

## Producción de nanopartículas de plata a partir de bacterias anaerobias para la desinfección de aguas residuales contaminadas con *Escherichia coli*

Jésica García-Torres <sup>1,\*</sup>, Marisol Gallegos-García <sup>1</sup> y Verónica Gallegos-García <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava No. 8, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México. C.P. 78290.

<sup>2</sup> Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Niño Artillero No. 130, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México. C.P. 78290.

\* Autor de correspondencia: jes.gt.510@gmail.com;

**Contaminación de agua, suelo y aire** (Tratamientos biológicos).

**Resumen:** Dado el acelerado crecimiento de las poblaciones, y las actividades que esto conlleva, el problema de contaminación de agua se ha agravado con el paso de los años, presentándose distintos tipos de contaminantes en solución que disminuyen la calidad del recurso hídrico. En México, las diversas actividades económicas que se llevan a cabo aportan una amplia gama de contaminantes; de entre ellos, la presencia de plata en efluentes industriales representa un foco de atención, debido a los potenciales riesgos que estas descargas representan. Los métodos tradicionales de descontaminación de agua por metales como la plata resultan costosos y por la generación de residuos peligrosos, suponen un problema adicional. Estudios recientes reportan que el proceso de degradación anaerobia es una buena alternativa para la remoción de metales solubles a partir de su reducción al estado metálico, debido a la disminución del potencial óxido-reducción (ORP). Además, se ha demostrado que la aplicación de nanotecnología en la desinfección de agua con *Escherichia coli* resulta efectiva, por lo que las propiedades de las nanopartículas de plata (AgNP) se encuentran en evaluación en este campo. En este trabajo se planteó la síntesis de AgNP recuperadas de un agua residual sintética, mediante la reducción de plata iónica ( $Ag^+$ ) a plata metálica ( $Ag^0$ ), utilizando bacterias metanogénicas, con el fin de desinfectar agua. La síntesis se realizó en pruebas en lote con bacterias metanogénicas y nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) como precursor de las nanopartículas; estas se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM-EDS) y espectroscopía UV visible. Se evaluó además la propiedad bactericida de las AgNP contra *Escherichia coli*, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados indicaron la presencia de AgNP esféricas dispersadas, y una CMI y CMB de 1 mg/L y 10 mg/L. respectivamente.

**Palabras clave:** Nanotecnología, consorcio microbiano, recuperación de plata, desinfección.

## Production of nanosilver nanoparticles by anaerobic bacteria for wastewater disinfection contaminated with *Escherichia coli*

**Abstract:** Due the rapid growth of populations, and the consumption of raw materials and activities that this entails, the problem of water pollution has been a concern over the years, presenting different types of contaminants in solution that reduce the quality of the water resource. In Mexico, the different economic activities carried out provide a wide range of pollutants; among them, the presence of silver in effluents of the mining-metallurgist industry, and of radiography and photography, represent a problem of special attention, due to the risks that these discharges represent. Traditional methods of water decontamination by metals such as silver, generate high costs, and the manage of hazardous waste turns out to be an additional problema. Recent studies report that the anaerobic degradation process is a good alternative for the removal of soluble metals from their reduction to the metallic state, due to the decrease in redox potential (RP). In addition, it has been demonstrated that the application of nanotechnology in the disinfection of wastewater with *Escherichia coli* is effective, so that the properties of the silver nanoparticles (AgNP) are still under evaluation in this field. In this work the synthesis of AgNP recovered from a synthetic wastewater was proposed, by reducing ionic silver ( $Ag^+$ ) to metallic silver ( $Ag^0$ ), using methanogenic bacteria, in order to disinfect water. The synthesis was carried out in batch tests with methanogenic bacteria and silver nitrate ( $AgNO_3$ ) as a precursor of the nanoparticles. The bactericidal property of the AgNP against *Escherichia coli* was also evaluated, obtaining a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/L, and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 10 mg/L.

**Keywords:** Nanotechnology, microbial consortium, silver recovery, disinfection.

### Introducción

La plata es un metal empleado comúnmente como ornamento o para agregar valor a diferentes utensilios como cubiertos o piezas artísticas (Jastram, 1981), además es utilizada en el área médica para el tratamiento de heridas y desinfección de material. Aguas residuales con contenido de plata son originadas en actividades como la revelación

fotográfica, radiográfica, en la industria minera y de galvanoplastia, principalmente. Debido al incremento de las poblaciones en el mundo, y a la demanda de productos y actividades que esto conlleva, las concentraciones de plata en agua han aumentado significativamente (FAO – ONU, 2013). Conocidos sus efectos sobre la salud humana, además de su persistencia en sistemas acuáticos y seres vivos en general, actualmente representa un problema de salud pública latente (ATSDR, 2016).

