



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ingeniería
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Desarrollo de una geomembrana polimérica impregnada con nanopartículas de plata sintetizadas a partir de bacterias anaerobias para la desinfección de agua contaminada con *Escherichia coli*

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Tecnología y Gestión del Agua

Presenta:

L.N. Adriana García Titla

Asesora:

Dra. Marisol Gallegos García

Co-asesora:

Dra. Zoe Vineth Quiñones Jurado



Agradecimientos

A la Dra. Marisol Gallegos García por su paciencia, dirección y apoyo a lo largo de los cuatro semestres, a la Dra. Zoe Quiñones Jurado por las contribuciones a un trabajo multidisciplinario, si bien a distancia sus comentarios y guía fue siempre útil.

A la Dra. Diana María Escobar García y a la Dra. Verónica Gallegos García por apoyarme en mejorar los métodos experimentales y orientarme en la discusión de resultados.

Al Ing. Héctor Isidoro Solís Torres, encargado de los análisis de Espectroscopia de Absorción Atómica en el laboratorio de Análisis de Agua de la UASLP.

A la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado coordinadora de LINAN, división de materiales avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

A Rogelio E. Cruz Briano, por el apoyo dentro del Laboratorio de Ciencias Ambientales.

Finalmente, gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada bajo el folio 1007571, para realizar mis estudios de Maestría en Tecnología y Gestión de Agua dentro de la UASLP.

Índice General

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	6
Simbología y notación	7
Resumen	8
Abstract	10
1. Introducción	12
2. Antecedentes de geomembranas impregnadas con nanopartículas y su efecto sobre <i>Escherichia coli</i>	15
2.1 Problemática de contaminación del agua	15
2.2 Presencia de <i>Escherichia coli</i> en el agua	17
2.3 Métodos de desinfección de agua	18
2.4 Nanopartículas de plata	21
2.5 Síntesis biológica de nanopartículas de plata	24
2.6 Digestión anaerobia	26
2.7 Geomembranas poliméricas	30
2.8 Geomembranas compuestas para la desinfección de agua	32
3. Materiales y métodos para la síntesis de nanopartículas de plata y geomembranas impregnadas para la desinfección de agua con <i>Escherichia coli</i>	36
3.1 Síntesis de nanopartículas en reactores en lote	36
3.1.1 Acondicionamiento de lodos anaerobios	37
3.1.2 Medio mineral para reactores en lote	37
3.1.3 Determinación de sólidos suspendidos volátiles	38
3.1.4 Actividad Metanogénica Específica	38
3.1.5 Determinación de demanda química de oxígeno	40
3.1.6 Monitoreo de pH, ORP y nitratos	40
3.2 Caracterización de AgNPs	41
3.2.1 Lavado de AgNPs	41
3.2.2 Espectroscopia UV-visible	42
3.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido	42
3.2.4 Espectroscopia de Absorción Atómica	42
3.2.5 Difracción de Rayos X	43
3.3 Evaluación de actividad antimicrobiana de AgNPs ante <i>E.coli</i>	43
3.3.1 Condiciones de incubación de <i>E.coli</i>	43
3.3.2 Ensayos de concentración mínima inhibitoria en placa micropocillos	44
3.3.3 Ensayos de Actividad Metabólica	45
3.3.4 Ensayos de concentración mínima bactericida en medio agar	46
3.4 Fabricación de geomembranas poliméricas con AgNPs impregnadas	47
3.5 Evaluación de actividad antimicrobiana de la geomembrana polimérica ante <i>E.coli</i>	49
3.5.1 Ensayos de concentración mínima inhibitoria en placa micropocillos y Ensayo de Actividad Metabólica	49
3.5.2 Ensayos de concentración mínima bactericida en medio agar	50

3.6 Evaluación tiempo de vida de geomembranas	51
3.7 Formación de biofilm	51
4. Síntesis biológica y caracterización de nanopartículas de plata	53
4.1 Caracterización del lodo anaerobio	53
4.2 Actividad metanogénica específica	53
4.3 Cuantificación de plata	58
4.4 Caracterización de AgNPs	59
4.5 Condiciones para biosíntesis y mecanismos de síntesis de AgNPs	64
4.6 Conclusiones	66
5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata ante <i>Escherichia coli</i>	68
5.1 Resultados de inhibición de <i>E.coli</i> con AgNPs por síntesis biológica	68
5.1.1 Concentración mínima inhibitoria	68
5.1.2 Ensayo de Actividad Metabólica	72
5.1.3 Concentración mínima bactericida	74
5.2 Conclusiones	75
6. Desarrollo de una geomembrana con nanopartículas de plata, para la desinfección de un agua contaminada con <i>Escherichia coli</i>	77
6.1 Resultados de la fabricación de geomembrana con AgNPs	77
6.2 Caracterización de geomembrana compuesta	78
6.3 Resultados de la geomembrana con AgNP ante <i>E.coli</i>	80
6.3.1 Concentración mínima inhibitoria y Ensayo de Actividad Metabólica	81
6.3.2 Pruebas de concentración mínima bactericida	89
6.3.3 Comparativo con geomembranas comerciales	91
6.3.4 Liberación de las AgNPs y estudio de tiempo de vida de la geomembrana	98
6.3.5 Formación de biofilm	99
6.4 Conclusiones	103
7. Conclusiones generales	105
8. Referencias	109
Anexos	118

Índice de Figuras

Figura 2.1 Mecanismos antimicrobianos de nanopartículas (Palza, 2015)	24
Figura 2.2 Comunidades de bacterias anaerobias en gránulos de lodo.	27
Figura 2.3 Esquema de la digestión anaerobia (Varnero-Moreno, 2011)	27
Figura 2.4 Perfil vertical del potencial redox (mV) en sedimentos (Fuentes y Massol-Deyá, 2002)	29
Figura 2.5 Etapas de etapas de formación de biofilm. (Van Houdt, Michiels 2005)	34
Figura 3.1 Botellas con lodo metanogénico y medio mineral en incubación.....	36
Figura 3.2 Sistema de desplazamiento volumétrico NaOH 3% - Metano. (García-Torres, 2019).....	39
Figura 3.3 Placa de micropocillos y distribución de ensayos por cuadruplicado.....	44
Figura 3.4 Reducción de rasazurin a resorufin en ensayos de actividad metabólica.....	46
Figura 3.5 Pruebas de CMB, <i>E.coli</i> en medio Agar con filtros #1 para AgNPs en solución.	46
Figura 3.6 Arreglo experimental para obtención de geomembrana	48
Figura 3.7 Geomembranas fabricadas y corte para pruebas.....	49
Figura 3.8 Geomembranas sobre cultivo de <i>E.coli</i> en medio Agar.....	50
Figura 3.9 Arreglo experimental para evaluar el tiempo de vida, montaje de geomembranas.	51
Figura 3.10 Arreglo experimental para formación de biofilm, observación de geomembranas en microscopio óptico.....	52
Figura 4.1 Cinética de producción de CH ₄ de lodo metanogénico en sistemas en lote. a) Inicio de AME con gránulos de lodo metanogénico. b) Fin de la AME medio con tonalidad de café a grisácea.	54
Figura 4.2 Diagrama de Pourbaix de plata	59
Figura 4.3 Reactores en lote con lodo metanogénico en a) previo a AME, b) termino de AME.....	60
Figura 4.4 Espectro UV-vis de nanopartículas de plata por síntesis verde.	61
Figura 4.5 Micrografía por MEB de a) AgNPs lavadas, b) Tamaño de AgNPs de 415 a 500 nm c) AgNPs no lavadas, d) Tamaños de AgNPs entre 20 a 123 nm.	62
Figura 4.6 Análisis elemental por EDS confirmando presencia de plata	63
Figura 4.7 Difractograma por XRD de las nanopartículas de plata.....	64
Figura 4.8 Esquema reducción de Ag ⁺ por enzima nitro reductasa (Adaptación García-Torres 2019, original Kalimuuthu 2008).....	66
Figura 5.1 Resultados de actividad antimicrobiana de AgNPs. C=Control de crecimiento bacteriano. Naranja = AgNPs no lavadas (NL), Verde = AgNPs lavadas (L). Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24.	69
Figura 5.2 Mecanismos de interacción entre una célula bacteriana y las AgNPs (Sánchez-López, 2020)	71
Figura 5.3 Ensayo de actividad metabólica cambio de color tras reducción de resazurina a resorufin ..	73
Figura 5.4 Ensayo de CMB para distintas concentraciones de AgNPs	75
Figura 6.1 Geomembranas polimérica impregnada con AgNPs a) Polipropileno, b) Polietileno.....	78
Figura 6.2 Recorte de geomembranas de polietileno para pruebas de CMI y CMB.....	78
Figura 6.3 Micrografía por MEB de a) superficie de geomembrana de polietileno, b) poro en geomembrana, c) nanopartículas de plata esféricas, d) aglomerado de AgNPs en superficie de geomembrana de polietileno, e) superficie de geomembrana de polipropileno, f) nanopartícula inmersa en la geomembrana	79
Figura 6.4 Análisis elemental por EDS confirmando presencia de plata en geomembrana de polietileno	80

Figura 6.5 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polipropileno con AgNPs a concentraciones de 100 a 600 mg/L. C=Control de crecimiento bacteriano. SN = sin nanopartículas, Morado = AgNPs no lavadas, Verde = AgNPs lavadas. Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24, L=lavadas, NL= no lavadas, *p > 0.05 vs. control.	82
Figura 6.6 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polietileno con AgNPs. C=Control de crecimiento bacteriano. SN = sin nanopartículas, Cafe = AgNPs no lavadas, Azul = AgNPs lavadas. Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24, L= lavadas, NL= no lavadas, *p > 0.05 vs. control.....	83
Figura 6.7 Resultados de actividad antimicrobiana para concentraciones de 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/L de AgNPs por individual, PE300: geomembranas impregnadas con 300 mg/L de AgNPs en polietileno y PP200: geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgNPs, C24: control a las 24 hrs.....	87
Figura 6.8 Mecanismo de inhibición de nanopartículas en geomembranas (Palza, 2015).....	89
Figura 6.9 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polipropileno.....	90
Figura 6.10 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polietileno	91
Figura 6.11 Capacidad bactericida de geomembranas C=Control de <i>E.coli</i> , SN=geomembrana de polipropileno sin material antibacteriano, 2P AgSiO ₂ = geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgSiO ₂ , 2P AgTiO ₂ = geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de 2P AgTiO ₂ , 2E- Ag= geomembrana de polietileno con 200 mg/L de AgNPs, *p > 0.05 vs. control.	92
Figura 6.12 Resultados de inhibición de <i>E.coli</i> en medio agar para geomembranas con plata.....	94
Figura 6.13 Capacidad bactericida de geomembranas de polietileno con distintos compuestos bactericidas 1) PL 835N= polietileno 2) polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol, 3) polietileno con 1000 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol, 4) polietileno con 500 mg/L de oxibisfenoxarsina, 5) polietileno con 1000 mg/L de oxibisfenoxarsina, 6) polietileno con 1500 mg/L de oxibisfenoxarsina.	94
Figura 6.14 Resultados inhibición de <i>E.coli</i> en medio agar para geomembranas comerciales.....	95
Figura 6.15 Micrografías por MEB de geomembranas a) polietileno con 1500 mg/L Oxibisfenoxarsina, b) polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol c) 2E Ag= geomembrana de polietileno con 200 mg/L de AgNPs d) polietileno con 500 mg/L Oxibisfenoxarsina e)2P AgSiO ₂ = geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgSiO ₂ , f) 2P AgTiO ₂ = geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de 2P AgTiO ₂	96
Figura 6.16 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembranas PE300 = polietileno 300 mg/L de AgNPs, PP200 = polipropileno 200 mg/L de AgNPs, 2P AgSiO ₂ = Polipropileno 200 Ag/SiO ₂ mg/L, O500 = Polipropileno con 500 mg/L de oxibisfenoxarsina, C24 = Control de crecimiento bacteriano de 24 horas.	97
Figura 6.17 Observación en microscopio óptico a 10x de biofilm. PEc: Control de polietileno. PPC: Control de polipropileno. PE300: Polipropileno con 300mg/L de AgNPs. PP200: Polipropileno con 200mg/L de AgNPs. #2: polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi) fenol. #4: polietileno con 500 mg/L Oxibisfenoxarsina. #6: polietileno con 1500 mg/L Oxibisfenoxarsina.	100
Figura 6.18 Micrografías de geomembrana de polietileno con formación de biofilm	102

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Trabajos de síntesis biológica de nanopartículas de plata	25
Tabla 2.2 Trabajos de membranas poliméricas con materiales antibacterianos	33
Tabla 3.1 Composición de medio 10x para bacterias anaerobias	37
Tabla 3.2 Composición de solución elementos traza	37
Tabla 3.3 Composición de medio 10x para pruebas en lote	38
Tabla 3.4 Concentraciones de AgNPs en geomembranas poliméricas	47
Tabla 3.5 Concentraciones de agente antibacteriano en geomembranas comerciales	49
Tabla 4.1 Resultados de determinación de sólidos en lodo	53
Tabla 4.2 Valores de AME, aprovechamiento de sustrato etanol para lodo metanogénico.	54
Tabla 4.3 Parámetros iniciales y resultados de remoción de DQO, pH y ORP de reactores en lote.	57
Tabla 4.4 Concentración de plata iónica por EAA	59
Tabla 5.1 Comparación de CMI de AgNPs sintetizadas por diversas vías	71
Tabla 5.2 Ensayo de viabilidad celular para distintas concentraciones de AgNPs	73
Tabla 6.1 Geomembranas fabricadas a distintas concentraciones	77
Tabla 6.2 Pruebas de toxicidad con ensayo de actividad metabólica para polipropileno	86
Tabla 6.3 Pruebas de toxicidad con ensayo de actividad metabólica para polietileno	86
Tabla 6.4 Resultados de concentración de plata en geomembranas por EAA	98
Tabla 6.5 Resultados de concentración de plata en medio.	98

Simbología y notación

Ag ⁺	Plata iónica
Ag ⁰	Plata metálica
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
AME	Actividad metanogénica específica
CH ₄	Metano
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
D.O.	Densidad óptica
DRX	Difracción de Rayos-X
DQO	Demanda química de oxígeno
DPS	Subproductos de desinfección del agua
EAA	Espectroscopia de absorción atómica
EDA	Enfermedad diarreica aguda
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
MEB	Microscopia electrónica de barrido
NADH	Nicotin adenin dinucleótido
NO ₃ ⁻	Nitratos
OBPA	10,10'-Oxibisfenoxarsina
ORP	Potencial óxido-reducción
PP	Polipropileno
PE	Polietileno
PVC	Cloruro de polivinilo
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SVI	Sólidos volátiles inmovilizados
THM	Trihalometanos
TiO ₂ NPs	Nanopartículas de oxido de titanio
UV	Luz Ultra violeta
UV-vis	Espectrofotometría ultravioleta visible
ZnO NPs	Nanopartículas de oxido de zinc

Resumen

Mantener la calidad del agua es un reto debido a la contaminación biológica. *Escherichia coli* es una de las bacterias causante de enfermedades diarreicas por lo que es importante evitar su propagación en reservorios de agua. Los métodos convencionales de desinfección involucran el uso de compuestos clorados o biocidas, sin embargo, éstos presentan efectos adversos a nivel salud y daños al medio ambiente. La investigación en nuevos materiales propone recubrimientos con polímeros impregnados con nanopartículas de plata para aprovechar sus propiedades antibacterianas. Dentro de los métodos de síntesis de nanopartículas, se destaca el uso de microorganismos y extractos de plantas por su bajo impacto ambiental y costo energético en comparación con métodos fisicoquímicos. La digestión anaerobia de bacterias metanogénicas proporciona las condiciones necesarias para la reducción de plata iónica a plata metálica.

Con base en lo anterior, el presente trabajo plantea desarrollar geomembranas con propiedades antimicrobianas al impregnarlas con nanopartículas de plata sintetizadas con bacterias anaerobias, para la desinfección de agua contaminada con *Escherichia coli*. La primera parte del trabajo se enfocó en las nanopartículas de plata. La síntesis se llevo a cabo en el medio mineral de bacterias metanogénicas en sistemas en lote. La caracterización por espectroscopia UV-vis, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X confirmó que las condiciones de actividad metanogénica específica permitieron la reducción de Ag^+ a Ag^0 en forma de nanopartículas esféricas con tamaños desde los 20 nm hasta aglomerados de 500 nm. Se evaluó la propiedad antibacteriana a concentraciones de 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/L de nanopartículas de plata ante *Escherichia coli*, donde se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.62 mg/L de nanopartículas de plata en cultivo acuoso y una concentración mínima bactericida de 0.62 mg/L de nanopartículas de plata en cultivos en agar. De igual forma los ensayos de actividad metabólica mostraron que concentraciones de 10 y 20 mg/L de nanopartículas de plata presentan un efecto toxico inhibitorio en las bacterias.

Posteriormente se fabricaron geomembranas de polietileno y polipropileno con impregnación de nanopartículas en concentraciones de 100 a 600 mg/L. La caracterización de las geomembranas por microscopia electrónica de barrido y espectroscopia de absorción atómica corroboran la impregnación de las nanopartículas de plata, inmersas en las porosidades

del polímero. De igual forma se evaluó su propiedad antibacteriana ante *Escherichia coli*, como resultado se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 200 mg/L de nanopartículas de plata en polipropileno y 100 mg/L de nanopartículas de plata en polietileno, mientras que la concentración mínima bactericida fue de 100 mg/L de nanopartículas de plata en ambos polímeros, polietileno y polipropileno. Las geomembranas fabricadas en este trabajo se compararon con geomembranas con biocidas convencionales como triclosan o oxibisfenoxarsina, así como con nanopartículas de plata acompañadas con óxido de silicio y óxido de titanio. La mayor inhibición se presentó con la geomembrana fabricada en este trabajo de polietileno con 300 mg/L de nanopartículas de plata, por otro lado, a pesar de que la geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de nanopartículas de plata presentó un mayor crecimiento de *Escherichia coli*, los resultados son comparables con la inhibición por parte de las geomembranas comerciales.

El uso de 20 mg/L de nanopartículas por individual dispersas en el medio acuoso resultó en la mayor inhibición de *Escherichia coli*, sin embargo su impregnación en una matriz polimérica evita su pérdida en los flujos de agua, así como prolonga el efecto antibacteriano con una liberación paulatina de iones de plata. Con las pruebas de liberación de plata se calcula un tiempo de vida de 9 años en el caso de polietileno y de 8 años en el caso de polipropileno.

Con base en lo anterior se puede decir que el uso de nanopartículas de plata sintetizadas con bacterias anaerobias es una alternativa viable, de bajo costo energético y menor impacto ambiental en comparación con métodos fisicoquímicos, para el desarrollo de geomembranas con propiedades antibacterianas para la desinfección de agua contaminada con *Escherichia coli*.

Abstract

Maintaining water quality is a challenge due to biological contamination. *Escherichia coli* is one of the bacteria that causes diarrheal diseases, so it is important to avoid its spread in water reservoirs. Conventional disinfection methods involve the use of chlorinated compounds or biocides, however these present adverse health effects and damage to the environment. Research in new materials proposes coatings with polymers impregnated with silver nanoparticles to take advantage of their antibacterial properties. Among the nanoparticle synthesis methods, the use of microorganisms and plant extracts stands out due to their low environmental impact and energy cost compared to physicochemical methods. Anaerobic digestion of methanogenic bacteria provides the necessary conditions for the reduction of ionic silver to metallic silver.

Based on the above, the present work proposes the development of geomembranes with antimicrobial properties by impregnating them with silver nanoparticles, these ones synthesized with anaerobic bacteria, for the disinfection of water contaminated with *Escherichia coli*. The first part of the work focuses on silver nanoparticles. The synthesis was carried out in the mineral medium of methanogenic bacteria in batch systems. The characterization by UV-vis spectroscopy, scanning electron microscopy and X-ray diffraction confirmed that the specific methanogenic activity conditions allowed the reduction of Ag^+ to Ag^0 in the form of spherical nanoparticles with sizes from 20 nm to agglomerates of 500 nm. The antibacterial property was evaluated at concentrations of 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L of silver nanoparticles against *Escherichia coli*, where the minimum inhibitory concentration was 0.62 mg/L of silver nanoparticles in aqueous culture and the minimum bactericidal concentration was 0.62 mg/L of silver nanoparticles in agar cultures. Similarly, the metabolic activity tests showed that concentrations of 10 and 20 mg/L of silver nanoparticles present an inhibitory toxic effect on bacteria.

Subsequently, polyethylene and polypropylene geomembranes with nanoparticle impregnation were manufactured in concentrations of 100 to 600 mg/L. The characterization of the geomembranes by scanning electron microscopy and atomic absorption spectroscopy corroborates the impregnation of the silver nanoparticles, immersed in the porosities of the polymer. Similarly, its antibacterial property was evaluated against *Escherichia coli*, the result

of minimum inhibitory concentration was 200 mg/L of silver nanoparticles in polypropylene and 100 mg/L of silver nanoparticles in polyethylene, while the minimum bactericidal concentration was 100 mg/L of silver nanoparticles in both polymers, polyethylene, and polypropylene. The geomembranes manufactured in this work were compared with geomembranes with conventional biocides such as triclosan or oxybisphenoxarsine, as well as with silver nanoparticles accompanied with silicon oxide and titanium oxide. The highest inhibition presented was with the geomembrane manufactured in this work of polyethylene with 300 mg/L of silver nanoparticles, on the other hand, even though the polypropylene geomembrane with 200 mg/L of silver nanoparticles presented a higher growth of *Escherichia coli*, the results are comparable with the inhibition by commercial geomembranes.

The use of 20 mg/L of nanoparticles per individual, dispersed in the aqueous medium resulted in the greatest inhibition of *Escherichia coli*, however its impregnation in a polymeric matrix prevents its loss in water flows, as well as prolongs the antibacterial effect with a gradual release of silver ions. With the silver release tests, the shelf life calculated was of 9 years for polyethylene and 8 years for polypropylene.

Based on the above, it can be said that the use of silver nanoparticles synthesized with anaerobic bacteria is a viable alternative, with low energy cost and less environmental impact compared to physicochemical methods, for the development of geomembranes with antibacterial properties for the disinfection of water contaminated with *Escherichia coli*.

1. Introducción

El agua es uno de los recursos naturales de mayor importancia para el desarrollo del hombre y de los ecosistemas. Del total de agua en la Tierra solo el 2.5% es agua dulce para consumo humano, éste se encuentra en los polos, cumbres de montañas, acuíferos, donde aproximadamente el 0.01 % escurre a cuencas hidrográficas ríos, arroyos, lagos y lagunas. El uso de este recurso abarca el área agrícola, doméstico, industrial, acuicultura intensiva, recreativo, etc. Si bien el agua suministrada a los usuarios es distribuida con los estándares de calidad y normas de cada país, la disposición y almacenamiento de agua pueden ser puntos de contaminación debido a la falta de higiene y prácticas de desinfección, que junto a factores externos disminuyen la calidad necesaria para su consumo (Heinscheimer, 1967).

Las fuentes de contaminación se pueden clasificar como física, química o biológica al alterar la composición del agua y volverla no apta para su consumo. La contaminación de este recurso representa un problema de salud pública al ser causa de diversas enfermedades como hepatitis infecciosa, fiebre tifoidea, amebiasis, etc. Los contaminantes físicos incluyen el calor y las radiaciones causando efectos de promoción o inhibición de microorganismos o especies patógenas en el agua. La contaminación química incluye compuestos o elementos químicos que impiden su consumo. La contaminación biológica se da por hongos, bacterias, virus o esporas que incentivan el crecimiento de plantas acuáticas y proliferación de enfermedades (Ivanissevich, 1974).

El amplio rango de posibles agentes patógenos en el agua imposibilita su monitoreo por individual, por lo que se trabaja con indicadores de la calidad del agua, como la bacteria *Escherichia coli*, la cual es representativa de agua contaminada por desechos fecales y posible presencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* y *Cryptosporidium* (Khan y Gupta, 2020). El consumo de estos microorganismos tiene efectos perjudiciales a la salud al ser causante de enfermedades gastrointestinales.

El problema de contaminación biológica se ha atacado de forma química con la cloración, de forma física con el uso de luz ultravioleta y recientemente con la adición de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas, como las nanopartículas de dióxido de titanio, dióxido de zinc o plata. Adicionalmente para tener un efecto residual en el uso de estos antibacterianos, se propone integración de esta propiedad a otros materiales mediante su

impregnación, de modo que se pueda tener un recubrimiento antibacteriano para superficies propensas a contaminación biológica. La estructura de los polímeros permite incorporar aditivos que le brinden nuevas características conservando su conformación como geomembrana.

Estos nuevos materiales que se encuentran en el área de la nanotecnología presentan propiedades distintas a su contraparte macromolecular. El tamaño nanométrico y mayor área superficial les proporcionan una interacción distinta con la materia. En particular el estudio de nanopartículas de plata (Iravani *et al.*, 2014) muestra su capacidad bactericida ante diversos microorganismos. La síntesis de nanomateriales se puede clasificar como física, química o biológica. Debido al alto consumo energético y el manejo de reactivos contaminantes para el medio ambiente se ha optado por metodologías más sustentables como el uso de extractos de platas o bacterias. (Khodashenas y Ghorbani, 2015)

La síntesis biológica de nanopartículas tiene varias ventajas, al ser un método de síntesis rápida, sin daños al medio ambiente, así como provee una amplia gama de recursos biológicos de bajo costo y alta disponibilidad. Los microorganismos que llevan a cabo la síntesis biológica son bacterias, hongos, levadura y actinomicetos, todos mediante el uso de enzimas y proceso que puede ser extracelular o intracelular. Es por lo que, en el caso de este estudio se elige una ruta verde para la síntesis de nanopartículas con un consorcio de bacterias anaerobias.

La síntesis se lleva a cabo al activar a las bacterias anaerobias, mismas que suelen utilizarse en el tratamiento de aguas residuales. Mediante sus rutas metabólicas las bacterias consumen la materia orgánica del agua y desarrollan un medio con potencial oxidoreducción negativo. En este medio la plata soluble es capaz de reducirse a plata metálica en forma de nanopartículas (García-Torres, 2019). Una vez sintetizadas, se pueden aprovechar sus propiedades antimicrobianas de diversas formas, una de ellas es su dispersión en el agua, sin embargo, esto representa una falta de distribución homogénea y pérdidas de las nanopartículas en el efluente, otra opción es posicionar las nanopartículas en sitios proclives a contaminación biológica.

Debido a que un punto de infección previo al consumo de agua es en su almacenamiento, se recomienda que contenedores como tambos, cisternas, aljibes puedan contar con propiedades antibacterianas. El presente trabajo propone la fabricación de una geomembrana integrada por

una matriz polimérica e impregnada con nanopartículas de plata sintetizadas por una ruta verde. La finalidad de esta geomembrana es usarla como recubrimiento en superficies que almacenen agua y evitar la proliferación de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, contando así con un almacenamiento que mantiene la calidad del agua y previene las enfermedades que se propagan por este medio.

2. Antecedentes de geomembranas impregnadas con nanopartículas y su efecto sobre *Escherichia coli*

2.1 Problemática de contaminación del agua

El agua potable además de ser un recurso vital en el desarrollo del hombre es un derecho humano, su acceso y saneamiento deben estar garantizados con los estándares de calidad para consumo humano desde su potabilización hasta su disposición y consumo. La calidad del agua hace referencia a las características químicas, físicas y biológicas, esta medida es con relación a las condiciones del agua y su impacto en el uso que se le da, sea para fines industriales, domésticos, de agricultura o recreativo. Los estándares que evalúan la calidad del agua se establecen para mantener la salud de los ecosistemas, la seguridad al contacto humano y el abastecimiento de agua potable (Weber, 1979).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera el agua contaminada cuando su composición es alterada de modo que no reúne las condiciones para el consumo del hombre o animales. Dado que su acceso y disponibilidad es esencial para el desarrollo del hombre, la potabilización debe asegurar un proceso de desinfección para prevenir daños en la salud de quien la consuma.

La contaminación del agua trae consigo la aparición de diversas enfermedades y otros riesgos para la salud humana, causados por diversos contaminantes. La contaminación biológica involucra la presencia de bacterias, virus, hongos, protozoos o cualquier microorganismo que alteren la composición del agua. Los microorganismos pueden ser patógenos y transmisores de infecciones, la mayoría de los cuales se originan por los residuos fecales de animales (Gerba, 2009).

Según datos de la OMS a nivel mundial alrededor de 2000 millones de personas se abastecen de una fuente de agua potable contaminada por heces, misma que puede transmitir enfermedades como diarrea, cólera, disentería, fiebre tifoidea, poliomielitis entre otras. A nivel mundial la diarrea causa más de 502 000 muertes al año y en el caso de México, datos de SEMARNAT y CONAGUA del 2011 plantean a la diarrea como la principal enfermedad intestinal del país, al año se presentan 5521 casos por cada 100 000 habitantes. El problema de contaminación biológica se puede dar por infiltración de agentes patógenos en puntos que

pueden ir desde un incorrecto tratamiento que asegure la ausencia de agentes patógenos, la distribución y hasta el almacenamiento de agua potable en los hogares (Olivares y Sandoval, 2008).

Según datos del Consejo Consultivo de Agua en el 2011 en México el 91% del agua suministrada a zonas urbanas cuenta con un tratamiento de desinfección y en zonas rurales llega a un 48%. En el país hay 1.6 millones de personas que habitan en zonas urbanas sin acceso al agua potable y 3.8 millones sin saneamiento básico, por su parte en zonas rurales son 7.2 millones de personas sin acceso al servicio de agua potable y 13.2 millones de personas sin saneamiento.

La calidad microbiana del agua se estudia a través de indicadores que evalúan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos. Estos parámetros se establecen en normas que garantizan la seguridad del agua, de modo que su cumplimiento reduce el riesgo a contraer enfermedades infecciosas (Cortés-Lara, 2003). La norma NOM-127-SSA1-1994, establece para el uso y consumo de agua potable un máximo de organismos coliformes totales de 2 UFC/100 mL y organismos coliformes fecales: No detectable NMP/100 mL.

Los organismos coliformes son un grupo de bacterias conformados por los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Se distingue a los coliformes fecales como los organismos de origen intestinal, mientras que, los coliformes totales comprenden a la totalidad del género. Las bacterias coliformes llegan a encontrarse en el medio ambiente acuático, suelo y vegetación. Debido a que existe una amplia gama de especies contaminantes en 1890 se designó a la bacteria *Escherichia coli* (comúnmente abreviada como *E.coli*) como indicador de la calidad del agua debido a que su presencia esta vinculada con la presencia de otros microorganismos patógenos (Khan y Gupta, 2020).

Otros organismos que se pueden encontrar en el agua pueden ser patógenos de origen humano como *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Vibrio cholera*, *Cryptosporidium parvum*, *rotavirus*, *Giardia cysts*, microorganismos libres como *Microcystis aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, de aquí la importancia de preservar la calidad del agua, para proteger a quienes la consumen, de las diferentes enfermedades que se transmiten por el agua.

2.2 Presencia de *Escherichia coli* en el agua

Escherichia coli es una bacteria patógena del tipo gram negativa, tiene una capa delgada de peptidoglucano con una membrana externa adicional de lipopolisacáridos, es anaerobia facultativa y no esporulante. La forma de esta bacteria es de bastoncillo con un tamaño de 2 μm de largo y 0.5 μm de diámetro. Se encuentra comúnmente en el intestino delgado de organismos de sangre caliente (endotermos) y es desechado en la materia fecal. Esta especie de bacteria está compuesta por 14 serotipos, algunos de los cuales causan gastroenteritis, y enfermedades diarreicas debido a su consumo en alimentos o agua contaminada (Odonkor y Ampofo, 2013).

La presencia de *E.coli* indica un mayor riesgo de presencia de bacterias y virus transmitidos por heces fecales como *Salmonella spp* o hepatitis A. El análisis en muestras de agua indica que *E.coli* es capaz de sobrevivir meses en sedimentos de recipientes de agua. La respiración de esta bacteria puede ser aerobia o anaerobia mediante pares redox, con oxidación de ácido pirúvico, ácido fórmico, hidrógeno y aminoácidos, y la reducción de nitrato, dimetilsulfóxido y trimetilamina N-óxido (Ingledeew y Poole, 1984). Las condiciones óptimas para el desarrollo de *E.coli* es una temperatura de 37°C, sin embargo, en pruebas de laboratorio se ha incubado desde los 25°C a 55°C con pH de 3 a 9 (Sussman, 1997).

El consumo de agua o alimentos contaminados con *E.coli* puede provocar infección cuando el patógeno se aloja en el huésped. El período de incubación para el inicio de la enfermedad es de 1 a 2 días y se produce cuando la cantidad de bacterias ingeridas es de 10^6 y 10^{10} bacterias, éstas se establecen en el epitelio intestinal y producen afectaciones en el funcionamiento del sistema gastrointestinal con síntomas que incluye náuseas, vómito, diarrea y fiebre, síntomas molestos para adultos sanos pero letal para infantes (Mirhoseini *et al.*, 2018). Una vez que la enfermedad se desarrolla puede contagiar a otros por las secreciones y residuos fecales.

La agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA), la Comisión Europea (EC) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomiendan el uso de pruebas basadas en la concentración de *E.coli*, como predictor de contaminación fecal y e indicador de riesgo por enfermedades transmitidas en el agua, además de mostrar similitudes en la persistencia de otros patógenos en el medio y de los efectos del tratamiento de aguas en la viabilidad celular en comparación con otros patógenos transmitidos por el agua (Odonkor y Ampofo, 2013).

Los alimentos y el agua contaminada son las formas más comunes de exponerse a *E.coli*. Una persona que consume alimentos o agua contaminada puede experimentar náuseas, vómitos, cólicos abdominales, diarrea y fiebre. La presencia de *E.coli* puede ser indicativo de la contaminación con otras bacterias, virus o protozoos patógenos como la *Salmonella*, bacteria comúnmente implicada al consumo de alimentos o agua contaminados y causante de fiebre tifoidea. *Cryptosporidium* es otro patógeno transmitido por el agua que afecta el tracto gastrointestinal de humanos y animales, se elimina en forma de oosquistes en heces fecales y suele ser muy resistente al cloro utilizado en el tratamiento de agua potable. El ganado en su materia fecal produce millones de bacteria *E.coli*, *Giardia cysts* y esporas de *Cryptosporidium*, en residuos fecales del pollo es común encontrar *Salmonella* y *Campilobacter*, por su parte, los fertilizantes de la tierra suelen ser arrastrados por las lluvias y contaminar cuerpos de agua superficiales o subterráneos (Gerba, 2009).

