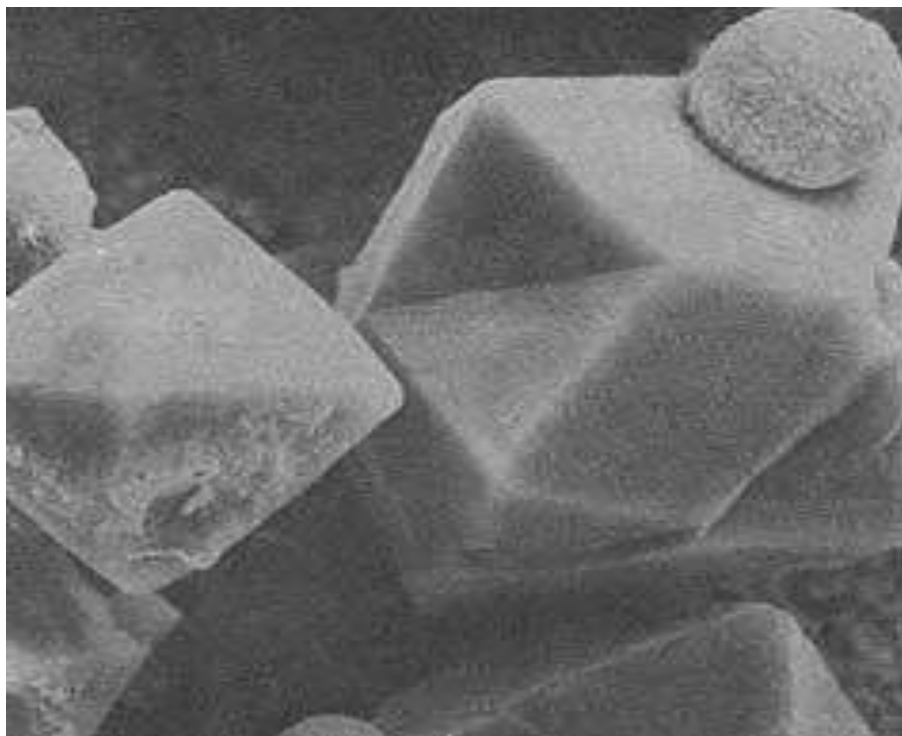


Figura 2.2 .Zeolita faujasita X observada en el microscopio electrónico de barrido. Los cristales son de 50 μ m aproximadamente. Las partículas esféricas son de zeolita P.

2.5.2 Zeolita clinoptilolita

La clinoptilolita es una zeolita presente en la naturaleza que posee un sistema de canales de 8 a 10 miembros de dimensiones $7.5 \times 3.1 \text{ \AA}$ (figura 2.3 a) que se encuentran interconectados entre sí por medio de otro sistema de canales de menor tamaño ($4.6 \times 3.6 \text{ \AA}$) figura 2.3 b.

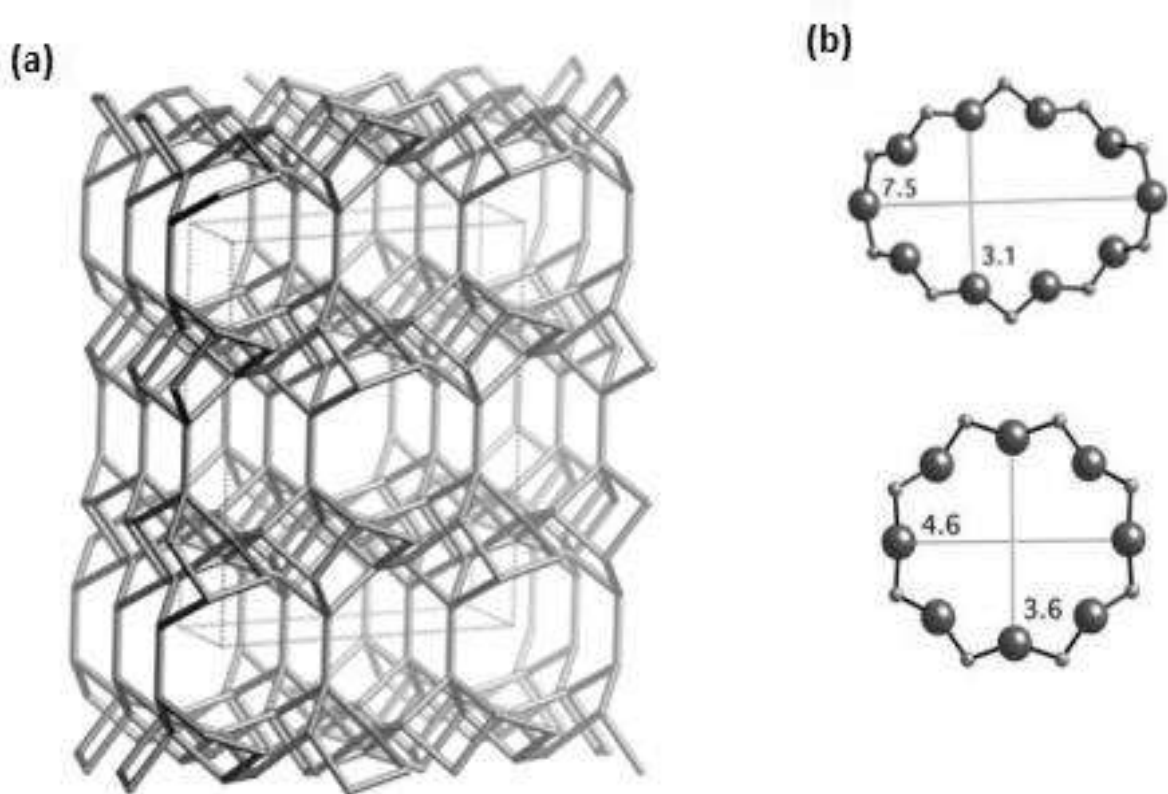


Figura 2.3 (a) Estructura de la zeolita clinoptilolita, (b) anillos de 8 y 10 tetraedros que forman las ventanas de los canales.

2.6. Técnica de filtración por membrana para detección de coliformes totales y fecales.

La técnica de filtración por membrana utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro (0.45 μm); esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los microorganismos de tamaño menor que el específico del poro pasan la membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego esta es llevada a un medio enriquecido, selectivo o diferencial, quien a través de intercambio metabólico y una incubación, evidencian el crecimiento de microorganismos y Unidades Formadoras de Colonia.



Esta técnica es altamente reproducible y proporciona resultados numéricos, es una manera rápida y simple de estimar las poblaciones bacterianas en el agua, y especialmente útil al evaluar grandes volúmenes o al realizar diariamente muchas.

pruebas de Coliformes (HACH, 2000).

2.6.1. Filtros de membrana

Se deben utilizar filtros de membrana con un diámetro de poro que permita una completa retención de las bacterias coliformes. Solo se emplean filtros en los que se haya comprobado, mediante una adecuada prueba de control de calidad y por garantía del fabricante, que permita una retención de las bacterias coliformes totales. (APHA, 1992).

Se debe tener en cuenta, que dichos filtros deben ser libres de químicos susceptibles de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano, que posean una velocidad de filtración satisfactoria, ausencia de influencias significativas sobre el pH del medio (no mas de ± 0.2 unidades) y que no produzcan un aumento en el número de colonias confluentes o expansivas, en comparación con los filtros de membrana de control (APHA, 1992).

Se recomienda utilizar filtros de membrana preesterilizados cuyos fabricantes garanticen que la técnica de esterilización no ha inducido toxicidad ni alterado las propiedades físicas o químicas de la membrana, si estas se esterilizan en el laboratorio se deben someter al autoclave por 10 minutos a 121°C . (APHA, 1992).

El mecanismo de acción es muy simple: retienen todas las partículas que posean un tamaño mayor que los poros, estos poros quedan formados por los espacios que resultan de la súper posición de las fibras de las distintas capas que forman la membrana, así algunas partículas de menor tamaño son retenidas por otros mecanismos como las fuerzas de Van der Waals o por la suma de partículas retenidas previamente (PEARCE, 2007)



2.6.2. Filtros de profundidad

Están elaborados por un material fibroso (papel, asbesto o fibra de vidrio) dispuesto al azar, de manera que dentro de la estructura del filtro se crean vías tortuosas donde pueden quedar retenidos la mayoría de los contaminantes presentes.

