

Evaluación del efecto de inhibición bacteriana de micropartículas core@shell en agua natural

Espinoza-Castañeda Marisol*, García Delgadillo Ismael, Castañeda Briones María Teresa, Haro Pérez Catalina, Cruz Colín María del Rocío

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02200. México.

*Autor para correspondencia: maesca@azc.uam.mx

Recibido:

11/marzo/2020

Aceptado:

11/diciembre/2020

Palabras clave:

Micropartículas de plata, core@shell, patógenos

Keywords:

Silver microparticles, core@shell, pathogens

RESUMEN

La problemática de las enfermedades biológico-infecciosas causadas por el consumo de aguas contaminadas se encuentra en un estado alarmante, por lo que día a día se buscan nuevas técnicas para la erradicación de bacterias patógenas presentes en agua, una gran alternativa para la eliminación de dichos contaminantes es el uso de micromateriales metálicos de fácil recuperación. Por lo que, en este trabajo se presenta una metodología para obtener micropartículas de magnetita cubiertas con plata (core@shell) mediante síntesis verde, con la finalidad de evaluar su efecto inhibitorio sobre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* en presencia de dichas micropartículas. Los experimentos fueron evaluados en un lapso de 24 horas, donde se encontró que las core@shell inhiben en su totalidad el desarrollo bacteriano, demostrando tener un efecto bactericida. Debido al centro paramagnético de las core@shell su recuperación se lleva a cabo mediante un imán de forma rápida y eficiente.

ABSTRACT

The problem of biological-infectious diseases caused by the consumption of contaminated water is in an alarming state, every day new techniques are sought for the eradication of pathogenic bacteria present in water, a great alternative for the elimination of these contaminants is the use of metallic micromaterials. This paper presents a methodology to obtain magnetite microparticles covered with silver (core@shell) by green synthesis, in order to evaluate the effect of inhibition of bacterial growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in the presence of the microparticles. The experiments were evaluated in a 24-hour period, where was found that core@shell completely inhibit bacterial development, proving to have a bactericidal effect. Due to the paramagnetic center of the core@shell, its recovery is carried out by means of a magnet, quickly and efficiently.



Introducción

La contaminación del agua es uno de los principales problemas que se tienen a nivel mundial, ya que agrava el suministro de agua potable; los tipos de contaminantes que en ella se encuentran pueden ser: desechos humanos, desperdicios caseros, descargas pluviales y desechos industriales principalmente, los cuales son vertidos en ríos que desembocan en las aguas dulces alterando sus propiedades químicas, físicas, y biológicas; repercutiendo en el funcionamiento del ecosistema. Dicha contaminación repercute prácticamente en todos los ámbitos de las actividades humanas, sin embargo, en un país en vías de desarrollo como lo es México, el efecto en la salud de las personas es prioridad nacional ya que la población es blanco fácil de enfermedades causadas por microorganismos patógenos presentes en alimentos y aguas contaminadas. La mayoría de las enfermedades relacionadas con el agua contaminada se deben a la contaminación por microorganismos, entre las principales están las infecciones gastrointestinales causadas por bacterias asociadas con material fecal (Robert, 2014) tales como *Salmonella typhi* que causa fiebre tifoidea; *Vibrio cholerae* que provoca cólera; *Escherichia coli* (*E. coli*) que produce diarrea; *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) causante de intoxicación alimenticia; entre otras.