Para preservar la calidad del agua se debe mantener a los animales de cualquier tipo alejados de depósitos de agua, recoger los desechos fecales de mascotas y animales, evitar la formación de ambientes sépticos e identificar las escorrentías que puedan contaminar los lugares de disposición del agua. Ante la contaminación fecal del agua se debe evitar el contacto y consumo hasta que la presencia de *E.coli* sea indetectable y el agua se considere nuevamente segura. Garantizar la seguridad del agua es un desafío continuo, por lo que el desarrollo de materiales desinfectantes o antibacterianos en el agua es fundamental para proteger la salud pública ante las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por el agua.

2.3 Métodos de desinfección de agua

La desinfección del agua involucra la extracción, desactivación y/o eliminación de los microorganismos patógenos del agua de igual forma se buscan sistemas que prevengan el crecimiento y reproducción. Debido a la amplia gama de enfermedades que se pueden transmitir por el agua, la desinfección de ésta toma importante relevancia cuando se trata de agua para su consumo. Los mecanismos por los cuales se lleva la desinfección consisten en cambios en la permeabilidad de la célula, destrucción de la pared celular, cambios en la actividad enzimática, de modo que no es posible la reproducción celular (Caceres, 1990).

A lo largo de la historia los métodos de desinfección han evolucionado desde la exposición al sol, filtrar el agua, almacenarla en recipientes de plata (Daub y Seese, 1996) y en

la actualidad los desinfectantes químicos son los de mayor uso doméstico y los físicos para uso industrial, a continuación, se enlistan los métodos más empleados:

Cloración: en distintas presentaciones se utiliza el cloro elemental gaseoso (Cl_2), el hipoclorito de sodio (ClO^-), el dióxido de cloro (ClO_2) y la mezcla de cloro con amoníaco o cloramina (Cl_2/NH_3). El mecanismo de acción es por la ruptura de uniones moleculares e intercambio de átomos en las enzimas, un hidrogeno puede ser sustituido por un átomo de cloro y desestabilizar las enzimas, además de provocar una oxidación debido a los átomos oxígeno libres. Sin embargo, factores como la concentración de uso, temperatura, pH, y presencia de materia orgánica determinan su efectividad como desinfectante. Por otro lado, el exceso de uso de cloro puede provocar afecciones a nivel salud en el sistema respiratorio con efectos de tos, dolores de pecho y acumulación de fluidos en pulmones, así como irritación de ojos y piel (Gonzalez-Bosquet 2003).

Luz Ultravioleta (UV): la radiación ultravioleta de alta energía provoca reacciones fotoquímicas en componentes de las células como la membrana, en las proteínas y ácidos nucleicos del RNA y ADN hasta provocar su ruptura, por lo que interrumpe la mayoría de sus mecanismos de reproducción. Es un método de inactivación de bacterias, virus y protozoarios, sin embargo, para tener un efecto residual es necesario la adición de agentes químicos o de otra forma se da un crecimiento de microorganismos (Weber, 1979).

Permanganato de potasio: por su potencial oxidante es buen inhibidor de bacterias coliformes como *Vibrio cholerae*, *Salm, typhi* y *Bact. Flexner*, también ayuda a controlar el olor, sabor y remover metales como hierro y manganeso (Font, 2001). Sin embargo, el lapso para lograr una buena desinfección es largo. También presenta afecciones en sistema respiratorio cuando éste es inhalado y una prolongada exposición provoca irritaciones en piel y ojos.

Triclosán (5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi) fenol): es un biocida de amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas no esporulantes, hongos como como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*, sin embargo, otras bacterias gram-negativas como *P. aeruginosa* son resistentes a este compuesto al contar con una membrana externa que dificulta su entrada. El mecanismo de acción del triclosán inhibe en las bacterias la enoil-acil reductasa, una enzima para la síntesis de ácidos grasos. En la actualidad se utiliza como ingrediente antiséptico en productos de cuidado personal, así como a ropa, muebles juguete. Sin embargo,

se ha demostrado que se absorbe en la mucosa, piel, boca y tracto gastrointestinal y llega a provocar alergias, resistencia a antibióticos, alteraciones endocrinas, y bioacumulación. De igual forma es considerado como ecotóxico por estudios en algas acuáticas (Adolfsson-Erici *et al.*, 2002).

OBPA (10,10'-Oxibisfenoxarsina): es un agente fungicida y antibacteriano de amplio espectro utilizado principalmente para integrarlo en PVC no plastificado, poliuretano y latas de dibutilo (Turner y Filella, 2021). Sin embargo, un estudio de Zitko en 1999 encontró que es altamente tóxico para la biota acuática, por lo que no se debe integrar a materiales de construcción que alberguen fauna acuática. Igualmente, por su contenido de arsénico ($C_{24}H_{16}As_2O_3$) se restringió su uso en Estados Unidos por deterioro ambiental y perfil de toxicidad a largo plazo (Jones 2009).

Nuevos estudios han encontrado que el uso de desinfectantes convencionales puede formar subproductos nocivos (DBPs, por las siglas en inglés). Entre los más comunes se encuentran el cloro libre, las cloraminas y el ozono que en ambientes de agua natural pueden reaccionar para formar DBPs (Krasner *et al.*, 2006). Algunos DBPs como trihalometanos, (THM) y los ácidos haloacéticos (AHA) se asocian a cáncer, mutaciones, defectos de nacimiento, problemas hepáticos, renales y del sistema nervioso central. Debido a los daños a la salud y al medio ambiente se empieza a replantear el uso de desinfectantes convencionales con nuevos materiales que su mecanismo de desinfección no de la formación de DBPs (Srinivasan y Sorial, 2011). La mayoría de los desinfectantes de agua son orgánicos y continúa el reto de inhibir el crecimiento bacteriano de manera efectiva sin que en el intermedio se creen subproductos nocivos por el uso de desinfectantes químicos convencionales. Una nueva propuesta sugiere el uso de materiales inorgánicos como desinfectantes debido a su mayor resistencia térmica, estabilidad química y periodos de duración más largos (Pomogailo y Kestelman, 2005). Así como nuevas formas de distribuir el agente antibacteriano.

Nanopartículas metálicas: los metales a escala nanométrica interactúan directamente con las bacterias, sin embargo, no tienen mecanismos de toxicidad bacteriana específicos, no se unen a un receptor específico en la célula bacteriana, esta es una ventaja debido a que dificulta el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias, además de tener un amplio espectro de actividad antibacteriana, tanto en bacterias gram positivas como gram negativas (Sánchez-

López *et al.*, 2020). Ejemplo de los metales más estudiados por su actividad antibacteriana son las nanopartículas de plata (AgNPs) por la liberación de iones de plata que crean un estrés oxidativo en la bacteria; de dióxido de titanio (TiO₂NPs) por la producción de radicales de hidroxilos libres y peróxido formado bajo irradiación UV-A (Kikuchi *et al.*, 1997); de dióxido de zinc (ZnONPs) a través de la generación fotocatalítica de peróxido de hidrógeno (Sawai, 2003).

2.4 Nanopartículas de plata

La plata se considera como uno de los metales nobles de mayor valor debido a sus propiedades como conducción eléctrica y calorífica, para el aprovechamiento de sus características se ha utilizado en forma pura y en aleaciones. En la medicina se ha utilizado desde la antigüedad debido a sus propiedades antibacteriales, su uso es en forma de plata coloidal y mayormente de forma externa por medio de vendas para tratamientos para heridas y quemaduras, otro ejemplo de aplicación que se le ha dado es en la purificación de agua mediante filtros a base de plata igualmente usados desde la antigüedad con jarrones de plata (Jefferson, 1943; Alexander, 2009).

De la toxicidad de este metal se ha reportado que, ante una absorción por vías cutáneas, digestivas o respiratorias, de plata en forma de iones o nanocristales, el metal se conglomeraba como partículas y causa argiria, una coloración gris-azulada en la piel, mucosa y algunos órganos. Esta enfermedad se presenta en dosis acumuladas de 70 a 1500 mg de plata/kg de peso corporal (Arenas, 2015). A pesar de tener un bajo potencial de irritación en contacto con la piel, se reporta irritación ocular y alergias dérmicas, además de efectos hepáticos, renales y hematológicos (Hadrup *et al.*, 2018). Goff y Powers en 1975 reportaron que la plata se une en el ADN a las bases de purina y pirimidina, lo que aumenta la posibilidad de interferir en la función normal de los genes, sin embargo, se menciona que son necesarios más estudios sobre su interacción y así determinar el impacto en cuanto a genotoxicidad y carcinogenicidad. Foldbjerg (2015) reporta que uno de los mecanismos de citotoxicidad de las nanopartículas de plata es debido a la oxidación producida por los iones de plata presentes en la superficie de la nanopartícula.

La escala nanométrica comprende tamaños de partícula o complejos entre 1 y 100 nm, a dicha escala la materia interactúa de distinta manera y se adquieren nuevas propiedades, ejemplo

de esto, las nanopartículas de plata cuentan con actividad bactericida y fungicida, alta conductividad eléctrica y térmica (Korbekandi y Iravani, 2012) gran área superficial, estabilidad en condiciones ambientales, amplio rango de absorción en la región del visible y el infrarrojo lejano, estabilidad química, actividad catalítica (Ahmed *et al.*, 2017; Sang *et al.*, 2012; Zivic *et al.*, 2017). La nanotecnología se encarga del estudio, diseño, fabricación de materiales con escalas nanométricas incluyendo las variables en su síntesis que otorgue debido a su tamaño, forma, composición o polidispersión nuevas propiedades para aplicaciones en diversos campos.

Las nanopartículas de plata se han integrado a distintos materiales con el fin de otorgarles nuevas características. En el área de la medicina las aplicaciones de las nanopartículas de plata han sido para terapia y diagnóstico. Al ser antimicrobianas se pueden añadir recubrimientos tanto a instrumentos de operación, como refuerzos en la matriz en materiales ortopédicos o implantes cardiovasculares (Qiu y Qian, 2008). La industria electrónica hace uso de las nanopartículas para conectores en circuitos o electrodos. En circuitos integrados, las tintas de plata han sustituido las conexiones alámbricas (Zhang *et al.*, 2016). Otros usos médicos son preventivos al añadir las nanopartículas a calcetines, toallas, ropa de trabajo y pinturas para paredes con el fin de evitar olor y crecimiento de bacterias (Barkat *et al.*, 2013)

La caracterización de las nanopartículas de plata se puede llevar a cabo mediante espectroscopia electrónica de barrido (MEB) para determinar la morfología y superficie de las nanopartículas; la espectrometría de dispersión de rayos X (EDS) nos permite identificar los elementos presentes en la estructura y conocer posibles impurezas; mediante la espectroscopia electrónica de transmisión (MET) se obtienen imágenes e información acerca del tamaño y aglomeración de las nanopartículas; por difracción de rayos-X (DRX) se obtiene el patrón de difracción y la orientación y planos cristalográficos de las partículas; mediante espectroscopia de absorción UV-visible se puede determinar el plasmón de resonancia de superficie característico de cada metal, un pico alrededor de 400 nm confirma la presencia de las nanopartículas de plata, así con un análisis por espectrometría de absorción atómica (EAA) permite conocer la concentración de iones de plata en solución. Otra forma para determinar presencia del metal resulta evidente debido al cambio de color amarillo claro a café oscuro, asociado a la formación de nanopartículas de plata. Adicionalmente la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) nos permite identificar las posibles biomoléculas responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas.

La interacción entre las nanopartículas de plata y las bacterias lleva a distintas rutas o mecanismos bajo los cuales se interfiere en procesos metabólicos de la célula hasta llevarla a su muerte. La carga negativa de las paredes de la membrana bacteriana interactúa electrostáticamente acercando a la carga positiva de las nanopartículas de plata. La unión y acumulación de las nanopartículas en la membrana resultan en su ruptura y consecuente permeabilidad (Sánchez-López *et al.*, 2020). De anclarse en la membrana, las nanopartículas pueden interrumpir la cadena transportadora de electrones, necesaria como ruta de respiración, de igual forma representa un obstáculo en la obtención de nutrientes del exterior al interior de la bacteria (Tang y Zheng, 2018).

Otro mecanismo de inhibición en el crecimiento de bacterias lo reporta Palza (2015) con la liberación de iones metálicos para crear un estrés oxidativo en el interior de la célula, al generar especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones de superperóxido (O_2^-) y radicales hidroxil ($OH\cdot$) que lleva a la oxidación de distintos componentes celulares (Qing *et al.*, 2018). Los iones de plata interactúan con los grupos tiol en las proteínas, lo que resulta en la inactivación de las enzimas respiratorias (Matsumura *et al.*, 2003). Otra interacción importante de los iones de plata es con el ADN de la bacteria ya que los iones son capaces de formar complejos con los ácidos nucleicos al interactuar especialmente con los nucleósidos en lugar de los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, causando así un daño al ADN de la bacteria (Ahmed, 2017). En la Figura 2.1 se ejemplifican algunos de estos mecanismos en general para nanopartículas metálicas.

El desempeño de las nanopartículas de plata también depende de sus características como tamaño, forma o dispersión. Tang y Zheng en 2018 reportan que nanopartículas de tamaños entre 1 y 75 nm son capaces de penetrar a la bacteria, mientras que tamaños superiores a 75 nm se acumulan en la membrana de la bacteria hasta su ruptura, en ambos casos existe una liberación de iones que desestabiliza a la bacteria. Con respecto a la forma de las nanopartículas de plata Helmlinger *et al* (2016) hace una comparación de efecto antibacteriano para platos, esferas, rodillos y cubos. Las esferas tenían tamaños de 40 a 80 nm y de 120 a 180 nm, los platos eran de 20 a 60 nm, los cubos eran de 140 a 180 nm y los rodillos de 80 a 120 nm. La diferencia radica en el área superficial específica de modo que el efecto de mayor toxicidad fue para los platos y esferas mientras que los rodillos y cubo presentaron menor capacidad bactericida. De

igual forma entre los tamaños de nanopartículas esféricas, las de 20 a 60 nm obtuvieron una concentración mínima inhibitoria de 12.5 mg/L de AgNPs para *Staphylococcus aureus*.

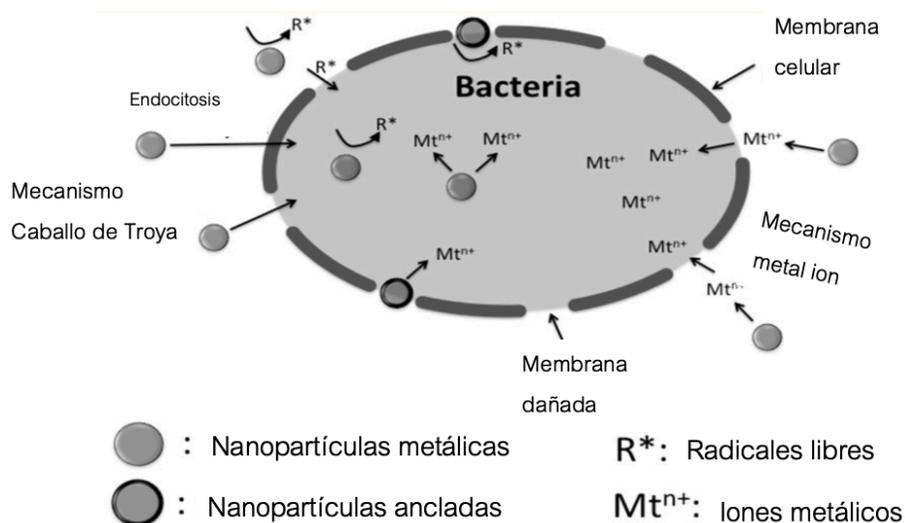


Figura 2.1 Mecanismos antimicrobianos de nanopartículas (Palza, 2015)

2.5 Síntesis biológica de nanopartículas de plata

Los métodos de síntesis de nanopartículas se pueden clasificar como físicos, químicos, fotoquímicos y biológicos o síntesis verde. Los métodos físicos se consideran como *top-down* debido a que se parte de un metal en bulto que se va fraccionando hasta llegar a escalas nanométricas sin embargo esto requiere de altas cantidades de energía, lo que eleva el costo de síntesis y lo hace menos aplicable (Ghorbani *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2016). Los métodos químicos se consideran como *bottom-up* debido a que involucran tres componentes principales la presencia de sales o precursores del metal, que sufrirán una reducción química para crecer como nanopartícula metálica debido a un agente reductor, así como surfactantes químicos que eviten su aglomeración a mayores tamaños, las desventajas que presenta son el uso de reactivos que generalmente son caros, nocivos para la salud, inflamables y generan contaminación ambiental debido a los metales pesados. Por otro lado, la síntesis biológica de las nanopartículas tiene varias ventajas, al ser un método de síntesis rápida de igual forma *bottom-up*, sin daños al medio ambiente, así como proveer una amplia gama de recursos biológicos de bajo costo y alta disponibilidad (Park, *et al.*, 2011). Los microorganismos que llevan a acabo la síntesis biológica son las bacterias, hongos, levadura y actinomicetos, todos mediante el uso de distintas enzimas

con un proceso que puede ser extracelular o intracelular (Thakkar *et al.*, 2010). En la Tabla 2.1 se presentan trabajos de síntesis verde de nanopartículas de plata, así como el microorganismo con el cual se comprobó su actividad antimicrobiana.

Tabla 2.1 Trabajos de síntesis biológica de nanopartículas de plata

Especie	Microorganismo	Morfología	Tamaño (nm)	Microorganismo evaluado	Referencia
Bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	Esférica	20-40	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i>	Sunkar <i>et al.</i> , 2012
Planta	<i>Garcinia mangostana</i>	Esférica	35	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Veerasamy <i>et al.</i> , 2010
Planta	<i>Datura alba</i>	Esférica	28	<i>Clostridium diphtheria</i>	Nalwade y Jadhav, 2013
Bacteria	Cultivo mixto de bacterias anaeróbicas	Esférica	5-65	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus amylophilus</i> , <i>Salmonella enterica</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2014
Alga	<i>Tetraselmis gracilis</i>	Esférica	28-122	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Shahverdi <i>et al.</i> , 2007

Monopoli *et al* (2012) reportan una mayor biocompatibilidad de las nanopartículas por síntesis verde, al adsorber progresiva y selectivamente biomoléculas cuando entran en contacto con fluidos biológicos complejos, lo que resulta en la formación de una corona que interactúa con los sistemas biológicos, en otras palabras, se da la unión de componentes biológicamente activos en la superficie de las nanopartículas sintetizadas cuando se utilizan fuentes biológicas. Otras ventajas del proceso es la posibilidad de añadir grupos funcionales a la superficie de las nanopartículas para hacerlas biológicamente activas. Durante la síntesis no se requiere añadir agentes estabilizadores dado que los propios componentes biológicos actúan como agentes de cobertura y estabilizadores.

García-Torres en 2019 reporta una síntesis biológica de nanopartículas de plata mediante el uso de lodos metanogénicos y la evaluación de la actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*. Los experimentos fueron en lodo granular y biopelícula, con una remoción de plata del 93% y del 89% respectivamente. Las condiciones de digestión anaerobia de las bacterias

metanogénicas redujeron el medio mineral a valores de -350 mV con un pH neutro, brindaron el medio para reducir los iones de plata a plata metálica, lo cual se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido obteniendo nanopartículas de 2 a 20 nm y aglomerados de 70 a 1000 nm. Los mecanismos que propone García-Torres (2019) consisten en la reducción debido a las condiciones de potencial óxido-reducción (ORP) y pH; por la oxidación de la coenzima NADH de las mismas bacterias; o la disponibilidad de sitios de carga negativa sobre la biopelícula para la nucleación y reducción del metal. Al evaluar su acción bactericida se encontró la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida en 1.25 mg/L de AgNPs en presencia de *Escherichia coli*. Las nanopartículas de plata tienen un gran área superficial y sitios activos en comparación con su contraparte en bulto, de manera que su uso es una alternativa de mayor costo beneficio como agente antimicrobiano.

En 2016 Ruiz-Castillo reportó la recuperación de plata en forma de nanopartículas mediante sistemas biológicos anaerobios de lodo granular y biopelícula. Su trabajo evaluó el efecto tóxico de la plata soluble sobre un lodo granular de bacterias anaerobias, así como el mismo efecto sobre una biopelícula anaerobia en un soporte de polietileno de baja densidad en un reactor de lecho fluidificado inverso. Ambos sistemas debido a su activación y proceso de digestión anaerobia mostraron una disminución del potencial óxido-reducción que permitió la reducción de la plata soluble, con una remoción mayor al 96%. La caracterización del efluente demostró una síntesis de nanopartículas con morfología irregular y tamaño de 2 a 45 nm. La propiedad antibacteriana de las nanopartículas mostró una inhibición en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

2.6 Digestión anaerobia

Las bacterias anaerobias descomponen la materia orgánica en ausencia de oxígeno, este proceso metabólico se llama digestión anaerobia. Las cuatro etapas del proceso son hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metagénesis, obteniendo como resultado biogás como metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), hidrógeno en forma de gas (H₂), ácido sulfhídrico (H₂S), digestato o productos inorgánicos como nitrógeno, potasio, fósforo, calcio y compuestos de difícil degradación. Las bacterias que llevan a cabo esta transformación son del tipo bacterias hidrolíticas, acetogénicas, metanogénicas, sulfato reductoras y acidogénicas, las cuales se organizan en gránulos de lodo como se observa en la Figura 2.2.

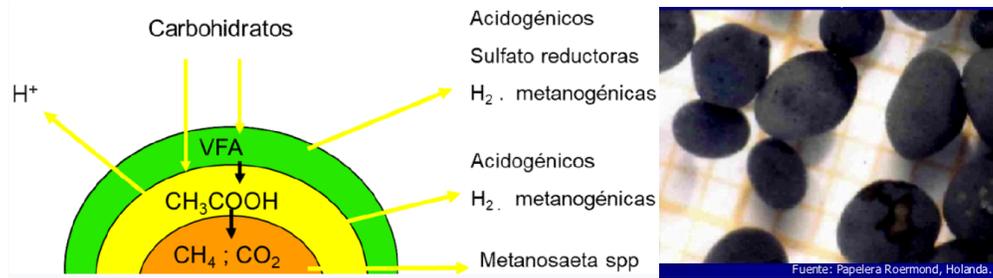


Figura 2.2 Comunidades de bacterias anaerobias en gránulos de lodo.

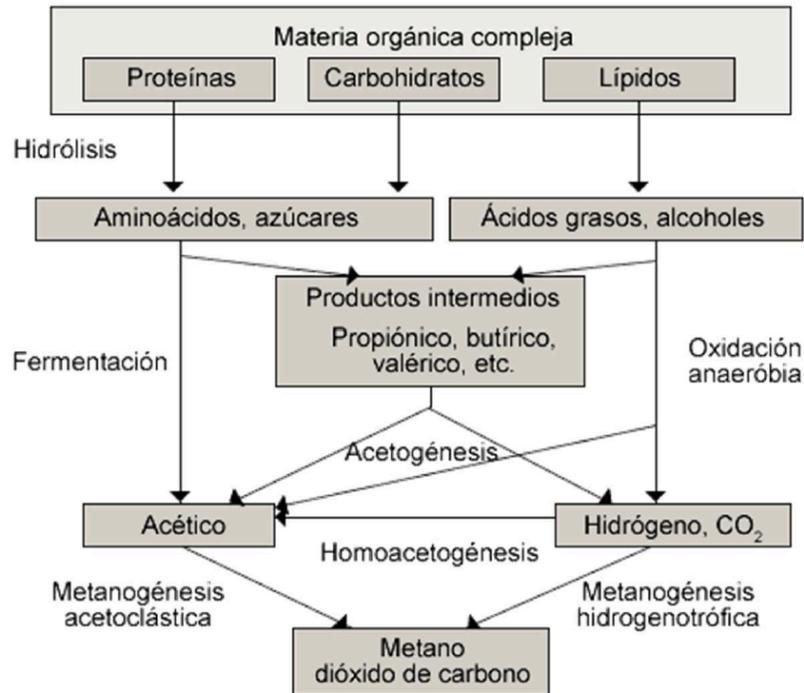


Figura 2.3 Esquema de la digestión anaerobia (Varnero-Moreno, 2011)

La Figura 2.3 muestra un esquema de los distintos procesos llevados a cabo por las bacterias anaerobias. Durante la etapa de hidrólisis el material mas complejo pasa a compuestos mas simples, este proceso lo llevan a cabo microorganismos hidrolíticos mediante enzimas extracelulares (Romero Zúñiga, 2001; Varnero-Moreno, 2011). En la etapa de acidogénesis el sustrato es asimilado como ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes, CO₂, de igual forma metabolizan las trazas de oxígeno, esta etapa la llevan a cabo bacterias facultativas formadoras de ácido (Varnero-Moreno, 2011). Un tercer proceso es el acetogénesis, donde las bacterias acetogénicas asimilan los productos de la acidogénesis para formar acetato y H₂ mientras que las bacterias homoacetogénicas consumen el H₂ junto con azúcares y las moléculas monocarbonadas producen acetato. El proceso de metanogénesis consume los productos de

etapas anteriores para asimilarlos como metano, si el sustrato es H_2 , CO_2 y fórmico participan las hidrogenotróficas, mientras que si el sustrato es acetato, metanol o aminas, participan los acetoclastos (Varnero-Moreno, 2011). La presencia de nitratos puede ser asimilada en la desnitrificación donde los grupos nitratos (NO_3^-) se reducen a nitrito (NO_2^-), a óxido de nitrato (NO_2) y gas nitrógeno (N_2) mediante las bacterias denitrificantes (Claros-Bedoya, 2012).

El monitoreo de los microorganismos permite conocer el grupo de bacterias que se activó debido al consumo de materia orgánica o sustrato. El consumo de sustrato se mide mediante la demanda química de oxígeno (DQO). La actividad metanogénica específica (AME) permite contabilizar los mililitros de metano producido por las bacterias metanogénicas, de igual forma, el potencial oxido-reducción (ORP) y pH es un indicio de la comunidad bacteriana que se activó, adicionalmente en presencia de nitratos, la remoción de estos implica la participación de bacterias denitrificantes.

Las reacciones oxido-reducción durante este proceso permiten la descomposición de los sustratos orgánicos mediante su oxidación, esta liberación de electrones proporciona al medio mineral potenciales oxido-reducción del orden de -350 a -400 mV (Lorenzo-Acosta y Obaya Abreu, 2005). El potencial oxido-reducción es una medida de la actividad de los electrones, indicando la presencia de especies oxidantes y reductoras, a menor cantidad de agente oxidante menor será el potencial. Las bacterias anaerobias se desarrollan en ambientes libre de oxígeno y en condiciones de ORP reducidos. En la Figura 2.3 se presenta un esquema de los potenciales a los cuales actúa cada grupo de bacterias. En los distintos procesos se observa que los nitratos (NO_3^-) son el aceptor de electrones más oxidantes, si existe la presencia de sulfatos (SO_4^{2-}) estos se convierten en el aceptor de electrones, de otra forma la siguiente colonia en actuar son las bacterias metanogénicas con el menor potencial oxido-reducción.

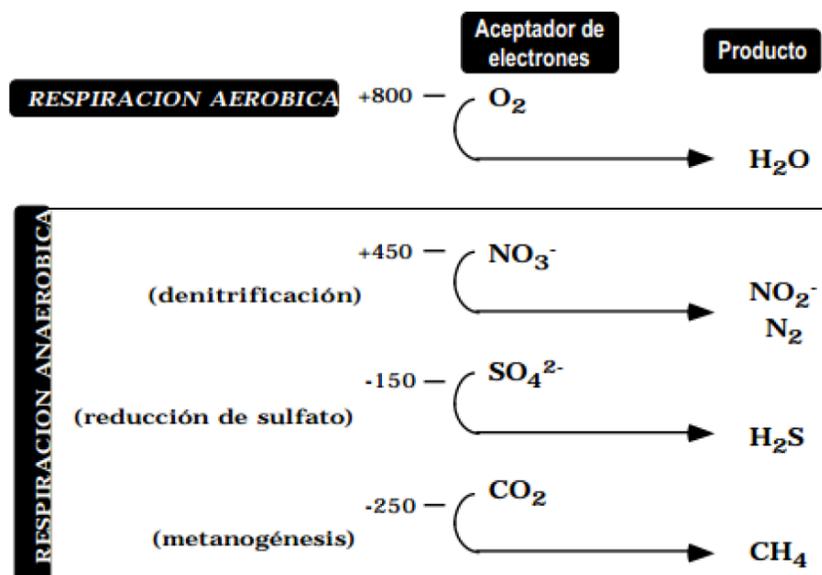


Figura 2.4 Perfil vertical del potencial redox (mV) en sedimentos (Fuentes y Massol-Deyá, 2002)

En el trabajo de Kumar *et al* (2014), se sintetizaron nanopartículas de plata de diámetro de 5 a 65 nm, se utilizó un cultivo mixto de bacterias anaerobias responsables de la reducción de iones de plata a nanopartículas de plata metálica. La solución precursora fue 2 mL de $AgNO_3$ a una concentración de 0.2mM a la que se le agregó 10 mL de un cultivo mixto de bacterias anaerobias, la reacción se completó después de tres horas, obteniendo una suspensión coloidal de color amarillo oscuro representativa de altas concentraciones de nanopartículas. Durante el proceso se monitorea la formación de las nanopartículas de plata mediante espectroscopia UV-vis con un pico en 425 nm, la morfología se analizó por microscopia electrónica de transmisión (TEM) mostrando nanopartículas esféricas de entre 5 y 50 nm de diámetro y una dispersión homogénea, la estructura cristalina se determina por difracción de rayos-X con picos representativos para la plata de estructura cúbica centrada en las caras, y la interacción de las nanopartículas con cultivos de bacterias se analizó mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR) donde se encontraron picos características de enlaces con grupo amino y carboxilato en la proteínas, lo que sugiere que estos grupos sean responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas.

Hamzia *et al* (2018) reporta la síntesis de nanopartículas de plata mediante el uso de la bacteria *Haemophilus influenzae*, se utilizaron 5 mL del sobrenadante de cultivo de la bacteria

y se le añadió 1 mg de AgNO_3 , el tiempo de reacción fue de 24 horas, mostrando una solución café oscura al término. Realizaron una caracterización por microscopía de fuerza atómica para conocer su topografía esférica y tamaño promedio de partículas de 93 nm. La actividad antimicrobiana se comprobó por un ensayo de difusión en pozo de agar, al añadir 50 μL de nanopartículas de plata a cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp*, *Klebsiella spp*, *E. coli*, *Serratia spp* y *Candida albicans* durante 24 horas a 37°C, logrando inhibir el crecimiento de bacterias únicamente en la región donde fueron esparcidas las nanopartículas.

2.7 Geomembranas poliméricas

En la búsqueda de prolongar el efecto residual en la desinfección del agua, se plantean nuevos materiales compuestos, los cuales actúen como soportes del material antibacteriano, para promover una liberación paulatina, lo cual surge como el uso de polímeros como matriz de impregnación.

Los polímeros son una opción debido a su morfología y estructura química de largas cadenas, permitiendo la incorporación y dispersión de otro material, para este interés, antibacteriano. En el caso de la industria hidráulica se utilizan geosintéticos como recubrimientos de superficies de contención de agua, debido a sus propiedades mecánicas y estabilidad química.

Los geosintéticos como barrera de separación entre medios se pueden clasificar dependiendo de su función, como de: separación para evitar la contaminación física entre el suelo y el líquido; filtración con cierta permeabilidad evitando la migración de ciertas partículas; drenado permitiendo el flujo cuando existe compresión o transporte de fluidos; refuerzo al aumentar la capacidad de carga y estabilidad de una superficie; protección al recibir el impacto o mitigar la fuerza ejercida por otros elementos que ocasionen un daño a la superficie; impermeabilizar al ser una barrera que evita la impregnación de sustancias externas. Las geomembranas son barreras de revestimiento de un polímero termoplástico, este recubrimiento promueve la estanqueidad del agua y evita la migración de contaminantes provenientes del

suelo. Los materiales mas usados son polietileno (PE), polipropileno (PP), policloruro de vinilo (PVC), polietileno clorosulfonado (CSPE), aleación interpolímero de etileno (EIA), entre otros.

El polietileno es el polímero mas simple en cuanto a estructura química, es una cadena repetitiva de etilenos $(C_2H_4)_n$ y esta compuesto por una unidad lineal y repetida de grupos de etilenos, esta misma sencillez hace que su fabricación sea la mas económica, este polímero es químicamente inerte, en estado sólido es resistente al impacto y abrasión, flexible a temperatura ambiente, con una tonalidad transparente a blanquecina, cuando se encuentra en estado líquido su viscosidad varía con la temperatura, es un buen aislante de eléctrico y térmico (Hall, 1981). Este material se puede clasificar según sea el empaquetamiento de las ramificaciones de modo que sea de alta o baja densidad. La estructura del polietileno de alta densidad (HDPE) le brinda mayor rigidez, debido a su estructura lineal con poca ramificación con una densidad mayor o igual a 0.96 gr/cm^3 , mientras que el polietileno de baja densidad (0.91 a 0.94 gr/cm^3) cuenta con más ramificaciones que impiden un mayor empaquetamiento por lo que es parcialmente cristalino, de 50 a 60% (Bilurbina y Liesa, 1990).

El polipropileno es igualmente un termoplástico compuesto por unidades repetidas de propileno $(C_3H_6)_n$. Dentro de sus características cuenta con ligereza debido a su baja densidad (0.9 gr/cm^3), es de alta cristalinidad lo que le proporciona alta resistencia mecánica, rigidez y dureza, cuenta con baja absorción de la humedad porque lo que el agua no daños que lo deterioren, resistencia química ante sustancias ácidas y alcalinas, aislante eléctrico (Billmeyer, 1975)

El policloruro de vinilo $(C_2H_3Cl)_n$ se caracteriza por ser dúctil, resistente a la humedad, a la abrasión e impacto, muy estable e inerte, la presencia de cloro en su estructura le brinda una estructura amorfa que impide su recristalización. Se caracteriza por ser muy versátil al poder ser tan rígido como para formar tuberías o flexible para formar geomembranas, así como para ser transparente o aceptar cualquier tintura o color que se le añada (Weininger y Stermitz, 1988).

El polietileno clorosulfonado contiene cloro y dióxido de azufre dentro de sus cadenas carbonatadas del etileno, es de baja cristalinidad a bajos porcentajes de cloro. Posee características similares a las del polietileno clorado, de alta tenacidad a altas temperaturas, a ácidos diluidos y poco oxidantes, resistente a la intemperie y al ozono, ha mostrado tener larga vida bajo condiciones ambientales extremas (Billmeyer, 1975).