Presenta ventajas como la alta capacidad de retención de partículas sobre su superficie y a través de toda su estructura y que permiten filtrar grandes volúmenes. Presenta desventajas en cuanto a que no presentan un tamaño de poro uniforme y existe la liberación, hacia el material filtrado, de partículas y microorganismos que hayan crecido dentro del filtro.

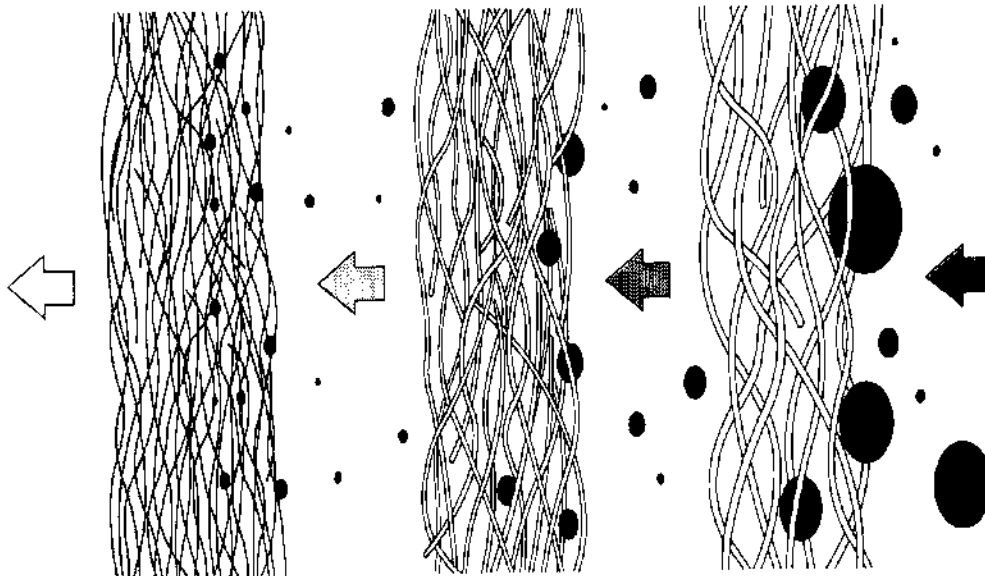


Figura 2.4 Filtros en profundidad.



3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación microbiológica de las aguas de consumo humano impacta negativamente a la salud de la población. Los riesgos epidemiológicos, relacionados con el consumo de agua contaminada por microorganismos virulentos son causales del cólera, de las fiebres tifoideas o de la hepatitis vírica. Una contaminación microbiológica puede afectar a algunas personas o a comunidades enteras, dependiendo de la calidad o del tipo de microorganismo, su modo de transmisión, así como del perfil de las personas contaminadas. La contaminación microbiológica del agua ocurre por lo general a través de aguas residuales con heces de origen humano o animal (Anales de la real academia nacional de la medicina, 1975).

El riesgo de contraer una infección por microorganismos patógenos depende de su grado de invasión, de su dosis mínima infectante así como del nivel inmunológico del organismo huésped. Algunas bacterias patógenas pueden incluso multiplicarse en los alimentos y las bebidas, lo que aumenta los riesgos de infección. Debido a estas condiciones, en el caso de los microorganismos patógenos no existe un límite inferior tolerable; por lo que el agua destinada al consumo (alimentos y bebidas) y a la higiene personal no debe contener ningún agente patógeno para los seres humanos (NMX-AA-42-SCFI-1987, 2000).

Las bacterias patogénicas, son de particular interés por ser transmisoras de enfermedades por alimentos; son causantes de enfermedades peligrosas, como la salmonelosis y el síndrome urémico hemolítico, ambas con consecuencias graves y permanentes para el ser humano.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar la eficiencia de materiales porosos para soportar nanopartículas de plata inhibidoras del crecimiento de *Coliformes Fecales*.

4.2 Objetivos particulares

- Soportar nanopartículas de plata en materiales porosos.
- Estudiar el efecto de la forma y tamaño de las nanopartículas plata en el soporte.

5. HIPÓTESIS.

La clinoptilolita es una zeolita que puede variarse fácilmente sus propiedades físico-químicas. La plata soportada en zeolitas tipo clinoptilolita tiene propiedades bactericidas para los *coliformes fecales*.



6. METODOLOGÍA Y MATERIALES

La incorporación de la plata a los diferentes soportes se llevo a cabo mediante intercambio catiónico. En una primera serie de experimentos se intercambiaron los cationes de las zeolitas (la mayoría de las veces K^+ y Na^+) por cationes Ag^+ presentes en solución acuosa. En esta primera serie se obtendrá una colección de muestras con diferente contenido de Ag^+ . En el caso del sólido mesoporoso, la plata se impregnó a partir de sales inorgánicas y evidentemente sobre la superficie también se contará con la presencia de aniones compensadores, aunque no se descarta la posibilidad de preparar un material mesoporoso a base de Si y Al al que pueda incorporarse Ag^+ por intercambio catiónico.

Los aspectos estructurales y morfológicos de los materiales sintetizados se caracterizarán mediante técnicas fisicoquímicas y espectroscópicas: difracción de rayos-X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión. Estas caracterizaciones permitieron tener una visión amplia de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas metal-soporte y correlacionarlas con su eficiencia como materiales inhibidores del crecimiento bacteriano.

6.1 Materiales

Se prepararon una serie de materiales de Clinoptilolita con 2.5 y 5.0 % en peso de plata, utilizando $AgNO_3$. Para favorecer la reducción de la plata y la incorporación del metal, los materiales se sometieron a tratamientos térmicos en flujo de H_2 a 500 o 700 °C. Los materiales soporte-Ag preparados se pusieron en contacto con las bacterias para explorar el efecto de la concentración del metal, la temperatura de reducción y el tiempo de contacto en las propiedades biocidas del material.



6.1.1 Preparación de la clinoptilolita

Se molió y tamizó (0.15 mm) una toba rica en clinoptilolita, el material de zeolita se trató con una solución 5 M de NaCl por 8 días, se lavó con agua desionizada hasta que no hubo presencia de iones cloruro. La clinoptilolita tratada con Na^+ se secó a 80 °C por 12 h.

6.1.2 Clinoptilolita-Ag

Material	Solución usada durante el intercambio Na-Ag	Temperatura de reducción (°C)	Contenido Ag (% peso)
ClinoAg-500-2.1	AgNO_3 0.05 M	500	2.1
ClinoAg-700-2.1	Ag NO_3 0.05 M	700	2.1
ClinoAg-500-4.0	Ag NO_3 0.10 M	500	4.0
ClinoAg-700-4.0	Ag NO_3 0.10 M	700	4.0

Tabla 6.1 Contenido de Ag en Ag-clinoptilolita preparada bajo diferentes condiciones.

5 g de zeolita clinoptilolita sódica se agitaron por 3 h en 100 mL de solución 0.1 M o 0.05 M de AgNO_3 . Las muestras se separaron por centrifugación y se secaron a 80 °C. Posteriormente, las muestras se redujeron a 500 (o 700) °C en Hidrogeno (5 mL/min) por 4 h. La tabla 6.1 resume las muestras en estudio, la nomenclatura adoptada es ClinoAg-X-Y, donde X es la temperatura de reducción y Y es la cantidad de plata (% en peso), según se determinó por espectroscopia de absorción atómica.



6.2 Caracterización de los materiales

6.2.1 Difracción de rayos-X

Los patrones de difracción de rayos X (por sus siglas en inglés XRD) de las muestras se obtuvieron en un difractómetro Siemens D500 que usa un tubo de cobre de rayos-X. La radiación $K\alpha$ (longitud de onda de 0.70930 Å) se seleccionó con un monocromador de haz difractado.

6.2.2 Dispersión de rayos X a bajos ángulos

Las curvas de dispersión de rayos X (SAXS) a ángulos pequeños se adquirieron en una cámara Kratky, acoplada a un tubo de ánodo de cobre. Los datos de SAXS se procesaron con el programa ITP (Glatter O., 1984), donde el parámetro angular (h) se define como $h = 4\pi \sin \theta / \lambda$, siendo θ y λ el ángulo de dispersión de rayos X y la longitud de onda, respectivamente.