Dos de los principales microorganismos presentes en el agua residual son: *B. subtilis*, bacteria Gram positiva (G+), facultativa y formadora de endosporas protectoras resistentes que le permiten tolerar condiciones extremas. No es considerada patógena estricta, pero puede estar presente en alimentos y en algunos casos causa intoxicación alimenticia. Se han hecho estudios con *B. subtilis* por ser una bacteria omnipresente, comúnmente encontrada en suelos, agua y aire (Méndez et al., 2004). Por otro lado, *E. coli*, es una bacteria Gram negativa (G-), facultativa, asociada con enfermedades gastrointestinales, entre las que destacan diarrea y disentería; se encuentra en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos formando parte de la flora intestinal, ayudando a la absorción de nutrientes (Allocati et al., 2013). La eliminación de microorganismos ya sea del agua, suelo o aire, se lleva a cabo por un proceso denominado desinfección, dentro del cual existen los procesos físicos, tales como la radiación UV, por calor, entre otros, que dañan la pared celular de los microorganismos alterando la fisiología y ocasionando la muerte; también existen los métodos químicos los cuales penetran la pared celular y paralizan el metabolismo provocando la muerte; como la cloración, ozonación, así como también el uso de la plata (CONAGUA, 2016).

Una alternativa a los tratamientos comunes es el uso de nanopartículas (NPs), ya que representan un campo de estudio lleno de aplicaciones, sobre todo en la creación de materiales más resistentes por sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas, físicas y químicas, entre otras, muchas de las cuales están en relación a su forma, además de que pueden ser funcionalizadas en su superficie (Veiga-Álvarez et al., 2015). Uno de los campos donde están adquiriendo relevancia es su aplicación en el medio ambiente ya que las NPs se usan para dar seguimiento a la contaminación, prevenirla y también para eliminar contaminantes presentes en el ambiente (Villarraga, 2016). Un aspecto importante al momento de sintetizar NPs, es el material a partir del cual serán sintetizadas, ya que, dependiendo de éste, es el uso que se les puede dar. Por otra parte, las condiciones de síntesis permiten controlar la morfología y proveer los medios para adaptar las propiedades de las NPs (Zanella, 2014). La principal característica de las NPs metálicas es que contienen un número determinado de electrones libres que les dan propiedades como la sensibilidad de la resonancia del plasma al ambiente, esto ha llevado al uso de NPs en sensores químicos biológicos (DeVries et al., 2008).

Particularmente las nanopartículas de plata (NPsAg), tienen características ópticas, como la longitud de onda absorbida; químicas, especialmente catalíticas; mecánicas como la resistencia a la deformación, corrosión e impacto; y por supuesto antibacterianas. El método más común para la síntesis de NPsAg consiste en la reducción de una solución salina de plata con un agente reductor como el borohidruro de sodio, el citrato o el ascorbato (Leyva, 2013). Como agentes antibacterianos, las NPsAg inhiben la replicación del ADN de las células, además se ha observado que este efecto depende de la concentración de NPs provocando la destrucción de la bacteria (Bao et al., 2015; Camacho et al., 2013).

La tendencia de los métodos de síntesis, actualmente se enfoca en el uso de compuestos que no causan daño al medio ambiente (Kaviya et al., 2011). Es por esto que en este trabajo se plantea la síntesis de micropartículas de magnetita (MPsFe₃O₄) que en una segunda etapa serán recubiertas con plata (MPsFe₃O₄@Ag), usando un extracto de la cáscara del limón agrío, como agente reductor. Las cuáles serán usadas como agentes inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos presentes en agua cruda. Al tener un centro paramagnético permitirá su fácil recuperación mediante la aproximación de un campo magnético (imán), para así evitar los posibles riesgos y daños a la salud que pudieran derivar de su aplicación.

Metodología

Obtención del extracto de cáscaras de limón y su caracterización

A un limón agrio, previamente lavado, se le retiró la cáscara en trozos pequeños, se pesaron 4 g. En un vaso de precipitados de 250 mL se añadieron 40 mL de agua Milli-Q, fueron calentados en una parrilla. Una vez que el agua entró en ebullición, se agregaron los 4 g de cáscara, con ebullición constante durante dos minutos (Lima, 2018). Transcurridos los dos minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, el extracto obtenido fue filtrado con papel filtro Whatman No. 1; posteriormente se almacenó en un recipiente cerrado a 4°C.