Los anteriores materiales además de ya trabajar como base en superficies contenedoras de agua, tiene una estructura que permite añadir materiales antimicrobianos, de forma que liberen este agente en el medio e impidan la reproducción de ciertos microorganismos tanto en la superficie como en medio.

2.8 Geomembranas compuestas para la desinfección de agua

Las geomembranas compuestas son una nueva propuesta en materiales antibacterianos, al mismo material que sirve como recubrimiento en múltiples superficies, se le da una nueva función con la adición de compuestos antibacterianos a la matriz polimérica. De modo que el recubrimiento de superficies en contacto con el agua impida la propagación de bacterias, hongos o virus. El activo antibacteriano que se puede añadir desde los tradicionales como los materiales orgánicos previamente mencionados OBPA y triclosán, o la impregnación de materiales inorgánicos en forma de nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂-NPs), óxido de zinc (ZnO-NPs), plata (AgNPs) etc, con la ventaja de que no generar subproductos nocivos y poseer nuevas propiedades debido a su tamaño.

El prefijo nano proviene del griego y significa la mil millonésima parte de un metro. A partir de la conferencia dictada por Richard Feynman en 1959, donde menciona que existe mucho espacio en el fondo, se prestó mayor atención a la investigación en la escala nanométrica. Los nanomateriales se caracterizan por tener un gran área superficial y alta reactividad, por lo que la interacción de la materia a esta escala presenta distintas propiedades en los materiales.

En un estudio elaborado por Galli *et al* (2020) se fabricó membranas de una mezcla polimérica de polietileno de baja densidad y etileno acetato de vinilo con actividad antimicrobiana al incorporar nanopartículas de óxido de zinc. Su evaluación fue contra la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus* y la bacteria gram-negativa *Escherichia coli*, en este último caso para una eliminación microbiológica del 87% se utilizó una concentración de 2 wt% en 6 horas de incubación. El mecanismo de las ZnO-NPs supone la unión debido a la carga positiva de las nanopartículas con la carga negativa de la membrana de la célula y su posterior ruptura. Por otro lado, las ZnO-NPs se consideran de baja toxicidad ya que existe un requerimiento humano de 10 mg/día por persona.

Otro trabajo de incorporación de nanopartículas a una matriz polimérica lo realizó Sánchez-Álvarez en 2018 al impregnar geomembranas de polietileno con ZnO-NPs y AgNPs y comprobar su actividad antimicrobiana ante *E.coli*. Con una impregnación de 60.93 mg/L de ZnO y 2.61 mg/L de Ag se eliminó el 99% de *E.coli*. La concentración mínima inhibitoria se identificó a 15 mg/L de ZnO y 0.37 mg/L de Ag, mientras que la concentración mínima bactericida se identificó a 60 mg/L ZnO y 2.61 mg/l de Ag. Adicionalmente el análisis de liberación de zinc y plata mostró un tiempo de vida de hasta 5 años para la geomembrana. En la Tabla 3.2 se presentan trabajos donde impregnan membranas con nanopartículas antibacterianas.

Tabla 2.2 Trabajos de membranas poliméricas con materiales antibacterianos

Polímero	Material antibacteriano	Concentración Inhibición	Microorganismo evaluado	Referencia
Polipropileno	ZnO y AgNPs	10 wt% 100%	Escherichia coli, Staphylococcus aureus	Du <i>et al.</i> , 2021
Acetato de celulosa	AgNPs y TiO ₂	5 wt% 100%	Escherichia coli, Staphylococcus aureus	Wahab <i>et al.</i> , 2018
Polietileno	AgNPs, ZnO NPs	60.93 mg/L de ZnO y 2.61 mg/L de Ag. 99%	Escherichia coli	Sanchez-Álvarez 2018
Polimetilmetacrilato	AgNPS	23 wt% 90%	<i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	An <i>et al.</i> , 2015
Poliestireno y polivinil alcohol	AgNPs	0.5 wt% 90%	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Krzywicka y Megiel, 2020

Debido a la interacción de las geomembranas con un medio con bacterias, estas bacterias se pueden adherir a la membrana y crecer a partir de ahí. El concepto de biofilm fue propuesto

por el Dr. John William Costerton en 1999, describe en su investigación a una biopelícula como el crecimiento de un grupo de células microbianas e incrustación a una superficie, estas células bacterianas se distinguen de las dispersas en el medio por la producción de una matriz de sustancia extracelular polimérica. La interfaz sólido-líquido entre la superficie de la geomembrana y el medio acuoso proporciona un soporte para la adhesión de bacterias, otras características que favorecen el crecimiento de la bacteria sobre la superficie son las propiedades de la superficie, la hidrodinámica, nutrientes del medio acuoso, temperatura, pH, fuerzas cortantes, tipo de soporte y superficie (Cresson, R. *et al.*, 2007).

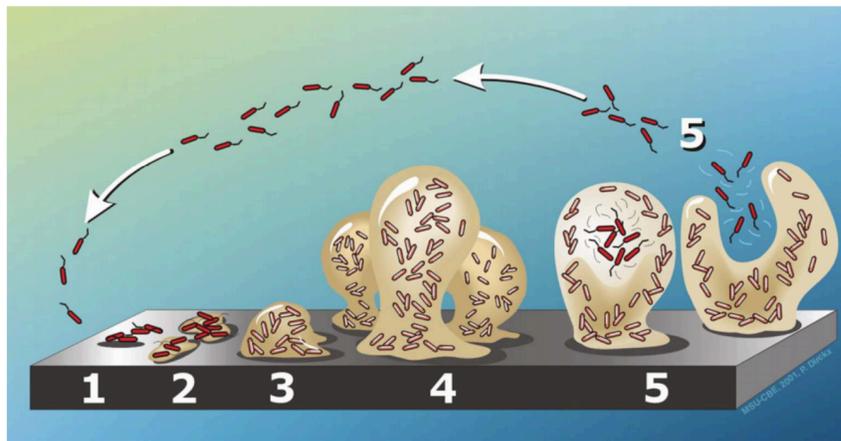


Figura 2.5 Etapas de etapas de formación de biofilm. (Van Houdt, Michiels 2005)

En la Figura 2.5 se observan las distintas etapas de formación de biofilm, la etapa 1 donde las bacterias del medio se adhieren de manera reversible en la superficie sólida cuando ha sobrepasado las fuerzas repulsión. La etapa 2 donde se pasa a un apego irreversible debido a la producción de polímeros extracelulares por las bacterias y de adhesinas específicas localizadas en pili y fimbrias que interactúan con la superficie. La etapa 3 es el desarrollo temprano de la estructura de biopelículas. En la etapa 4 se forman las microcolonias en una biopelícula madura con el desarrollo de patrones específicos de crecimiento y una fisiología y metabolismo diferentes de las células planctónicas, además continua la producción de sustancias que sirven como matriz adhesiva y atrapan nutrientes del medio ambiente. En la etapa 5 se dispersan las células de la biopelícula hacia el entorno circundante y retornan al estado

planctónico, con la posibilidad de adherirse a una nueva zona de la superficie sólida y continuar con el ciclo.

Sin embargo, el uso de geomembranas impregnadas con nanopartículas de plata sintetizadas por bacterias anaerobias como una metodología verde no se ha estudiado por lo que el objetivo de este trabajo fue:

OBJETIVO

Desarrollar una geomembrana polimérica con propiedades antimicrobianas impregnada con nanopartículas de plata sintetizadas con bacterias anaerobias. Con la finalidad de proponer un proceso de bajo impacto ambiental y económicamente viable para la desinfección de agua contaminada con *Escherichia coli*.

Objetivos particulares

1. Llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata a partir de bacterias anaerobias en sistemas en lote. Así como, realizar la caracterización de las nanopartículas recuperadas por espectroscopia UV-vis, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X.
2. Evaluar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de AgNPs lavadas y sin lavar ante *E.coli* en medio acuoso mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria y medio agar para la concentración mínima bactericida, de igual manera determinar la concentración de inhibición y toxicidad para las bacterias a partir de pruebas de actividad metabólica. Con la finalidad de establecer si hay un mayor efecto de inhibición en las pruebas al lavar las nanopartículas.
3. Desarrollar geomembranas impregnadas con diferentes materiales poliméricos (polietileno y polipropileno) y concentraciones de AgNPs lavadas y sin lavar, así como caracterizarlas por MEB y DRX.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de las geomembranas (polietileno y polipropileno) con AgNPs lavadas y sin lavar ante cultivos de *E.coli*, a partir de las pruebas de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.
5. Determinar el tiempo de vida de las geomembranas por el desprendimiento de las AgNPs y la formación de biofilm en su superficie debido a su exposición a un medio con bacterias.

3. Materiales y métodos para la síntesis de nanopartículas de plata y geomembranas impregnadas para la desinfección de agua con *Escherichia coli*

3.1 Síntesis de nanopartículas en reactores en lote

La síntesis biológica de nanomateriales hace uso de diversos recursos biológicos para llevar a cabo las reacciones necesarias. En este trabajo se utilizó un lodo metanogénico proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la empresa Ricolino S.A. de C.V. en San Luis Potosí, México.

Se realizaron 3 ensayos por triplicado de síntesis en reactores en lote, donde se monitoreó la actividad metanogénica específica, pH, ORP, se determinó DQO y remoción de nitratos y plata. Los ensayos se realizaron en botellas de 60 mL. Se contaba con una botella ‘Control’ sin plata ni sustrato, ‘Blanco’ sin plata y con sustrato, Ensayo 1 Csa’ (Csa= cerrado sin agitación) cerrado todo el tiempo y ‘Ensayo 2Asa’ (Asa= abierto sin agitación) abierto diariamente para medir pH y ORP, a 120 rpm, los últimos dos ensayos con sustrato y precursor de plata. Cada botella contenía 2.02 g de lodo granular anaerobio lo equivalente a 2 g SSV/L, 40 mL de medio mineral con 2 g de DQO/L en forma de etanol como sustrato y 2000 mg/L de Ag^+ en forma de $AgNO_3$. Se sellaron las botellas con tapones de hule, anillos de aluminio y se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación de la plata (Figura 3.1). Finalmente se incubaron las botellas a 30°C en la incubadora Orbital mca. Labnet, mod. 311DS hasta el termino de la Actividad Metanogénica Específica (AME).



Figura 3.1 Botellas con lodo metanogénico y medio mineral en incubación

3.1.1 Acondicionamiento de lodos anaerobios

Las bacterias anaerobias se encuentran inmersas en un lodo granular con medio que le proporciona los nutrientes y sales para su adecuado desarrollo, los reactivos para preparar las soluciones que componen el medio mineral se presentan en la Tabla 3.1 y Tabla 3.2.

Tabla 3.1 Composición de medio 10x para bacterias anaerobias

Reactivo	g/L de solución
KCl	2.5
K ₂ HPO ₄	2
NH ₄ Cl	3
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15

Tabla 3.2 Composición de solución elementos traza

Reactivo	g/L de solución
FeCl ₂ ·H ₂ O	1.500
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.100
EDTA	0.500
H ₃ BO ₃	0.062
ZnCl ₂	0.070
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.036
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.040
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.024
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.070
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.020
HCl 36%	1 mL
Na ₂ SeO ₃	0.100

3.1.2 Medio mineral para reactores en lote

El lodo para las pruebas en lote se mantuvo en condiciones metanogénicas en un medio mineral. El medio se preparó con 100 mL de medio 10x (Tabla 3.3), 1 mL de solución elementos traza (Tabla 3.2), se aforó a un litro con agua desionizada y se ajustó el pH a 7 con NaHCO₃. Adicionalmente se le añadió etanol como sustrato a una concentración de 2 g de DQO/L.

Tabla 3.3 Composición de medio 10x para pruebas en lote

Reactivo	g/L de solución
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	7.03
K ₂ HPO ₄	6.00
NH ₄ Cl	2.80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.11
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.06

3.1.3 Determinación de sólidos suspendidos volátiles

Previo a la síntesis de nanopartículas se calculó la cantidad de sólidos suspendidos volátiles (SSV) por gramo de lodo y sólidos suspendidos totales (SST). En capsulas de porcelana se pesaron 2g de lodo metanogénico, se dejó secar la muestra en una parilla caliente, posteriormente se metieron a un horno a 105°C por 12 horas, hasta que el peso de la capsula fue constante, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se registró el peso como medida de los SSF, finalmente se calcinó la muestra en una mufla a 550°C durante una hora y el peso fue registrado como SST. La cantidad de SSV es la diferencia gravimétrica entre los sólidos suspendidos totales y los sólidos suspendidos fijos (APHA, 1998).

3.1.4 Actividad Metanogénica Específica

El monitoreo de la Actividad Metanogénica Específica (AME) se hace con el fin de conocer la capacidad de producción de metano por parte de los microorganismos, el monitoreo de esta producción indica la activación y consumo del sustrato por parte de las bacterias. Conociendo la cantidad de g SSV/L y la concentración de DQO que alimenta a los microorganismos se puede estimar la producción de metano. Cada día se midieron los mL de metano (CH₄) producidos mediante desplazamiento de NaOH al 3%, con el sistema que ilustra la Figura 3.2.

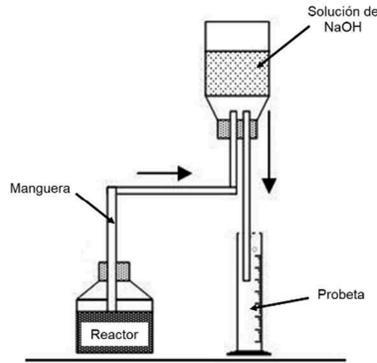


Figura 3.2 Sistema de desplazamiento volumétrico NaOH 3% - Metano. (García-Torres, 2019)

El monitoreo de la AME (Ec. 3.3) consistió en graficar el volumen acumulado de metano producido vs tiempo en horas. La reacción de combustión de metano indica que para la oxidación completa de un mol de metano se requiere de dos moles de oxígeno, con base en esto y considerando las condiciones de temperatura y presión atmosférica, se producen 0.35L de CH₄ por gramo de DQO removido (Torres y Pérez, 2010). Debido a que los experimentos se realizan en condiciones de incubación se hace la siguiente corrección K(T) (Ec. 3.1) para conocer el volumen teóricamente producido (Ec. 3.2).

$$K(T) = \frac{P+K}{R*(273.15+T)} \quad \text{Ec.3.1}$$

Donde,

K(t) = factor de corrección (g DQO/L), P= presión atmosférica (atm), R= constante de los gases (0.08206 atm*L/mol*K), K= carga orgánica digerida correspondiente a un mol de CH₄ (64 g DQO/mol), T= temperatura operacional del experimento.

$$V_{CH_4} = \frac{DQO_{CH_4}}{K(T)} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde,

V_{CH₄} = volumen teórico de metano producido (L), DQO CH₄ = Carga de DQO removida y convertida en metano (g DQO).

$$AME = \frac{m \cdot 24}{V_{CH_4} \cdot M} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde,

AME = Actividad Metanogénica Específica (g DQO/g SSV d), m = pendiente máxima de la curva de producción de metano (volumen acumulado vs tiempo), M = masa de lodo (g).

Una vez que la gráfica de AME mostró un comportamiento asintótico o fase estacionaria en los ensayos, se suspendió la incubación y se prosiguió a la caracterización de las nanopartículas.

3.1.5 Determinación de demanda química de oxígeno

La DQO se interpreta como la cantidad de materia orgánica e inorgánica susceptible a ser oxidada. El sustrato que se utilizó para alimentar a los microorganismos fue etanol, por lo que monitorear la DQO durante el experimento permite conocer el porcentaje de remoción o aprovechamiento de alimento por parte del consorcio de bacterias.

Para la determinación (APHA, 1998) se mezclaron en tubos de vidrio mca. HACH, 2 mL de muestra de agua filtrada del reactor; 1.2 mL de solución digestora compuesta por dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como agente oxidante y sulfato de mercurio ($HgSO_4$) como catalizador; por último, se adicionó 2.8 mL de solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los tubos se sometieron a digestión térmica durante 2 horas a 150 °C. Al término de la digestión se dejaron enfriar y mediante espectrofotometría UV visible (espectrofotómetro mca. HACH mod. DR 5000) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Con los datos de absorbancia se construyó la curva de calibración para concentraciones de 0 hasta 1000 mg/L de DQO con solución estándar de biftalato de potasio (BFK) y agua desionizada como control, finalmente con la ecuación de la curva se calculó la concentración de DQO correspondiente a cada muestra.

3.1.6 Monitoreo de pH, ORP y nitratos

Se registró el pH de cada botella mediante un potenciómetro mca. Thermo Scientific mod. Orion 5 Star, equipado con un electrodo de pH mca. Sensorex mod. S200C/BCN y un electrodo de potencial ORP mca. OHAUS mod. STORP1. En ambos casos el análisis de los

reactores en lote consistió en retirar el anillo de aluminio y el tapón de hule para introducir los electrodos hasta sumergirlos en la solución del reactor. Se registró la medida y se cerraron de nuevo las botellas para evitar la oxidación del medio (APHA, 1998).

Para la determinación de nitratos se utilizó el método de espectrofotometría ultravioleta, tomando una muestra de 2 mL de cada ensayo para leer la absorbancia en el espectrofotómetro mca. HACH mod. DR 5000. Dado que los nitratos absorben la radiación ultravioleta a una longitud de onda de 220 nm y la materia orgánica también absorbe a 220 nm, se hace una corrección al medir la absorbancia a 275 nm donde los nitratos no absorben.

La absorbancia corregida se calcula con la Ec. 3.4:

$$\text{Abs. Nitratos} = (\text{Abs}_{220} - \text{Abs}_{275}) \quad \text{Ec. 3.4}$$

Se realizó una curva de calibración para conocer la concentración de nitratos según la absorbancia de las muestras. La curva de calibración se preparó con soluciones estándares de nitratos en un rango de 0 a 10 mg N/L por dilución de una solución stock y una solución intermedia. La solución stock de nitrato de potasio a 100 mg NO₃- N/L se preparó al secar a 105°C por 24 horas 0.7218g de KNO₃ y se disolvió en 1000 mL junto con 2 mL de cloroformo para conservarla por seis meses. La solución intermedia de nitratos de potasio a 10 mg NO₃- N/L se preparó al diluir 10 veces la solución stock de nitrato con agua desionizada y 2 mL de cloroformo (APHA, 1998).

3.2 Caracterización de AgNPs

3.2.1 Lavado de AgNPs

Para evaluar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata recuperadas de las pruebas en lote sobre *E.coli*, se procedió a lavar las nanopartículas para eliminar interferencias como sales o materia orgánica de su superficie. El ciclo de lavado consistió en resuspender las nanopartículas mediante vortex durante 30 segundos seguido de 15 minutos en la centrifugadora a 12 mil rpm, se retira el sobrenadante y se sustituye por agua desionizada, dicho ciclo se repite dos veces más y se hace un vortexeado final por 1 minuto.

3.2.2 Espectroscopia UV-visible

Se analizó el plasmón de resonancia de superficie por espectroscopia UV-Vis, para confirmar la presencia de nanopartículas de plata. Se tomó una alícuota del sobrenadante de los reactores y se diluyó con agua desionizada para evitar la lectura de otras señales provenientes del lodo, esta solución se colocó en celdas de cristal de 10 mm. La lectura de absorción se realizó con un barrido de los 300 a 900 nm en un espectrofotómetro UV-visible mca. HACH mod. DR 5000.

3.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido

El análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) brinda información sobre la morfología y tamaño de las nanopartículas. Se depositó una alícuota de nanopartículas, lodo granular y geomembrana sobre cinta de carbón y sobre rejillas de cobre, se dejó secar y se recubrieron con oro para mejorar la conducción de la muestra. El análisis fue en el equipo JEOL mod. JSM-6610LV, adicionalmente se hizo un análisis de composición elemental mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).

3.2.4 Espectroscopia de Absorción Atómica

La cuantificación de plata se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica (EAA), con el método de flama, el equipo utilizado fue un espectrofotómetro mca. Perkin Elmer mod. AAnalyst 400, para el caso de la plata tiene un límite de detección de 0.0001 mg/L. Para el análisis se construyó una curva de calibración con un estándar de 250 mg/L a continuación se realizó la lectura de una muestra de cada reactor a una dilución 1/20 con agua desionizada.

La concentración de plata en las geomembranas también se analizó con esta técnica. Se pesó 1.3g de geomembrana en un crisol y se llevó a la mufla durante 20 minutos a 600°C para calcinar los compuestos orgánicos y mantener solo la composición inorgánica. Posteriormente se colocó el crisol en la estufa hasta alcanzar la temperatura ambiente, después dentro de la campana de extracción se vaciaron las cenizas en un vaso de precipitados de 50 mL, se le añadió 10 mL de HCl al 10% y 15 mL de HNO₃ al 20 %. Los vasos se colocaron en una parrilla corning a 100 °C durante 20 minutos, ya disueltas las cenizas en el medio ácido, la solución se pasó a un matraz de 50 mL y se aforó con agua destilada, esta solución fue analizada por EAA.

3.2.5 Difracción de Rayos X

El análisis difractométrico de la muestra proporcionan información sobre los planos cristalográfico que se formaron en la síntesis de las nanopartículas. Se tomaron 20 mL de solución de nanopartículas, se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm, se llevó a secar con mufla a 300°C y posteriormente se hizo una molienda hasta un tamaño de partículas <100 micras. El análisis se realizó en un difractor de rayos X marca Rigaku modelo DMAX-2200, que dispone una identificación de fases cristalinas que se encuentran en una concentración superior a 5% en la muestra, por comparación con un banco de datos automatizado. Los diagramas fueron construidos en un rango de 2θ de 5 a 80°.

3.3 Evaluación de actividad antimicrobiana de AgNPs ante *E.coli*

La cepa que se utilizó para conocer el efecto antimicrobiano fue la bacteria *Escherichia coli* 22237, proporcionada por el laboratorio de bioquímica y nutrición de la Facultad de Enfermería de la UASLP.

Las pruebas de inhibición bacteriana para las AgNPs se realizaron en una placa de 96 pocillos, donde se depositaron 180 μ L de caldo nutritivo (BD Bioxon) con *E.coli* junto con 20 μ L de la solución de AgNPs. Las concentraciones que se evaluaron fueron 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/L de AgNPs, mediante la técnica de microdilución. La preparación de las concentraciones consistió a partir de una solución madre de AgNPs a 1990.7 mg/L de la que se tomaron 20 mL, se depositaron en el primer pocillo (ver Figura 3.2) y se añadieron 180 μ L de caldo nutritivo, para tener una concentración de 200 mg/L, de este pocillo se tomaron 100 μ L de solución para depositarlos en un segundo pocillo y agregar 100 μ L de caldo nutritivo para alcanzar una concentración de 100 mg/L de AgNPs, del segundo pocillo se tomaron 100 μ L y se depositaron en un tercer pocillo junto con 100 μ L de caldo nutritivo y se obtuvo una concentración de 50 mg/L de AgNPs, este mismo procedimiento se continuó hasta el sexto pocillo para una concentración de 6.25 mg/L de AgNPs.

3.3.1 Condiciones de incubación de *E.coli*

Previo a las pruebas se inocularon 500 μ L de *E.coli* en 8 mL de caldo nutritivo y se dejó incubar durante 24 horas para alcanzar una densidad óptica de 0.5 la cual según la escala de

McFarland corresponde a 1×10^8 bacterias por mL, para confirmar la densidad óptica se midió por espectroscopia UV-vis con valores entre 0.08 y 0.1 de absorbancia a una longitud de onda de 620 nm donde el blanco fue caldo nutritivo sin microorganismos.

3.3.2 Ensayos de concentración mínima inhibitoria en placa micropocillos

El ensayo de Concentración Mínima inhibitoria (CMI) permite determinar la concentración mas baja de un agente antibacteriano en solución a la cual se inhibe el crecimiento del microorganismo tras una incubación. El caldo nutritivo se preparó a una concentración de 8 g/L de BD Bioxon Caldo Nutritivo, éste junto con las pintas de micropipeta se esterilizaron en autoclave a $121.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($P = 20 \text{ lb/in}^2$) durante 20 min, mientras que la placa de micropocillos se esterilizó bajo luz UV en una campana de flujo laminar durante 40 minutos.

Una vez preparadas las concentraciones se prosiguió al ensayo de CMI, por cuadruplicado se depositaron $180 \text{ } \mu\text{L}$ de solución bacteriana y se añadieron $20 \text{ } \mu\text{L}$ de cada una de las concentraciones de AgNPs previamente preparadas, de forma que las concentraciones evaluadas fueron 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 mg/L de AgNPs, de igual forma se contó con un pocillo control con 200 mL de bacterias sin AgNPs. Para conocer el crecimiento e inhibición de *E.coli* se midió la absorbancia de la placa micropocillos mediante espectroscopia UV-vis en un lector de microplacas mca. ThermoScientific mod. Multiskan FC, a 620 nm en la hora cero, se incubó a 35°C y se volvió a medir la absorbancia pasadas 24 horas.

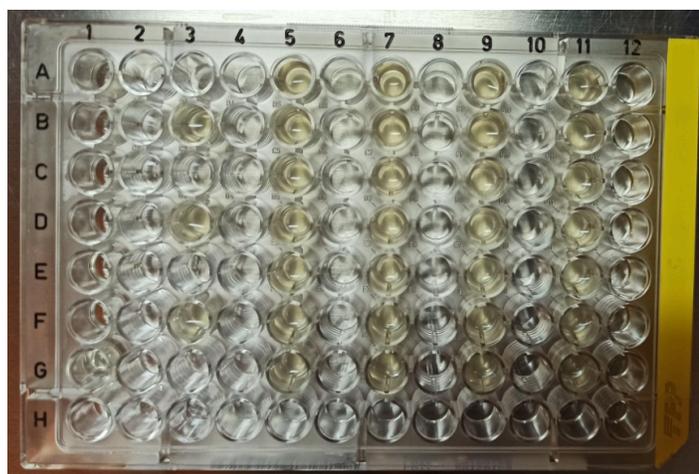


Figura 3.3 Placa de micropocillos y distribución de ensayos por cuadruplicado

A estos resultados se les hizo un análisis estadístico mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para determinar a que concentración se cuenta con una inhibición representativa. El análisis mide la probabilidad (P) de que un valor estadístico sea posible o probable en determinada hipótesis. Cuando la P es menor a 0.05 la diferencia es estadísticamente representativa, por lo cual se puede hablar de una inhibición que es significativamente representativa dentro del grupo evaluado.

3.3.3 Ensayos de Actividad Metabólica

Este ensayo se hace para conocer el nivel de inhibición de los microorganismos de manera cuantitativa en porcentaje y de manera cualitativa como viable o tóxico por el contacto con las AgNPs o las geomembranas impregnadas. La citotoxicidad celular se da debido a una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (Repetto, 2002).

Tras las 24 horas de incubación del ensayo para CMI, se añadieron 20 μ L de Alamar Blue a cada pocillo con *E.coli* y AgNPs y se incubó una hora a 35°C, de igual forma al pocillo que contenía *E.coli* sin nanopartículas se le añadieron 20 μ L de Alamar Blue para ser el grupo control. Posteriormente a la hora de incubación se midió la absorbancia a 570 nm en el mismo lector de microplacas utilizado anteriormente.

El mecanismo bajo el cual actúa esta prueba es por la presencia del reactivo resazurina permeable en membrana celular. Las células metabólicamente activas reducen la resazurina en resorufina Figura 3.4. La resorufina es un indicador rojo fluorescente, por espectroscopia UV-vis se mide la absorbancia producida lo cual es proporcional al número de células vivas. Se genera una medida cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad. Dada la relación directa entre absorbancia y viabilidad celular, el cálculo de la viabilidad se realiza respecto a las células control (sin material antibacteriano) mediante la Ec. 3.5:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs control}) \times 100 \qquad \text{Ec. 3.5}$$



Figura 3.4 Reducción de rasazurin a resorufin en ensayos de actividad metabólica

3.3.4 Ensayos de concentración mínima bactericida en medio agar

La prueba de Concentración Mínima Bactericida (CMB) determina la sensibilidad bacteriana ante un material antimicrobiano. Previo a las pruebas se preparó un agar sólido, a un matraz Erlenmeyer se agregaron 100 mL de agua desionizada, 0.8 g de BD Bioxon Caldo Nutritivo y 5 g de agar bacteriológico, se esterilizó y cuando la solución salió de la autoclave se sirvió en cajas Petri bajo mechero para tener condiciones estériles y se dejó enfriar y solidificar durante 20 minutos.

El ensayo de CMB consistió en esparcir *E.coli* inoculada a una densidad óptica de 0.5 de la escala de McFarland en las cajas Petri con medio Agar, posteriormente se distribuyeron 8 discos de filtros en la caja Petri en los que se depositó 10 mL de la solución a concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 mg/L de AgNPs, adicionalmente de utilizó clorhexidina al 5% como control negativo y agua desionizada como blanco (ver Figura 3.5). Se dejó incubar durante 24 horas a 35°C para después medir el halo de inhibición para cada una de las concentraciones examinadas por triplicado.

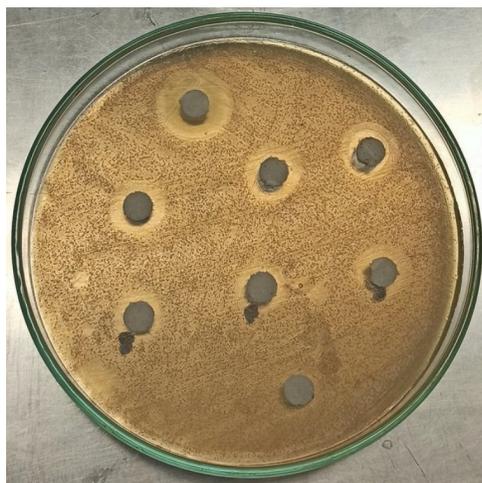


Figura 3.5 Pruebas de CMB, *E.coli* en medio Agar con filtros #1 para AgNPs en solución.

3.4 Fabricación de geomembranas poliméricas con AgNPs impregnadas

La segunda parte de este proyecto involucra la impregnación de una membrana polimérica con AgNPs, para aportarle la propiedad antimicrobiana a las geomembranas. La técnica de fabricación fue por inversión de fase. Las geomembranas fueron de dos polímeros diferente, polipropileno y polietileno en forma de pellets. Como solvente del polímero se utilizó xileno y como no solvente alcohol metílico. La relación es de 0.06 para el peso del polímero/volumen del solvente. Para fabricar tres geomembranas de tamaño caja Petri se depositó en un vaso de precipitado 10 mL de Xileno y se le añadió 0.6g de polímero.

Las concentraciones de nanopartículas (Tabla 3.4) con las que se impregnaron las geomembranas fueron 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L de AgNPs tanto lavadas (L) como no lavadas (S), adicionalmente se fabricaron geomembranas únicamente de polímero, sin impregnación de AgNPs.

Tabla 3.4 Concentraciones de AgNPs en geomembranas poliméricas

Polímero	Polipropileno		Polietileno	
Concentración de AgNPs impregnadas (mg/L)	Sin AgNPs		Sin AgNPs	
	100 L	100 S	100 L	100 S
	200 L	200 S	200 L	200 S
	300 L	300 S	300 L	300 S
	400 L	400 S	400 L	400 S
	500 L	500 S	500 L	500 S
	600 L	600 S	600 L	600 S

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una campana de extracción como se observa en el diseño experimental de la Figura 3.6. La solución de AgNPs se depositó en un vaso de precipitado de 50 mL, se dejó en la plancha de calentamiento por 10 min a 120°C, una vez que se evaporó el agua, se agregaron 10 mL de xileno y se llevó a ultrasonido por 2 minutos para resuspender las nanopartículas. A esta solución se agregó 0.6 g de polímero y se dejó en

agitación de 180 rpm durante 20 minutos a 120°C. La temperatura dentro de la solución no debe sobrepasar la temperatura de ebullición del xileno de 137°C. Al mismo tiempo se calentaron las cajas Petri donde se deposita la solución polimérica.

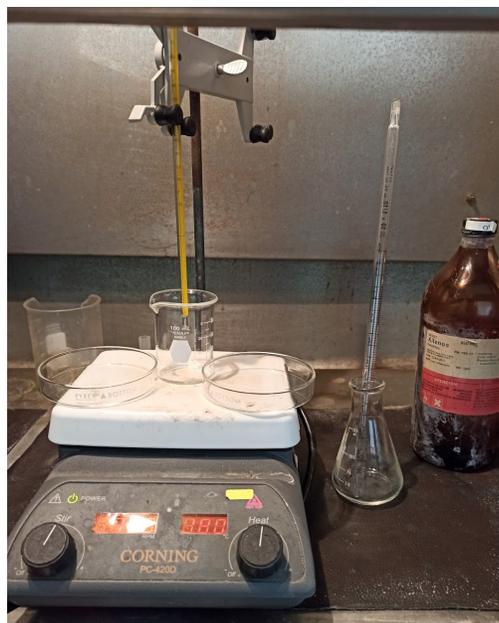


Figura 3.6 Arreglo experimental para obtención de geomembrana

Una vez que se consigue una solución translúcida sin presencia de pellets, se retiró el agitador magnético. La solución del polímero y AgNPs se vació en tres cajas Petri, se esparció cubriendo el fondo y a lo largo hasta alcanzar las paredes del recipiente. Se dejó enfriar con periodo de envejecimiento de la geomembrana, la temperatura se disminuyó a 50°C por 10 minutos y posteriormente se pasó a temperatura ambiente por 20 minutos todo dentro de la campana de extracción.

Tras el periodo de solidificación se esparcieron 2 mL de alcohol metílico en las paredes y en el centro de la geomembrana, se esperó a que el alcohol tuviera el mayor contacto con la superficie y se dejó evaporar 1 minuto. Con una espátula se desprendió la geomembrana por las orillas y con pizas planas se retira de la superficie (Figura 3.7). Dependiendo de la prueba de actividad antimicrobiana o tiempo de vida se cortaron las geomembranas como circunferencias o tiras.