6.2.3 Microscopia electrónica de transmisión

Los materiales se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOLJEM-3000F equipado con un procesador de imágenes (STEM). El voltaje de operación fue de 300kV, y la resolución fue de 0.20nm. Se midieron al menos 200 partículas para determinar el diámetro medio mediante el uso de un analizador de imágenes computarizado (Nippon Aviónica C. Ltd., EXCEL).

6.3 Materiales biológicos

6.3.1 Preparación de caldos nutritivos

El caldo soya tripticaseína se preparó según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse en autoclave, se dejó enfriar a temperatura ambiente (en forma estéril bajo campana de flujo laminar). Se agregaron 18 mL de caldo en tubos de ensaye con tapa rosca, en condiciones asépticas.



El caldo de Mueller-Hintonse preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} , ajustando a una concentración final de 25 mg de Ca^{2+} /L y 12.5 mg de Mg^{2+} /L de caldo.

6.3.2 Preparación de placas de agar

Los agares soya tripticaseína, Müller-Hinton, MacConkey y verde brillante, se prepararon según las indicaciones del fabricante. Después de esterilizarse se introdujeron en autoclave, se dejaron enfriar en un baño de agua a 45-50 °C (en forma estéril bajo campana de flujo laminar). Se vertieron 30 mL de los preparados en cajas Petri de 100 mm de diámetro, para dar un espesor uniforme de aproximadamente 5 mm. Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, evitando la acumulación de gotas de condensación en la tapa. Las placas preparadas se envolvieron en plástico, para minimizar el secado de los agares, y se almacenaron en refrigerador a 4 °C.

6.3.3 Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de *E. coli*, obtenidas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), las cuales se hicieron crecer en cuñas de agar soya tripticaseína a 35.5 °C por 48 h.

6.3.4 Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomaron 3 colonias aisladas del mismo tipo de morfología de las cepas mantenidas en cuñas de agar soya tripticaseína, y se hicieron crecer en tubos con 10 mL de caldo de soya tripticaseína a las condiciones óptimas de temperatura para los microorganismos (35.5 °C). Los inóculos se resembraron cada 24 h por 3 días para mantener la fase exponencial de crecimiento.



6.4 Evaluación de los materiales como bactericidas

6.4.1 Bactericida en medio líquido

Para valorar la capacidad bactericida de los materiales se empleó la técnica de ensayo de dilución en caldo Müller-Hinton, la cual proporcionó información preliminar acerca de la actividad antimicrobiana. En los ensayos de dilución en caldo, en 6 tubos de ensaye con la misma cantidad de caldo soya tripticaseína (18 mL), se agregó una cantidad de material bactericida, para obtener diluciones dobles y progresivas de agente microbiano. Los tubos fueron inoculados con una cantidad calibrada de los microorganismos de prueba (para garantizar una misma cantidad de bacterias en cada tubo), e incubados por 24 h a una temperatura de 35.5 °C. Uno de los tubos no contenía agente bactericida y se tomó como testigo o control. En aquellos tubos donde la bacteria se desarrolló, se observó una turbidez. Cuando el material biocida inhibió el crecimiento el medio de cultivo no presentó turbidez, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es un punto de ruptura en el desarrollo bacteriano. Después de la incubación, los tubos en donde no hubo crecimiento fueron sembrados en agar Müller-Hinton, para determinar la concentración mínima de bactericida (CMB).

Las pruebas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 4000. Se midió la absorbancia a 590 nm, manteniendo los cultivos a 35.5 °C, para determinar el crecimiento o inhibición de los microorganismos. Esta medición se realizó diariamente por 3 días.

Una vez que no se observó turbidez en las muestras, se sembraron en cajas Petri con agar nutritivo para observar si el efecto de los materiales era bactericida o bacteriostático.

6.4.2 Bactericida en medio sólido

La CMB de los materiales se determinó a través de la técnica de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Para ello, se inoculó una cantidad estandarizada de bacterias sobre la superficie de una placa de agar Müller-



Hinton. Se pusieron en contacto con discos de papel filtro impregnados con diferentes cantidades conocidas del material bactericida a evaluar.

Las bacterias fueron sembradas mediante la técnica de inoculación con el uso del replicador de Steer, el cual permite sembrar varias cepas en forma rápida y simultánea en el agar.

El replicador se calibró para depositar alícuotas de 1-2 μL de cada inóculo sobre la superficie del agar.

En cada ensayo se inoculó, como control, una placa sin material bactericida, al comienzo y al final, para determinar viabilidad (pureza) y detectar posibles contaminaciones durante el procedimiento. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta secar el inóculo. Luego se incubaron invertidas a 35.5 °C por 24 h en atmósfera aeróbica. Se midieron los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose los resultados como crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-).



Figura 6.1 crecimiento bacteriano en agar tripticaseína



6.5 Crecimiento bacteriano en presencia de los materiales biocidas

Se determinó el crecimiento de *coliformes* en presencia de los materiales biocidas. Para ello, se valoró la capacidad bactericida de los materiales en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Las concentraciones fueron la CMI de cada material biocida. Se inoculó 1 mL de muestra de los sistemas líquidos con bacterias, en 18 mL de caldo de soya tripticaseína contenido en tubos de ensaye con tapa rosca. Se agregó una cantidad de material biocida (cantidad determinada como CMI) a cada tubo incubándose a 35.5 °C con agitación a 30 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 5, 30, 60, 90 y 120 min). La muestra tomada se sembró en cajas Petri con 30 mL de agar selectivo por la técnica de estriado en placa. Como control, una placa se inoculó con cultivo sin material bactericida, al comienzo y al final. Las placas se incubaron invertidas a 35.5 °C por 48 h en atmósfera aeróbica y se realizó el conteo de colonias.

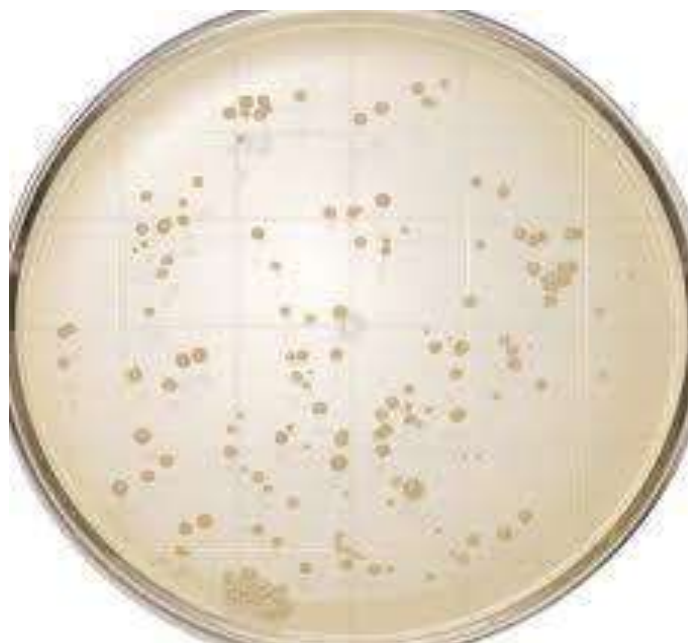


Figura 6.2 Crecimiento de E.coli frente a los materiales biocidas.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Materiales

7.1.1 ClinoAg-X-Y

La figura 7.1 muestra los patrones de difracción de rayos X (DRX) de cuatro muestras ClinoAg-X-Y. Todos los difractogramas exhiben los picos asociados a la zeolita clinoptilolita. Las muestras con plata presentan picos estrechos bien definidos, atribuibles a plata metálica, etiquetados con Ag. Entre mayor fue la cantidad de plata, más intenso fue el pico DRX de Ag. No se observaron diferencias significativas, dentro de los límites de la técnica de DRX, entre las muestras con el mismo contenido de plata reducida a una temperatura diferente. Estos resultados indican claramente que la estructura de la zeolita se conservó después de la deposición de plata. A bajas concentraciones, la plata metálica estuvo bien dispersada en la zeolita. Con el aumento de la cantidad de plata, las partículas pequeñas se aglomeran para formar otras más grandes, que se localizan principalmente en la superficie externa de la zeolita.