Se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro (EPOCH2 de Biotek), colocando 300 μ L, por triplicado, en una placa de 96 pocillos haciendo un barrido de 200 nm a 900 nm de longitud de onda.

Síntesis de MPsFe_3O_4

Las MPsFe_3O_4 se sintetizaron siguiendo la técnica de coprecipitación propuesta por Santos et al. (2011), realizando algunas modificaciones (Gómez, 2016).

En 50 mL de agua Milli-Q se agregaron 200 mg de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Por otra parte, se pesaron 135 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se agregaron a otros 50 mL de agua Milli-Q. El matraz balón fue colocado en un sonicador a una temperatura de 60°C, posteriormente en él se mezclaron las 2 soluciones.

Con la ayuda de una bureta se agregaron 42 mL de NaOH 1M, gota a gota, durante este proceso se va obteniendo un precipitado negro, el sobrenadante se mantiene transparente. Posteriormente se mantuvo en sonicación constante durante 30 minutos más a 60°C.

Verificación de la propiedad paramagnética y su limpieza

Para verificar que las MPsFe_3O_4 , fueran paramagnéticas, se acercó un imán de neodimio al precipitado obtenido. Una vez comprobado, éstas fueron separadas del sobrenadante con ayuda de un separador magnético y colocadas en tubos Eppendorf (Epp) para posteriormente ser lavadas con una solución de agua-etanol al 50% (v/v), tres veces.

Finalmente, las MPsFe_3O_4 fueron secadas en un horno de secado a 70°C durante 1 hora, obteniendo un polvo negro. Las cuales fueron almacenadas en un Epp.

Caracterización de MPsFe_3O_4

Para la caracterización fue necesario resuspender las MPsFe_3O_4 , a una concentración de 1 mg/mL en Milli-Q.

Posteriormente fueron colocadas en sonicación constante durante 20 minutos.

Espectrofotometría de ultravioleta visible

Se colocaron 300 μ L de MPsFe_3O_4 a 1 mg/mL, por triplicado, en una placa de 96 pocillos, ésta se colocó en un espectrofotómetro EPOCH2, con un rango de longitud de onda de 200 – 900 nm, para determinar el máximo de absorbancia, el cual está en relación directa con la concentración, cada determinación fue realizada por triplicado.

Tamaño Z

Todas las medidas se realizaron por triplicado en el equipo ZetaSizer de Malvern, donde fueron colocados 800 μ L de MPsFe_3O_4 a 1 mg/mL, en una celda de 1 cm^2 para determinar el tamaño hidrodinámico de las micropartículas.

Síntesis de $\text{MPsFe}_3\text{O}_4@Ag$

Se agregaron 40 mL de agua Milli-Q a un matraz balón de 50 mL, posteriormente se colocó en una parrilla de calentamiento a 90°C. Por otra parte, se prepararon 2 mL de MPsFe_3O_4 [2 mg/mL] y fueron colocados en sonicación constante durante 20 minutos.

Una vez que el agua del matraz balón alcanzó la temperatura de 90°C, se agregaron 20.7 mg de AgNO_3 y la solución de MPsFe_3O_4 , después se agregaron 9 mL del extracto de limón. La solución se mantuvo a temperatura constante en una parrilla durante 60 minutos. Después, el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente, la suspensión de partículas fue puesta en un recipiente cerrado y almacenadas a 4°C. Finalmente se acercó un imán al matraz para comprobar el efecto paramagnético.

Caracterización de $\text{MPsFe}_3\text{O}_4@Ag$

Espectrofotometría de ultravioleta visible

Se colocaron 300 μ L, por triplicado, en una celda de 96 pocillos. Se realizó un barrido en un rango de longitud de onda de 200 – 900 nm, para determinar el máximo de absorbancia, el cual está en relación directa con la concentración.