De manera general, las aguas residuales presentan concentraciones de plata de entre 2 y 3 mg/L, sin considerar concentraciones puntuales (FAO – ONU, 2013). El tratamiento de aguas residuales con contenido de metales en solución suele darse por procesos fisicoquímicos, sin embargo éstos generan residuos peligrosos debido al uso de reactivos químicos específicos, además de representar importantes gastos energéticos, siendo poco cordiales con el ambiente y sus recursos.

Estudios anteriores han evaluado la posibilidad de recuperar metales haciendo uso de bacterias anaerobias (Gallegos-García et al., 2009; Pat-Espadas et al., 2016); se sabe que los consorcios metanogénicos son capaces de reducir el potencial oxido – reducción (ORP) a valores por debajo de los -300 mV; en estas condiciones la plata soluble ( $\text{Ag}^+$ ) es reducida a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ), obteniéndose nanopartículas en suspensión (Ruíz-Castillo, 2016). Por sus características, las nanopartículas de plata (AgNP) tienen propiedades físicas, químicas y biológicas que aún se encuentran en evaluación, entre ellas, su capacidad bactericida y de desinfección (Eugenia y Cristina, 2012; s.i., 2014).

La desinfección de agua se convirtió en punto vital para su consumo, procurando siempre la calidad de esta. La bacteria *Escherichia coli* resulta uno de los indicadores mayormente utilizados para evaluar la calidad del agua de uso humano; su consumo puede generar enfermedades diarreicas (Molina, 2015), por lo que se ha procurado su ausencia en sistemas de distribución, y puntos de almacenamiento y consumo de agua.

El objetivo de este trabajo es evaluar la reducción de plata soluble ( $\text{Ag}^+$ ) de aguas residuales a su forma metálica ( $\text{Ag}^0$ ), a partir de bacterias anaerobias, y su utilización como antibacterial para la eliminación de *Escherichia coli* presente en aguas residuales.

## Materiales y Métodos

La síntesis de AgNP se llevó a cabo en botellas serológicas de 60 mL, que contenían lo equivalente en lodo metanogénico a 2 g de SSV (sólidos suspendidos volátiles), medio mineral, lo equivalente a 2 g de DQO (demanda química de oxígeno) en etanol como sustrato, y 2000 mg/L de  $\text{Ag}^+$ , en forma de  $\text{AgNO}_3$ . Los ensayos se realizaron por duplicado, y se agregó un control, que no contenía sustrato, ni plata. Se registró la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ), medido por desplazamiento volumétrico de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 3% p/v. Para evaluar la formación de las AgNP se llevó a cabo un barrido entre 200 y 1000 nm en un espectrofotómetro UV-vis, obteniéndose el espectro de absorción.

La capacidad bactericida de las AgNP fue evaluada utilizando la metodología reportada en otra publicación (Borges et al., 2013) para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), con la variación de utilizar caldo y agar nutritivos para el cultivo de *E. coli*; además las lecturas de turbidimetría se realizaron cada hora, durante 24 horas de incubación. Se utilizaron diferentes concentraciones de nanopartículas, desde 1 hasta 25 mg/L sobre *E. coli*.

## Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos de las pruebas de actividad metanogénica, permitieron demostrar que la plata no provocó la inhibición del consorcio microbiano, si no que promovió que la producción de biogás se diera en un tiempo menor que los experimentos en los que no se agregó el metal. Sin embargo, las botellas con plata produjeron una menor cantidad de biogás total, en comparación con las que no tienen plata. Lo anterior se muestra en la Figura 1.