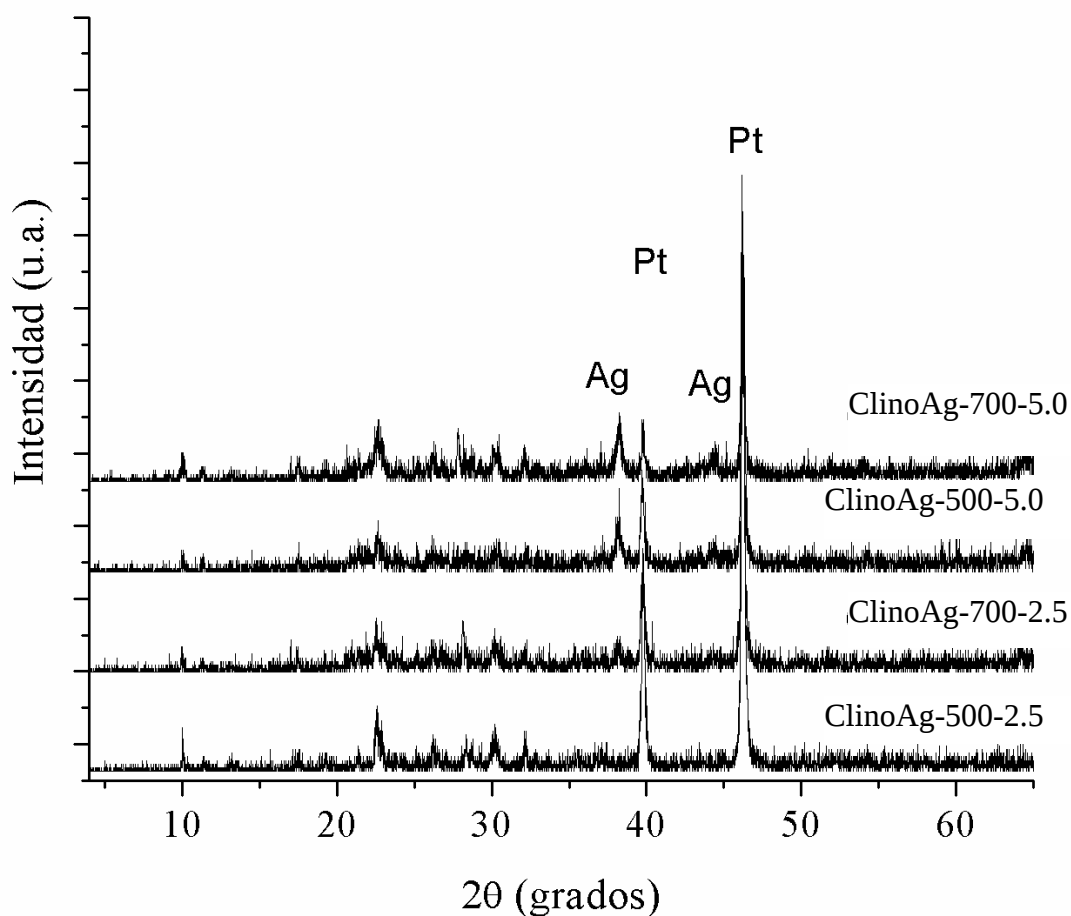


Figura 7.1 Patrones de difracción de rayos X de las muestras ClinoAg-X-Y.

La distribución de tamaño de las partículas se calculó por microscopía electrónica de transmisión (MET). En la figura 7.2 se muestran los histogramas de las muestras de clinoptilolita preparadas con diferentes cantidades de Ag y a diferentes temperaturas de reducción. En la muestra reducida a 500°C con la menor cantidad de plata se obtuvo una distribución multimodal observándose partículas de 3 hasta 15 nm, con la mayor parte de las partículas de 12.5 nm de diámetro. Cuando la temperatura de reducción fue 700°C se observaron partículas de 3 hasta 20 nm, predominando partículas de 7.5, 10 y 15 nm (diámetro). De los histogramas de distribución de tamaño se percibe que el tamaño de las partículas es dependiente del



contenido de Ag y la temperatura de reducción. Un aumento en la concentración de metal genera partículas más grandes. En las muestras reducidas a 500°C el diámetro de partícula predominante aumenta de 12.5 a 17.5 nm aumentando el contenido de Ag de 2.5 a 5.0 %. Para las muestras reducidas a 700°C el diámetro de partícula más probable aumenta de 15 nm a 17.5 nm. Con el aumento de la temperatura de reducción se observa un incremento en el tamaño de las partículas. Incluso, en la muestra ClinoAg-700-5.0 la alta temperatura de reducción y alto contenido de plata, combinados, provocan una distribución más heterogénea de las partículas grandes que se forman.

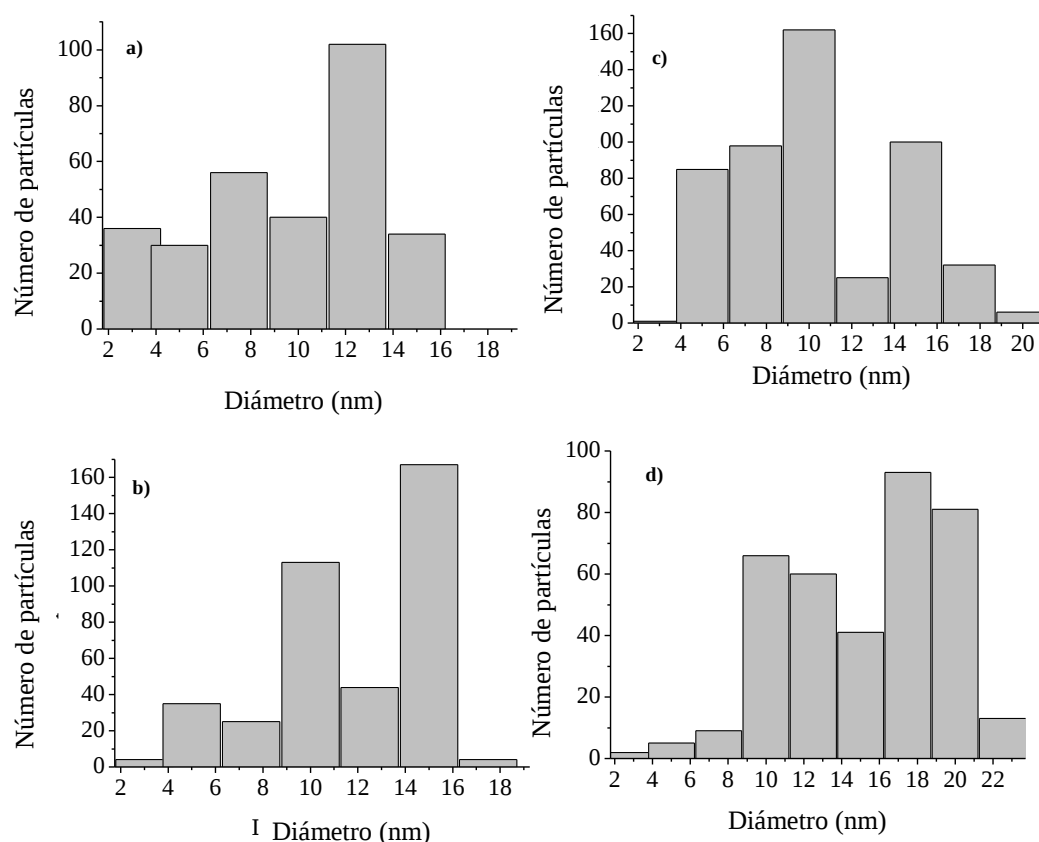


Figura 7.2 Histogramas de distribución de tamaño de partícula de ClinoAg-X-Y: a) ClinoAg-500-2.5 b) ClinoAg-500-5.0 c) ClinoAg-700-2.5 y d) ClinoAg-700-5.0.