Tamaño Z

Mediante la dispersión de luz dinámica, se determinó el diámetro hidrodinámico promedio de las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4@Ag$ sintetizadas, para lo cual fue necesario colocar 800 μ L en una celda de 1 cm^2 , la muestra fue analizada en el equipo ZetaSizer por triplicado.

Preservación y verificación de la pureza de las bacterias

La verificación de la pureza se realizó mediante observación de frotis por duplicado de las cepas con tinción diferencial de Gram, los cuales fueron observados en un microscopio con un objetivo de 100X con el fin de encontrar bacilos Gram negativo (coloración roja o rosa) en el caso de *E. coli* y bacilos Gram positivo en el caso de *B. subtilis*. Una vez comprobada la pureza de las cepas, para su preservación cada una fue sembrada en dos tubos de agar nutritivo inclinado y dos tubos de caldo nutritivo, incubándose a 37°C durante 48 horas para su desarrollo. Transcurrido este tiempo fueron colocados en refrigeración a 4°C. Cada dos meses se llevó a cabo la resiembra de las bacterias para su preservación.

Determinación de la curva de crecimiento de las bacterias

Para cada bacteria se determinó la curva de crecimiento mediante UV-Vis, para lo cual en una placa de 6 pocillos se colocaron 7 mL de caldo nutritivo estéril en cada uno de ellos, 2 pocillos fueron inoculados con una asada de la bacteria de *E. coli*, otros 2 inoculados de igual manera con *B. subtilis* y los 2 restantes únicamente contenían el caldo nutritivo estéril utilizados como control. Posteriormente la placa se puso en incubación en el equipo EPOCH2 durante 48 horas a 37°C determinando su absorbancia cada hora a 625 nm.

Determinación de la escala de turbidez de McFarland

Para obtener dicha escala se prepararon dos soluciones: la primera de BaCl₂ al 1.175% y la segunda de H₂SO₄ al 1%, cada uno aforados con agua Milli-Q a 100 mL. Posteriormente, se prepararon los estándares mostrados en la tabla 1, donde se indica la concentración de UFC/mL correspondiente a cada tubo.

Tabla 1. Concentración de UFC/mL correspondiente a cada tubo, (Perilla et al., 2003).

Tubo	BaCl ₂ / mL	H ₂ SO ₄ / mL	UFC/mL (x10 ⁸)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

Inmediatamente después de preparar la serie de tubos, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro EPOCH2, colocando por triplicado 300 µL de cada tubo en una placa de 96 pocillos.

Pruebas de actividad antimicrobiana en agua cruda en presencia de MPsFe₃O₄@Ag

Se tomaron 100 mL de una muestra de agua cruda, obtenida de un charco formado por la lluvia, para evaluar la eficiencia del sistema desarrollado en presencia de interferentes naturales (microorganismos, algas u otros contaminantes presentes en la muestra). Ésta se colectó en un recipiente estéril y fue almacenada a 4°C.

Caracterización del agua cruda

La muestra fue caracterizada mediante observación al fresco, para determinar la presencia de protozoarios, y mediante preparación de frotis por duplicado y tinción de Gram para determinar la presencia de microorganismos.

Evaluación de la actividad antimicrobiana en agua cruda

Se preparó una placa de 6 pocillos utilizando la distribución presentada en la tabla 2, se llevó a incubación durante 24 horas con agitación constante a una temperatura de 37°C en el EPOCH2, esto se realizó para cada una de las bacterias por separado en presencia de las MPsFe₃O₄@Ag concentradas.

Tabla 2. Distribución para la placa de 6 pocillos en la prueba de inhibición en agua cruda.