Figura 3.7 Geomembranas fabricadas y corte para pruebas

3.5 Evaluación de actividad antimicrobiana de la geomembrana polimérica ante *E.coli*

Para corroborar la propiedad antibacteriana de las geomembranas se realizaron las mismas pruebas que con las nanopartículas en solución, el ensayo de concentración mínima inhibitoria, el ensayo de actividad metabólica y el ensayo de concentración mínima bactericida. Las pruebas se realizaron para las geomembranas fabricadas en este trabajo, así como con geomembranas comerciales, para comparar los resultados de otros materiales antimicrobianos, con los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 3.5 Concentraciones de agente antibacteriano en geomembranas comerciales

Matriz polimérica	Agente antibacteriano	Concentración (mg/L)
Polietileno	5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol	500
Polietileno	5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol	1000
Polietileno	5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol	1500
Polietileno	Oxibisfenoxarsina	500
Polietileno	Oxibisfenoxarsina	1000
Polietileno	Oxibisfenoxarsina	1500
Polipropileno	AgSiO ₂	200
Polipropileno	AgTiO ₂	200
Polietileno	AgNPs	200

3.5.1 Ensayos de concentración mínima inhibitoria en placa micropocillos y Ensayo de Actividad Metabólica

La propiedad antimicrobiana de las geomembranas se probó al ser expuestas a *E.coli*. En la placa micropocillos se depositaron 200 μ L de solución de *E.coli* previamente inoculada a una densidad óptica de 0.5 en la escala McFarland. Se midió la absorbancia de estos pocillos en la

hora cero por medio de espectroscopia UV-Vis para placa micropocillos a 620 nm, posteriormente en los pocillos con solución se depositaron las geomembranas cortadas en circunferencias para evaluar la concentración desde 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L para ambos polímeros, polipropileno y polietileno. Se dejó en incubación a 35°C y se midió la absorbancia pasadas 24 horas.

Posteriormente en los mismos pocillos, previamente incubados por 24 horas, se realizó el ensayo de actividad metabólica para conocer la viabilidad celular tras su exposición al material antibacteriano. Se retiraron las geomembranas de los pocillos y se añadieron 20 μ L de Alamar Blue mca. Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, se dejó incubar a 35°C durante una hora sin exposición a la luz, finalmente se midió la absorbancia a 570 nm.

3.5.2 Ensayos de concentración mínima bactericida en medio agar

La CMB se evaluó mediante ensayos con agar sólido en cajas Petri (Figura 3.8). Se realizó el mismo procedimiento explicado en la sección 2.3.4 para preparar el agar sólido. En el agar se esparció uniformemente la solución con *E.coli* a una densidad óptica de 0.5 de la escala de McFarland, después se distribuyeron las 7 geomembranas de distintas concentraciones, todas previamente sumergidos en caldo nutritivo para mejorar la adhesión al agar. Las cajas Petri se incubaron durante 24 horas a 35°C para después medir el halo de inhibición para cada una de las concentraciones examinadas por triplicado.

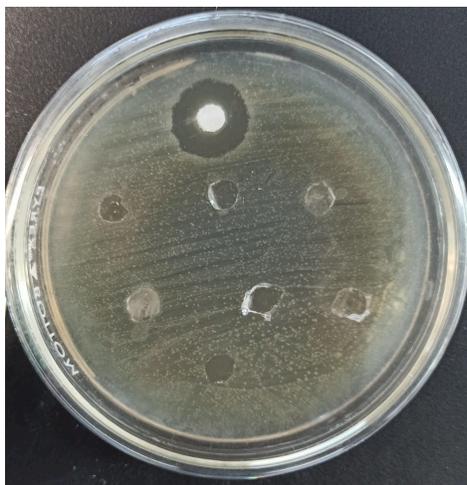


Figura 3.8 Geomembranas sobre cultivo de *E.coli* en medio Agar

3.6 Evaluación tiempo de vida de geomembranas

Las pruebas se realizaron en tubos de ensaye de 2.5 cm de ancho y 10 cm de largo. Se cortaron geomembranas rectangulares de 1x8 cm para unir las en un soporte cuadrado para mantener la geomembrana rígida y permitir el contacto directo con la solución de bacterias y evitar que se adhiriera a las paredes. La concentración inicial de *E.coli* fue de 0.5 en la escala McFarland. Ya montadas la geomembrana se esterilizó bajo campana con luz UV durante 40 minutos. A cada tubo de ensaye se agregaron 40 mL de solución con *E.coli* previamente inoculada a 0.5 de la escala McFarland, se incubaron los tubos a 37°C y 200 rpm durante 60 días. Semanalmente se cambiaba la solución de *E.coli* y se media por EAA la concentración de iones de plata que se liberaba de la geomembrana (ver Figura 3.9), las pruebas se realizaron para las membranas con mejor desempeño en inhibición de *E.coli*, polietileno con 300 mg/L de AgNPs y polipropileno con 200 mg/L de AgNPs por triplicado.



Figura 3.9 Arreglo experimental para evaluar el tiempo de vida, montaje de geomembranas.

3.7 Formación de biofilm

Debido a la exposición de las geomembranas en un medio acuoso con bacterias puede existir un crecimiento bacteriano en la superficie, que incrementa con el tiempo. Esto se midió con el mismo diseño experimental de las pruebas de tiempo de vida.

Se cortaron geomembranas rectangulares de 1x8.5 cm para unir las en un soporte cuadrado para mantener la geomembrana rígida y permitir el contacto directo con la solución dentro del tubo evitando que se adhiriera a las paredes. Ya montadas la geomembrana se esterilizó bajo campana UV durante 40 minutos. A cada tubo de ensaye se agregaron 40 mL de solución

con *E. coli* previamente inoculada a 0.5 de la escala McFarland, se incubaron los tubos a 37°C y 200 rpm durante 60 días. Cada 20 días se cortó una parte de geomembrana de 1x1 cm para identificar *E. coli* mediante una tinción gram negativa. Previo a su observación en el microscopio óptico, la geomembrana se colocó en el portaobjetos, se realizó un frotis, se dejó secar por 5 minutos, se pasó por el mechero para fijar la geomembrana al portaobjetos, se cubrió con gotas de cristal violeta, se dejó secar y se lavó el exceso con agua desionizada, se añadió lugol y se lavó el exceso nuevamente con agua desionizada, se hizo un segundo lavado con alcohol etílico, se cubrió con safranina y se retiró el exceso con agua destilada. Tras preparar la muestra, éstas se observaron en el microscopio óptico marca Carl Zeiss a un aumento de 10x con aceite de inmersión (ver Figura 3.10).



Figura 3.10 Arreglo experimental para formación de biofilm, observación de geomembranas en microscopio óptico.

4. Síntesis biológica y caracterización de nanopartículas de plata

4.1 Caracterización del lodo anaerobio

Para llevar a cabo las pruebas de síntesis de nanopartículas en sistemas en lote, primero se determinó la cantidad de lodo (bacterias anaerobias) necesario para depositar lo equivalente a 2 g SSV/L en cada botella. Por lo que, se realizó la técnica de los sólidos suspendidos volátiles (Sección 3.1.3), y se hicieron los cálculos correspondientes para obtener el peso de los sólidos volátiles que comprenden a la materia orgánica y el peso de los sólidos fijos que representan la materia inorgánica presente.

Tabla 4.1 Resultados de determinación de sólidos en lodo

Sólidos	Peso
Sólidos totales	0.0075842 g ST/ g lodo
Sólidos fijos (cenizas)	0.00742 mg SF/ g lodo
Sólidos suspendidos volátiles (g SSV /g lodo)	0.0397 mg SSV/ g lodo

Una vez que se conocía el contenido de sólidos volátiles, se pudo estimar la producción teórica de metano para la prueba de actividad metanogénica específica de acuerdo con la cantidad de sustrato administrado. Como lo indica la Tabla 4.1 se tiene 0.0397 mg SSV/ g lodo que representa al cultivo bacteriano o biomasa.

4.2 Actividad metanogénica específica

La Figura 4.1 presenta la AME de los 3 ensayos realizados para lodos metanogénicos, y en la Tabla 4.2. se muestran los resultados de la AME obtenida según la Ec. 3.3 (Sección 3.1.4). El experimento finalizó tras 380 horas de incubación, donde la máxima producción de metano fue de 9 mL para el ensayo 'Ensayo 1 Csa'. Cuando la producción de metano entra en fase estacionaria indica la inactivación de las bacterias metanogénicas y se da por terminada la síntesis biológica de nanopartículas.

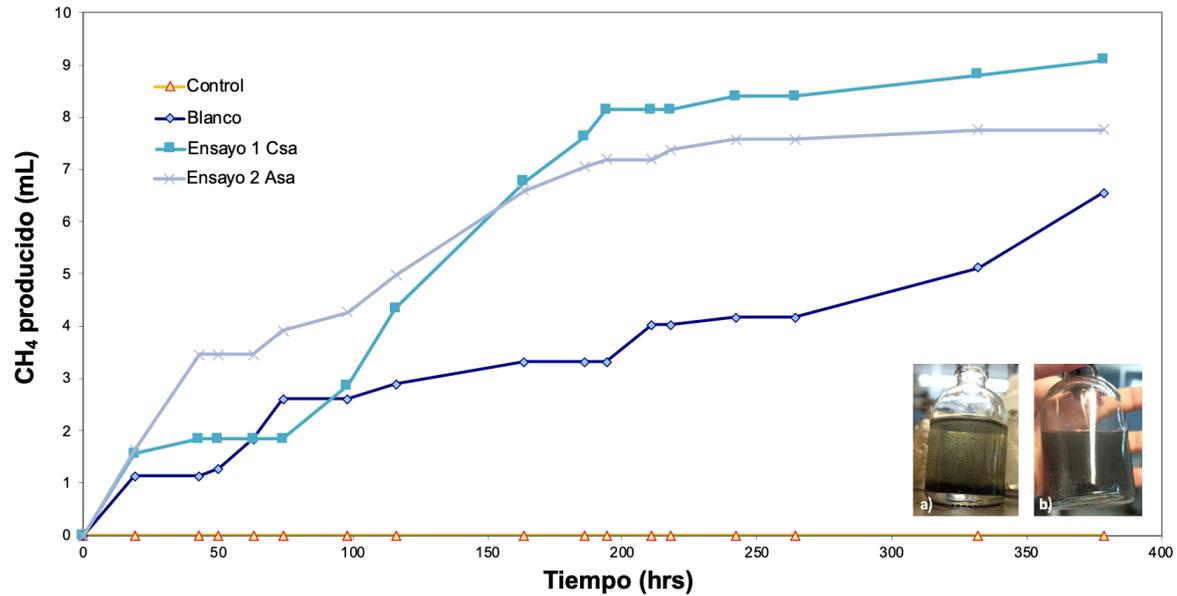


Figura 4.1 Cinética de producción de CH₄ de lodo metanogénico en sistemas en lote. a) Inicio de AME con gránulos de lodo metanogénico. b) Fin de la AME medio con tonalidad de café a grisácea.

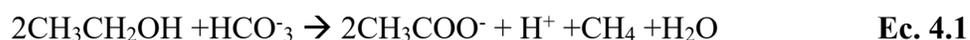
Tabla 4.2 Valores de AME, aprovechamiento de sustrato etanol para lodo metanogénico.

Ensayo	AME (gDQO / gSSV·d)
Blanco	0.368
Ensayo 1 Csa	0.924
Ensayo 2 Asa	0.844

De la Tabla 4.2 se observa que el sustrato fue mayormente aprovechado por el ‘Ensayo 1 Csa’ y menormente por el ensayo ‘Blanco’ misma observación muestra que la presencia de plata incentiva la producción de metano. Mudhoo y Kumar (2013) reportaron que, a bajas concentraciones de metales pesados, éstos tienen un efecto estimulador en la digestión anaerobia. Ruiz-Castillo (2016) mostró en pruebas en lote con lodo granular que concentraciones superiores a 2000 mg/L de Ag⁺ inhiben a las bacterias anaerobias.

La estimulación en la digestión del sustrato se traduce también en una estimulación en la producción de metano. Esto se puede ver más claramente en la Figura 4.1, donde se observa que el ensayo ‘Control’, únicamente contenía el lodo metanogénico en su medio mineral, no produjo en ningún momento mililitros de metano, esto debido a que no se alimentó con el sustrato, por lo que las bacterias se mantuvieron inactivas. Por lo contrario, en los demás ensayos

al suministrar alimento con el sustrato etanol, se activa a las bacterias y éstas produjeron metano como parte de la metabolización de la materia orgánica. A pesar de que el 'Ensayo 2 Asa' fue preparado igual que el 'Ensayo 1 Csa', éste no obtuvo la misma producción de metano al final de la prueba, posiblemente se deba a que le entraba aire al abrir la botella de manera continua, lo que pudo causar un efecto adverso en las bacterias provocando una disminución en la producción de metano. La ecuación 4.1 explica la formación de metano al tener etanol como sustrato.



El ensayo 'Blanco' contenía lodo en medio mineral más 2 g DQO/L de etanol como sustrato y su producción de metano fue menor en comparación con el resto de los reactores a los que se le añadió 2000 mg/L de Ag^+ . A lo largo de la AME en los 3 ensayos existen periodos de no producción, estos se pueden deber a que el lodo contiene una comunidad de distintos tipos de bacterias, metanogénicas, acetogénicas, desnitrificante, las cuales aprovechan el sustrato, pero no lo asimilan necesariamente como metano, por lo que existe una competencia por el sustrato. En las primeras 50 horas las bacterias metanogénicas aprovecharon el sustrato y produjeron metano, sin embargo, más adelante pudo ser otra comunidad de bacterias las que consumían el sustrato. De igual forma cabe destacar que el ensayo 'Blanco' tuvo la menor producción de metano para las primeras 50 horas, no obstante, cerca de las 200 horas había una diferencia de 6 mL entre la producción de metano del ensayo 'Blanco' y 'Ensayo 1 Csa', posteriormente para la hora 380 la diferencia fue de alrededor de 3 mL de metano, lo que sugiere que la presencia de plata incentiva la activación de bacterias metanogénicas y el tiempo de producción de metano, en otras palabras, la velocidad de producción de metano en ausencia de plata es menor y no presenta una fase estacionaria prolongada como en el caso de los reactores con plata.

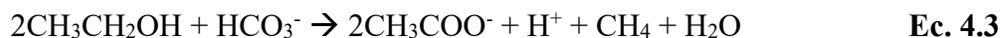
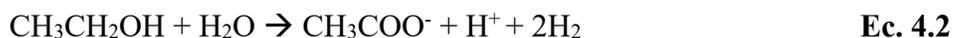
Oleskiewicz y Sharma reportaron en 1990 que metales como hierro, zinc y plata puede representar un estímulo para las bacterias anaerobias. Se muestra como un efecto estimulante dentro del sistema metabólico de microorganismos anaerobios, dado que actúan como cofactores enzimáticos en las rutas metabólicas de las células. Dentro de los factores a considerar está la concentración, las condiciones del medio como temperatura, pH, ORP y la

presencia de sulfatos, carbonatos y fosfatos, debido a que estos ligandos orgánicos propician la inactivación del efecto tóxico de los metales.

En estudios previos de Ruiz-Castillo en 2016 y García-Torres en 2019, trabajaron con bacterias anaerobias en sistemas en lote, en medios con una concentración de 2000 mg/L de plata, donde la presencia de este metal no presentó efecto inhibitorio para las bacterias anaerobias, por lo contrario, a concentraciones menores resultó incentivar la producción de metano.

Otra consideración al trabajar con microorganismos en presencia de un metal lo presenta Mudhoo y Kumar, en su trabajo de 2013 explican que ciertas condiciones dentro de un reactor biológico como la distribución y concentración de biomasa frente a la presencia de metales pesados, así como su concentración en una forma iónica soluble en la solución, repercuten en el volumen de metano producido. De igual forma García-Torres (2019) muestra etapas de mayor y menor producción de metano, y explica el aprovechamiento del sustrato por otro tipo de bacterias como pueden ser las bacterias acetogénicas ya que también son afines a etanol como sustrato.

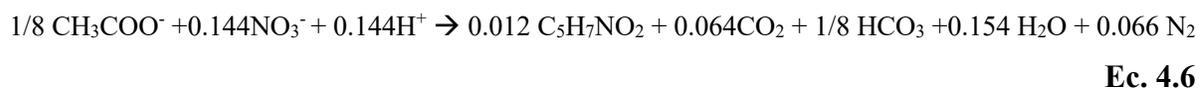
Como se mencionó anteriormente, existen tres tipos de comunidades presentes en el lodo, por lo que el consumo de DQO no necesariamente se traduce en actividad de las bacterias metanogénicas. Las bacterias acetogénicas son capaces de producir acetato a partir de etanol (Ec. 4.2), mientras que las bacterias metanogénicas pueden además producir metano a partir de etanol (Ec. 4.3) y también a partir de acetato (Ec.4.4). Sin embargo, la activación o inactivación de cierto grupo de bacterias depende también de las condiciones y cambios en el medio, como pH y ORP.



Para la interpretación de producción de metano es importante integrar el hecho de que existen periodos de distinta actividad por parte de los microorganismos. Existe un periodo de adaptación al medio, un periodo de consumo y competencia por el sustrato. Estos periodos

pueden monitorearse con el consumo de DQO o grado de remoción por parte del consorcio anaerobio.

El proceso de desnitrificación en condiciones anaerobias se ha descrito por Canto *et al* (2008), el sustrato actúa como donador de electrones para la reducción de NO₃⁻ a gas nitrógeno. La Ec. 4.3 y 4.4 muestra la reacción de oxidación de etanol y acetato para producir metano, de igual forma hacen uso del etanol (Ec.4.5) y acetato (Ec.4.6) para reducir nitratos a gas nitrógeno.



Cada una de las comunidades de bacterias juega un papel importante con las reacciones y condiciones que propician. Chen y Lin en 1993 explicaron la estructura de crecimiento de las comunidades bacterianas en un lodo. La primera capa más cercana al material la conforman las bacterias metanogénicas, posteriormente se agrupan las bacterias desnitrificantes que consumen las trazas de oxígeno que pueda haber en el medio y ayudan a tener la condición anóxica para las bacterias metanogénicas. El equilibrio de consumo de sustrato permite tener las condiciones de ORP y pH favorables para su desempeño.

A continuación, en la Tabla 4.3 se presentan los valores finales de remoción de DQO, pH y ORP por cada ensayo. Las condiciones anaerobias permiten el correcto desempeño de las bacterias metanogénicas. Mediante el monitoreo del parámetro ORP se conoce la presencia o ausencia de oxígeno en el medio. Varnero-Moreno en 2011 explica que el ORP de las bacterias metanogénicas llega a evolucionar de un estado oxidado a uno reducido debido a la presencia de bacterias acetogénicas encargadas de consumir el oxígeno existente.

Tabla 4.3 Parámetros iniciales y resultados de remoción de DQO, pH y ORP de reactores en lote.

Ensayo	DQO	Nitratos	pH	ORP	Remoción	Nitratos	ORP	pH
	Inicial	Inicial	Inicial	Inicial	de DQO	Final	final	final
	(mg/L)	(mg/L)		(mV)	(%)	(mg/L)	(mV)	
Blanco	2000	-	7.1	381	56	-	-392	7.0
Ensayo 1 Csa	2000	1149	7.0	399	66	2.0	-405	7.1
Ensayo 2 Asa	2000	1149	7.0	408	55	5.1	-382	8.3

El mayor porcentaje de remoción de DQO fue para el 'Ensayo 1 Csa' lo que concuerda con su producción de metano al obtener el máximo volumen acumulado. Por otro lado, el 'Ensayo 2 Asa' también presenta un alto porcentaje de remoción, pero menor producción de metano, este comportamiento sugiere que las bacterias acetogénicas consumieron el sustrato en mayor proporción que las bacterias metanogénicas.

Para corroborar la activación del grupo de bacterias desnitrificantes, se midió la concentración de nitratos en el medio. Estos se cuantificaron mediante espectroscopia UV-vis, en la Tabla 4.3 se muestra el porcentaje de remoción que se obtuvo por ensayo. Su remoción indica que estas bacterias también consumieron parte del sustrato. Dado que el porcentaje de remoción de nitratos es superior al 99% esto indica que, a partir de la activación de las bacterias desnitrificantes, los nitratos del medio también sufrieron una reducción a gas nitrógeno.

Por parte de las condiciones finales de ORP se muestran valores de un medio reducido. El potencial bajo el cual actúan los microorganismos anaerobios va desde los -200 a lo -350 mV (Lorenzo Acosta y Obaya Abreu, 2005), por lo que estos valores también corroboran la activación de las bacterias metanogénicas debido al sustrato etanol. Con respecto al pH, éste obtuvo valores neutros, mismo que refleja la oxidación del sustrato y la activación de las bacterias acetogénicas al consumir lo del medio y disminuir la alcalinidad. Sin embargo, Rittman y McCarty en 2001 reportan que el valor óptimo de pH es entre 6.5 y 7.6, mientras que el 'Ensayo 2 Asa' alcanzó un pH de 8.3, esto junto con un valor de ORP de -405 mV sugiere un desequilibrio entre las comunidades de bacterias (Del Real Olvera, 2007). Condiciones similares se alcanzaron en el trabajo de Ruiz-Castillo con un pH entre 7.64 y 8.04, sugiere que un aumento en la alcalinidad se da por la generación de iones OH^- durante la desnitrificación (ver Ec. 4.5).

La actividad metanogénica había terminado cuando la gráfica de producción de metano mostró un comportamiento asintótico o fase estacionaria prolongada. De los reactores se recuperó el líquido sobrenadante libre de lodo y se prosiguió a la caracterización para comprobar la presencia de nanopartículas de plata en cada ensayo.

4.3 Cuantificación de plata

El principal interés al suministrar el nitrato de plata en el medio fue la reducción de plata iónica a plata metálica, por lo que la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica permitió

cuantificar la concentración de plata iónica en el medio, dentro de la suposición que la diferencia de plata con respecto a la inicial permite conocer la concentración de nanopartículas de plata. La Tabla 4.4 presenta los resultados de cada ensayo.

Tabla 4.4 Concentración de plata iónica por EAA

Ensayo	Ag ⁺ inicial	Ag ⁺ final	remoción
	(mg/L)	(mg/L)	(%)
Ensayo 1 Csa	2000	9.3	99.5
Ensayo 2 Asa	2000	5.2	99.7

La concentración de plata iónica al finalizar la AME mostró una remoción mayor al 99%. Por lo que se puede decir que la plata que se encontraba en solución se redujo a plata metálica, esto de acuerdo con el diagrama de Pourbaix (Figura 4.2) dadas las condiciones un potencial inferior a -380 mV y pH neutro.

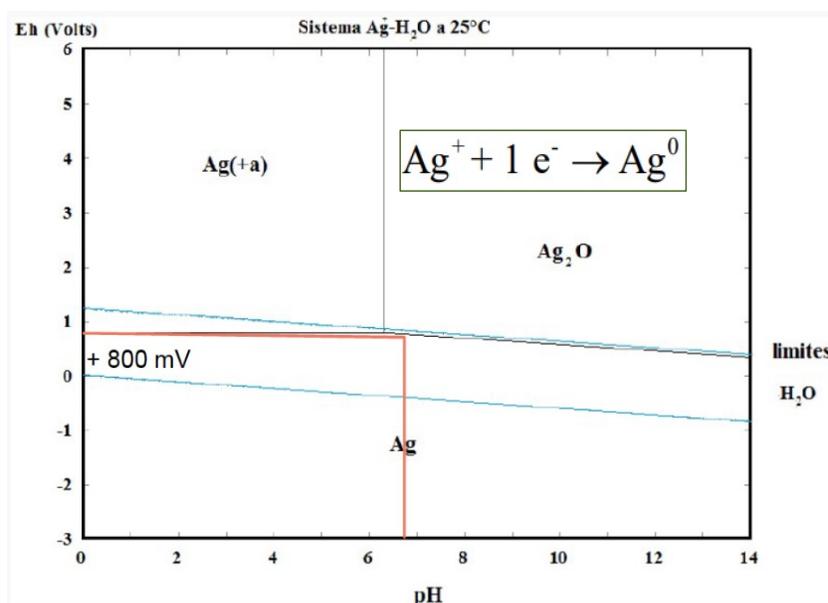


Figura 4.2 Diagrama de Pourbaix de plata

4.4 Caracterización de AgNPs

Para confirmar la reducción de plata en forma de nanopartículas se hizo una caracterización por espectroscopia UV-vis, espectroscopia electrónica de barrido y difracción de rayos X para conocer la morfología, tamaño y estructura cristalina.

La Figura 4.3a muestra la botella con lodo metanogénico y medio previo a la AME, la tonalidad del medio es semitransparente a oscura, en la Figura 4.3b se muestra la botella con lodo metanogénico tras el termino de la AME, el medio se observa de tonalidad café-marrón con ligeros reflejos de tonalidad grisácea, en el fondo es perceptible acumulación de partículas grisáceas.

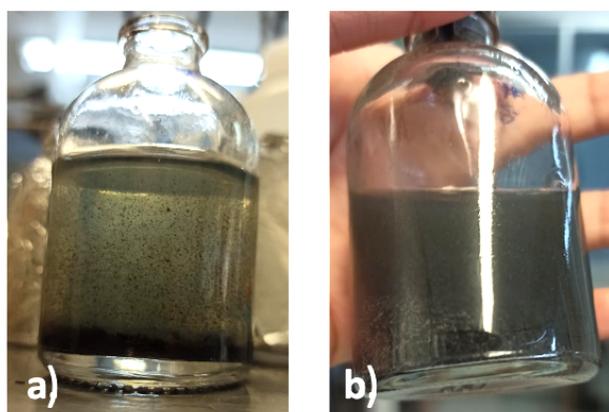


Figura 4.3 Reactores en lote con lodo metanogénico en a) previo a AME, b) termino de AME.

Mulvaney (1996) reporta el cambio de color del medio a marrón tras completar la síntesis por la excitación de la resonancia del plasmón superficial en las nanopartículas metálicas.

Mediante espectroscopia UV-vis se corroboró la presencia de nanopartículas de plata. Esta caracterización permite detectar el plasmón de resonancia superficial de las nanopartículas y dependiendo del tamaño del pico se puede estimar el tamaño y acumulación de las nanopartículas. Se tomó una alícuota de la suspensión del reactor evitando tomar porción de lodo que pueda interferir en la lectura y se diluyó con agua desionizada. El espectro de absorción para esta síntesis verde se muestra en la Figura 4.4 con un pico de absorción alrededor de los 400 nm, lo que corrobora la presencia de nanopartículas de plata (Singh *et al.*, 2018).

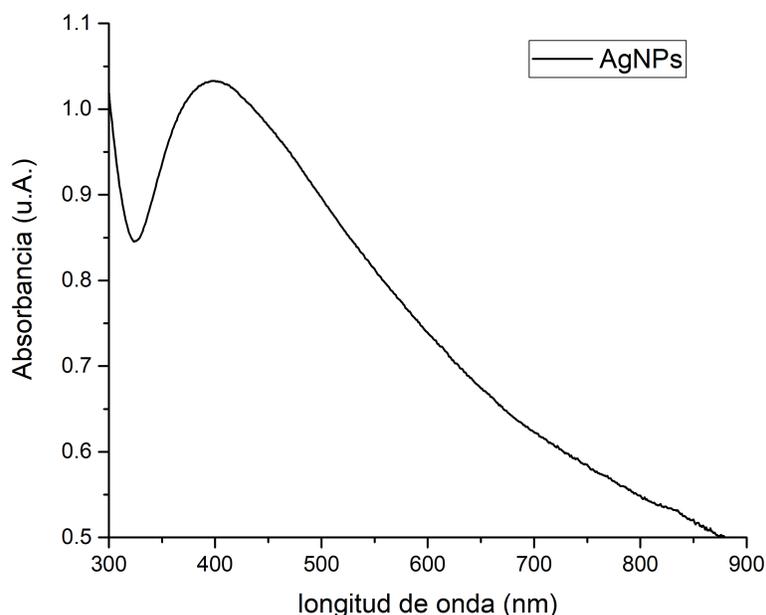


Figura 4.4 Espectro UV-vis de nanopartículas de plata por síntesis verde.

En la literatura se reporta que nanopartículas de plata que absorben a una longitud de onda de entre 397 a 403 nm se trata de nanopartículas con un tamaño entre 15 y 70 nm (*Raza et al.*, 2016). Adicionalmente, la anchura del pico revela la presencia de aglomerados de tamaño mayor a los 100 nm (*Otari et al.*, 2015).

En el trabajo de Vegosavá y Mraziková de 2017 relacionado a la síntesis de AgNPs hacen hincapié en las condiciones de almacenamiento, dado que su exposición a luz solar incrementa la tasa de colisión entre las nanopartículas, lo que a su vez induce a aglomeraciones y alterar la polidispersión de tamaños. Las mejores condiciones de almacenamiento son en oscuridad y a 5°C para garantizar la estabilidad de las nanopartículas por un periodo largo de tiempo.

Las micrografías por MEB se muestran en la Figura 4.5 y el análisis por espectroscopia de EDS en la Figura 4.6, ambos confirmaron la síntesis de nanopartículas, con información sobre morfología, tamaño y elementos presentes.

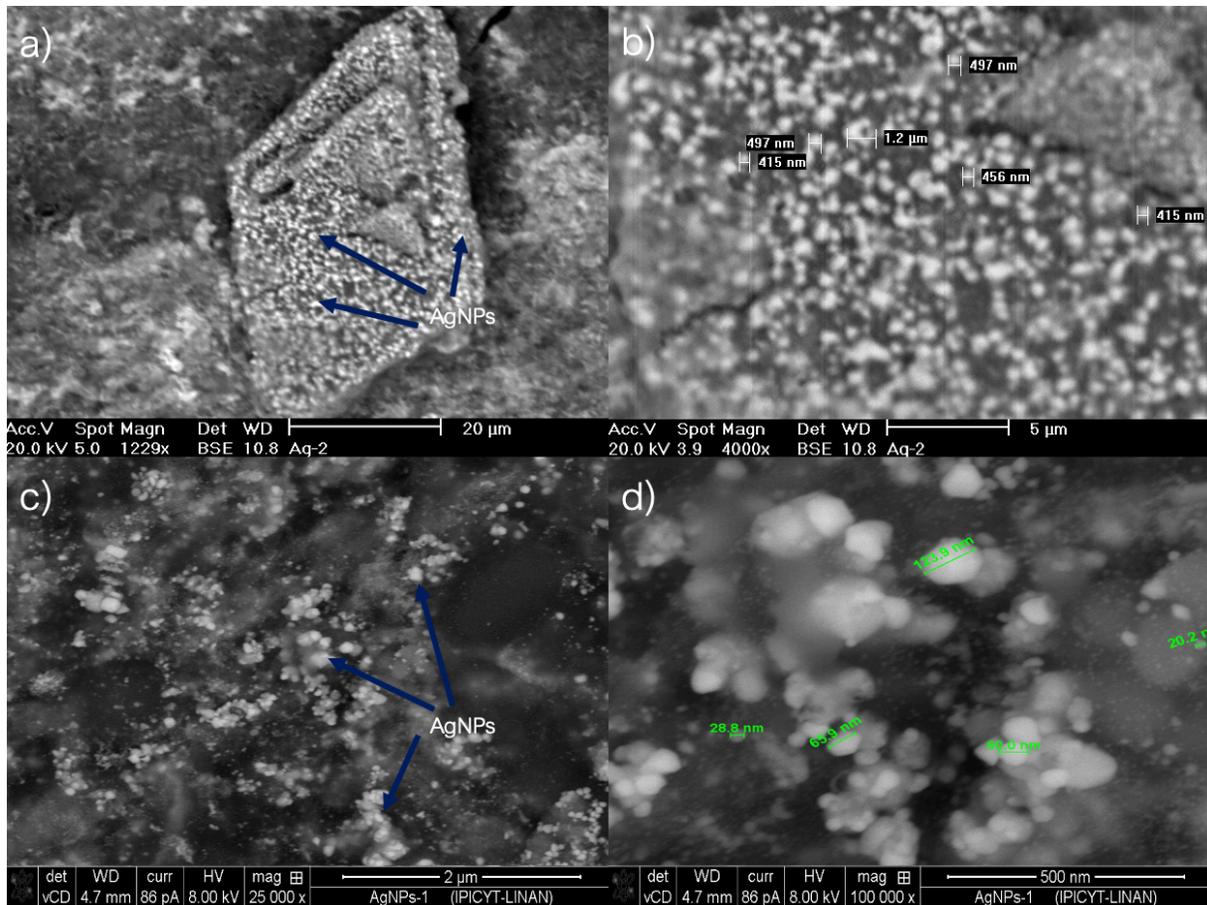


Figura 4.5 Micrografía por MEB de a) AgNPs lavadas, b) Tamaño de AgNPs de 415 a 500 nm c) AgNPs no lavadas, d) Tamaños de AgNPs entre 20 a 123 nm.

La morfología de las nanopartículas es esférica, en la Figura 4.5 a) se presenta un aglomerado donde los puntos blancos son las nanopartículas tras el proceso de lavado, en b) se presenta un acercamiento que permite medir aglomerados de las nanopartículas, con un tamaño entre 415 y 500 nm o hasta de 1 μm . En c) y d) se presentan las nanopartículas no lavadas como esferas de mayor brillo, se observa materia a su alrededor de distintas tonalidades que puede ser el conjunto de materia orgánica y sales que las acompañan, los tamaños de nanopartículas fueron variados, desde menores a 20 nm que no se lograron enfocar ni medir, esferas de 123 nm de diámetro. La variación de tamaños entre lavadas y no lavadas se puede deber a una pérdida de las de menos tamaño durante los ciclos de lavado o una aglomeración.

Si bien el espectro de UV-vis predecía un tamaño de partícula entre 15 y 70 nm, dicho análisis se hizo al término de la AME, mientras que el análisis por MEB se realizó meses después de la síntesis y las nanopartículas en el mismo medio de las bacterias anaerobias, probablemente

las condiciones de almacenamiento fomentaron la aglomeración de las AgNPs por lo que se recomienda preparar las muestras para MEB tras terminar la síntesis y conservar la solución de nanopartículas en refrigeración.