7.2 Evaluación de materiales como bactericidas

7.2.1 Ensayo de concentraciones mínimas Inhibitorias para materiales soporte-Ag como biocida de Coliformes totales.

Se realizó un primer sondeo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los materiales soporte-Ag como biocida de Coliformes totales. En el ensayo se incluyeron 4 aislados de Coliformes totales, los que fueron expuestos a los materiales soporte-Ag para obtener suspensiones con concentraciones (gramos de material por mililitro de caldo de cultivo) de 2.2×10^{-3} g/mL, 3.3×10^{-3} g/mL y 4.4×10^{-3} g/mL; después de la incubación por 72 h se determinó el poder inhibitorio de los materiales soporte-Ag. Finalizado el tiempo de incubación, se obtuvieron los resultados de las pruebas que se presentan en la tabla 4.2. En este primer sondeo, la cepa de *coliformes totales* mostró crecimiento frente a los materiales ClinoAg-700-2.5 y ClinoAg-500-2.5, indicando una tolerancia a concentraciones de 4.4×10^{-3} g/mL para estos materiales. Por otra parte, los materiales ClinoAg-700-5.0 y ClinoAg-500-5.0 inhibieron el crecimiento de *coliformes totales* a concentraciones de 3.3×10^{-3} g/mL. A partir de estos resultados, fue posible plantear un segundo sondeo para encontrar la concentración mínima inhibitoria de *coliformes totales* frente a los materiales ClinoAg-700-2.5 y ClinoAg-500-2.5. En el segundo barrido se utilizaron concentraciones de 5.5×10^{-3} g/mL, 6.6×10^{-3} g/mL, y 7.7×10^{-3} g/mL (Tabla 7.1); después de la incubación se determinó la inhibición de *coliformes totales* para los materiales soporte-Ag a diferentes concentraciones. Se observó una inhibición del crecimiento de *coliformes totales* frente a los materiales ClinoAg-700-2.5 y ClinoAg-500-2.5 a una concentración de 5.5×10^{-3} g/mL. En los ensayos con ClinoAg-X-Y, se detectó que la efectividad de los materiales para inhibir el crecimiento de *coliformes totales* fue dependiente de la concentración de Ag.



Cepa/ Material biocida	Control 1	2.2x10 ⁻³ g/mL	3.3x10 ⁻³ g/mL	4.4x10 ⁻³ g/mL	Control 2
ClinoAg-700-2.5	+	+	+	+	+
ClinoAg-700-5.0	+	+	-	-	+
ClinoAg-500-2.5	+	+	+	+	+
ClinoAg-500-5.0	+	+	-	-	+
Cepa/ Material biocida	Control 1	5.5 x 10 ⁻³ g/mL	6.6 x 10 ⁻³ g/mL	7.7 x 10 ⁻³ g/mL	Control 2
ClinoAg-700-2.5	+	-	-	-	+
ClinoAg-700-5.0	+	-	-	-	+
ClinoAg-500-2.5	+	-	-	-	+
ClinoAg-500-5.0	+	-	-	-	+

Tabla 7.1 Concentraciones mínimas inhibitorias de los materiales soporte-Ag para *E. coli*.

+: Indica que hubo crecimiento bacteriano, -: indica ausencia de crecimiento

7.3 Materiales como inhibidores del crecimiento bacteriano

Debido a que la técnica turbidimétrica depende del tamaño de las células bacterianas, así como de la presencia de células dañadas (Skandamis P. *et al.*, 2001), se realizaron pruebas microbiológicas para obtener curvas de crecimiento de los microorganismos en estudio en presencia de los materiales soporte-Ag como agentes antimicrobianos, debido a que algunos materiales tienden a quedar suspendidos en soluciones acuosas y por tanto afectan las mediciones de turbidez. En la figura 7.3 se observa el efecto inhibitorio en placa microbiana de las bacterias en estudio expuestas a los soportes y a los soportes-Ag, respectivamente.

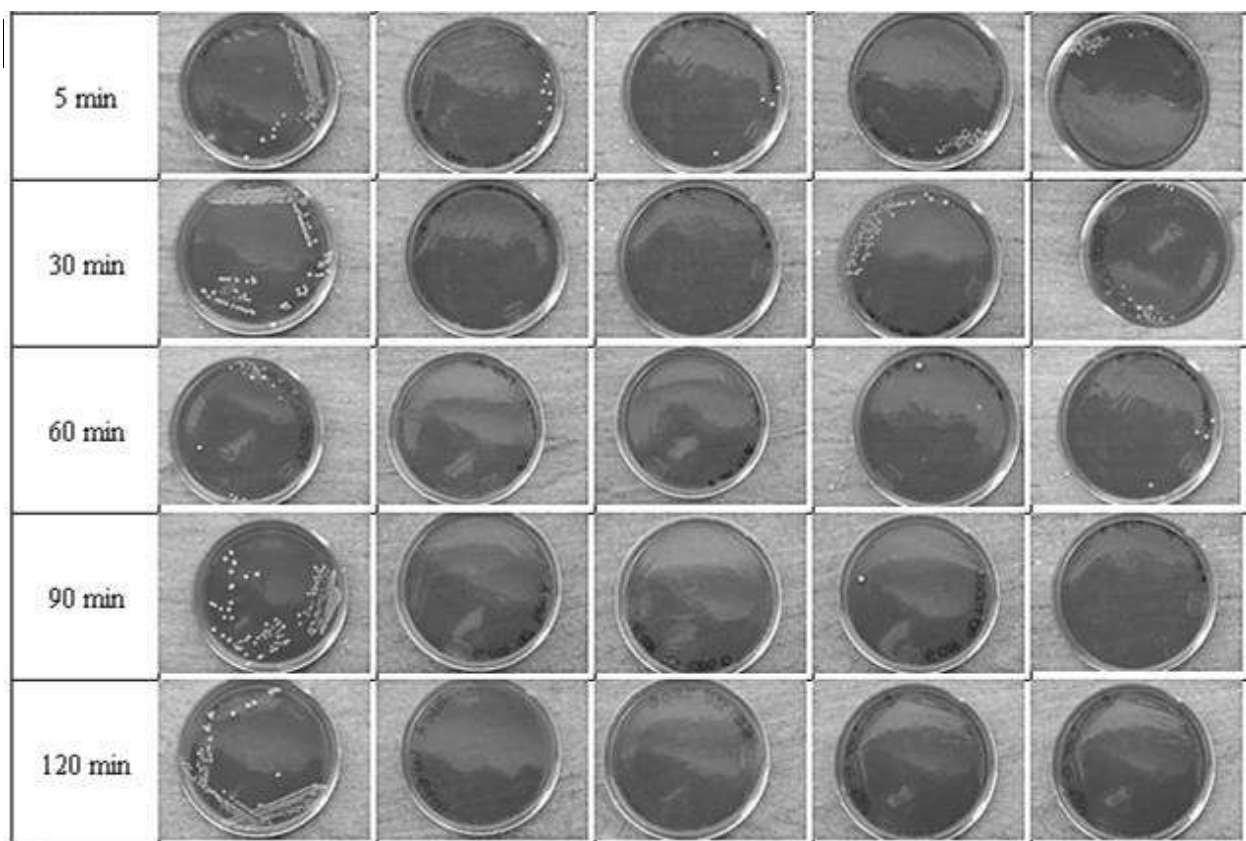


Figura 7.3. Crecimiento de colonias de *coliformes* expuestas a 7.7×10^{-3} g/mL del material a) soportes sin plata y soportes con plata(ClinoAg-X-Y).

Antes de evaluar el carácter bactericida de los materiales se realizaron los controles de calidad a las cepas de trabajo por microdiluciones. Los resultados de los controles de calidad (viabilidad y pureza) de *coliformes*, empleados en la evaluación bactericida, cumplieron con los criterios de aceptación al obtenerse valores de viabilidad del orden de 10^8 , de modo que los resultados de pureza para ambos microorganismos cumplen con la condición de cultivos libres de contaminación microbiana.



7.3.1 Clinoptilolita-Ag como biocidas de Coliformes totales

La figura 7.4 presenta el efecto biocida de las muestras de ClinoAg-X-Y sobre Coliformes totales. Como una muestra de referencia, la zeolita sin plata también se evaluó. En este último caso, el número de colonias aumentó rápidamente con el tiempo, mostrando que el soporte no es bactericida. En cambio, con una carga de 5% en peso de Ag a una CMI de 3.3×10^{-3} g/mL, independientemente de la temperatura de reducción, se eliminó la Coliforme total a un tiempo de 30 min. Por el contrario, las muestras con menor cantidad de plata permiten la reproducción de las bacterias durante los primeros 30 min. A partir de los 60 min hubo una disminución en el número de colonias, pero fue hasta los 120 min cuando las colonias fueron eliminadas por completo. Por tanto, parece que la distribución de la plata en la superficie del material es un parámetro crucial para obtener materiales eficientes como inhibidores del crecimiento bacteriano. Por un lado, en un material con un alto contenido de Ag, las bacterias están en contacto rápidamente con las partículas de plata grandes y densas, dispersas en la superficie externa de la zeolita. Por otro lado, con un contenido de Ag de 2.5% en peso en las zeolitas, las bacterias se dispersan en la zeolita mejorando su desarrollo, pero con el tiempo las bacterias se ponen en contacto con los sitios de plata situada en la entrada de los canales de la zeolita y algunos otros en la superficie externa.