	1	2	3
A	300 µL bacteria, 300 µL MPsFe ₃ O ₄ @Ag 7 mL de agua cruda	300 µL bacteria, 300 µL MPsFe ₃ O ₄ @Ag 7 mL de agua cruda	300 µL bacteria, 300 µL MPsFe ₃ O ₄ @Ag. 7 mL de agua cruda
B	300 µL bacteria 7 mL de agua cruda	300 µL de MPsFe ₃ O ₄ @Ag 7 mL de agua cruda	7 mL de agua cruda

Resultados y discusión

Obtención del extracto de cáscaras de limón y su caracterización

Las cáscaras fueron agregadas al vaso con agua cuanto ésta se encontraba en ebullición y se dejaron así durante 2 minutos, como se ve en la figura 1a. Posteriormente, el vaso de precipitados se retiró de la parrilla y se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue filtrado utilizando papel filtro Whatman N°1 como se observa en la figura 1b.



Figura 1. a) Cáscaras de limón en agua en ebullición, b) filtración del extracto de limón en un recipiente estéril.

Síntesis de partículas de magnetita

Verificación de la propiedad paramagnética

Una vez finalizado el proceso de síntesis de las $MPsFe_3O_4$, se comprobó que fueran paramagnéticas, acercando un imán al precipitado sintetizado, donde las partículas fueron atraídas por el imán. En la figura 2, se observa el fondo del matraz balón con las $MPsFe_3O_4$, del lado izquierdo se observa que, al acercar un imán a la pared del matraz, las $MPsFe_3O_4$ son atraídas a él, con lo cual se comprueba su efecto paramagnético.



Figura 2. Precipitado reaccionando al campo magnético del imán.

Una vez comprobado que las partículas fueran paramagnéticas se procedió a lavarlas, poniendo el precipitado negro en tubos Epp, los cuales fueron colocados en un separador magnético (Figura 3), posteriormente una vez que las partículas fueron atraídas por el separador, se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta beral.



Figura 3. $MPsFe_3O_4$ contenidas en tubos Epp en un separador magnético

Después de ser lavadas y secadas en el horno de calor seco, todas las partículas en polvo fueron concentradas en un solo Epp donde nuevamente se comprobó que aún fueran paramagnéticas.

Caracterización de $MPsFe_3O_4$

Espectrofotometría de ultravioleta visible

Se preparó 1 mL a 0.125 mg/mL, el cual fue sonificado durante 20 minutos para romper los aglomerados formados en el proceso de secado, finalmente se determinó la absorbancia (Figura 4).

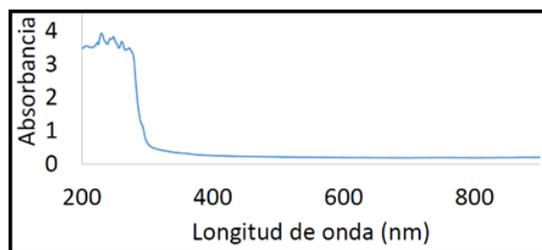


Figura 4. Espectro de absorbancia de la solución de $MPsFe_3O_4$.

Se puede observar que no hay picos significativos, este espectro de absorbancia sirve como referencia para determinar la presencia del recubrimiento de plata en las $MPsFe_3O_4@Ag$.

Tamaño Z

Se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 110.423 ± 2.592 nm de una solución de $MPsFe_3O_4$, a una concentración de 0.25 mg/mL.

Caracterización de las $MPsFe_3O_4@Ag$

Espectrofotometría de ultravioleta visible

Se tomaron, por triplicado, 300 μ L de la dilución de $MPsFe_3O_4@Ag$, se colocaron en una placa de 96 pocillos y con ayuda del equipo EPOCH2 se midió su absorbancia en un rango de 200 - 900 nm de longitud de onda arrojando la curva mostrada en la figura 5.

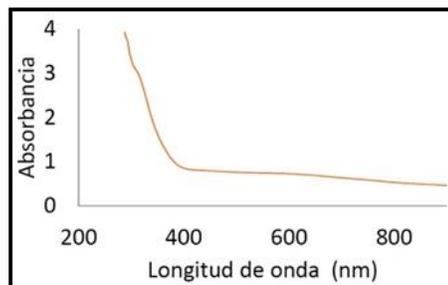


Figura 5. Espectro de absorbancia de $MPsFe_3O_4@Ag$.