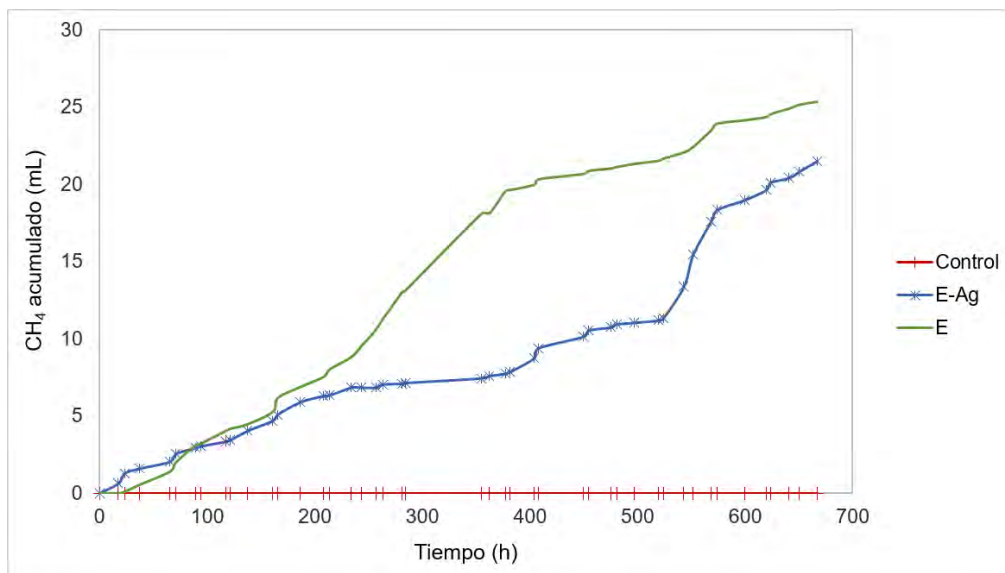


Figura 1. Cinética de producción de CH<sub>4</sub>. Experimentos con plata (E-Ag) y sin plata (E).

El efecto que tiene la plata sobre el consorcio de bacterias es de estimulación, haciendo que la fase de latencia se acorte, y se presente una producción exponencial de metano desde el inicio de la cinética (Eugenia y Cristina, 2012).

La formación de nanopartículas se comprobó con el plasmón de resonancia superficial, mostrado en la Figura 2; en él se observa una señal cerca de los 400 nm, característica de las nanopartículas de plata en suspensión (Cornejo-Álvarez, 2015); una señal más aparece alrededor de los 600 nm, correspondiente al grupo NO<sup>3-</sup>, reportado así por otros autores (Eftink y Giron, 1981) y presente debido al precursor utilizado para la síntesis de las nanopartículas.

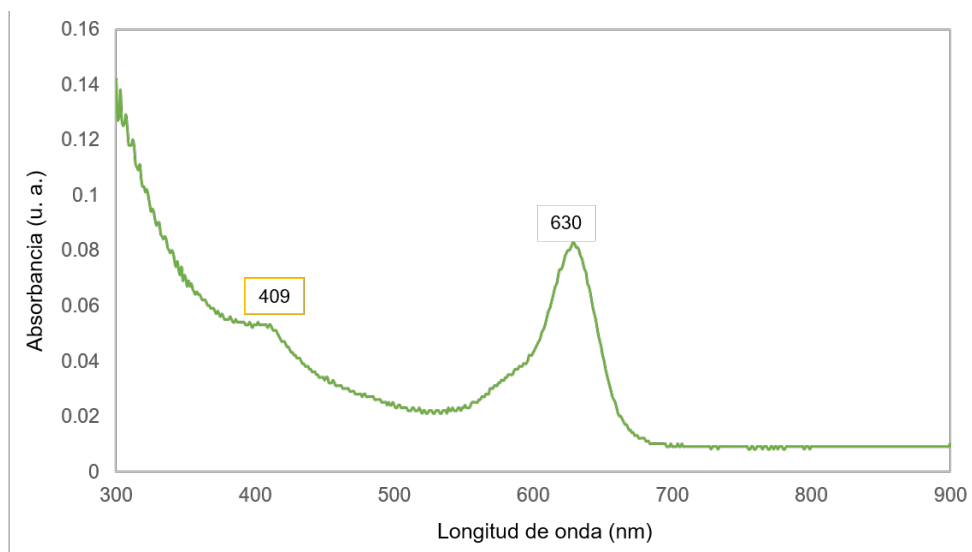


Figura 2. Plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas de plata sintetizadas.

En la Figura 3 se muestra la micrografía de las nanopartículas obtenidas, analizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET).