La relación masa de Ag-zeolita/volumen de medios de cultivo, para el caso de la zeolita cargada con un 5% en peso de plata, parece ser muy eficiente y las bacterias sobrevivieron sólo por muy poco tiempo. Cuanto menor es la cantidad de Clino-Ag más largo es el tiempo para alcanzar el menor número de colonias sobrevivientes. Como se mostró por MET, la mayoría de las partículas de plata tienen tamaño menor a 10nm de diámetro, parece así, que estas partículas no son inmediatamente accesibles a las bacterias, posiblemente porque estas partículas se estabilizan en la entrada de los canales. Aunque estas partículas no son en un primer momento accesibles,



las bacterias utilizan la superficie externa para reproducirse, aumentando el número de colonias, pero son rápidamente eliminadas cuando las partículas de plata son accesibles.

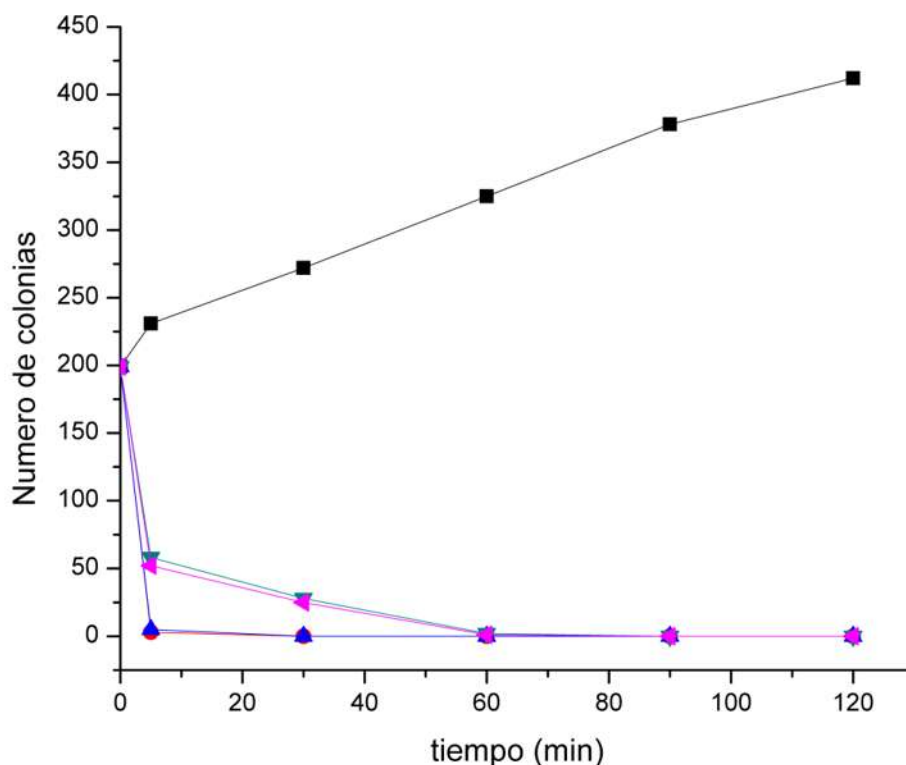


Figura 7.4 Efecto inhibitorio de ClinoAg-X-Ya CMI de 3.3×10^{-3} g/mL sobre el crecimiento de *E. coli*: (—■—) ClinoNa, (—●—) ClinoAg-500-5.0, (—◆—) ClinoAg-500-2.5, (—▲—) ClinoAg-700-5.0, (—▼—) ClinoAg-700-2.5.

La Coliformes totales en contacto con los materiales ClinoAg-X-2.5 presentó una fase larga (aproximadamente 60 min) de inactivación bactericida, lo cual se atribuye a que las partículas de tamaño menor a 7.5 nm no son accesibles inmediatamente, propiciando que el soporte favorezca la reproducción de las bacterias, pero después de este intervalo estas partículas entran en contacto con la bacteria, superando los mecanismos de defensa celular.



Hasta ahora se ha demostrado que la plata soportada en clinoptilolita tiene propiedades bactericidas para Coliformes totales. Otros autores (Shahverdi A., 2007; Lara H., 2010), ya habían reportado a la plata iónica como elemento bactericida. No obstante, la plata iónica reacciona con los elementos del medio disminuyendo así su probabilidad de contacto con la bacteria, por lo que se requiere de una alta concentración de plata iónica. Así, los resultados que se acaban de exponer prueban que la plata parcialmente cargada, soportada en clinoptilolita, es igualmente eficiente como bactericida y se requiere una menor cantidad para inhibir el crecimiento bacteriano, además de que el material soporte-Ag puede reutilizarse.



8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8.1 Conclusiones

- Los materiales Clinoptilolita-Ag son agentes antibacterianos para coliformes totales. Su eficacia, reflejada por un radio CMB/CMI menor a 1.2, indica que los materiales son bactericidas y no bacteriostáticos.
- La CMI de los materiales varía en función de los soportes, la cantidad de plata soportada en el material y la distribución de ésta en la superficie. El tamaño de las partículas es un parámetro crucial en su eficiencia antibacteriana.

8.2 Perspectivas

El tratamiento de aguas industriales, urbanas y de potabilización son algunas de las aplicaciones en las que pueden aplicarse los soportes-Ag para cumplir con las normas mexicanas NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-033-SEMARNAT-1997, las cuales aplican en los índices de contaminación orgánica y biológica del agua y con la norma NOM-127-SSA1-1994 relacionada con el consumo de agua.

Los materiales clinoptilolita-Ag presentan las siguientes ventajas como bactericidas:

- Eliminan las bacterias en un único proceso “in situ” a tiempos cortos.
- El proceso se desarrolla a temperatura ambiente.
- Pueden ser usados como tratamiento terciario, en combinación con cualquier otro tipo de tratamiento convencional, lo que permite su fácil integración en procesos de potabilización de agua.
- El efecto bactericida de los materiales en cepas de distintos tipos y con un variado perfil de resistencias, el tiempo mínimo de exposición



necesario para alcanzar el efecto antibacteriano y la poca resistencia bacteriana que se desarrolla a los materiales, convierten a estos materiales en elementos con gran potencial para la elaboración de múltiples productos que podrían utilizarse para evitar la propagación de microorganismos resistentes en el ambiente hospitalario, como filtros, recubrimientos, máscaras, y gasas antimicrobianas para las quemaduras. En la industria de alimentos, los materiales servirían de apoyo en la aplicación de bioconservantes alimentarios en la industria láctea y cárnica siendo un punto de partida en la industria de bioconservantes de origen natural.

- Un buen complemento a las ventajas del uso de la plata es su baja toxicidad y mínimos efectos secundarios.



9. TERMINOS

- OPS: Manual para el control de las enfermedades transmisibles.
- UFC: Unidades formadores de colonia.
- APHA: Asociación Americana de Salud Pública .
- Cromogeno: Nombre dado a ciertas sustancias incoloras por sí mismas, pero capaces, bajo diversas influencias (oxidación) de originar productos coloreados.
- Nano: (símbolo **n**) es un prefijo del Sistema Internacional de Unidades que indica un factor de 10^{-9} .
- Transposon. Secuencia de DNA que puede moverse de un lugar a otro del cromosoma, insertar copias adicionales de ella misma en otros puntos o pasar de un cromosoma a otro. Tramo de DNA que puede incorporarse en otras moléculas de DNA en lugares donde no hay homología de secuencia. Tienen un tamaño entre 1 y 40 kb.
- Isomórfica: tiene la misma forma en sus lados.
- Biocidas: sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- NMX-AA-42-SCFI-1987,2000:Calidad del agua.-determinacion del numero mas probable (nmp) de coliformes totales, coliformes Fecales (termotolerantes) y escherichia coli presuntiva.
- Zeolita: se trata de un aluminosilicato (pues están constituidos por Al, Si, Na y O) hidratado y altamente cristalino (ya que los grupos de átomos están dispuestos ordenadamente). La estructura es porosa y los diámetros de poro son mínimos, o sea de 3 a 10 Å.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K., Gosink, Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. American Society for Microbiology, 2002, 46, 2268-2670.
- Dwyer J., Zeolite structure, composition and catalysis, Chemistry & Industry, 1984, 7, 258.
- Dyer A., An introduction to zeolite molecular sieves. John Wiley and Sons Inc., 2008, 82-99.
- EdelmanR., LevineM., Summary of an international workshop on typhoid fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 8, 49-329.
- Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K., Gosink, Häse C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. Antimicrobial Agents and Chemoteraphy, American Society for Microbiology, 2002, 46, 2268-2670.
- Dwyer J., Zeolite structure, composition and catalysis, Chemistry & Industry, 1984, 7, 258.
- Dyer A., An introduction to zeolite molecular sieves. John Wiley and Sons Inc., 2008, 82-99.
- EdelmanR., LevineM., Summary of an international workshop on typhoid fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 8, 49-329.
- Esteban A., Evidence-based management of patients with respiratory failure, update in intensive care medicine, Jean-Louis Vincent Edition, 2005, 81-162.
- Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T., and Kim J., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and



Staphylococcus aureus, Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 52, 662-668.