Se observa un ligero pico a 620 nm, lo cual es indicativo de que las $MPsFe_3O_4$ han sido recubiertas de plata.

Tamaño Z

Se obtuvo un incremento en el diámetro hidrodinámico, lo cual es indicativo de la formación de la corteza de plata. El diámetro obtenido fue de 525.8 ± 25.36 nm.

Determinación de la curva de crecimiento de las bacterias

Se realizó una determinación cada hora durante 50 horas, a una temperatura de incubación de 37°C. La figura 6A muestra la curva de crecimiento de *B. subtilis*; se observa que el crecimiento exponencial comienza a las 5 horas de incubación, en la figura 6B se observa la curva de *E. coli*; donde también el crecimiento exponencial comienza a las 5 horas. En ambos casos el incremento de la absorbancia es indicativo del buen desarrollo de ambas bacterias.

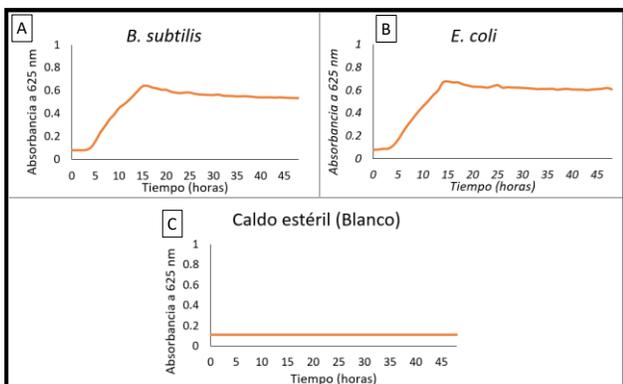


Figura 6. Curvas de crecimiento de (A) *B. subtilis* y (B) *E. coli*, como control caldo estéril (C).

En la figura 6C se observa el espectro obtenido para el caldo estéril (control), donde al no observarse ningún pico, se comprueba su esterilidad.

Determinación de la escala de turbidez de McFarland

Una vez preparados los tubos de la escala, se midió su absorbancia y con esos valores se construyó la gráfica mostrada en la figura 7.

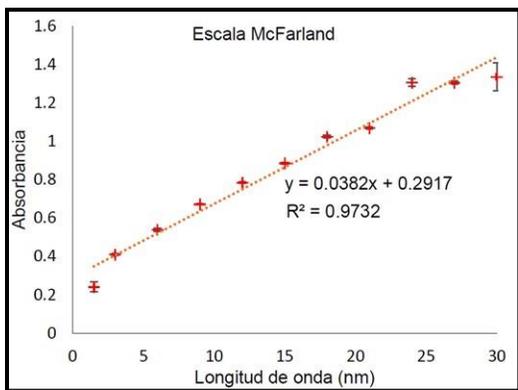


Figura 7. Curva de calibración obtenida de la Escala de McFarland.

Pruebas de actividad antimicrobiana en agua cruda en presencia de $MPsFe_3O_4@Ag$

Para determinar la eficiencia de $MPsFe_3O_4@Ag$ en presencia de interferentes naturales, se tomaron 100 mL de una muestra de agua de lluvia encharcada, ésta se colectó en un recipiente estéril. Como se observa en la figura 8, hay partículas sólidas precipitadas en la muestra.



Figura 8. Muestra de agua cruda.

Posteriormente se evaluó la actividad antibacteriana de $MPsFe_3O_4@Ag$, frente a *E. coli* y *B. subtilis*.

Caracterización del agua cruda

En la figura 9A se muestra una fotografía de lo observado al microscopio de una preparación de gota al fresco. Se reporta la presencia de materia orgánica y de esporas.