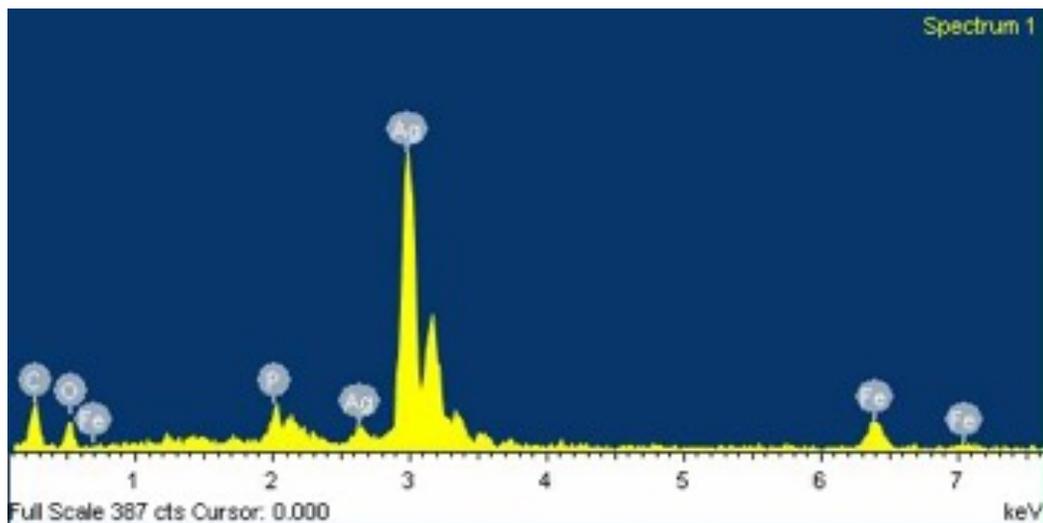


Figura 4.6 Análisis elemental por EDS confirmando presencia de plata

El análisis de EDS confirmó que las nanopartículas en solución son de plata. La señal de mayor intensidad es un pico cercano a las 3 keV, perteneciente a la plata, otras señales de menor intensidad corresponden al carbono y oxígeno como restos orgánicos de la síntesis, así como hierro y potasio proveniente del medio de las bacterias, compuestos que a pesar de los lavados pudieron quedarse adheridos a la superficie de las nanopartículas. En la literatura se reporta a los nanocristales de plata metálica con una señal a 2.983 keV, debido a la resonancia superficial del plasma (Raza *et al.*, 2021). Mismo valor lo ha reportado Jagtap *et al* (2013) cuando sintetizaron AgNPs con extracto de semilla de *Artocarpus heterophyllus*, confirmando que el uso de recursos naturales permite la síntesis de partículas en el orden nanométrico.

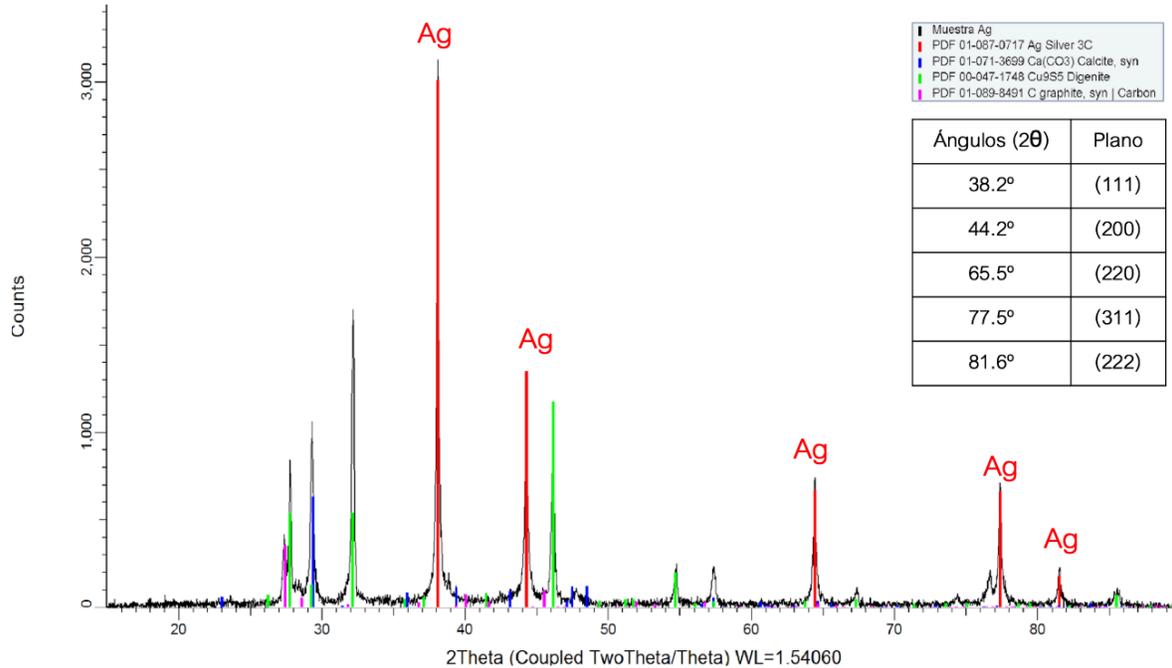


Figura 4.7 Difractograma por XRD de las nanopartículas de plata

En la Figura 4.7 se presenta en negro la señal proveniente de la muestra y en rojo se sobrepone la señal característica de la plata de los datos de JCPDS file No. 04-0783. En la tabla adjunta se presentan la lectura de picos y los planos con lo que se relacionan, estos planos son característicos para una estructura cristalina cubica centrada en las caras.

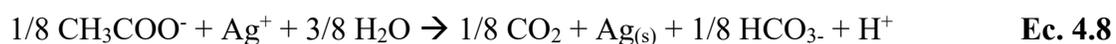
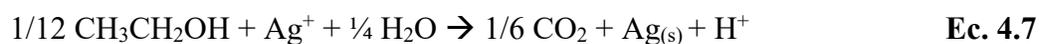
Durante la síntesis con bacterias anaerobias la sal de plata aporta los iones Ag^+ en el medio acuoso, al reducirse y pasar al estado sólido los átomos toman un orden de acuerdo con su tamaño. En el caso de los metales, la estructura que toman es muy ordenada de manera que forman una red cristalina, de la unión entre átomos se forma una “semilla” que da paso a una nanopartícula. La estructura cristalina brinda las propiedades al material, en el caso de la plata su estructura FCC le brinda las propiedades de conducción eléctrica y térmica, maleabilidad y ductilidad, estas características sumadas a un tamaño nanométrico proporcionan propiedades magnéticas, ópticas, antibacterianas, entre otras. (Falconi, 2015; Sanchez-Moreno, 2017).

4.5 Condiciones para biosíntesis y mecanismos de síntesis de AgNPs

El objetivo principal de los ensayos de AME fue la síntesis de nanopartículas de plata, por lo que en el medio con las bacterias se colocó una solución madre de 2000 mg/L de Ag^+ en

forma de AgNO₃. El primer mecanismo que permite la síntesis de las nanopartículas es el medio reductor bajo el cual actúan las bacterias metanogénicas al consumir el sustrato, como se muestra en la Tabla 3.3 la solución de los ensayos tiene un rango de potencial redox de -300 a -400 mV, valores que están dentro del diagrama de Pourbaix y permite la reducción de Ag⁺ a Ag⁰. En la literatura se reporta que el medio necesario para reducir la plata debe estar en el rango entre valores de ORP desde 800 mV hasta -400 mV (Kavamura y Esposito, 2010). Mismas condiciones que reportan García-Torres 2019 y Ruiz-Castillo en 2016 para lodo metanogénico en forma granular y soportado en una biopelícula.

Otro mecanismo que pudo haber intervenido es por la misma presencia del etanol, acetato o compuestos orgánicos que contribuyen a la transferencia de electrones durante la oxidación de éstos y permiten la reducción de Ag⁺. La Ec. 4.7 presenta la reducción de Ag⁺ a partir de etanol y la Ec. 4.8 es reducción de Ag⁺ a partir de acetato (Rittman y McCarty, 2001).



Un tercer mecanismo para la síntesis de nanopartículas es mediante la intervención de biomoléculas como estabilizadores de nanopartículas (Chandran *et al.*, 2016). En el trabajo de García-Torres (2019) se confirmó la presencia del grupo amina de la cisteína por análisis FTIR con picos en 1637.08 y 3321.07 cm⁻¹, mostrando un enlace por interacción electrostática entre el grupo carboxilo de la cisteína y las nanopartículas. Otro pico detectado en 1861 cm⁻¹ pertenece al enlace C-N de las estructuras amino aromáticas (Jena *et al.*, 2013). La presencia del grupo carboxilo ha sido descrito por Otari (2015) como una interacción que beneficia la formación de nanopartículas ya que actúa como capa estabilizadora y evita la aglomeración de las AgNPs.

Una cuarta ruta de síntesis puede ser de manera intracelular por las bacterias anaerobias y sus enzimas reductoras. Dentro de los procesos de digestión anaerobia se da el aprovechamiento de nitratos por parte de la enzima nitro reductasa, encargada de catalizar la reducción de nitratos, misma vía que los iones de plata tomarían para su reducción a Ag⁰. Esta vía ya ha sido descrita por diversos autores (Kumar *et al.*, 2014, Shivaji *et al.*, 2011, Kalishwaralal *et al.*, 2008) donde intervienen los procesos biológicos de las bacterias desnitrificantes con la enzima nitrato-reductasa. Más específicamente dentro de estas enzimas se encuentra el cofactor nicotin adenin dinucleótido (NADH) quien donará los electrones para la

reducción de Ag^+ a plata metálica (Figura 4.8). Esta ruta fue comprobada por Kumar, *et al* (2007) con pruebas *in vitro* realizaron la síntesis de AgNPs mediante la enzima nitrato reductasa extraída y purificada del hongo *Fusarium oxysporum*. Donde describen nuevamente al NADH como elemento de transferencia de electrones para la reducción de plata iónica a plata metálica.

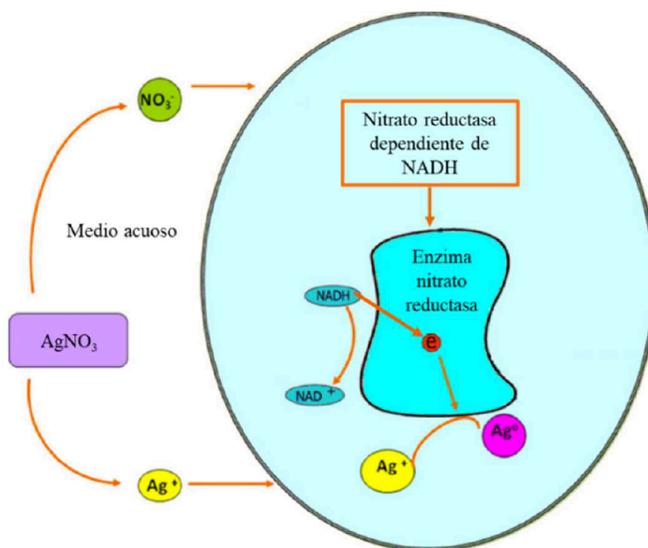


Figura 4.8 Esquema reducción de Ag^+ por enzima nitrato reductasa (Adaptación García-Torres 2019, original Kalimuuthu 2008)

4.6 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se corrobora la efectividad de bacterias anaerobias en sistemas en lote para la síntesis de nanopartículas de plata. Las condiciones de activación de bacterias metanogénicas demostraron que la digestión anaerobia genera un medio reducido con valores de ORP y pH que permitieron la reducción de plata iónica a plata metálica en forma de nanopartículas.

Así mismo se comprobó que la presencia de plata incentiva la AME, los ensayos que incluían la sal de plata tuvieron una mayor tasa de producción de metano en comparación con el ensayo "Blanco" que únicamente contenía el sustrato y fue más prolongada su producción de metano. Los resultados de AME mostraron las fases de producción de metano, esto asociado a los porcentajes de remoción de DQO y valores de ORP, permitió reconocer la población de

bacterias que se activó, en la mayoría de los ensayos predominaron las bacterias metanogénicas. Por otro lado, la remoción de nitratos demostró la activación de las bacterias desnitrificantes quienes también son afines al sustrato etanol. Los valores de ORP alrededor de los -390 mV, permiten reconocer que los microorganismos en mayor proporción fueron las bacterias metanogénicas con periodos de activación de las bacterias acetogénicas también a fines al sustrato etanol.

Mediante espectroscopia UV-vis se comprobó la presencia de nanopartículas de plata al identificar el plasmón de resonancia con un pico a 400 nm, lo que indica tamaño entre 15 y 70 nm con aglomerados de mayor tamaño. Las micrografías de MEB muestran una morfología esférica y un tamaño de partícula entre los 415 y 500 nm. La diferencia de tamaños entre análisis se puede deber al lavado y condiciones de almacenamiento que derivaron en aglomeración de las nanopartículas. El análisis elemental por EDS corroboró a la plata como elemento principal en las nanopartículas con presencia de otros elementos y materia orgánica adherida en la síntesis. Los resultados de difracción de rayos-X arrojaron los picos característicos para una estructura cristalina cubica centrada en las caras para plata.

El principal mecanismo de síntesis que se plantea es a partir del consumo de DQO y activación de la digestión anaerobia, para producir un medio reducido y permitir la reducción de Ag^+ a Ag^0 . Sin embargo, no se descartan otros mecanismos que involucren la misma oxidación del sustrato etanol, que lleva a un flujo de electrones; una síntesis intracelular debido a la enzima nitro reductasa; o la intervención de biomoléculas estabilizadoras que al adherirse a la superficie de las nanopartículas impiden su crecimiento. La síntesis biológica además de permitir la reducción del metal proporciona los estabilizadores en la superficie de la nanopartícula con un menor costo económico, energético y daño ambiental.

5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata ante *Escherichia coli*

5.1 Resultados de inhibición de *E.coli* con AgNPs por síntesis biológica

Una de las propiedades de las nanopartículas de plata es su actividad antimicrobiana. Entre los microorganismos que puede inhibir se encuentran los hongos, virus, las bacterias gram negativo, gram positivo (Woo *et al.*, 2012; Shao, 2014). En este estudio se escogió la bacteria gram negativa *Escherichia coli* para las pruebas de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. *E.coli* es considerada como una bacteria indicadora de contaminación fecal y su análisis valora la calidad de alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, agricultura, industria y recreación (Khan y Gupta, 2020).

5.1.1 Concentración mínima inhibitoria

El concepto de CMI se refiere a la mínima concentración del material antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de 24 horas de incubación (Andrews, 2001). Las pruebas para corroborar la propiedad antibacteriana de las AgNPs se realizaron en una placa micropocillos con 180 μ L de una solución con *E.coli* y 20 μ L de AgNPs (Sección 3.3.2). Los resultados de inhibición de *E.coli* se muestran en la Figura 5.1 para un periodo de incubación de 24 horas a 35°C, las concentraciones de AgNPs evaluadas fueron 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/L tanto en partículas lavadas como no lavadas.

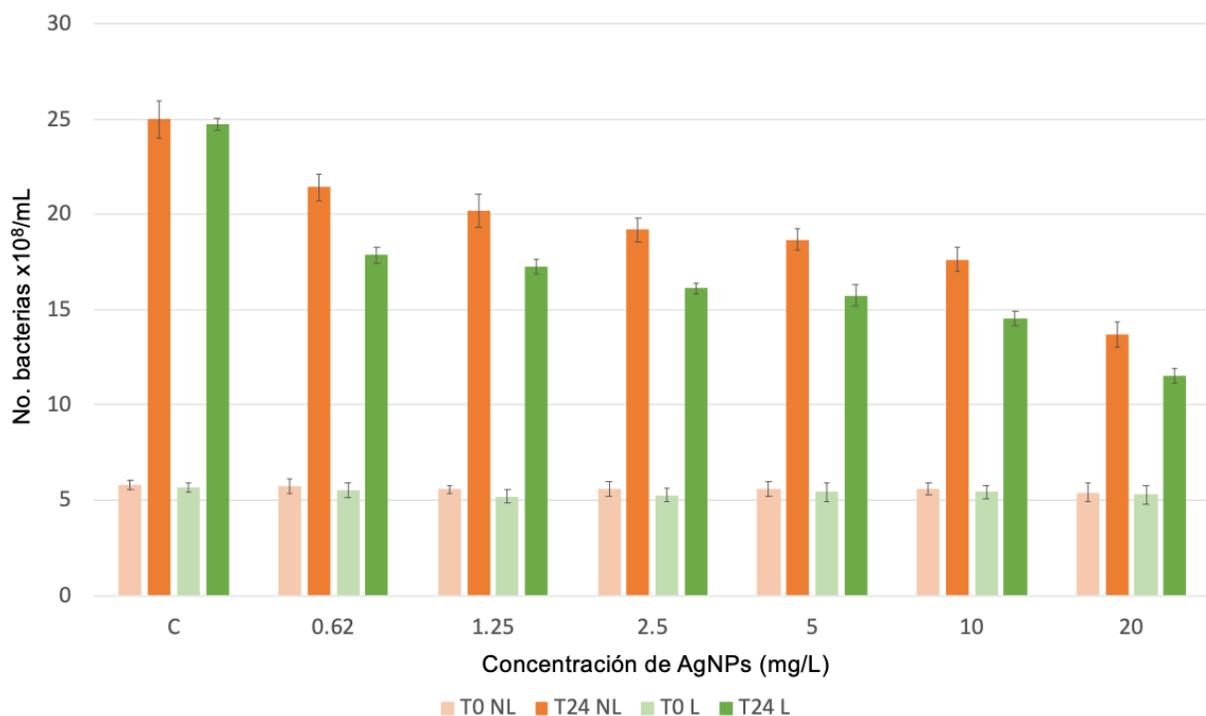


Figura 5.1 Resultados de actividad antimicrobiana de AgNPs. C=Control de crecimiento bacteriano. Naranja = AgNPs no lavadas (NL), Verde = AgNPs lavadas (L). Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24.

Se observa que en la hora 0 para todas las concentraciones se tiene una población similar de alrededor de 6×10^8 bacterias/mL. Pasadas las 24 horas de incubación el grupo control creció hasta una población de 25×10^8 bacterias/mL, obteniendo el máxima crecimiento de bacterias en comparación con los ensayos con presencia de AgNPs donde se muestra una inhibición en el crecimiento de *E.coli*.

Desde la mínima concentración evaluada, 0.62 mg/L, se observa una inhibición en el crecimiento de *E.coli*, de 15% para las AgNPs no lavadas y de 28% para las lavadas, por lo tanto se establece esta concentración como la CMI. Para las concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/L de AgNPs la población de bacterias fue entre 20 y 15×10^8 bacterias/mL lo que representa entre un 20 y 30% de inhibición bacteriana. Por otro lado, las AgNPs lavadas a concentración de 10 mg/L obtuvieron resultados similares a las AgNPs no lavadas a concentración de 20 mg/L con una inhibición de 42%. El mayor efecto antibacteriano se observó con las AgNPs lavadas a 20 mg/L donde la inhibición fue de 53%.

También se puede observar que las AgNPs lavadas tienen una actividad antimicrobiana del 15% mayor en comparación con las nanopartículas no lavadas. Esto podría ser debido a que

el lavado de las nanopartículas permitió liberar de su superficie sales o materia orgánica que impedía el contacto con las bacterias o la liberación de iones de plata, que disminuía el área de contacto con *E.coli*. Hua *et al* (2016) realizaron una síntesis de AgNPs con extracto de la planta *Taxus yunnanensis*, y se hizo la comparación de lavado con agua desionizada y con alcohol metílico. El espectro de FTIR de las AgNPs indicó una mayor eliminación de los grupos unidos a las AgNPs con el lavado con alcohol. Sin embargo, los resultados de potencial zeta muestran que después de dos semanas las AgNPs lavadas con agua éstas se mantienen estables, mientras que el lavado con alcohol rompió la estabilidad coloidal de las nanopartículas, por lo que sugieren que los ligandos o metabolitos secundarios en los extractos podrían ayudar en la estabilidad de las AgNPs.

Con respecto a la propiedad antibacteriana como menciona Morones *et al* (2005), uno de los mecanismos antibacterianos es la interacción de los iones de plata al provocar un estrés oxidativo en la bacteria. La Figura 5.2 muestra las distintas vías por las cuales las AgNPs interactúan y llevan a la muerte a la bacteria, mismas que se mencionan a continuación. El tamaño de la nanopartícula también juega un papel fundamental para su propiedad bactericida, como se observó en la sección 4.4, las micrografías revelan que las nanopartículas sintetizadas mediante digestión anaerobia tienen un tamaño variado desde nanopartículas por individual de 40 nm hasta aglomerados que alcanzan las dos micras. De forma que como lo mencionan Tang y Zheng (2018) las partículas de mayor tamaño se pueden acumular en la membrana de la bacteria e interrumpir la cadena transportadora de electrones, así como de impedir la permeabilidad de nutrientes con el exterior, mientras que las nanopartículas con tamaños de 1 a 75 nm son capaces de penetrar a la bacteria, interactuar y causar daños al ADN. Ahmed en 2017 describe la importancia de la carga positiva de los iones de plata para las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas, ya que al liberar iones Ag^+ , estos son capaces de formar complejos con ácidos nucleicos e interactuar especialmente con los nucleósidos en lugar de los grupos fosfato de los ácidos nucleicos causando así un daño al ADN de la bacteria.

Otro parámetro importante es la forma de las nanopartículas, en el trabajo de Helmlinger *et al* (2016) reportan que las nanopartículas con un área de superficie específica más alta mostraron un efecto más tóxico que partículas con áreas de superficie específicas más pequeñas, en sus resultados las formas de platos y esférica son más tóxicas en comparación con rodillos y cubos.

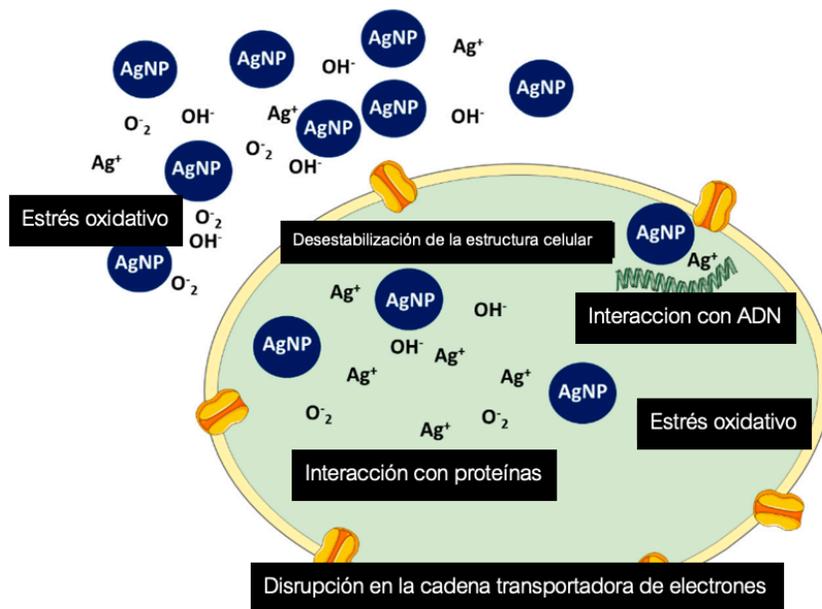


Figura 5.2 Mecanismos de interacción entre una célula bacteriana y las AgNPs (Sánchez-López, 2020)

En la Tabla 5.1 se presenta la CMI de *E.coli* para nanopartículas sintetizadas por vía biológica y por vía química, demostrando la propiedad antibacteriana, sin embargo esta propiedad tiene gran dependencia en el tipo síntesis ya que metodologías biológicas obtuvieron valores de CMI inferiores a trabajos con síntesis química, de igual forma existe una relación en cuanto al tamaño. Guzman *et al* (2012) encontraron una CMI de 14.38 mg/L de AgNPs para partículas entre 10 y 20 nm de síntesis química, por otro una CMI menor la presenta Ruiz-Castillo (2016) con 6.3 mg/L para partículas de 2 a 45 nm.

Tabla 5.1 Comparación de CMI de AgNPs sintetizadas por diversas vías

Ruta de síntesis	Rango de tamaño (nm)	Forma	CMI (mg/L AgNPs)	Microorganismo evaluado	Referencia
Químico	10-20 (ind.) 40-60 (agl.)	Esférica	14.38	<i>Escherichia coli</i>	Guzman, M. <i>et al.</i> , 2012
Biológico	50-200	Platos	27		Sharma, V.K <i>et al.</i> , 2009
Biológico	65-80	Triangular	4		Vo, Q. <i>et al</i> , 2019
Biológico	2-45	Esférica	6.3		Ruiz-Castillo, A.L. 2016
Biológico	15-70 (ind.) 415-500 (agl.)	Esférica	0.62		Este trabajo

*ind: nanopartículas individuales, agl: aglomerado de nanopartículas

Además Helmlinger en 2016 enlista las características importantes que determinan la actividad antimicrobiana de las nanopartículas como son: el tamaño, la forma, la carga superficial, la funcionalización, mismas que definirán la interacción y la distribución intercelular.

En diversos trabajos (Abbasi *et al.*, 2016; An *et al.*, 2015; Bilal *et al.*, 2019) se presenta a la síntesis biológica como una alternativa rentable y ecológica en comparación con métodos químicos y físicos debido a ventajas en las condiciones como temperatura ambiente, pH neutro, bajos costos y uso de reactivos con menor impacto ambiental.

Namrata en 2009 reporta la síntesis de AgNPs mediante el uso de extracto de *Carica papaya* donde el análisis por FTIR muestra la presencia en superficie de proteínas y otros ligandos necesarios que funcionaron como estabilizadores naturales para las nanopartículas. De igual forma Huang *et al* (2007) reportan la biosíntesis de AgNPs con hojas de *Cinnamomum camphora*, confirmando que grupos funcionales como $-C-O-C-$, $-C-O-$, $-C = C-$ y $-C = O$, son los ligandos de protección de las nanopartículas, mismos que evitan un mayor crecimiento y aglomeración de las nanopartículas. El impedimento para que se aglomeren las nanopartículas, les permite conservar un tamaño nanométrico, que a su vez favorece los mecanismos de inhibición antibacteriano previamente mencionados.

5.1.2 Ensayo de Actividad Metabólica

Posterior a las 24 horas de incubación con las bacterias, se añadió el reactivo Alamar Blue, esto para evaluar la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico basado en la medición de absorbancia a 570 nm (ver sección 3.3.3). El principio activo que sigue el Alamar blue, es la capacidad de su ingrediente activo resazurina de penetrar células vivas y reducirse a la molécula resorufin. La reducción ocurre debido a la enzima oxidoreductasa activa únicamente en las células viables, de manera que se obtiene una medida cuantitativa de la viabilidad y citotoxicidad para comparar el crecimiento bacteriano en la presencia o ausencia de nanopartículas de plata. (Ahmed *et al.*, 1994). En la Figura 5.3a se observa la resazurina antes de la reducción, se muestra como un colorante azul no fluorescente y en Figura 5.3b tras

reducirse a resorufin la coloración cambia a rojo altamente fluorescente. La Tabla 5.2 muestra los resultados de esta prueba tras un tiempo de incubación de una hora.

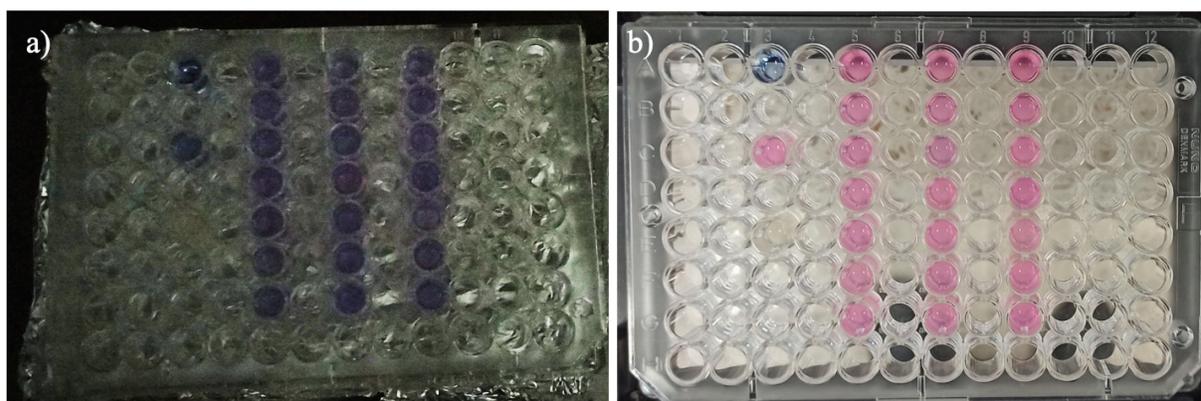


Figura 5.3 Ensayo de actividad metabólica cambio de color tras reducción de resazurina a resorufin

Tabla 5.2 Ensayo de viabilidad celular para distintas concentraciones de AgNPs

AgNPs	lavadas			no lavadas		
	Concentración (mg/L)	ABS promedio	% Viabilidad	Citotoxicidad	ABS promedio	% Viabilidad
20	0.5953	74	inhibición	0.8508	72	inhibición
10	0.6052	75	inhibición	0.8796	74	inhibición
5	0.6248	77	viable	0.9128	77	viable
2.5	0.6397	79	viable	0.9375	79	viable
1.25	0.6425	80	viable	0.9751	82	viable
0.62	0.6784	84	viable	1.0016	85	viable
Control	0.8070	100	control	1.1841	100	control

De acuerdo con el análisis de actividad metabólica al usar Alamar Blue, se considera un efecto tóxico cuando la viabilidad celular es inferior al 75% y viable cuando la viabilidad celular es superior al 75%. Dado que el objetivo de usar nanopartículas de plata es tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria *E.coli*, el parámetro tóxico representa una alta inhibición. A concentraciones de 10 y 20 mg/L de AgNPs la viabilidad celular es inferior al 75%, mientras que a concentraciones de 5 a 0.62 mg/L el efecto inhibitorio es bajo y aun representa viabilidad para el crecimiento celular. De igual forma este ensayo corrobora un efecto tóxico superior para las nanopartículas lavadas en comparación con las nanopartículas no lavadas.

En el trabajo de Helmlinger (2016) reportó resultados similares, donde en pruebas de citotoxicidad, una concentración mayor a 12.5 mg/L mostraba viabilidad celular menor al 75% para AgNPs esféricas, de igual forma una concentración de 25 mg/L reportaba viabilidad celular de aproximadamente 50%.

La relación entre tamaño y toxicidad de AgNPs fue presentado por Angel *et al* (2013) donde en sistemas acuáticos con organismos de agua dulce como *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Ceriodaphnia dubia*, la plata iónica era más tóxica que las AgNP y éstas a su vez más tóxicas que partículas de plata de escala micrométrica. De aquí la importancia de aprovechar la liberación de iones de plata por parte de nanopartículas ancladas a una superficie para prolongar el efecto inhibitorio y evitar agregaciones que minimicen la propiedad.

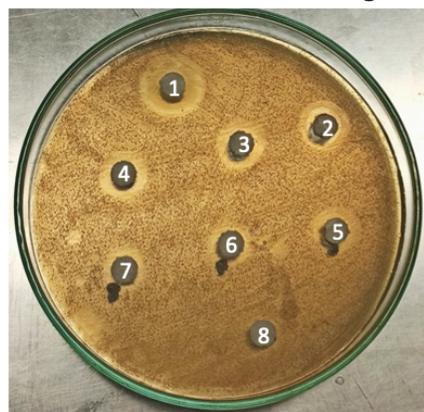
5.1.3 Concentración mínima bactericida

Otra prueba para conocer el efecto antimicrobiano fue en ensayo de CMB ésta prueba da a conocer la mínima concentración del material antimicrobiano para eliminar a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un periodo de incubación de 24 horas. Para ello se inoculó *E.coli* en cajas Petri con agar sólido y se depositaron las AgNPs lavadas y no lavadas en filtros, tras 24 horas se midió el halo de inhibición, la Figura 5.4 muestra los resultados.

Transcurridas las 24 horas de incubación se muestran las zonas de inhibición alrededor de los discos, el control positivo fue clorhexidina al 5% con un halo de inhibición de 14 mm y el control negativo fue agua desionizada sin mostrar una zona de inhibición, las demás concentraciones de AgNPs distribuidas en los discos mostraron una zona de inhibición. Se observa que AgNPs tienen un efecto antibacteriano relacionado con la concentración, a mayor concentración mayor diámetro de la zona de inhibición. Al comparar los halos entre las AgNPs lavadas y no lavadas, se observa un diámetro mayor por parte de las nanopartículas lavadas, a una concentración de 20 mg/L el halo es de 14 mm, comparable con el halo de clorhexidina al 5%. Por otro lado, las AgNPs no lavadas muestran un diámetro de inhibición de 10 mm para concentraciones de 2.5 a 20 mg/L. La CMB en ensayos de 0.62 mg/L mostraron un halo de inhibición de 8 mm donde no se fomenta el crecimiento de *E.coli*. Cabe destacar que la solución de nanopartículas se expandió más allá de la superficie del filtro, de forma que su

comportamiento fue como agente migratorio a través del filtro, esta movilidad le permitió un área de inhibición correlacionada a la concentración de nanopartículas.

AgNPs no lavadas



	Concentración de AgNPs (mg/L)	Halo de inhibición (mm)
1	Clorexidina (5%)	14
2	20	10
3	10	10
4	5	10
5	2.5	10
6	1.25	8
7	0.62	8
8	Agua desionizada	0

AgNPs lavadas



	Concentración de AgNPs (mg/L)	Halo de inhibición (mm)
1	Clorexidina (5%)	14
2	20	14
3	10	12
4	5	10
5	2.5	9
6	1.25	8
7	0.62	8
8	Agua desionizada	0

Figura 5.4 Ensayo de CMB para distintas concentraciones de AgNPs

Raza *et al* (2016) reportan el uso de AgNPs sintetizadas por vía química mediante citrato de trisodio y nitrato de plata, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana ante *E. coli* y *P.aeruginosa*, específicamente para *E.coli* sus pruebas en difusión en disco muestran un halo de inhibición de 7.3 mm para una concentración de 10mg/L de AgNPs. En comparación con el presente trabajo las nanopartículas no lavadas mostraron un halo de inhibición de 10 mm, por lo que una vía de síntesis biológica muestra ventajas en la propiedad antibacteriana.

5.2 Conclusiones

Las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata se comprobaron con su efecto de inhibición de *E.coli* en medio acuoso y medio agar. Desde bajas concentraciones las

nanopartículas de plata inhiben el crecimiento de *E.coli*, la CMI para este trabajo se encontró a 0.62 mg/L de AgNPs con una inhibición del 27% para nanopartículas lavadas, por otro lado la mayor inhibición fue de 53% cuando se evaluó una concentración de 20 mg/L de AgNPs. A pesar de que tanto nanopartículas lavadas como no lavadas presentan una inhibición de *E.coli*, el lavado de las nanopartículas permite que su superficie se libere de sales y materia orgánica, lo que mejora la interacción con *E.coli*. La prueba en agar sólido mostró que la CMB es igual de 0.62 mg/L de AgNPs obteniendo un halo de inhibición de 8 mm.

Con estos resultados se corrobora que la síntesis biológica de nanopartículas de plata con bacterias anaerobias otorga una propiedad antibacteriana superior a la reportada en estudios con síntesis fisicoquímica, sumada a esta ventaja, la amplia gama de recursos biológicos hace que la síntesis biológica sea de mayor viabilidad en cuanto a costos, a no ser contaminante con el medio ambiente y requerir menos energía que métodos fisicoquímicos. Por individual las nanopartículas obtuvieron buenos resultados y si estas son integradas a otros materiales se les pueden proporcionar la propiedad antibacteriana al liberarse gradualmente los iones de plata e inhibir el crecimiento bacteriano.