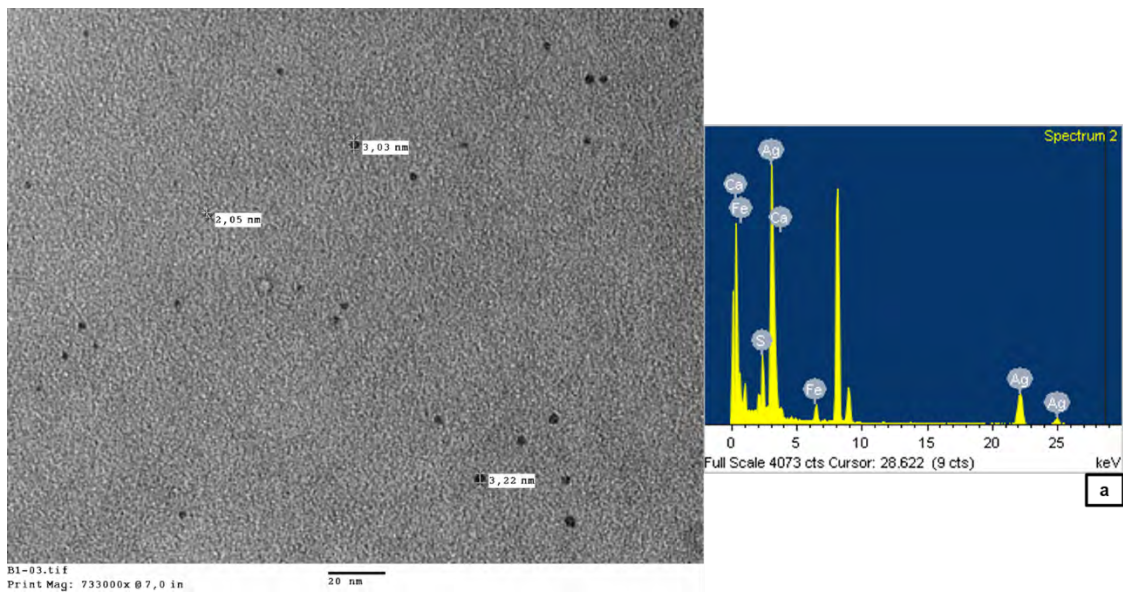


Figura 3. Micrografía por MET de nanopartículas sintetizadas y análisis elemental (3a) de las mismas.

De la Figura 3 puede observarse un tamaño de partícula de entre 2 y 3.5 nm, sin presentarse agregados de nanopartículas. El tamaño obtenido (<20 nm) facilita su utilización en tareas de desinfección, debido al área superficial disponible, y a la capacidad de penetración de las partículas a través de las membranas celulares (Deshmukh et al., 2018). El análisis elemental presentado en la Figura 3a confirma la naturaleza de las nanopartículas sintetizadas.

La CMI y la CMB de las nanopartículas evaluadas sobre *E. coli*, resultaron de 1 y de 10 mg/L, respectivamente. Estos valores de concentración resultan menores que los reportados en otros trabajos en donde la síntesis es realizada por 'rutas verdes' con extractos de plantas, o cepas de hongos o bacterias específicas. Lo anterior significa que es necesaria una cantidad menor de estas AgNP para generar un efecto inhibitorio sobre *E. coli*. En la Tabla 1 se muestra una comparación de la CMI y la CMB obtenidas, con las de otros trabajos.

Tabla 1. Nanopartículas biológicas y su actividad antibacterial.

CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	Auxiliar de síntesis de NP	Referencia
1	10	Bacterias metanogénicas	Este trabajo
9.10	20	Bacterias sulfatorreductoras	Eugenia y Cristina, 2012
30	-	<i>Rhodococcus spp</i>	Eftink y Giron, 1981
2	-	<i>Shewanella oneidensis</i>	Deshmukh et al., 2018
10	-	<i>Acalypha</i>	Otari et al., 2015

El efecto de las nanopartículas sobre la bacteria *E. coli* se observa en la Figura 4, donde el crecimiento comienza a verse afectado desde el tiempo 0, momento en el que se agregó la suspensión de nanopartículas al cultivo de bacterias.

El experimento Control, al que no se le añadió suspensión de nanopartículas, se muestra por encima del resto de los experimentos, lo que demuestra que desde la concentración más baja con la que se trabajó, se inhibe el crecimiento de *E. coli*.