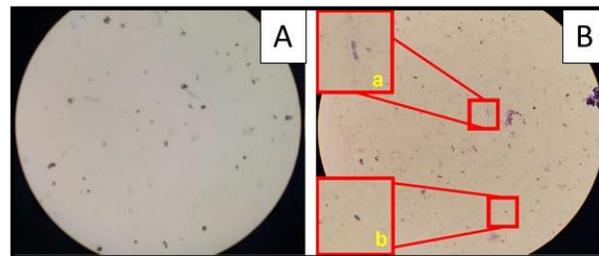


Figura 9. Observaciones al microscopio de; (A) Materia orgánica en la muestra de agua, (B) Microorganismos presentes en la muestra de agua.

En la figura 9B se muestra una fotografía de lo observado al microscopio frotis con tinción de Gram, se determina la presencia de bacterias con una morfología correspondiente a bacilos tanto Gram negativos (inserto a) como Gram positivos (inserto b), ambos nativos de la muestra de agua. Lo cual demuestra ser apta para el desarrollo bacteriano.

Evaluación de la actividad antimicrobiana en agua cruda

Esta prueba se realizó por triplicado, para cada bacteria se preparó una placa de 6 pocillos utilizando la distribución presentada en la tabla 2, la cual fue puesta en incubación en el equipo EPOCH2 durante 24 horas,

midiendo la absorbancia cada hora a una longitud de onda de 625 nm. En la tabla 3 se muestran las absorbancias correspondientes al inicio y final de la prueba, donde se observa que en un periodo de 24 horas hubo una inhibición del 57.1% para el desarrollo de *E. coli* en presencia de $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$.

Tabla 3. Resultados de la prueba de inhibición transcurridas las 24 horas de incubación.

	Abs./ 0 h	Abs./24 h	Inhibición
Agua+ <i>E. coli</i>	0.281±0.004	0.697±0.027	
Agua+ <i>E. coli</i> + MPsFe_3O_4	0.327±0.548	0.398±0.032	57.10%

En la tabla 4 se puede observar que las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ lograron inhibir el desarrollo de *B. subtilis* en un 50.5% en un periodo de 24 horas.

Tabla 4. Resultados de la prueba de inhibición transcurridas las 24 horas de incubación.

	Abs./ 0 h	Abs./24 h	Inhibición
Agua+ <i>B. subtilis</i>	0.135±0.542	0.453±0.001	
Agua+ <i>B. subtilis</i> + MPsFe_3O_4	0.186±0.159	0.229±0.004	50.55%

Con estos resultados se demuestra la eficiencia de las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ como agentes inhibidores del desarrollo bacteriano de *E. coli* y *B. subtilis*. Además, al tener un centro paramagnético su recuperación fue muy sencilla, ya que al acercar un imán a la pared de la celda las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ fueron atraídas a él, lo cual facilitó su recolección, ver figura 10.



Figura 10. Se observa como las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ son atraídas por el campo magnético del imán.

Por lo cual éstas $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ pueden ser usadas con agentes antibacterianos de manera controlada sin representar un riesgo para la salud debido a su fácil recuperación.

Conclusiones

Se demostró que, mediante una técnica optimizada se pueden sintetizar MPsFe_3O_4 , con un diámetro hidrodinámico de 110.423 ± 2.592 nm. Posteriormente fueron recubiertas satisfactoriamente con plata mediante una síntesis de química verde utilizando un extracto de cáscara de limón como agente reductor, lo cual fue confirmado por el incremento en el diámetro hidrodinámico de las $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$ que fue de 525.8 ± 25.36 nm.