6. Desarrollo de una geomembrana con nanopartículas de plata, para la desinfección de un agua contaminada con *Escherichia coli*

El objetivo de soportar las nanopartículas de plata en una geomembrana polimérica es brindarle la propiedad antimicrobiana a este material y que sea usada como recubrimiento en superficies e inhibir el crecimiento de bacterias. Las superficies de interés incluyen reservorios de agua limpia como estanques, aljibes, etc., por lo que el recubrimiento lleva por nombre geomembrana. Los polímeros que se evaluaron en este trabajo son polietileno y polipropileno, tal como se muestra en la Tabla 6.1 impregnados con distintas concentraciones de AgNPs.

6.1 Resultados de la fabricación de geomembrana con AgNPs

El método de fabricación fue por inversión de fase al usar el solvente hexano para solubilizar el polímero y un no solvente etanol para desprender la geomembrana de la superficie (ver sección 3.4). El polímero tuvo un cambio de fase controlado, a partir de una solución del polímero y al ir disminuyendo la temperatura entró en un proceso de envejecimiento formando la geomembrana.

Tabla 6.1 Geomembranas fabricadas a distintas concentraciones

Polímero	Polipropileno		Polietileno	
Concentración de AgNPs impregnadas (mg/L)	Sin AgNPs		Sin AgNPs	
	100 L	100 S	100 L	100 S
	200 L	200 S	200 L	200 S
	300 L	300 S	300 L	300 S
	400 L	400 S	400 L	400 S
	500 L	500 S	500 L	500 S
	600 L	600 S	600 L	600 S

L: nanopartículas lavadas, S: nanopartículas sin lavar

Dependiendo de la cantidad de solución del polímero sobre la superficie, la geomembrana puede adquirir una tonalidad translúcida o blanquecina, así como el periodo de envejecimiento puede demorar más al ser una capa más gruesa. En la Figura 6.1 se muestran las

geomembranas impregnadas con AgNPs tanto para a) polipropileno como para b) polietileno. Las geomembranas de polipropileno son mas brillantes y translucidas en comparación con las geomembranas de polietileno. En cuanto a la flexibilidad, el polipropileno cuenta con menor flexibilidad, por lo que al hacer los cortes en circunferencias el polietileno, más sencillo de recortar, Figura 6.2.

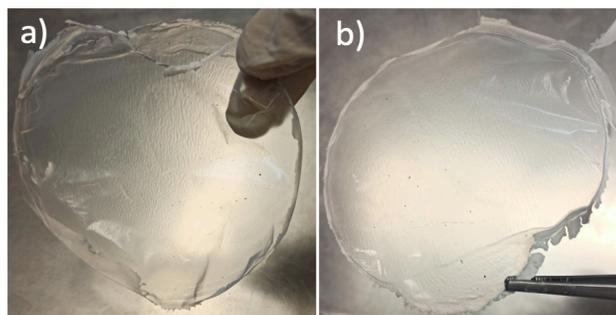


Figura 6.1 Geomembranas polimérica impregnada con AgNPs a) Polipropileno, b) Polietileno



Figura 6.2 Recorte de geomembranas de polietileno para pruebas de CMI y CMB

6.2 Caracterización de geomembrana compuesta

Para corroborar la impregnación de las nanopartículas en la geomembrana se les hizo un análisis mediante microscopia electrónica de barrido. La Figura 6.3 de a) a d) muestra la geomembrana de polietileno desde menor a mayor aumento, en la figura a) la superficie de la geomembrana se puede observar que es lisa con algunos agrietamientos derivados de la técnica de síntesis, el cambio de temperatura y el mismo desprendimiento de la superficie de vidrio; en b) se observan los destellos de nanopartículas de plata dentro los poros que tiene la geomembrana, de las tonalidades destacan la presencia de subcapas de polímero; en c) y d) se señalan los cúmulos de nanopartículas, por individual se aprecian de forma esférica y un tamaño aproximado de 140 nm. De este análisis se destaca que las nanopartículas se encuentran impregnadas en orillas, grietas y poros de la geomembrana, en su mayoría están inmersas en la geomembrana y no en superficie. Las imágenes de la geomembrana de polipropileno se muestran en e) con una vista panorámica de la superficie con protuberancias y zonas con mayor

rugosidad en comparación con la geomembrana de polietileno, en f) se observan las grietas entre protuberancias, mismas que albergan sales o nanopartículas, sin embargo, se muestra una nanopartícula inmersa dentro de la matriz, lo que sugiere una impregnación de las AgNPs en las capas interiores de la geomembrana.

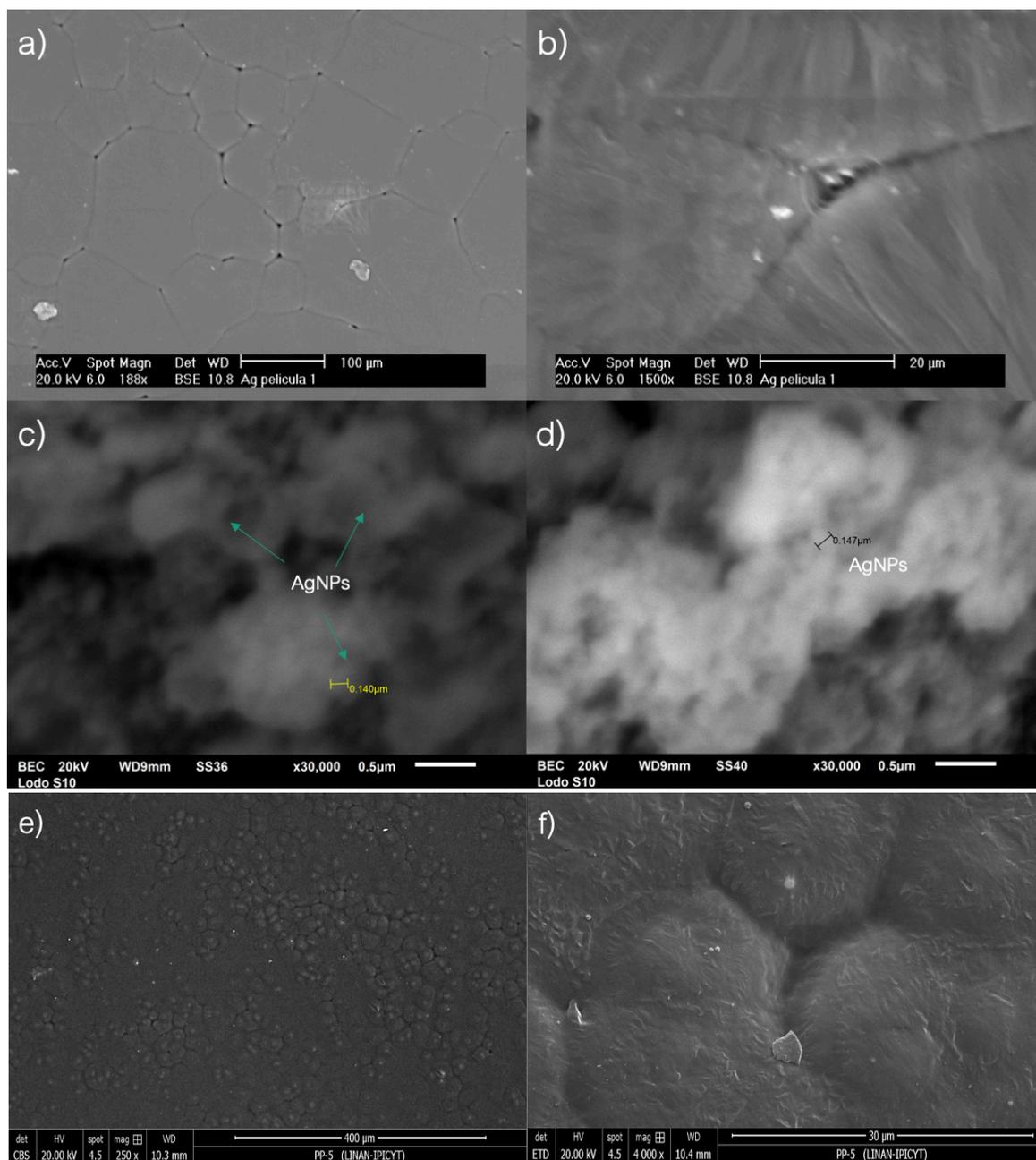


Figura 6.3 Micrografía por MEB de a) superficie de geomembrana de polietileno, b) poro en geomembrana, c) nanopartículas de plata esféricas, d) aglomerado de AgNPs en superficie de geomembrana de polietileno, e) superficie de geomembrana de polipropileno, f) nanopartícula inmersa en la geomembrana

Mediante espectroscopia EDS se realizó un análisis de los elementos químicos presentes en la geomembrana, la Figura 6.4 presenta el espectro donde se comprueba la presencia de plata con el pico característico en 2.98 keV de nanocristales de plata. Así mismo, la lectura tiene presencia de otros elementos que representan impurezas como silicio, calcio, fósforo, sodio, provenientes del momento de la fabricación, de la misma cristalería o incluso de sales presentes en el medio de las nanopartículas.

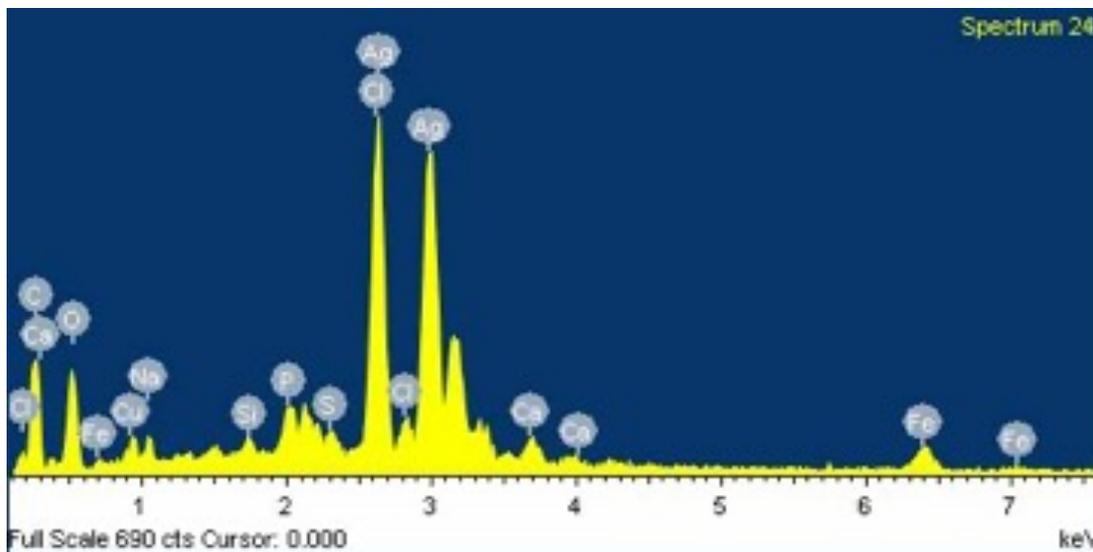


Figura 6.4 Análisis elemental por EDS confirmando presencia de plata en geomembrana de polietileno

6.3 Resultados de la geomembrana con AgNP ante *E.coli*

El propósito de soportar las nanopartículas es otorgarle la propiedad antibacteriana a una geomembrana polimérica, que ésta pueda adherirse a superficies o reservorios de agua susceptible a estancamiento y evitar la proliferación de *E.coli* por la contaminación del agua.

Para corroborar la inhibición bacteriana se hicieron pruebas de CMI en caldo nutritivo de *E.coli*, Ensayo de Actividad Metabólica con el reactivo Alamar Blue y pruebas de CMB en medio Agar. Para conocer el desempeño de las geomembranas se realizaron observaciones de crecimiento de biofilm y pruebas de tiempo de vida con exposición en medio con bacterias y lecturas semanales de desprendimiento de plata.

6.3.1 Concentración mínima inhibitoria y Ensayo de Actividad Metabólica

De igual forma que en las pruebas para corroborar la propiedad antibacteriana de las nanopartículas, se evaluaron las geomembranas impregnadas a distintas concentraciones al entrar en contacto con el caldo nutritivo y las bacterias (ver sección 3.5.1). En la placa de micropocillos se incubó durante 24 horas las geomembranas y se midió por espectroscopia UV-vis el crecimiento e inhibición de *E.coli*, los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk, para conocer las diferencias estadísticamente significativas de inhibición. Posterior a las 24 horas se realizó la prueba de Actividad Metabólica al añadir el reactivo Alamar Blue e incubar una hora más para conocer la viabilidad celular al estar en contacto con las geomembranas (ver sección 3.5.1).

En la Figura 6.5 se presentan los resultados para CMI para las geomembranas de polipropileno, con concentraciones de AgNPs de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/L, donde los colores claros pertenecen a las medidas a las 0 horas y en color oscuro las medidas de concentración de *E.coli* tras 24 horas de incubación. Con asterisco se marcan los ensayos que no presentan una diferencia estadística con respecto al grupo control, de acuerdo con la prueba de normalidad, cuando la P es mayor a 0.05 la diferencia no es estadísticamente representativa por lo cual el material antibacteriano a dicha concentración evaluada no inhibe el crecimiento bacteriano de manera estadísticamente representativa, sigue perteneciendo al grupo control.

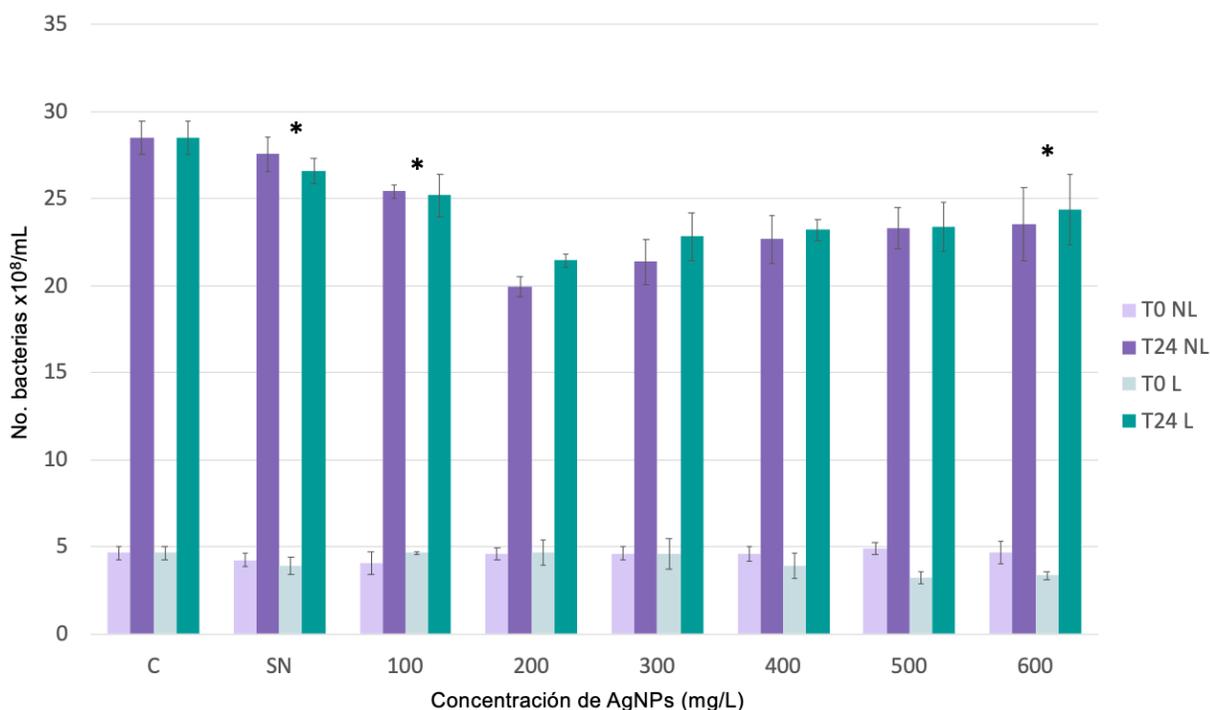


Figura 6.5 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polipropileno con AgNPs a concentraciones de 100 a 600 mg/L. C=Control de crecimiento bacteriano. SN = sin nanopartículas, Morado = AgNPs no lavadas, Verde = AgNPs lavadas. Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24, L=lavadas, NL= no lavadas, * $p > 0.05$ vs. control.

El mayor crecimiento es del grupo control, el cual contenía únicamente caldo nutritivo y *E.coli*, por parte de la geomembrana de polipropileno sin material antimicrobiano se observa un crecimiento siendo el mayor crecimiento de entre los pocillos con geomembranas. A partir de las geomembranas de polipropileno impregnadas con nanopartículas de plata se observa una inhibición mayor al 15%. Sin embargo, la prueba de normalidad muestra que los grupos de geomembranas sin nanopartículas, con 100 mg/L y 600 mg/L de AgNPs no tienen una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, por lo que no se está inhibiendo el crecimiento de *E.coli*. Por lo tanto, la concentración mínima inhibitoria para la geomembrana de polipropileno es de 200 mg/L de AgNPs para nanopartículas lavadas y no lavadas, de igual forma son las geomembranas que presentaron la mejor inhibición ya que a concentraciones superiores a ésta muestran un mayor crecimiento bacteriano.

En la Figura 6.6 se muestran los resultados de CMI para las geomembranas de polietileno, donde al igual que con polipropileno, las geomembranas impregnadas con plata presentan una inhibición de *E.coli* en comparación con el grupo control o con las geomembranas que no contenían plata.

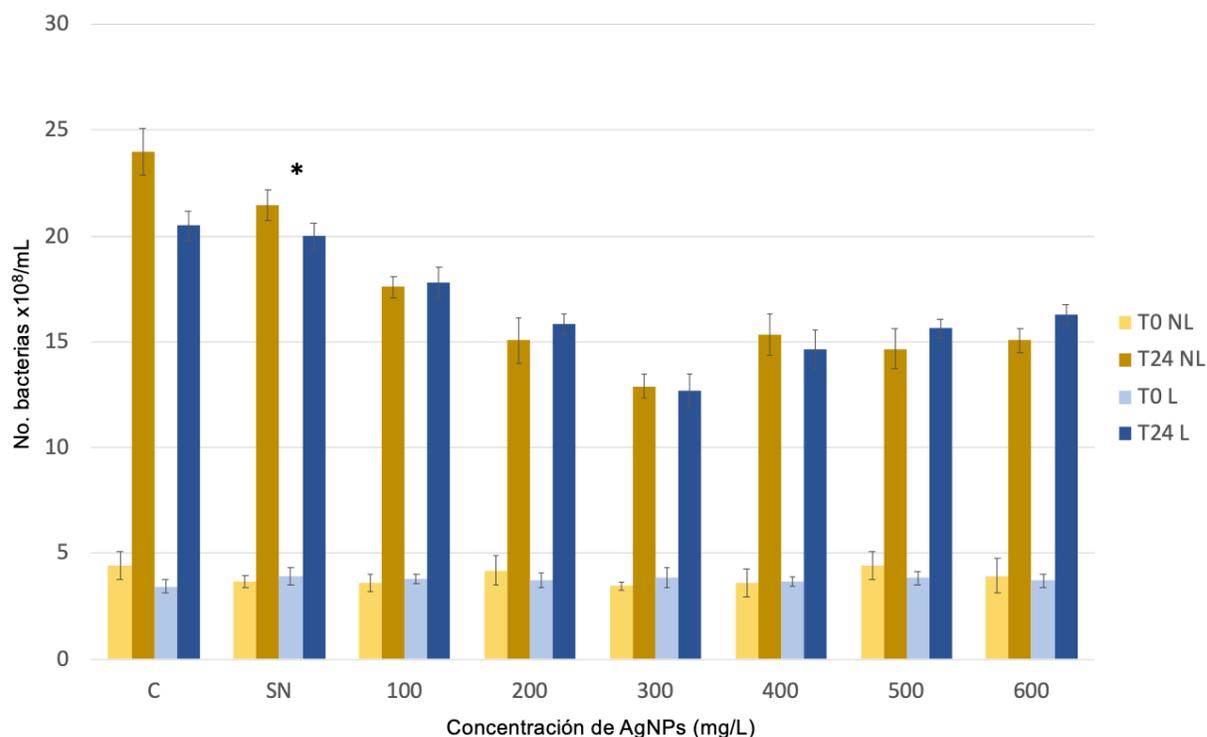


Figura 6.6 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polietileno con AgNPs. C=Control de crecimiento bacteriano. SN = sin nanopartículas, Cafe = AgNPs no lavadas, Azul = AgNPs lavadas. Color claro = hora 0, Color oscuro = hora 24, L= lavadas, NL= no lavadas, *p > 0.05 vs. control.

Para las geomembranas de polietileno el único grupo que no cuenta con una diferencia estadística significativa fue la geomembrana sin impregnación de nanopartículas, por lo que se le puede considerar parte del grupo control ya que no presenta inhibición en el crecimiento de *E.coli*. Al evaluar las distintas concentraciones se observa que desde 100 mg/L de AgNPs se presenta una inhibición del 20% por lo que se considera como la concentración mínima inhibitoria. Por otro lado, la mayor inhibición para las geomembranas de polietileno se observa con una impregnación con 300 mg/L de AgNPs.

Existen diferencias entre las estructuras de ambos polímeros. En los trabajos de Viera *et al*, 2008 y de Furukawa *et al*, 2006 se describe la estructura de polietileno y polipropileno. A pesar de que ambos materiales son amorfos, el polipropileno es más cristalino que el polietileno, por lo que tiene un mayor ordenamiento de las cadenas poliméricas y menor aceptación de impurezas. Por su parte el polietileno al tener un mayor grado de desorden en su red deja volumen libre entre sus ramificaciones, mismos espacios que pueden ocupar las nanopartículas. En la impregnación de nanopartículas del presente trabajo se observa con los mejores resultados

de inhibición con 300 mg/L de AgNPs en el caso de polietileno y 200 mg/L de AgNPs para polipropileno.

Nikonorova *et al* en 1992 reportan la síntesis de las nanopartículas fue *in situ*. La reducción de sales metálicas como plata, cobre, níquel y hierro en forma de nanopartículas fueron impregnadas en membranas de tereftalato de polietileno, polipropileno y polietileno. En el caso de polipropileno observaron un tamaño de poro de 10 nm, mientras que para polietileno fue de 16 nm. El crecimiento de las nanopartículas de hierro fue de 11 nm y se anclaron en los poros de matriz de polipropileno, por otro lado, la matriz de polietileno acepto nanopartículas de plata de 30 nm, de cobre de 24 nm y de níquel de 13nm, que sugieren un aumento de tamaño de poro para alojar nanopartículas. En relación con el presente trabajo, de igual forma el polietileno tiene mayor aceptación de AgNPs en comparación con el polipropileno y se supondría la impregnación de AgNPs de tamaños menores a 30 nm, mismas que se encontraron en la Figura 4.5 para la solución de nanopartículas no lavadas, las partículas de mayor tamaño no se acoplarían a la matriz y se expulsarían fuera de esta, de manera similar si al momento de mezclar las nanopartículas y la solución polimérica, se aglomeran las nanopartículas su tamaño impide que se establezcan en los poros.

En el 2006 Tseng *et al* reportaron que el enlace iónico entre los iones metálicos y la matriz polimérica suele ser inestable en solución acuosa. El efecto de hidratación provoca que los iones metálicos se desprendan del polímero y se aglomere fácilmente. Su trabajo se enfocó en la impregnación de AgNPs en fibras de polipropileno para lo cual propuso el reemplazo de la unión iónica con una unión de alta estabilidad con la adición de un polímero quelante o grupos quelantes, como el éster 3- (biscarboximetilamino) -2-hidroxi propílico del ácido 2-metacrílico (GMA-IDA), que contiene un grupo quelante de ácido iminodiacético. El GMA-IDA junto con monómeros vinílicos componen el copolímero quelante con sitios de coordinación para la impregnación de iones y nanopartículas de plata.

En el trabajo de Du *et al* (2021) impregnaron una matriz de polipropileno con nanopartículas esféricas de plata y nanopartículas en forma de tetrápodos de óxido de zinc, este trabajo menciona la importancia que las nanopartículas a impregnar sean de una superficie suficientemente hidrófoba para ser compatibles con la matriz del polímero y evitar agregaciones, para esto en su trabajo añadieron a la solución de las nanopartículas metacrilato de 3-

(trimetoxisilil) propilo (MPS), este compuesto puede formar un enlace con las AgNPs y polimerizar junto con la matriz, por lo que es una forma de anclar a las nanopartículas.

En la investigación de Sile-Yuksel *et al* (2014) destacan que las AgNPs tienden a acumularse y agregarse en una fase rica en polímero y también podrían mantenerse con más fuerza dentro de una matriz polimérica viscosa como el acetato de celulosa, mientras que en polímeros como polietersulfona, la viscosidad es más baja provocando por una mayor tasa de difusión del solvente, alta porosidad donde las nanopartículas pueden moverse rápidamente a la superficie de la geomembrana formada debido a la rápida inversión de fase. El parámetro de viscosidad es un indicio de la posición que tendrán las AgNPs si se establecen mayormente en capas superficiales o se asienten en subcapas de la matriz polimérica.

Los resultados obtenidos para la inhibición de *E.coli* corroboran la propiedad antibacteriana por una impregnación de nanopartículas en el interior de la membrana, en los poros, como lo reportan los autores previamente mencionados, mismo que se observó con las imágenes de MEB (sección 6.2), donde se aprecia que las nanopartículas de plata se encuentran en las grietas y poros de la superficie, mientras que en la geomembrana de polipropileno se encuentran inmersas en subcapas y forman protuberancias en la superficie.

Otra prueba que se realizó en el presente trabajo fue un ensayo de actividad metabólica, esto para conocer el porcentaje de viabilidad celular tras estar en contacto con las geomembranas y determinar si éstas generan un efecto tóxico en *E.coli*. El compuesto resazurina dentro del Alamar Blue es permeable en las células y se reduce a resorufina en las células metabólicamente activas, éstas se tornan rojo brillante de manera que se puede leer la intensidad de su fluorescencia e interpretarse como el número de células vivas. Cuando el porcentaje de viabilidad celular es mayor al 75% se dice que es viable el crecimiento celular, mientras que un porcentaje menor expresa toxicidad para las células, lo que para este estudio se traduce en una inhibición. En la Tabla 6.2 se encuentran los resultados para las geomembranas de polipropileno y la Tabla 6.3 muestra los resultados de polietileno.

Tabla 6.2 Pruebas de toxicidad con ensayo de actividad metabólica para polipropileno

Polipropileno						
AgNPs	lavadas			no lavadas		
Concentración (mg/L)	ABS promedio	% Viabilidad	Citotoxicidad	ABS promedio	% Viabilidad	Citotoxicidad
SN	0.5598	81	viable	0.5932	83	viable
100	0.5398	78	viable	0.5956	87	viable
200	0.5683	82	viable	0.5217	77	viable
300	0.5868	85	viable	0.5785	85	viable
400	0.5378	78	viable	0.5627	83	viable
500	0.5235	76	viable	0.6138	90	viable
600	0.5715	83	viable	0.5495	81	viable
Control	0.6914	100	control	0.6816	100	control

Debido a que el porcentaje de viabilidad para las geomembranas de polipropileno impregnadas con nanopartículas tanto lavadas como no lavadas es mayor al 75% se puede decir que el material no se considera citotóxico o presenta una inhibición representativa para *E.coli*.

Tabla 6.3 Pruebas de toxicidad con ensayo de actividad metabólica para polietileno

Polietileno						
AgNPs	lavadas			no lavadas		
Concentración (mg/L)	ABS promedio	% Viabilidad	Citotoxicidad	ABS promedio	% Viabilidad	Citotoxicidad
SN	0.9015	98	viable	0.7552	99	viable
100	0.8412	92	viable	0.6041	79	viable
200	0.6862	75	inhibición	0.6219	81	viable
300	0.6210	68	inhibición	0.5197	68	inhibición
400	0.7543	82	viable	0.5410	71	inhibición
500	0.7291	79	viable	0.5746	75	inhibición
600	0.8276	90	viable	0.5907	77	viable
Control	0.9187	100	control	0.7652	100	control

Por otro lado, los resultados de actividad metabólica con las geomembranas de polietileno sí muestran una viabilidad celular igual y menor al 75% para las geomembranas con una concentración de 200 y 300 mg/l de nanopartículas lavadas, y a concentraciones de 300, 400 y 500 mg/l para nanopartículas no lavadas, por lo que se traduce en un efecto inhibitorio donde la viabilidad celular de *E.coli* es menor al 75%.

En este sentido los resultados de actividad metabólica muestran que las geomembranas de polietileno tienen un efecto tóxico e inhibitorio mayor que las geomembranas de polipropileno, esto se atribuye a una mayor impregnación de las nanopartículas en la matriz de polietileno. Por parte del mecanismo de inhibición que tienen las geomembranas, las nanopartículas impregnadas en el polímero liberan gradualmente iones de plata a través de la porosidad del polímero, los cuales presentan el efecto tóxico en las células bacterianas.

A continuación, se presentan los resultados (Figura 6.7) al comparar el efecto inhibitorio entre las distintas concentraciones de nanopartículas de plata por individual desde 0.62 mg/L hasta 20 mg/L contra los mejores resultados de geomembranas, 300 mg/L de AgNPs en polietileno y 200 mg/L de AgNPs en polipropileno.

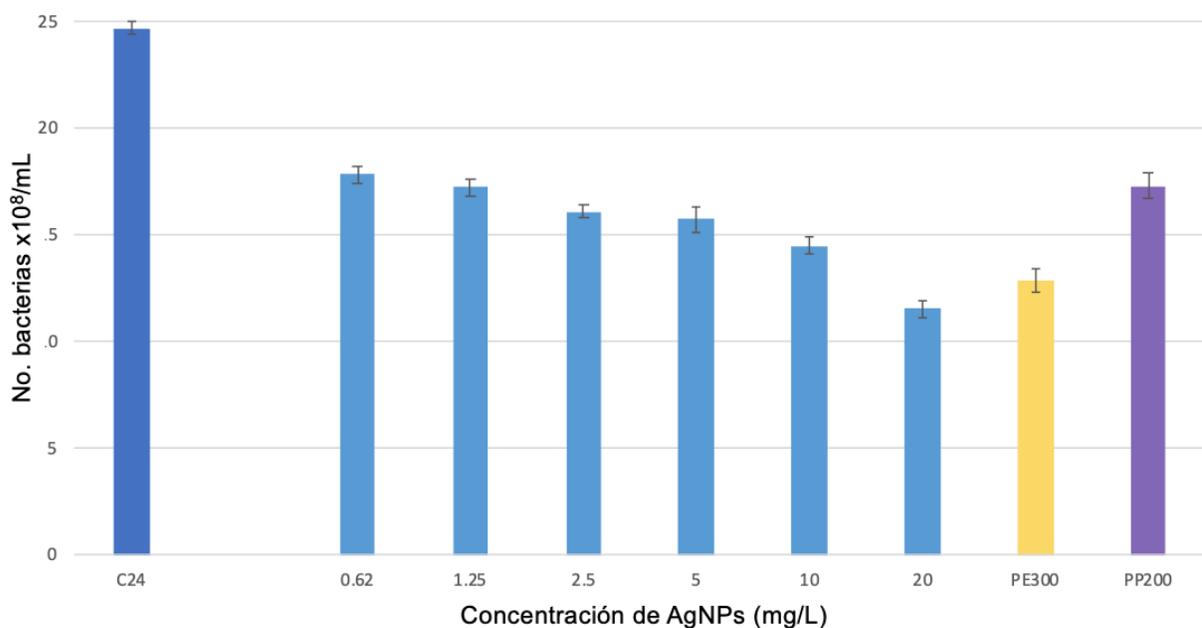


Figura 6.7 Resultados de actividad antimicrobiana para concentraciones de 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/L de AgNPs por individual, PE300: geomembranas impregnadas con 300 mg/L de AgNPs en polietileno y PP200: geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgNPs, C24: control a las 24 hrs.

La mayor inhibición de *E.coli* se presenta con el uso de 20 mg/L de AgNPs en solución, seguido del uso de la geomembrana de polietileno impregnada con 300 mg/L de AgNPs con una inhibición que supera a los 10 mg/L de AgNPs por individual. Mientras que la geomembrana

de polipropileno a 200 mg/L de AgNPs tiene resultados de inhibición comparables con el uso de 1.25 mg/L de AgNPs por individual.

A pesar de que ambos materiales muestran la propiedad antibacteriana, las nanopartículas por individual dispersas en el medio actúan con más de un mecanismo de inhibición contra *E.coli*, con un mayor efecto antibacteriano a menores concentraciones que cuando están en la geomembrana, debido a que no están inmovilizadas en el polímero y pueden penetrar rápidamente en la membrana de la bacteria, como se mencionó en el capítulo 4, el mecanismo de acción de las AgNP es por liberación de iones que crean un estrés oxidativo para las bacterias; por internalización de las nanopartículas en la bacteria y daño al ADN; así como acumulación de las nanopartículas en la membrana de la bacteria lo que impida la cadena transportadora de electrones y su interferencia en la toma de nutrientes con el exterior (Tang y Zheng, 2018; Feng *et al.*, 2000; Hadrup *et al.*, 2018).

Por otro lado, cuando las nanopartículas se encuentran impregnadas en la matriz polimérica, su mecanismo de acción primario es la liberación de iones que al interactuar con las bacterias provoca un estrés oxidativo en la bacteria (Morones, 2005). La Figura 6.8 muestra un esquema para nanopartículas metálicas en una matriz polimérica, donde la liberación de los iones metálicos ocasiona un daño en la membrana celular de la bacteria, se internalizan los iones y llevan a la muerte celular (Palza, 2015). Otro mecanismo consiste en el desprendimiento de las nanopartículas al medio (Santo *et al.*, 2018), de modo que pueden actuar por individual, como previamente se mencionó acumulándose y rompiendo la membrana y pared celular o interactuando con el ADN.