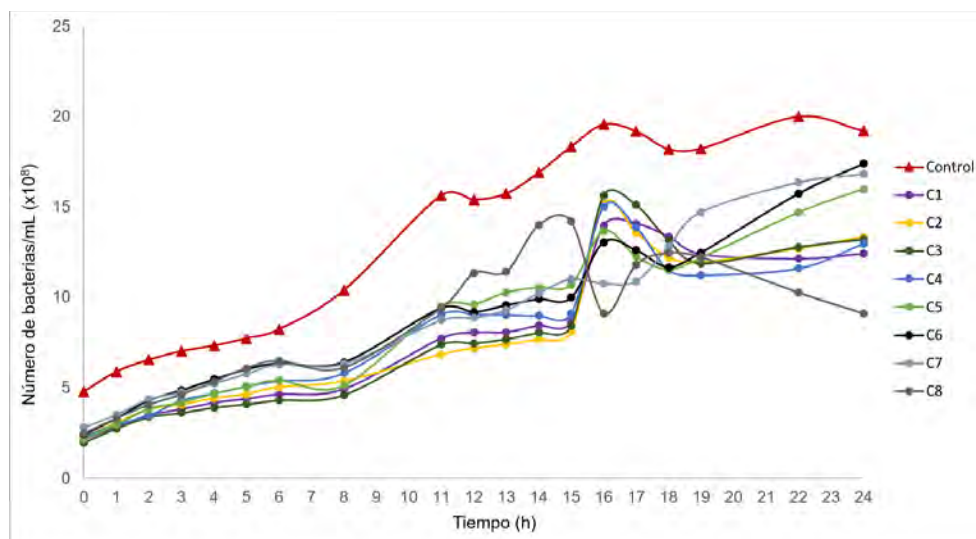


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ante AgNP.

## Conclusiones

Los experimentos de actividad metanogénica mostraron que las bacterias anaerobias no sufren inhibición por la presencia de plata, sino que son capaces de reducirla al estado metálico, lo que fue corroborado por el espectro UV-Vis.

Las AgNP sintetizadas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* desde una concentración de 1 mg/L, además de eliminar el 99.9% del microorganismo a partir de una concentración de 10 mg/L, lo que permite utilizar cantidades menores de AgNP que las reportadas en otros trabajos, para combatir el crecimiento de *Escherichia coli*.

Los experimentos llevados a cabo demuestran que es posible utilizar consorcios de bacterias anaerobias para retirar el metal plata de un agua residual, y darle un segundo uso como desinfectante en agua con contenido de *E. coli*.

## Bibliografía

- Jastram, W.R. (1981). Silver the Restless Metal. John Wiley and Sons Inc.
- Afrontar la escasez de agua. Un marco de acción para la agricultura y la seguridad alimentaria. (2013). Informe sobre temas hídricos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). p. 1 – 10.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (2016), ToxFAQs – Plata (Silver). Recuperado de [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts146.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts146.html)
- Gallegos-García, M., Celis, L. B., Rangel-Méndez, R., Razo-Flores, E. (2009). Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 91–99. <https://doi.org/10.1002/bit.22049>
- Pat-Espadas, A. M., Field, J. A., Otero-Gonzalez, L., Razo-Flores, E., Cervantes, F. J., Sierra-Alvarez, R. (2016). Recovery of palladium(II) by methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, 144, 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.035>
- Ruiz-Castillo AL. Recuperación de plata metálica de aguas residuales a partir de una biopelícula anaerobia en un reactor de lecho fluidificado inverso. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Tesis de Maestría 2016.
- Eugenia, M., Cristina, N. C. (2012). Desinfección y purificación de agua mediante nanopartículas metálicas y membranas compósitas. *Tecnología Y Ciencias Del Agua*, III, 87–100.
- Fisicoquímica del agua. Ecoeficiencia. (2014). Recuperado de <http://javierpancorbo.blogspot.com/2011/05/desinfeccion-del-agua-mediante.html>
- Molina, J. (2015). Universidad Nacional Autónoma de México. ESCHERICHIA COLI DIARROGÉNICA. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
- Cornejo Álvarez, L. (2015). La revolución nanotecnológica en los nuevos materiales. Un reto tecnológico para el siglo XXI. Universidad de Jaen, 0–56. Retrieved from [http://www.nuevatecnologiasymateriales.com/wp-content/uploads/edd/2015/06/Revolucion\\_Nanotecnologica.pdf](http://www.nuevatecnologiasymateriales.com/wp-content/uploads/edd/2015/06/Revolucion_Nanotecnologica.pdf)

- Eftink, M. R., & Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry*, 114(2), 199–227. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90474-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90474-7)
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2018). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.12.102>
- Otari, S. V. V., Patil, R. M. M., Ghosh, S. J. J., Thorat, N. D. D., & Pawar, S. H. H. (2015). Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 1175–1180. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.003>
- Gu, B., Mortensen, N. P., & Phelps, T. J. (2010). Silver Nanocrystallites : Biofabrication using *Shewanella oneidensis* , and an Evaluation of Their Comparative Toxicity on Gram-negative and Gram-positive Bacteria, 44(13), 5210–5215.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. (2010). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens, 76, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.008>