- Fricker S., Medicinal chemistry and pharmacology of gold compounds, Transition Metal Chemistry, 1996, 21, 377-383.
- FSIS, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture, New performance standards for *salmonella* and *campylobacter* in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments, 2011.
- Fyfe C., Feng Y., Grondy H., Kokotailo G., Mar A., Natural abundance, two-dimensional silicon-29 MAS NMR investigation of the three-dimensional bonding connectivities in the high- and low-temperature forms of zeolite ZSM-11, The Journal of Physical Chemistry, 1991, 95, 3747-3751.
- Roberto Guerra, Enrique Lima, Margarita Viniegra, Ariel Guzmán, Víctor Lara, Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites, Microporous and Mesoporous Material, 2012, 147, 267-273.
- Roberto Guerra, Enrique Lima, Ariel Guzmán, Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, Microporous and Mesoporous Material, 2013, 170, 62-66.
- Enrique Lima, Roberto Guerra, Víctor Lara, Ariel Guzmán, Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* Chemistry Central Journal, 2013, 7:11.
- Agencia de Protección Ambiental de las Naciones Unidas EPA. In-depth Studies on Health and Environmental Impacts of Selected Water Pollutants. 1978, Contract 68-01-4646.
- Alberti A., Vezzalini G., Crystal structures of heat-collapsed phases of barrerite. In Natural Zeolites, Occurrence, Properties Use. Sand, L.B. and Mumpton, Eds Pergamon Press, 1978, 85-98.



- American Society of Engineers American Water Works Association, Water Treatment Plant Design, 2nd Edition, 1990, 501-507.
- Anales de la real academia nacional de medicina, Coloquio sobre contaminación ambiental, Real Academia Nacional de Medicina, España, 1975, 1, 171-178.
- Bekkum H., Flanigen E., Studies in Surface Science and Catalysis; Elsevier Science B., 1991, 58-59.
- Belliveau B., Starodub M., Cotter C., Trevors, J., Metal resistance and accumulation in bacteria. Department of Environmental Biology, University of Guelph. 1987, 5, 27-101.
- Bosch P., Schifter I., La zeolita una piedra que hierve. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., 1997.
- Brock T., Madigan M., Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall, 5th edition. 1988, 835-842.
- Cervantes C., Bacterias que expulsan metales pesados. Información Científica y Tecnológica, 1992, 14,13-17.
- Cervantes C., Minerales que expulsan metales pesados. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. SPECTRA, 1992.
- Cervantes C., Vargas E., Álvarez A., Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos, Revista Latinoamericana de Microbiología, 1998, 40-53.
- Charles J., Nanosilver as a biocide in building materials. 2006. US 0272542, 4-5.
- Chmielewska D., Łukasiewicz A., Waliś L., Water soluble silica biocides containing quaternary ammonium salts. In: INCT Annual Report, 2006, 141-153.
- Cho K., Park J., Osaka T., Park S., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta, 2005, 51, 956-960.



- Clement J., Jarrett P. S., Antimicrobial silver. Metal based Drugs, 1994, 1, 467-482.
- Cooper R., A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care, World Wide Wounds, 2004.
- Csicsery S., Zeolite Chemistry and Catalysis, ACS Monograph, J. A. Rabo Edition, 1985, 171, 680-713.
- Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K., McMeekin T., Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23, 391-404.
- Damm C., Münstedt H., Rösch A., The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites. Materials Chemistry and Physics, 2008, 108, 61-66.
- Davis M., Zeolites and molecular sieves: not just ordinary catalysts. Industrial & Engineering Chemistry Research. 1991, 30, 1675.
- Day R., Furst D., Van Riel P., Bresnihan B., Progress in inflammation research, Antirheumatic Therapy: Actions and Outcomes, Michael J. Parnham Series Editor, 2005, 49-68.
- Demling R., De Santi L. Wounds. Scar management strategies in wound care. Rehabilitation Management, 2001, 14, 26-30.
- Derouane E., Zeolites Science and Technology, NATO ASI Series, F.R. Ribeiro et al. Eds., 1984, 80, 347-348.
- Dibrov P., Dzioba J., Khoosheh K., Gosink, Häse C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, 2002, 46, 2268-2670.
- Dwyer J., Zeolite structure, composition and catalysis, Chemistry & Industry, 1984, 7, 258.
- Dyer A., An introduction to zeolite molecular sieves. John Wiley and Sons Inc., 2008, 82-99.



- Edelman R., Levine M., Summary of an international workshop on typhoid fever. *Journal of Infectious Diseases*, 1986, 8, 49-329.
- Esteban A., Evidence-based management of patients with respiratory failure, update in intensive care medicine, Jean-Louis Vincent Edition, 2005, 81-162.
- Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T., and Kim J., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52, 662-668.
- Fricker S., Medicinal chemistry and pharmacology of gold compounds, *Transition Metal Chemistry*, 1996, 21, 377-383.
- FSIS, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture, New performance standards for salmonella and campylobacter in chilled carcasses at young chicken and turkey slaughter establishments, 2011.
- Fyfe C., Feng Y., Grondy H., Kokotailo G., Mar A., Natural abundance, two-dimensional silicon-29 MAS NMR investigation of the three-dimensional bonding connectivities in the high- and low-temperature forms of zeolite ZSM-11, *The Journal of Physical Chemistry*, 1991, 95, 3747-3751.
- García J., Rodríguez E., Ortiz C., Coutiño R., Efecto bactericida de los derivados de plata coloidal, cal y cloro en lechuga romana sin y con lavado, *Revista Higiene*, 2004, 1, 150-161.
- Garry G., Graham G., Champion D., Ziegler J., The cellular metabolism and effects of gold complexes, *Metal Based Drugs* 1, 1994, 395-404.
- Gemmell C., Edwards D., Fraise A. et al., Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57, 589-608.



- Geobaldo F., Bordiga S., Zecchina A., Giamello E., Leofanti G., Petrini G., DRX UV-VIS and EPR spectroscopy of hydroperoxo and superoxo complexes in titanium silicalite, *Catalysis letters*, 1992, 16, 109-115.
- Goodman A., Gilman S., Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Panamericana, 6ta. Edición. 1982, 57-68.
- Gottardi G., Mineralogy and Crystal Chemistry of Zeolites: in natural zeolites, L.B. Sand and F.A., Mumpton Eds., 1978, 31-44.
- Harrison A., Fractals in Chemistry. Oxford University Press Inc., 1995.
- Herikstad H., Hayes P., Mokhtar M., Fracaro M., Threlfall E., Angulo F., Emerging quinolone-resistant Salmonella in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, 3, 371-372.
- Hugo W., Russell A., Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. 3rd Ed., Blackwell Scientific Publications, 1995, 5-94.
- Im K., Takasaki Y., Endo A., Kuriyama M., Antibacterial Activity of A-Type Zeolite Supporting Silver Ions in Distilled Water. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 1996, 24, 269-274.
- Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M., Uchida M., Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials*, 2000, 16, 452-455.
- Kesraoui-Ouki S., Cheeseman C., Perry R., Natural zeolite utilization in pollution control: a review of applications to metals' effluents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1994, 59, 121-126.
- Klein D., Lansing M., Harley J., Microbiology. WCB/McGraw-Hill. 1999, 294-301.
- Landeen K., Yahya M., Gerba C., Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of legionella pneumophila. *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55, 3045-3050.