Además, se expuso que pueden ser usadas como agentes antibacterianos, ya que fueron aplicadas como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram positiva y Gram negativa en una muestra de agua cruda. Mediante su caracterización se reportó la presencia de bacterias nativa en la muestra de agua, así como materia orgánica, los cuales son considerados interferentes naturales. Al haber microorganismos, se determinó que la muestra de agua contenía los nutrientes necesarios para poner inocular y obtener un buen desarrollo de las bacterias de interés en este trabajo, las cuales fueron inoculadas e incubadas en presencia de $\text{MPsFe}_3\text{O}_4\text{@Ag}$. Transcurridas las 24 horas de incubación, se obtuvo una inhibición del 57.10% y del 50.55% para *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente, donde la mayor eficiencia se presentó frente a *E. coli*, la cual es una bacteria Gram negativa.

El uso de micropartículas con centro magnético, como es este caso, incrementa su potencial de aplicación, debido a su fácil recuperación. Ya que basta con acercar un imán para atraer a dichas micropartículas. Por lo que estas pueden ser reutilizadas en un segundo proceso, además de tener una gran eficiencia, la cual puede ser incrementada al aumentar la concentración de las mismas. Su fácil recuperación las hace más aptas para ser usadas en agua, sin representar riesgos a la salud.

Referencias

- Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235–6254.
- Bao H., Yu X., Xu C., Li X., Li Z., Wei D., Liu Y. (2015). New toxicity mechanism of silver nanoparticles: promoting apoptosis and inhibiting proliferation. *PLoS One*, 10(3), e0122535.
- Camacho P., J.D., Deschamps M., L.A., Herrera B., A.D. (2013). Síntesis de NPs de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. Tesis de Doctorado, Universidad de Cartagena.

- CONAGUA. (2016). Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento. Desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento. 35-108. México: secretaría de medio ambiente y recursos naturales.
- DeVries G., Brunnbauer M., Hu Y., Jackson A.M., Long B., Neltner B.T., Uzun O., Wunsch B.H., Stellacci F. (2008), Divalent metal nanoparticles.. *Science* 315, 358 (2007);
- Gómez C.A.V.S. (2016). Diseño y fabricación de un biosensor electroquímico nanoestructurado para detectar *Escherichia coli* O157:H7 en agua. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Ciudad de México.
- Kaviya S., Santhanalakshmi J., Viswanathan B., Muthumary J., Srinivasan K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*, 79(3), 594-598.
- Leyva G.G. (2013). NPs de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. Investigación en discapacidad, 2(1), 18-22.
- Lima M.L.I. (2018). Síntesis verde de NPs de plata para el estudio de su actividad antibacteriana contra bacterias Gram positiva y Gram negativa. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, Ciudad de México.
- Méndez M.B., Orsaria L.M., Philippe V., Pedrido M.E., Grau, R.R. (2004). Novel roles of the master transcription factors spo0A and σ B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *Journal of bacteriology*, 186(4), 989-1000.
- Perilla M.J., Bopp C., Elliott J., Facklam R., Popovic T., Wells J. (2003). Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella serotype Typhi*, *Shigella*, and *Vibrio cholerae*. Ginebra: World Health Organization.
- Robert P.M. (2014). Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias biológicas*, 45 (1), 25-36.
- Santos A.F., Macedo L.J., Chaves M.H., Espinoza-Castañeda M., Merkoçi A., Lima, F.D. C.A., Cantanhêde W. (2011). Hybrid self-assembled materials constituted by ferromagnetic nanoparticles and tannic acid: a theoretical and experimental investigation. *Journal of the brazilian chemical society*, 27(4), 727-734.
- Veiga-Álvarez A., Sánchez-de-Alcázar D., Martínez-Negro M., Barbu A., González-Díaz J.B., Maquea-Blasco J. (2015). Riesgos para la salud y recomendaciones en el manejo de NPs en entornos laborales. *Medicina y seguridad del trabajo*, 61(239), 143-161.
- Villarraga F.G. (2016). NPs metálicas y sus aplicaciones. *Revista digital innovación y ciencia*. 13:34:24
- Zanella R. (2014). Metodologías para la síntesis de NPs: controlando forma y tamaño. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencia y nanotecnología*, 5(1).