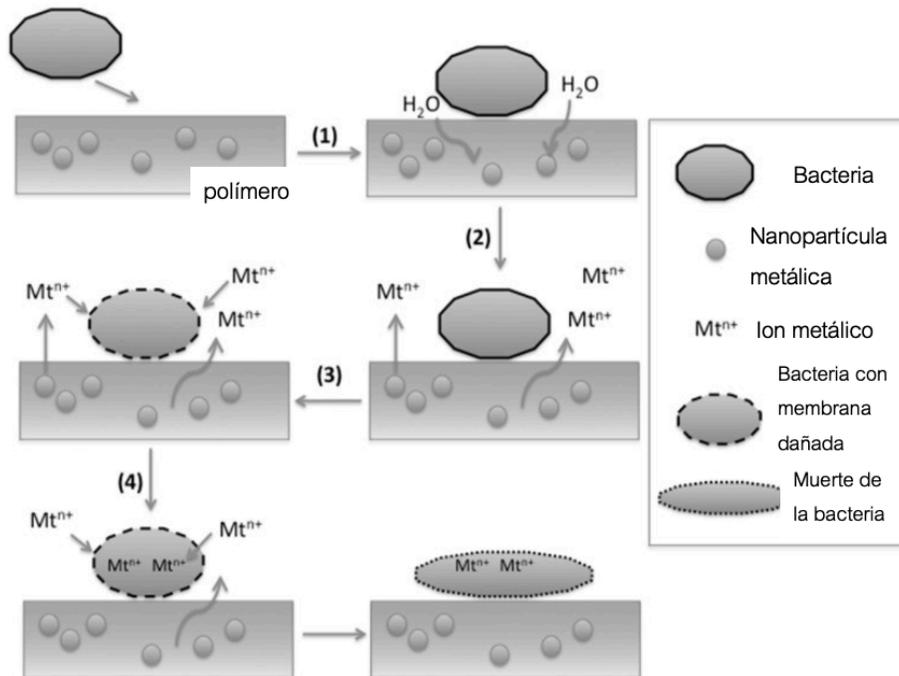


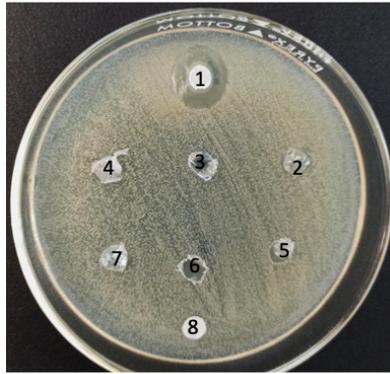
Figura 6.8 Mecanismo de inhibición de nanopartículas en geomembranas (Palza, 2015)

Por estos motivos, el desempeño de la geomembrana durante la inhibición de *E.coli* es distinto a la inhibición por parte de las nanopartículas por individual en el medio acuoso, si bien existen ventajas en cuanto al área que pueden abarcar la distribución de las nanopartículas, el hecho de que las AgNPs estén dispersas en el medio acuoso da paso a su pérdida en el efluente. Por otro lado, la impregnación de las nanopartículas en una matriz polimérica permite prolongar el tiempo de uso de las nanopartículas y liberación de iones. En la sección 6.3.4 se evalúa la liberación de iones de plata para conocer el tiempo de vida que tendrán las geomembranas con la propiedad antibacteriana.

6.3.2 Pruebas de concentración mínima bactericida

La prueba de CMB se realizó en medio agar donde se incubó *E.coli* durante 24 horas con las geomembranas a distintas concentraciones (ver sección 3.5.2), en la Figura 6.9 se muestran las cajas de agar y la tabla con las medidas del halo de inhibición.

AgNPs no lavadas



	Concentración de AgNPs (mg/L)	Halo de inhibición (mm)
1	Clorexidina (5%)	14
2	100	6
3	200	6
4	300	6
5	400	6
6	500	6
7	600	6
	Agua desionizada	0

AgNPs lavadas



	Concentración de AgNPs (mg/L)	Halo de inhibición (mm)
1	Clorexidina (5%)	14
2	100	6
3	200	6
4	300	6
5	400	6
6	500	6
7	600	6
8	Agua desionizada	0

Figura 6.9 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polipropileno

El grupo control negativo es clorhexidina al 5% contando con el mayor halo de inhibición en las pruebas con 14 mm. Las geomembranas de polipropileno tanto para una impregnación de nanopartículas lavadas como no lavadas tuvieron un halo de inhibición de 6 mm, por lo tanto, la CMB para las geomembranas de polipropileno es 100 mg/L de AgNPs.

De igual forma, los resultados de concentración mínima bactericida para las geomembranas de polietileno se muestran en la Figura 6.10 donde nuevamente el halo de inhibición es de 6 mm correspondiente a la circunferencia que abarca la geomembrana en contacto con el cultivo de *E.coli*, y éste se encuentra desde concentraciones de 100 mg/L.

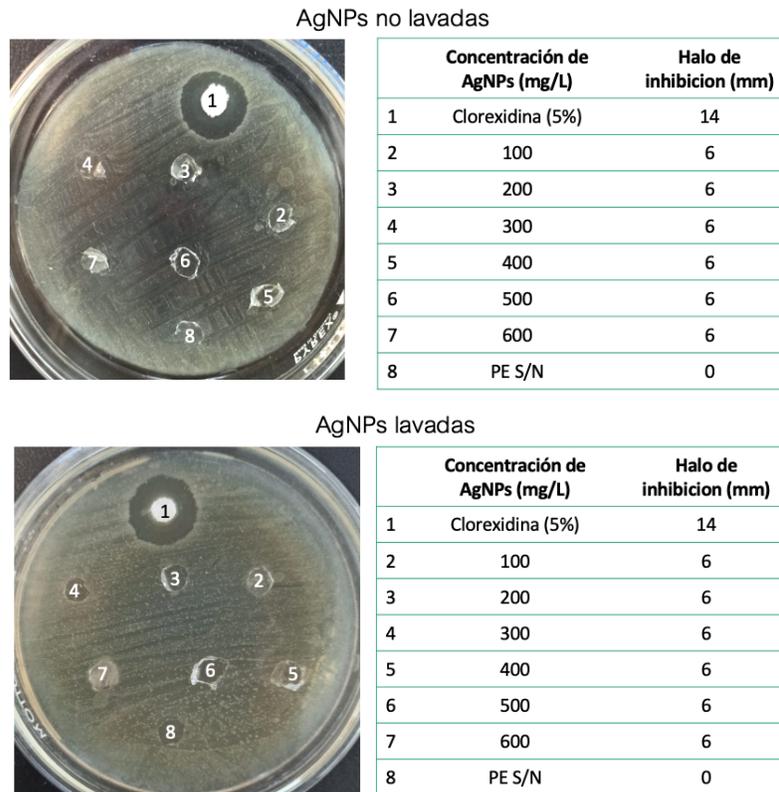


Figura 6.10 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembrana de polietileno

Los resultados de CMB en geomembranas tienen un comportamiento y halo de inhibición distinto en comparación con las pruebas de nanopartículas por individual, esto es debido a que el agente antibacteriano se encuentra inmerso en el polímero y no es un agente migrante que en un ambiente no acuoso se traslade desde el interior hacia el exterior como sucede las con los iones de plata cuando la geomembrana se encuentra en solución. De esta forma, únicamente la superficie en contacto con la bacteria es el área de inhibición que abarca, por lo contrario, la clorhexidina al 5% se encuentra en forma líquida y se deposita en un filtro #1 lo que permite que se esparza a través de éste y a los alrededores formando un halo mayor a la circunferencia del filtro.

6.3.3 Comparativo con geomembranas comerciales

Las mismas pruebas de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida se realizaron para geomembranas impregnadas con plata (2E Ag), sílice y plata (2P

AgSiO₂), así como dióxido de titanio y plata (2P AgTiO₂). En la Figura 6.11 se muestran los resultados de inhibición de *E.coli* para cada material.

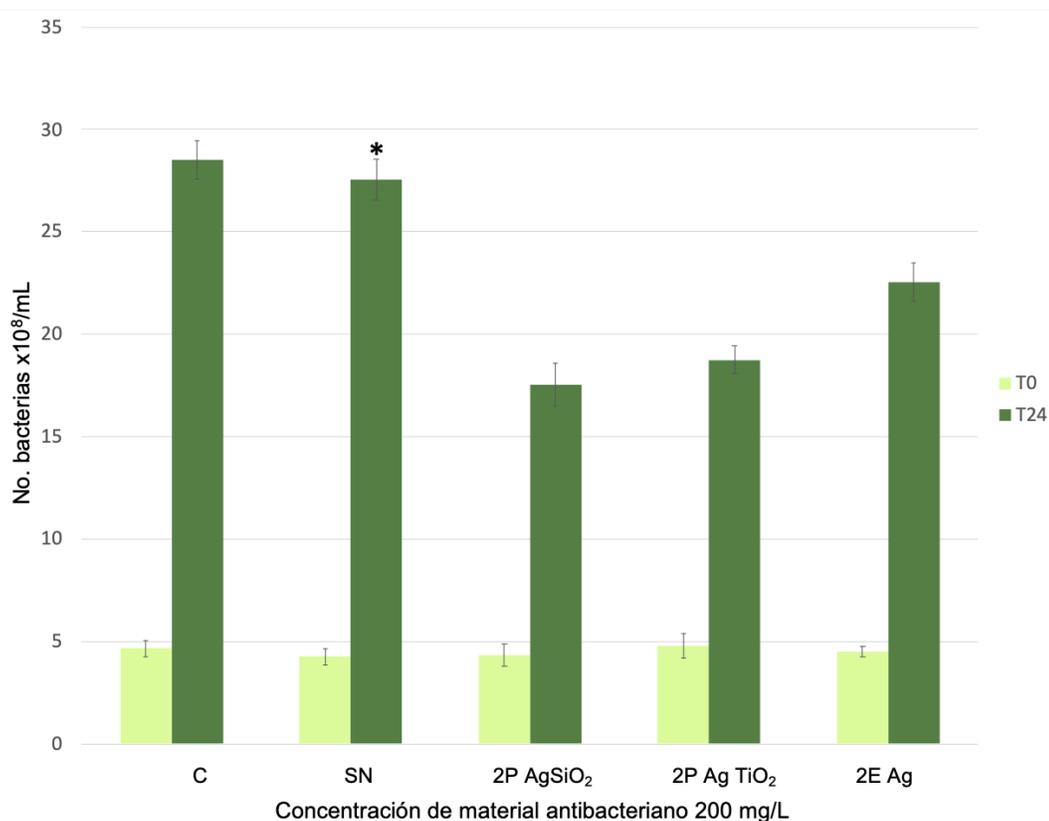


Figura 6.11 Capacidad bactericida de geomembranas C=Control de *E.coli*, SN=geomembrana de polipropileno sin material antibacteriano, 2P AgSiO₂= geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgSiO₂, 2P AgTiO₂= geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de 2P AgTiO₂, 2E-Ag= geomembrana de polietileno con 200 mg/L de AgNPs, *p > 0.05 vs. control.

Como muestra la gráfica el material que mayormente inhibió el crecimiento de *E.coli* a las 24 horas fue la geomembrana de polipropileno impregnada con nanopartículas de plata y óxido de silicio con un 43% de inhibición seguido la geomembrana de polipropileno con nanopartículas de plata y dióxido de titanio, por último con una inhibición del 27% las geomembranas impregnadas únicamente con nanopartículas de plata. Con respecto a la prueba de normalidad el único grupo que no tienen una diferencia estadísticamente significativa fue SN que era la geomembrana de polipropileno sin nanopartículas, la gráfica muestra un menor crecimiento y se puede deber a la barrera física que disminuye la tasa de reproducción de *E.coli*, sin embargo, la diferencia con respecto al grupo control es mínima por lo que no es un grupo que muestre inhibición de *E.coli*.

Se ha reportado que por sí solas las nanopartículas de plata presentan actividad antibacteriana, de igual forma su acompañamiento con otros metales potencializa esta propiedad. En el estudio de Mourad *et al* (2020) impregnaron una matriz de caucho natural con nanopartículas de óxido de silicio y plata. Ellos encontraron que el SiO₂ actúa como agente reticulante al controlaba la cantidad de plata liberada, además este factor ayuda a proteger las AgNPs de agregación. La ventaja de la sílice es que se usa comúnmente como relleno para refuerzo de compuestos de caucho, es biocompatible, y químicamente inerte a la luz en comparación con otros materiales inorgánicos.

Otro material también ampliamente utilizado como estabilizador es el óxido de titanio. Wahab *et al* (2019), inmovilizaron nanopartículas de plata y óxido de titanio en una matriz de acetato de celulosa. El TiO₂ cuenta con propiedades bactericidas fotoinducidas bajo luz ultravioleta, su mecanismo de acción consiste en producir especies reactivas de oxígeno como superóxido, radicales de oxígeno y radicales de hidróxido que alteran las paredes de las células bacterianas y bloquean su sistema respiratorio. De esta forma se cuenta con el TiO₂ tanto como sustrato inmovilizador de las nanopartículas de plata como material antibacteriano y fotocatalítico.

Como previamente se había mencionado, la impregnación de plata en una matriz polimérica tiene un límite dependiendo de las características de las nanopartículas y de las condiciones del polímero. Un efecto que impide el aprovechamiento de las nanopartículas de plata es su aglomeración e incorrecta impregnación. La modificación de la matriz polimérica con agentes quelantes o la adición de metales de mayor compatibilidad con el polímero contribuyen a una mayor impregnación y al efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata.

En la figura 6.12 se muestran los resultados de inhibición de *E.coli* en cajas de agar, se puede observar que el control negativo con clorhexidina al 5% muestra el mayor halo de inhibición con 14 mm, debido a que el compuesto antibacteriano se expande a través del papel filtro, mientras que las geomembranas muestran un halo de inhibición únicamente en la superficie en contacto siendo éste de 6 mm debido a que los compuestos antibacterianos se encuentran anclados en la red polimérica.

	Geomembranas	Halo de inhibicion (mm)
1	Clorexidina (5%)	14
2	2P AgSiO ₂ : Polipropileno 200 mg/L de AgSiO ₂	6
3	2PAgTiO ₂ : Polipropileno 200 mg/L de AgTiO ₂	6
4	2E Ag: Polietileno 200 mg/L de AgNPs	6
5	SN: Polietileno sin nanoparticulas	4

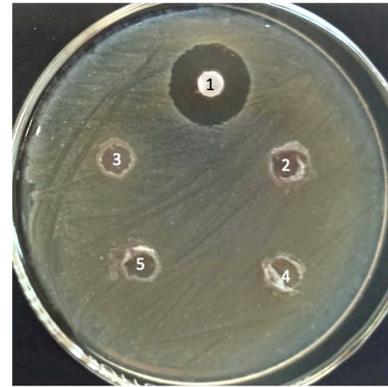


Figura 6.12 Resultados de inhibición de *E.coli* en medio agar para geomembranas con plata

Otros materiales antibacterianos suelen usar compuestos con cloro o fenoles como es el caso del compuesto 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol también conocido como triclosán y la oxibisfenoxarsina (OBPA). Ambos materiales fueron probados en las geomembranas de polipropileno, con ensayos en medio acuoso con bacterias Figura 6.13 y medio agar para conocer la inhibición a las 24 horas de incubar Figura 6.14.

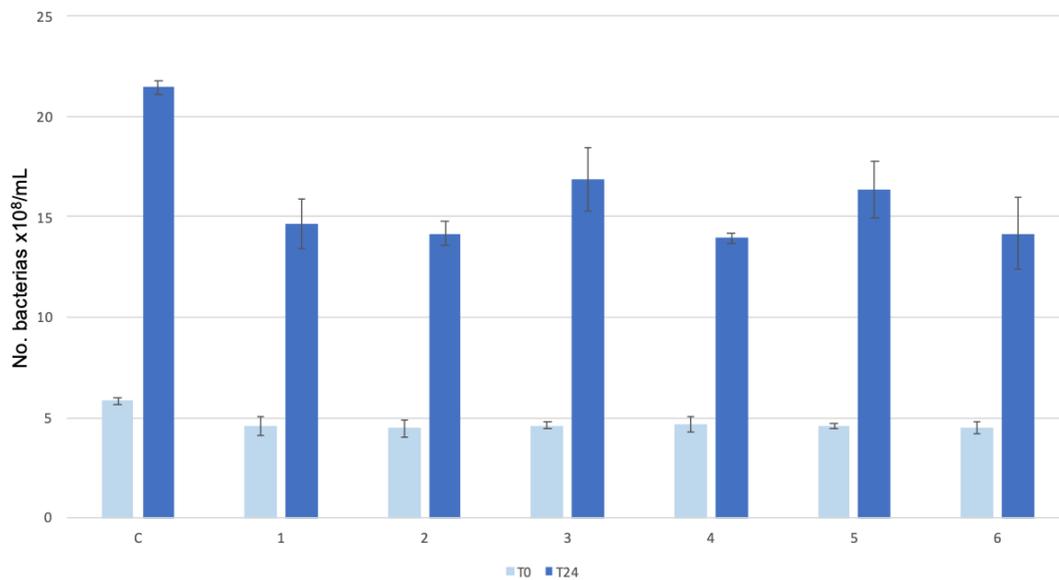
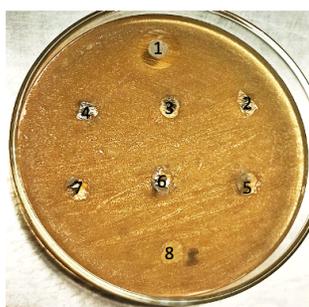


Figura 6.13 Capacidad bactericida de geomembranas de polietileno con distintos compuestos bactericidas 1) PL 835N= polietileno 2) polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol, 3) polietileno con 1000 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol, 4) polietileno con 500 mg/L de oxibisfenoxarsina, 5) polietileno con 1000 mg/L de oxibisfenoxarsina, 6) polietileno con 1500 mg/L de oxibisfenoxarsina.

La gráfica muestra que el porcentaje de inhibición de estos materiales ronda entre el 20% y 35% teniendo la mayor inhibición la geomembrana número 4 de oxibisfenoxarsina a una concentración de 500 mg/L. Si bien estos materiales muestran una inhibición en el crecimiento de *E.coli*, su uso como biocida ha sido cuestionado, en el caso del triclosán se le considera un contaminante del agua y se le asocia con alergias, resistencia a los antibióticos, alteraciones endocrinas, toxicidad aguda-crónica y bioacumulación (Carrasco, 2017). Para el caso de la oxibisfenoxarsina, por su contenido de arsénico se restringió su uso por deterioro ambiental y perfil de toxicidad a largo plazo (Jones, 2009). Por estas mismas desventajas, se le ha prestado más atención al uso de compuestos inorgánicos, metales y óxidos al brindar mayor seguridad y estabilidad.

Otra prueba que se realizó fue en medio agar donde se puso en contacto las geomembranas con *E.coli* en sólido y se dejó incubar durante 24 horas, nuevamente solo el área en contacto es donde se muestra la acción de inhibición por lo que el halo fue de 6 mm. Las geomembranas de los distintos polímeros y compuestos antibacterianos sirven como barrera física para el crecimiento de *E.coli* hasta donde se observó en las primeras 24 horas (ver Figura 6.14).



	Geomembrana	Halo de inhibición (mm)
1	Clorexidina 5%	14
2	PL 835N	6
3	5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol 500	6
4	5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol 1000	6
5	Oxibisfenoxarsina 500	6
6	Oxibisfenoxarsina 1000	6
7	Oxibisfenoxarsina 1500	6
8	Polipropileno	6

Figura 6.14 Resultados inhibición de *E.coli* en medio agar para geomembranas comerciales

En la Figura 6.15 se muestran las micrografías de las geomembranas con impregnación de oxibisfenoxarsina, 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol, AgNPs, AgSiO₂ y AgTiO₂. Dichas geomembranas fueron fabricadas de manera industrial, por lo que se observa una superficie en general una superficie más lisa en comparación con las geomembranas fabricadas en este trabajo. En el caso de a), b) y d) su impregnación fue con compuesto biocida no particulado,

mientras que en el caso de c), e) y f) su impregnación fue con nanopartículas metálicas por lo que se observan una superficie con presencia de grietas y partículas superficiales, sin embargo, no fue posible detectar por EDS la presencia de plata, esto podría deberse a una impregnación en las porosidades del interior de las membranas, mismo que ocurrió en la fabricación de las geomembranas del presente trabajo.

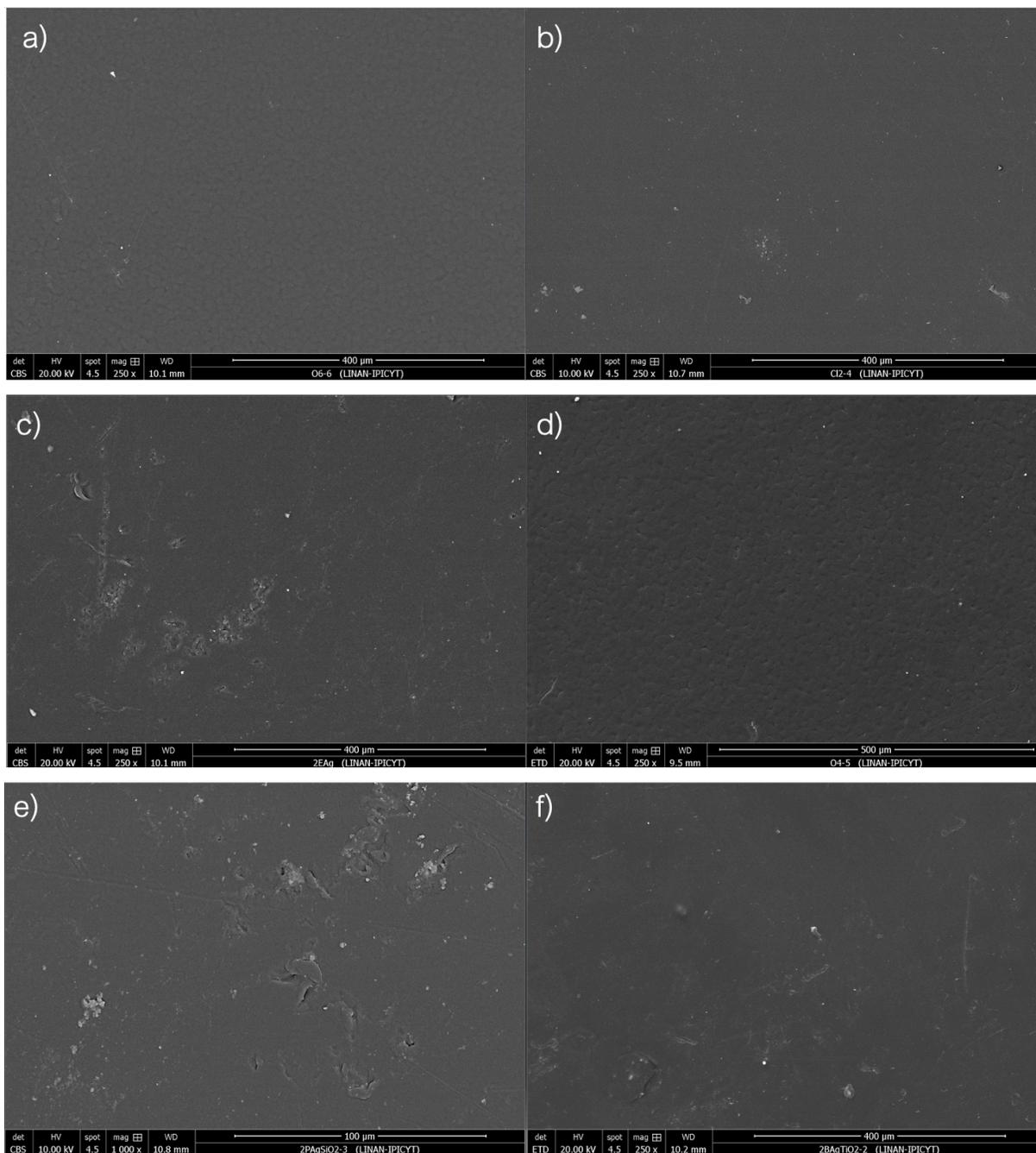


Figura 6.15 Micrografías por MEB de geomembranas a) polietileno con 1500 mg/L Oxibisfenoxarsina, b) polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi)fenol c) 2E Ag=

geomembrana de polietileno con 200 mg/L de AgNPs d) polietileno con 500 mg/L Oxibisfenoxarsina e) 2P AgSiO₂= geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de AgSiO₂, f) 2P AgTiO₂= geomembrana de polipropileno con 200 mg/L de 2P AgTiO₂.

Una vez analizados los distintos compuestos antibacterianos se hizo un comparativo entre los mejores resultados de cada grupo de geomembranas, la Figura 6.16 muestra los resultados de pruebas de inhibición en medio líquido con *E.coli*. La mayor inhibición para las geomembranas fabricadas en este trabajo fueron polietileno con una impregnación de 300 mg/L de AgNPs, así como polipropileno con 200 mg/L de AgNPs, por otro lado, de las geomembranas comerciales los mejores resultados se encontraron con polietileno impregnado con nanopartículas de plata y oxido de silicio, así como la geomembrana de polipropileno con oxibisfenoxarsina a una concentración de 500 mg/L.

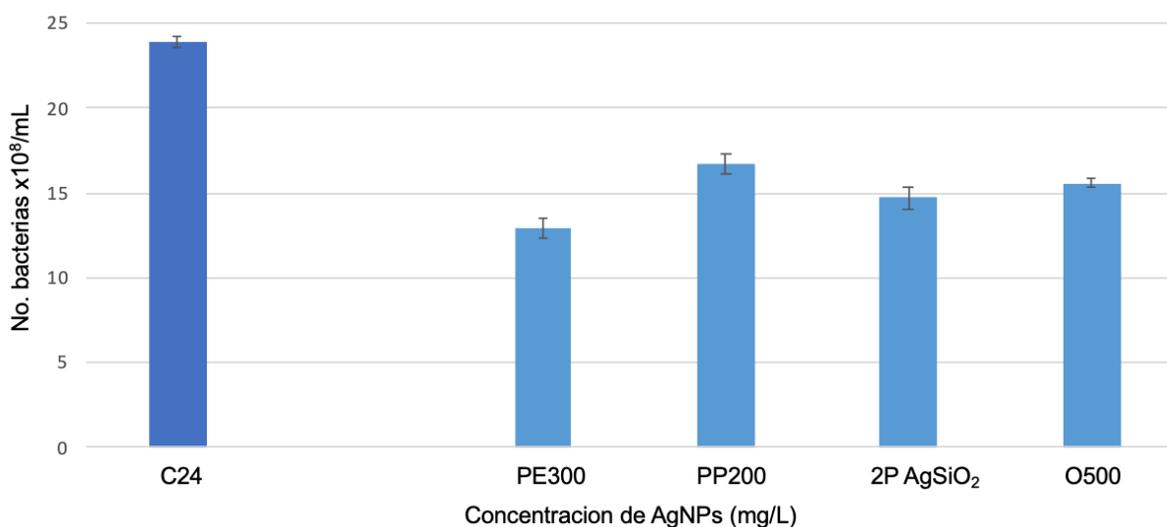


Figura 6.16 Resultados de actividad antimicrobiana para geomembranas PE300 = polietileno 300 mg/L de AgNPs, PP200 = polipropileno 200 mg/L de AgNPs, 2P AgSiO₂ = Polipropileno 200 Ag/SiO₂ mg/L, O500 = Polipropileno con 500 mg/L de oxibisfenoxarsina, C24 = Control de crecimiento bacteriano de 24 horas.

De todas las geomembranas evaluadas en este trabajo, la mayor inhibición fue del 46% para la geomembrana de polietileno con 300 mg/L de AgNPs, y las demás con una inhibición de alrededor del 30 al 38%. La geomembrana de polietileno aceptó una mayor concentración de AgNPs que la membrana de polipropileno, de igual forma tiene una mayor concentración

que la geomembrana de impregnada con plata y oxido de silicio. De estos resultados se puede destacar el uso de nanopartículas de plata como material antibacteriano comparable con un biocida convencional como el OBPA o triclosán.

6.3.4 Liberación de las AgNPs y estudio de tiempo de vida de la geomembrana

El uso que se plantea dar a las geomembranas es como recubrimiento para reservorios de agua, las geomembranas se encontraran inmersas en medio líquido por lo que se propicia la liberación de iones de plata. Dado que las nanopartículas de plata son las que otorgan la propiedad antibacteriana a las geomembranas es importante conocer el tiempo de vida o tiempo en que serán liberadas por completo las nanopartículas de plata de la geomembrana. Previo a las pruebas se disolvieron parte de las geomembranas (sección 3.2.4) y se analizó por EAA para conocer la concentración inicial de plata impregnada en la geomembrana (Tabla 6.4). La Tabla 6.5 muestra los resultados tras analizar semanalmente el desprendimiento de iones de plata por medio de espectroscopia de absorción atómica.

Tabla 6.4 Resultados de concentración de plata en geomembranas por EAA

	Material	Concentración (mg/L) por EAA
PE300	Polietileno con 300 mg/L de AgNPS	136
PP200	Polipropileno con 200 mg/L de AgNPs	109

Tabla 6.5 Resultados de concentración de plata en medio.

SEMANA	PE300 (mg/L)	PP200 (mg/L)
0	135.83	109.17
1	0.69	2.55
2	0.09	0.06
3	0.19	0.18
4	0.17	0.15
5	0.31	0.30
6	0.37	0.33
7	0.33	0.30
8	0.37	0.44
Tiempo de vida	9.7 años	8 años

El análisis por EAA mostró para ambos polímeros una concentración menor de AgNPs a la impregnada teórica, esto se puede deber a que las nanopartículas de mayor tamaño no se anclaron en los poros del polímero, por lo que la concentración de AgNPs dentro de la matriz fue menos a la concentración de la solución de AgNPs que utilizó al momento de fabricar la geomembranas. Mismo concepto que reporta Nikonorova (1994) donde AgNPs menores a 30 nm fueron ancladas en los poros de polietileno.

Las geomembranas fueron sumergidas en caldo nutritivo con bacterias a 200 rpm de agitación y 37°C, semanalmente se cambió el medio para conocer la concentración de plata liberada (ver sección 3.6), la Tabla 6.4 muestra el promedio de concentración de plata en el medio por lo que se pudo calcular un tiempo de vida de 9.7 años para el caso de las geomembranas de polietileno y de 8 años para las geomembranas de polipropileno.

Sánchez-Álvarez en 2017 reporta un tiempo de vida de 2.7 años para pellets impregnados con 0.439 mg/L de AgNPs y 216 mg/L de ZnO NPs, mientras que para geomembranas impregnadas con 2.1 mg/L de AgNPs y 60 mg/L de ZnO NPs reportó un tiempo de vida de 5 años (Sánchez-Álvarez, 2018). En comparación el presente trabajo presenta mayores tiempos de vida debido a una mayor concentración de nanopartículas de plata impregnadas, así como al método de impregnación, ya que Sánchez-Álvarez (2018) realizó un mezclado directo de las nanopartículas y un proceso de extrusión del plástico mientras que el presente trabajo fabricó las geomembranas mediante el método de inversión de fase.

6.3.5 Formación de biofilm

La exposición de las geomembranas a un medio con *E.coli* durante determinado tiempo propicia la formación de un biofilm al adherirse las bacterias a una superficie sólida como la geomembrana y crecer en forma de microcolonias estructuradas. Las condiciones de incubación fueron 37°C durante 20, 40 y 60 días, en un sistema estacionario, esto debido al uso que se plantea dar a las geomembranas como recubrimiento para reservorios de agua limpia proclives a estancamiento y reproducción de bacterias. Tras el periodo de incubación se realizó la tinción para observar la geomembrana (sección 3.7), la Figura 6.17 muestra las imágenes por microscopía óptica a 10x de aumento.

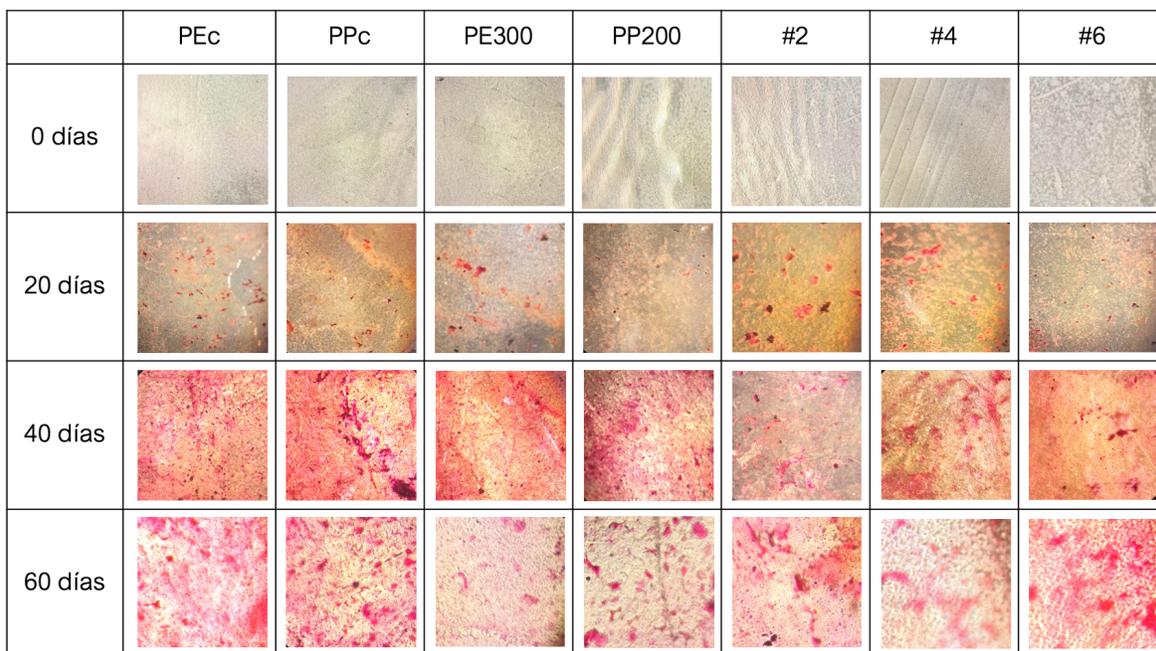


Figura 6.17 Observación en microscopio óptico a 10x de biofilm. PEc: Control de polietileno. PPc: Control de polipropileno. PE300: Polipropileno con 300mg/L de AgNPs. PP200: Polipropileno con 200mg/L de AgNPs. #2: polietileno con 500 mg/L de 5-Cloro-2(2,4diclorofenoxi) fenol. #4: polietileno con 500 mg/L Oxibisfenoxarsina. #6: polietileno con 1500 mg/L Oxibisfenoxarsina.

La tinción de la geomembrana permite reconocer entre las bacterias gram positivas y gram negativas. De acuerdo con la distribución de los peptoglicanos de la pared celular se puede fijar el colorante cristal violeta para las bacterias gram positivas debido a una pared mas gruesa, mientras que el colorante safranina tiñe a las bacterias gram negativas como es el caso de *E.coli* al distinguirse como manchas rozadas.