- Langella A., Pansini M., Cappelletti P., de Gennaro B., de Gennaro M., Colella C., NH_4^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} exchange for Na^+ in a sedimentary clinoptilolite, North Sardinia, Italy, Microporous and Mesoporous Materials, 2000, 37, 337-343.
- Lapotko D., Lukianova E., Potapnev M., Aleinikova O., Oraevsky A., Method of laser activated nanothermolysis for elimination of tumor cells. Cancer Letters 239, 2006, 36-45.
- Lara H., Ayala-Nuñez N., Ixtepan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C., Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26, 615-621.
- Leyva R., Aguilar A., González G., Guerrero C., Mendoza B., Ammonia exchange on clinoptilolite from mineral deposits located in Mexico, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2004, 79, 651-657.
- Macarulla J., Goñi F., Bioquímica humana, Editorial Reverté, S.A., Segunda Edición, 1994, 161-165.
- Maillard J., Bacterial target sites for biocide action. Journal of applied Microbiology Symposium Supplement, 2002, 92, 16-27.
- Martin A., Colloids, Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Ed. Sinko PJ 5th Edition., Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 469-498.
- McDonell G., Russell A., Antiseptics and disinfectants. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12, 147-179.
- McKeage M., Maharaj L., Berners-Price S., Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria, Coordination Chemistry Reviews, 2002, 232, 127-135.
- Meier W., Olson D., Baerlocher C., Atlas of Zeolite framework types, Elsevier, 2007, 17, 1-229.
- Meier W., Olson D., Baerlocher Ch., Atlas of Zeolite Structure Type, 4th Revised Edition, 1996.



- Muñoz R., Collazo P., Alvarado F., Efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa. Oficina Sanitaria Panamá, 1995, 118, 302-305.
- Murray R., Bioquímica de Harper. México, Editorial El Manual Moderno, 2010, 69-98.
- Nataro J., Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis. Current Opinion in Gastroenterology, 2005, 21, 4-8.
- Nataro J., Kaper J., Diarrheagenic Escherichia coli., Clinical Microbiology Reviews., 1998, 11, 142-201.
- Nataro J., Mai V., Johnson J., Diarrheagenic Escherichia coli infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. Clinical Infectious Diseases, 2006, 43, 402–407.
- NMX-AA-42-SCFI-1987. Calidad del agua determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli presuntiva. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Dirección General de Normas. 2000.
- NOM-002-SEMARNAT-1996, Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las recargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, 1998.
- NOM-033-SEMARNAT-1997, Norma oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicio al público, 1998.
- NOM-127-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, 1995.
- Nomiya K., Yamamoto S., Noguchi R., Yokoyama H., Kasuga N., Ohyama K., Kato C., Ligand-exchangeability of 2-coordinate phosphinegold(I) complexes with AuSP and AuNP cores showing



selective antimicrobial activities against Gram-positive bacteria. Crystal structures of $[\text{Au}(\text{2-Hmpa})(\text{PPh}_3)]$ and $[\text{Au}(\text{6-Hmna})(\text{PPh}_3)]$ (2-H(2)mpa=2-mercaptopropionic acid, 6-H(2)mna=6-mercaptonicotinic acid). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, 95, 208-228.

- Novelli F., Recine M., Sparatore F., Juliano C., Triorganotin compounds as antimicrobial agent, *Il Farmaco*, 1999, 54, 237-241.
- Orha C., Manea F., Pop A., Burtica G., Todea I. F., Obtaining and characterization of zeolitic materials with antibacterial properties, *Revista de Chimie*, 2008, 59, 173-177.
- Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolár M., Vecerová R., Pizúrová N. et al., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110, 16248-16253.
- Perego G., Bellusi G., Corno C., Taramsso M., Buonomo F., Esposito A., Titanium-silicate: a novel derivative in the pentasil family, *Proceedings 7th Int. Zeolite conference Tokyo*, Kodansha Publishing., 1986, 129.
- Pumarola A., *Microbiología y parasitología médica*, MASSON, S. A., 1987, 12-16.
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 76-83.
- Ronald M., *Principles of Microbiology*. Editorial Mosby, 1995, 43-55.
- Rosabal B., Rodríguez G., Bogdanchikova N., Bosch P., Lara V., Prakash A., Comparative study of natural and synthetic clinoptilolites containing silver in different states. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, 86, 249-255.
- Rowe B., Ward L., Threlfall E., Multidrug-resistant *Salmonella Typhi*: a worldwide epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, 24, 106-117.



- Russell A., Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2003, 52, 750-763.
- Ruttler M., Renna N., Balbi L., Garcia B., Guidone L., Fernandez R., Puig O. & Ortiz, A., Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 2002, 34, 167-170.
- Sadler P., *Lectures in Bioinorganic Chemistry*, Cortina International, 1991, 1-24.
- Shahverdi A., Fakhimi A., Shahverdi H., Minaian S., Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine*, 2007, 3, 168-171.
- Sigler J., Bluhm B., Duncan H., Sharp T., Ensing D., McCurry W., *Arthritis Rheumatism*, 1972, 15, 125.
- Silver S., Bacterial interactions with mineral cations and anions: good ions and bad, Eds. P. Westbroek & W. Jong, 1983, 439-457.
- Silver S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiology*, 2003, 27, 341-354.
- Silver S., Misra T., Laddaga R., ADN sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances, *Biological Trace Element Research*, Humana Press Inc., 1989, 21, 145-163.
- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G., Inhibition effect of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157-h7. *International Journal of Food Science and technology*, 2001, 13, 65-75.
- Sociedad Argentina de terapia intensiva, Infecciones por catéteres vasculares: En situaciones particulares. Ed. Médica Panamericana, 2003, 2, 97-101.



- Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 275, 177-182.
- Stobie N., Duffy B., McCormack D., Colreavy J., Hidalgo M., McHale P. et al., Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials*, 2008, 29, 963-972.
- Struther J., Westran P., *Bacteriología clínica*, Editorial Masson, S. A., 2005, 10-165.
- Taramasso M., Perego G., Notari B., "Preparation of porous crystalline synthetic material comprised of silicon and titanium oxides", *Patente USA 4410501*, 1983.
- Tenorio J., Espinosa D., Treatment of chromium plating process effluents with ion exchange resins, *Waste Management*, 2001, 21, 637-642.
- Thurman R., Gerba C., The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Critical Reviews of environmental control*, 1989, 18, 295-315.
- Torres M., *Tratado de cuidados críticos y emergencias*, Tomo II, Ediciones ARAN, 2002, 1343-1576.
- Tortora G., Berdell R. Funke, Christine L. Case, *Introducción a la microbiología*, 9a edición, Ed. Médica Panamericana, 2007, 69-89.
- Tuel A., Diab J., Gelin P., Dufaux M., Dutel J., EPR evidence for the isomorphous substitution of titanium in silicalite structure. *Journal of molecular catalysis*, 1990, 63, 95-96.



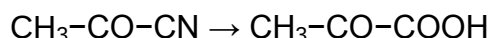
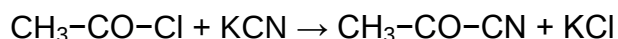
11. GLOSARIO

ADN: El Ácido Desoxirribonucleico es una macromolécula que codifica los genes de las células, bacterias y algunos virus. Esta información genética del ADN se usa para fabricar las proteínas necesarias para el desarrollo y funcionamiento del organismo.

Patogeno: Agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

Cromogeno: Nombre dado a ciertas sustancias incoloras por sí mismas, pero capaces, bajo diversas influencias (oxidación) de originar productos coloreados. Ejemplo: cromógeno de la urobilina.

Acido piruvico: El ácido pirúvico es un ácido incoloro, de aroma similar al ácido acético. Es miscible en agua y soluble en etanol y dietiléter. En el laboratorio, puede ser sintetizado por calentamiento de una mezcla de ácido tartárico y bisulfato de potasio; o por la hidrólisis de cianuro de etanoilo, formado por la reacción de cloruro de etanoilo y cianuro de potasio:



Zeolita: Es un aluminosilicato (pues están constituidos por Al, Si, Na y O) hidratado y altamente cristalino (ya que los grupos de átomos están dispuestos ordenadamente). La estructura es porosa y los diámetros de poro son mínimos, o sea de 3 a 10 Å.