La condición estacionaria de la incubación permite el asentamiento de *E.coli* sobre la geomembrana. Las geomembranas después del proceso del proceso de incubación con las bacterias muestran (Figura 6.17) a los 20 días la incrustación y crecimiento de microcolonias sobre la geomembrana, éstas se encuentran en la tercera etapa con la producción temprana hacia una biofilm. Los grupos control PEc y PPc contienen un mayor número de microcolonias en comparación con las geomembranas con nanopartículas de plata. A los 20 días en PP200 es casi imperceptible la presencia de *E.coli* y tiene menor incrustación de *E.coli* en comparación con la geomembrana de polietileno PE300, donde la tinción revela que las microcolonias son de mayor densidad de bacterias lo cual se observa por una tinción de tonalidad más oscura. En el caso de las geomembranas comerciales, el mejor desempeño a los 20 días se mostró en la geomembrana

de polipropileno con oxibisfenoxarsina con 1500 mg/L, comparable de igual forma con PP200 al impedir el crecimiento de *E.coli* en sus superficie. Por su parte las geomembranas #2 y #4 tienen una mayor incrustación de bacterias y crecimiento de microcolonias.

A los 40 días nuevamente los grupos control de PPc y PEc sin nanopartículas de plata tienen el mayor crecimiento de microcolonias, se observa una tinción oscura, por lo que existe una acumulación de bacterias. Por su parte PE300 y PP200 contienen microcolonias de menor tamaño y menor densidad de bacterias. Por parte de las geomembranas comerciales #4 muestran una biofilm que abarca mayor área superficial en comparación con #2 y #6 que muestran mínimas secciones habitadas por *E.coli*. Tanto a los 20 como 40 días se observan manchas rosadas oscuras que muestran estar en la etapa 4 con el crecimiento de microcolonias (Van Houndt y Michiels, 2005).

Por último a los 60 días la geomembrana PPc contiene la mayor presencia de *E.coli* sobre la geomembrana al igual que una tonalidad mas oscura en comparación con las demás geomembranas. La menor incrustación de *E.coli* se observa en PE300 con mínima presencia de microcolonias, mientras que PP200 muestra microcolonias definidas y de tonalidad oscura por lo que la biofilm esta en crecimiento, por parte de las geomembranas comerciales el mejor desempeño lo tiene #4 con una menor tinción que muestre el crecimiento de la biofilm, seguida por #2 con zonas de aumento de la biofilm, mientras que #6 se encuentra mayormente invadida por microcolonias de *E.coli* y crecimientos de éstas. Otras manchas difuminadas a los 60 días muestran estar en la etapa 1 de una adhesión reversible de bacterias.

El concepto de biofilm (Costerton, 1999) es el crecimiento de un grupo de células microbianas e incrustación a una superficie, estas células bacterianas se distinguen de las dispersas en el medio por la producción de una matriz de sustancia extracelular polimérica. La interfaz sólido-líquido entre la superficie de la geomembrana y el medio acuoso proporciona un soporte para la adhesión de bacterias, otras características que favorecen el crecimiento de la bacteria sobre la superficie son las propiedades de la superficie, la hidrodinámica, nutrientes del medio acuoso, temperatura, pH, fuerzas cortantes, tipo de soporte y superficie (Cresson, R. *et al.*, 2007).

En general se puede observar en la Figura 6.17 que las geomembranas impregnadas con nanopartículas tienen una menor formación de biofilm en comparación con su grupo control,

este efecto se debe a la presencia de las nanopartículas como especies receptoras de oxígeno al contacto con el agua, lo que impide en menor medida la adhesión de *E.coli* y cumple con su función de inhibir el crecimiento. (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Graziani *et al.*, 2013).

La Figura 6.18 muestra por MEB la formación de biofilm para la geomembrana de polietileno con 300 mg/L de AgNPs con una exposición de 60 días ante *E.coli*, en a) se observa una vista panorámica a 100 μm con secciones de microcolonias, en b) un acercamiento a 50 μm donde se observan las porosidades de la geomembrana, en c) y d) se muestran con un tamaño entre 1 y 1.3 μm las bacterias que conforman la microcolonia, confirmando la adhesión de *E.coli* a la geomembrana.

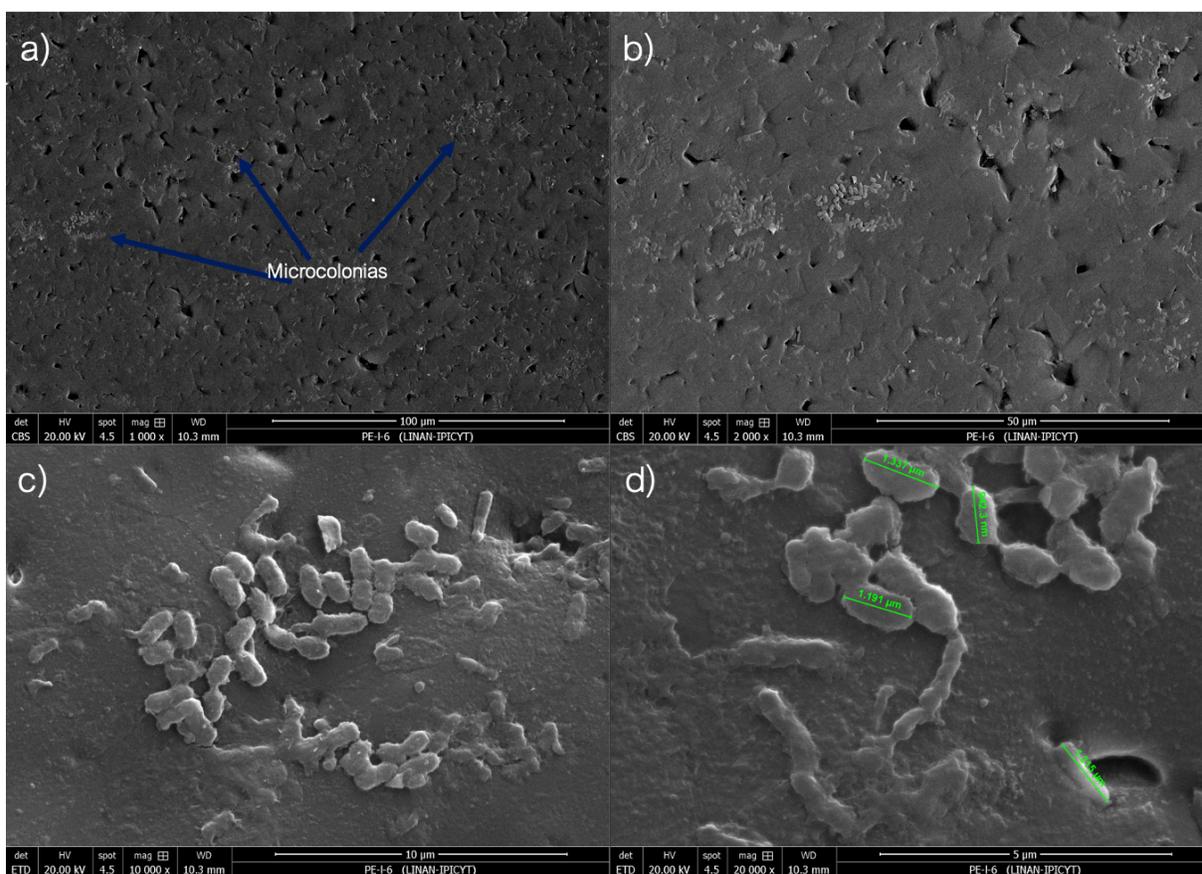


Figura 6.18 Micrografías de geomembrana de polietileno con formación de biofilm

El tipo de sistemas al que se considera dar uso a las geomembranas es estacionario por su aplicación en sistemas como tinacos, aljibes o cisternas con agua estancada comparable con las pruebas en estado estacionario, sin embargo, no se descarta que en los sistemas de

almacenamiento de agua exista un flujo de agua de entrada y salida que pueda impedir o desprender la biopelícula de ser un flujo intenso. Por otro lado, en diversos trabajos (Creson *et al.*, 2007; Gallegos-García *et al.*, 2009) reportan la formación de biopelículas en sistemas en flujo continuo y turbulento de 750 mL/min, para reactores de lecho fluidificado inverso, donde las bacterias se adhieren a un soporte y su crecimiento es a partir de éste. La importancia de supervisar el crecimiento de biofilm se debe a que la adhesión de *E.coli* a la geomembrana afecta la exposición de las nanopartículas de plata, la liberación de iones y la eficiencia del material antimicrobiano, además de que la formación de biofilm propicia el crecimiento de microcolonias y una fuente de bacterias.

6.4 Conclusiones

El método de inversión de fase permitió la fabricación de geomembranas poliméricas flexibles y transparentes, tanto para polipropileno como polietileno con una impregnación de nanopartículas de plata. Mediante microscopía MEB se comprobó la presencia de nanopartículas en orillas, poros y grietas de la matriz polimérica. Al evaluar las geomembranas ante *E.coli* se encontró que en pruebas en medio acuoso las geomembranas de polietileno tienen la mayor inhibición de *E.coli* con una impregnación de 300 mg/L de AgNPs, comparable con el uso de 10 mg/L de AgNPs por individual en el medio, mientras que las geomembranas de polipropileno alcanzan su mayor inhibición bacteriana a 200 mg/L de AgNPs.

La diferencia en la concentración de nanopartículas que mostró mayor inhibición se debe a la estructura de los polímeros y el grado impregnación que acepta cada uno y el tipo de unión que se da entre la plata y el polímero. El polietileno cuenta con mayor cantidad de regiones amorfas y espacios libres que permiten el anclaje de impurezas o en este caso nanopartículas.

En las pruebas en agar ambos polímeros mostraron un halo de inhibición de 6 mm con una CMB de 100 mg/L de AgNPs. Por parte del ensayo de actividad metabólica se observó que la presencia de AgNPs tiene un efecto tóxico e inhibitorio de *E.coli* a concentraciones de 200 a 500 mg/L de AgNPs en polietileno. Las pruebas de desprendimiento semanal de plata permitieron estimar un tiempo de vida de 9 años para las geomembranas de polietileno y 8 años para las de polipropileno.

Los resultados al comparar las geomembranas impregnadas de plata con otras geomembranas comerciales con materiales antibacterianos como triclosan, oxibisfenoxarsina o combinaciones de plata, óxido de silicio y óxido de titanio, muestran el mejor desempeño para inhibir *E.coli* con la geomembrana de polietileno con 300 mg/L de AgNPs, debido a una mayor aceptación de las nanopartículas dentro de la matriz polimérica. Por parte del ciclo de formación de la biofilm se muestra distintas etapas de su crecimiento, *E.coli* se adhiere a la geomembrana y empieza a formar microcolonias estas se muestran como manchas rosadas, las bacterias siguen absorbiendo los nutrientes del medio y de la geomembrana, promoviendo su reproducción y formando una biofilm que se expande en área y volumen. La menor formación de biofilm se presentó en la geomembrana de polietileno con 300 mg/L de AgNPs.

La evaluación de las geomembranas permitió corroborar la propiedad antibacteriana de las nanopartículas, éstas actuaron bajo los mecanismos de liberación de iones e intervención en distintos procesos de las células bacterianas que impiden su reproducción.

7. Conclusiones generales

Se comprobó con los ensayos de AME la síntesis de nanopartículas de plata mediante el uso de lodos metanogénicos añadiendo etanol como sustrato y nitrato de plata como precursor. El proceso de digestión anaerobia se llevó a cabo a -390 mV de ORP y pH neutro, dichas condiciones permitieron la reducción de Ag^+ a Ag^0 de acuerdo con el diagrama de Pourbaix ($E^\circ_{\text{Ag}^+/\text{Ag}^0} = +800 \text{ mV}$). Además del medio, los microorganismos proporcionaron los agentes reductores y estabilizadores naturales que promueven la formación de nanopartículas de plata. Se comprobó que las bacterias metanogénicas son afines al sustrato etanol ya que hubo una producción de metano de 9 mL y un consumo mayor al 60% de la DQO, de igual forma el desequilibrio en el pH indica que las bacterias acetogénicas también se activaron, por último, debido a una remoción mayor al 90% de nitratos, se corrobora la activación de las bacterias denitrificantes.

La caracterización del medio confirmó la presencia de AgNPs, al identificar su plasmón de superficie con un pico a los 400 nm, así como por difracción de rayos-X se confirmó la estructura cubica centrada en las caras de nanocristales de plata. Las micrografías de MEB mostraron nanopartículas esféricas con un tamaño entre 20 a 100 nm y aglomerados mayores a las 500 nm, el análisis por EDS confirmó su composición de plata con probabilidad de materia orgánica adherida a su superficie.

En las pruebas ante *E.coli* se comprobó su propiedad antibacteriana al inhibir *E.coli* en solución, teniendo una CMI de 0.62 mg/L de AgNPs e inhibiendo un 27% del crecimiento y en medio sólido agar con una CMB de 0.62 mg/L de AgNPs con un halo inhibitorio de 8 mm. A concentraciones de 20 mg/L se tiene una inhibición del 53% para las nanopartículas lavadas. El proceso de lavado libera la materia orgánica de la superficie y permite una mayor liberación de Ag^+ así como mayor interacción con las bacterias, sin embargo, debido a que la diferencia en su actividad antibacteriana no es significativa, el proceso de lavado puede no estar involucrado.

El método de inversión de fase permitió fabricar geomembranas transparentes y flexibles. Fue posible incorporar las AgNPs en un matriz polimérica hasta una concentración de 200 mg/L de AgNPs para el polipropileno y 300 mg/L de AgNPs para el polietileno. Mediante microscopia electrónica de barrido se observó que las nanopartículas llegan a situarse en grietas, poros y orillas de la geomembrana.

El polipropileno por su estructura de mayor cristalinidad tiende a aceptar menos impurezas en comparación con el polietileno que al ser más amorfo, sus espacios libres pueden ser ocupados por nanopartículas. Los polímeros tienen poca aceptación con los iones de plata por lo que al incrementar la concentración que se desea impregnar, las nanopartículas tienden a agregarse antes de unirse con el polímero y su tamaño no es aceptado en la matriz polimérica. La recomendación aquí es modificar el polímero al añadir grupos quelantes o la funcionalización de las AgNPs con biomoléculas compatibles con el polímero. Una correcta dispersión de las AgNPs en la matriz polimérica garantizará la estabilidad a largo plazo y permitirá una liberación controlada de iones al medio.

El objetivo de la impregnación de las nanopartículas fue proporcionar la propiedad antibacteriana a la geomembrana. Esto se comprobó con la inhibición de *E.coli* en solución, donde la mayor inhibición fue por parte de polietileno con 300 mg/L llegando a tener un 46% de inhibición contra un 30% en el caso de polipropileno con 200 mg/L de AgNPs. Sin embargo el mejor desempeño de inhibición se encontró con el uso de nanopartículas en solución a 20 mg/L, esto se debe a la movilidad que tiene en el medio, en comparación con la estabilidad cuando se impregnan en una matriz polimérica, en este último caso la inhibición solo se presentó en el área en contacto con *E.coli* como se mostró en las pruebas de concentración mínima bactericida en medio agar, debido a que las nanopartículas no son un compuesto migratorio dentro de las geomembranas.

Los ensayos de actividad metabólica mostraron un efecto tóxico por parte de las nanopartículas en solución a 10 y 20 mg/L mientras que para las geomembranas de polietileno fue de 200 a 500 mg/L por una viabilidad celular menor al 75%. En comparación con geomembranas impregnadas con plata (2E Ag), sílice y plata (2P AgSiO₂) o dióxido de titanio y plata (2P AgTiO₂), el mejor desempeño sigue siendo para la geomembrana de polietileno con 300 mg/L de AgNPs, debido a una mayor cantidad del material antibacteriano, sin embargo, se observa un efecto compuesto cuando se combina con propiedades de otros metales que contribuyen tanto a su impregnación al polímero como en su actividad antimicrobiana, esta es también una posibilidad en la generación de materiales antibacterianos.

El mecanismo bajo el cual actúan las nanopartículas puede ser por liberación de iones que crean un estrés oxidativo para las bacterias; por internalización de las nanopartículas en la

bacteria y daño al ADN; así como acumulación de las nanopartículas en la membrana de la bacteria lo que impida la cadena transportadora de electrones y su interferencia en la toma de nutrientes con el exterior. Por otro lado, el mecanismo de inhibición de las geomembranas con AgNPs se basa en la liberación prolongada de Ag^+ , esto permite tener un mayor aprovechamiento de las nanopartículas y evitar su pérdida en el efluente, así como su agregación si estuvieran por individual en el medio.

Los experimentos de liberación de iones permitieron calcular un tiempo de vida de 9.7 años para la geomembrana de polietileno y de 8 años para el caso de polipropileno. Por parte de la formación de biofilm se observó una menor adhesión y crecimiento de colonias en las geomembranas impregnadas con nanopartículas de plata en comparación con geomembranas conformadas únicamente por el polímero o geomembranas que contenían compuestos biocidas como OBPA y triclosán, estas últimos con desventajas por sus implicaciones a nivel salud y medio ambiente. Por lo tanto, los resultados confirman el potencial de geomembranas con nanopartículas de plata para sustituir geomembranas comerciales.

Este trabajo propone un método integral para la fabricación de geomembranas antibacterianas desde la síntesis de nanopartículas de plata hasta la obtención de la geomembrana. Esto a través de una vía sustentable de síntesis de nanopartículas con el uso de las mismas bacterias que se utilizan en el tratamiento de aguas residuales. Adicionalmente con la premisa de tener CMI menores en comparación con métodos de síntesis fisicoquímicos. Las nanopartículas de plata tienen la característica de contar con actividad antibacteriana, ésta se puede otorgar a otros materiales como polímeros cuando se integran en su composición. Los resultados de inhibición de *E.coli* con las geomembranas de este trabajo mostraron para polietileno con 300 mg/L la mayor inhibición en comparación con geomembranas con compuestos biocidas. Las geomembranas con AgNPs puede usarse como recubrimiento de superficies contenedoras de agua proclives a contaminación bacteriana como tinacos, aljibes, cisternas etc.

Perspectivas a futuro

En la mejora del proceso de obtención de una geomembrana antibacteriana con la impregnación de nanopartículas de plata y ante los resultados de este trabajo se recomienda dentro del análisis

de las nanopartículas medir la potencial zeta para conocer la carga de las partículas, esto debido que ante mayor carga positiva mayor es la atracción hacia la carga negativa de las bacterias, de tener una carga neutra se debilita la propiedad antibacteriana.

De igual forma se recomienda evaluar la propiedad antibacteriana con otras bacterias gram positivas como *Lactobacillus amylophilus* o *Staphylococcus aureus* para corroborar el espectro de inhibición de las nanopartículas sintetizadas mediante bacterias anaerobias.

Otro aspecto por contemplar es el tamaño de nanopartícula, debido a que este interviene en su actividad bactericida en una tendencia de menor tamaño mayor actividad, se recomienda hacer un filtrado para tener los menores tamaños de partícula y descartar tamaños con aglomerados mayores a 200 nm, lo cual será benéfico en la impregnación de las nanopartículas en el polímero debido a que el tamaño de poro acepta los menores tamaños de partículas.

En la impregnación de nanopartículas de plata se propone funcionalizar las nanopartículas con grupos quelantes o biomoléculas afines al polímero para aumentar la concentración de nanopartículas embebidas en la matriz polimérica.

Por parte de las geomembranas, una caracterización de tamaño de poro contribuiría a conocer el rango de tamaño de partículas que acepta el polímero, asimismo en la obtención de micrografías se propone analizar subcapas de la geomembrana mediante una exfoliación que remueva parte de la superficie, otra forma de análisis del interior de la geomembrana es mediante un corte transversal con bisturí para observar las nanopartículas en el interior.

Por último, en las pruebas de formación de biofilm, se puede agregar la condición de agitación para observar los cambios en comparación con la condición estática, así como hacer pruebas a distintas temperaturas considerando las características de intemperie al que se le piensa dar uso a las geomembranas como recubrimiento de aljibes, tinacos, etc.

8. Referencias

- Abbasi, E., Milani, M., Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Nasrabadi, H., Nikasa, P., Woo, S., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., Samiei, M. (2016) Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 42:2, 173-180.
- Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*; 46 (9-10): 1485-1489.
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*; 7: 17-28.
- Ahmed, S.A., Gogal Jr., R.M., Walsh, J.E., (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunology Methods*. 170, 211–224.
- Alexander, J. W. (2009). History of the Medical Use of Silver, 10(3).
- An, J. Luo, Q. Li, M. Wang, D. Li, X. Yin, R. (2015). A facile synthesis of high antibacterial polymer nanocomposite containing uniformly dispersed silver nanoparticles. *Colloid and Polymer Science* 293, 1997-2008.
- Angel, B. Batley, G. Jarolimek, C. Rogers, N. (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*, 93, 359-365.
- Arenas, R. (2015) *Dermatología Atlas, diagnóstico y tratamiento*. McGrawHill Education, 29.
- APHA. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *American Water Works Association*, Water Environment Federation.
- Baker, S. Rakshith, D. Kavitha, K. Santosh, P. Kavitha, H. Rao, Y. Satish, S. (2013). Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. *Bioimpacts* 3, 111–117.
- Baker, S. et al. (2014). Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. *Bioimpacts* 3, 111–117.
- Bilal, M. Khan, S. Ali, J. Ismail, M. Khan, M. Biosynthesized silver supported catalysts for disinfection of Escherichia coli and organic pollutant from drinking water. *Journal of Molecular Liquids* 281, 295-306.
- Bilurbina L. Liesa, F. (1990). Materiales no metálicos resistentes a la corrosión. *Productiva*. España.
- Billmeyer, F. W. (1975). Ciencia de los Polímeros. *Editorial Reverte*. España.
- Caceres-Lopez, O. (1990). Desinfección del Agua. Organización Panamericana de la Salud. <https://books.google.com.mx/books?id=JwowntwAACAAJ>
- Carrasco, J. Delgado, C. Cobos, D. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. *Revista de la facultad de Ciencias Medicas, Universidad de Cuenca*. 35,2, 55-59.

- Chandran, S., Ravichandran, V., Chandran, S., Chemmanda, J., & Chandarshekar, B. (2016). Biosynthesis of PVA encapsulated silver nanoparticles. *Journal of Applied Research and Technology*, 14(5), 319–324.
- Chen, K. C., Lin, Y. F. (1993). The relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges. *Water Research*, 27(12), 1749–1759.
- Claros-Bedoya, J. A. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Consejo Consultivo del Agua A.C. El Agua en México <https://www.aguas.org.mx/sitio/panorama-del-agua/agua-en-mexico.html>
- Cortés-Lara, M.C. (2003). Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *REVISTA BIOMÉDICA* 14(2)
- Costerton J.W., Stewart P.S., (1999). Greenberg, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science* 284, 1318– 1322.
- Cresson, R. Escudié, R. Steyer, J.P. (2007). Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Water Research*, 42, 3, 792-800.
- Daub, W. Seese, W. (1996). Química. *Pearson Educación*. 7 ed.
- Del Real Olvera, J. (2007). Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Du, Y., Ma, Dequan., Mao, J., Yao, J., Ma, Q., Lu, J., Lou, F., Lou, Chunhui., Li, L., (2021) Improving the antistatic and antibacterial properties of polypropylene via tetrapod-shaped ZnO@Ag particles. *Polymer Testing* 101, 107301.
- Escobar-Falconi, V. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), Uv-vis, absorcion atómica de llama(FAAs) y microscopia de barrido electrónico (SEM). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pontificia Universidad Católica de Ecuador.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668.
- Foldbjerg R, Jiang X, Miçlouş T., Chen, C. Autruo, H. Beer, C. (2015) Silver nanoparticles—wolves in sheep’s clothing? *Toxicology Research*. 4(3), 563–575.
- Font, E. (2001). Antisépticos y desinfectantes. *Farmacéutica*. 20, 2, 55-64.
- Fontecha-Umaña, F. (2014). Estudio de la eficacia bactericida y bacteriostática de productos químicos embebidos en materiales. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universitat, Autònoma de Barcelona.

- Fuentes, F., & Massol-Deyá, A. (2002). Manual de laboratorios: Ecología de microorganismos. Universidad de Puerto Rico.
- Furukawa, T. Sato, H. Kita, Y. Matsukawa, K. Yamaguchi, H. Ochiai, S. Siesler, H. Ozaki, Y. (2006) Molecular Structure, crystallinity and Morphology of Polyethylene/ Polypropylene Blends studied by Raman Mapping, Scanning Electron Microscopy, Wide Angle X-Ray diffraction and differential Scanning Calorimetry. *Polymer Journal*, vol 38, 11, 1127-1136.
- Galli, R. Canal, M. Breitenbach, E. Lopes, G. Zanetti, M. Muneron, J. Silva, L. Fiori, M. (2020). Antibacterial polyethylene - Ethylene vinyl acetate polymeric blend by incorporation of zinc oxide nanoparticles. *Polymer testing*. 89, 106554
- Gallegos-García, M. Celis, L.B. Rangel-Méndez, R.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.
- García-Torres, J. (2019). Tratamiento de aguas residuales a partir de bacterias anaerobias para la recuperación de nanopartículas de plata y su efecto sobre Escherichia coli. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Gerba, C. (2009). Environmentally Transmitted Pathogens. *Environmental Microbiology*. 445-484.
- Ghorbani, H.R.; Safekordi, A.A.; Attar, H.; Sorkhabadi, S.M.R. (2011). Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. Q.*, 25, 317–326.
- Goff, H., Powers, E., (1975). Effects of X-rays on Ag-DNA Complexes. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 27(5), 503-507.
- Gonzalez-Bosquet. L. (2003). Antisépticos y desinfectantes. *Offarm Ámbito farmacéutico educación sanitaria* 22.3.
- Guzman, M., Dille, J., & Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(1), 37–45.
- Hadrup, N., Sharma, A., Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 98, 257-267.
- Hamzia, A., et al. (2018). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by Haemophilus influenzae and their antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 10(1), 175-179.
- Hall C. (1981). Polymer Materials. 1 ed. London and Basingstoke: The MacMillan Press LTD.
- Hall-Stoodley. L. Costerton, J. Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2, 95-108.
- Heinsheimer, J. (1967). Existencias de agua del planeta. *Agua y Energía Eléctrica*.

- Helmlinger, H. Sengstock, C. Gross-Heitfeld, C. Mayer, c. Schildhauer, A. Köller, M. Epple, M. (2016) Silver nanoparticles with different size and shape: equa cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Advances*. 6, 18490.
- Hua, Q. Jun, Y. Wen, J. (2016). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Taxus yunnanensis* Callus and Their Antibacterial Activity and Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Nanomaterials*. 6(9), 160.
- Huang, J. (2007) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles bye novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*. 18, 105104.
- IngledeW WJ, Poole RK. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 48:222-71.
- Iravani, S. Korbekandi, H. Mirmohammadi, S.v. Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9(6): 385-406.
- Ivanissevich. O. (1974). Contaminación del aire y del agua. Ministerio de cultura y Educación. Argentina
- Jagtap, U. Bapat, V. (2013) Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. Seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*. 46, 132-137.
- Jefferson, W. (1943). Colloidal silver today: the all-natural, wide-spectrum germ killer. *Healthy Living Publications*.
- Jena, J., Pradhan, N., Prasad, B., & Behari, L. (2013). Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Microalga *Chlorococcum Humicola*. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(1), 1–8.
- Jones, A. (2009). Choosing antibacterial additives for plastics. *Plastics, Additives and Compounding*, 11:26-28
- Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) archivo 99-101-3078.
- Kalishwaralal, K., Banumathi, E., Pandian, S. R. K., Deepak, V., Muniyandi, J., Eom, S. H., Gurunathan, S. (2009). Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 51-57.
- Kavamura, V. N., Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28(1), 61–69.
- Khan F.M., Gupta R. (2020). *Escherichia coli* (E. coli) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. In: Jeon HY. *Sustainable Development of Water and Environment. ICSDWE 2020. Environmental Science and Engineering*. Springer, Cham.
- Khodashenas, B., Ghorbani, H.R. (2015). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*. 12, 8, 1823-1838.
- Kikuchi, Y., Sunada, K., Iyoda, T., Hashimoto, K., y Fujishima, A. (1997). Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 106(1-3), 51-56.

- Krasner, S. Weinberg, H. Richardson, S. Pasto, S. Chinn, R. Scilimenti, M. Onstand, G. Thruston, A. (2006). Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environmental Science and Technology*. 1;40(23):7175-85.
- Krzywicka, A. Megiel, E. (2020). Silver-Polystyrene (Ag/PS) Nanocomposites Doped with Polyvinyl Alcohol (PVA)—Fabrication and Bactericidal Activity. *Nanomaterials*. 10(11) 2245.
- Korbekandi H, Iravani S. (2012). Silver nanoparticles. In: Hashim AA, Eds. The delivery of nanoparticles. *InTechOpen*: 3-36.
- Kumar, K.S. Kumar, G Prokhorov, E. Luna-Barcenas, G. Buitron, G. Sanchez, V, I.C. (2014). Exploitation of Anaerobic enriched mixed bacteria (AEMB) for the silver and gold nanoparticles synthesis., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 462, 264-270.
- Kumar, S. Abyaneh, M. Gosavi, S. Ahmad, A. Kulkarni, S. Pasricha, R, Khan, M. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnology Letters*. 29 (3): 439:45.
- Lorenzo Acosta, Y., & Obaya Abreu, M. C. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar, 39(1), 35–48.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., y Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 4278-4281.
- Mirhoseini, A., Amani, J., & Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic Escherichia coli and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, 162–169.
- Monopoli, M.P, et al. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*. 7, 779–786.
- Morones, J.R. Elechiguerra, J.L. Camacho, A. Holt, K. Kouri, J. Tapia-Ramirez, J. Yacaman, M.J. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16, 2346-2353.
- Mourad, R.M. Darwesh, O.M, Abdel-Hakim, A. (2020). Enhancing physico-mechanical and antibacterial properties of natural rubber using synthesized Ag-SiO₂ nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164, 3234-3249.
- Mudhoo, A. Kumar. S. (2013). Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 10, 1383–1398
- Mulvaney, P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, 12(3), 788–800.
- Namrata, M. Ingle, A. Gade, A Rai, M. (2008). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Callus Extract of Carica papaya — A First Report. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18, 83-86.
- Nalwade AR, Jadhav AA. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Datura alba Nees. and evaluation of their antibacterial activity. *Archives of Applied Science Research*; 5: 45-9

Nikonorova, N.I. Semenova, E.V. Zanezin, V.D. Lukovkin, G.M. Volynsky, A.L. Bakeev, N.F. (1992). *Journal of Polymeric Science, Series A* 34, 123

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobials*. 1999; M 26-A.

Odonkor, S. Ampofa, J. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*. 4:e2.

Oleszkiewicz, J. A., & Sharma, V. K. (1990). Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals-A review. *Biological Wastes*, 31(1), 45–67.

Olivares, R. Sandoval, R. (2008) El agua potable en Mexico Historia reciente, actores, procesos y propuestas, Asociación Nacional de Empresas de Aguas Saneamiento de México, A.C.

Organización Mundial de la Salud. Agua. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water#:~:text=El%20agua%20contaminada%20puede%20transmitir,zonas%20con%20escapez%20de%20agua>.

Organización Mundial de la Salud. (2018) E.coli. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Otari, S. V., Patil, R. M., Ghosh, S. J., Thorat, N. D., & Pawar, S. 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.

Palza, H. (2015). Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Science* 16, 2099-2116.

Park, Y.; Hong, Y.N.; Weyers, A.; Kim, Y.S.; Linhardt, R.J. (2011). Polysaccharides and phytochemicals: A natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, 5, 69–78.

Pomogailo, A. D. Kestelman, V. N. (2005). Metallopolymer Nanocomposites. *Materials Science, Springer, Germany*

Qing, Y.; Cheng, L.; Li, R.; Liu, G.; Zhang, Y.; Tang, X.; Wang, J.; Liu, H.; Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*. 13, 3311–3327

Qiu, Y., Qian, X. (2008). Antimicrobial medical devices including silver nanoparticles. Patent WO2008094876A1 PCT/US2008/052249

Xia, Q. Ma, Y. Wang, J. (2016). Biosynthesis of silver Nanoparticles Usind *Tazus yunnensis* Callus and their Antibacterial Actibity and Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Nanomaterials (Basel)* 1, 6(9):160

Raza, M. Kanwal, Z. Rauf, A. Sabri, A. Riaz, S. (2016). Size- and Shape-Dependent antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes. *Nanomaterials*, 6, 74.

Raza, S. Ansari, A. Siddiqui, N. Ibrahim, F. Abro, M. Aman, A. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles for the fabrication of non cytotoxic and antibacterial metallic polymer based nanocomposite system. *Scientific reports*. 11:10500

Repetto, M. (2002). Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: *Ediciones Díaz de Santos*, Enpses-Mercie Group. Tercera edición, 303-305.

Rittmann, B. E. y McCarty, P. L. (2001). Environmental biotechnology: principles and applications. *McGraw-Hill series in water resources and environmental engineering*. McGraw-Hill.

Romero Zúñiga, L. E. (2001). Control de procesos. *Ingeniería Química* (Vol. 33).

Ruiz-Castillo, A. L. (2016). Recuperación de plata metálica de aguas residuales a partir de unabiopelícula anaerobia en un reactor de lecho fluidificado inverso. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Sánchez-Álvarez, K.L. (2018). Eliminación de Escherichia coli en sistemas de captación de agua estancada a partir de geomembranas impregnadas con nanopartículas metálicas. Tesis de Maestría, Centro de investigación y Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Sánchez, K. (2017). Desinfección de Escherichia coli de un agua residual sintética a partir de nanopartículas de Óxido de Zinc/Plata y plata iónica incorporados a un lecho de polietileno. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

Sanchez-Lopez, E. Gomez, D. Esteruelas, G. Bonilla, L. Lopez-Machado, A.L. Galindo, R. Cano, A. Espina, M. Ettcheto, M. Camins, A. Silca, A.M. Durazzo, A. Santini, A. García, M. L. Souto, E. B. (2020). Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials*, 10, 292.

Sánchez-Moreno, M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. Tesis de Maestría. Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química. Universidad Nacional de Educación a Distancia.

Sang, K. Jin, J. Kabir, L. Yun, K. Ji, M. Youn, L. (2012). Antifungal Effects of silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology*. 4081): 53-58.

Sawai, J. (2003). Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of microbiological methods*, 54(2), 177-182.

Santo, K. Vishnyakov, A. Brun, Y. Neimark, V. (2018). Adhesion and separation of nanoparticles on polymer-grafted porous substrates. *Langmuir*, 34, 4, 1481-1496.

Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on triclosan. Antimicrobial Resistance. 2010: 1-56.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana Nom-127-Ssa1-1994, "Salud Ambiental, Agua Para Uso Y Consumo Humano-Limites Permisibles De Calidad Y Tratamientos A Que Debe Someterse El Agua Para Su Potabilización.

Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones Sanitarias.

Shahverdi, R.A.; Minaeian, S; Shahverdi, R.H.; Jamalifar, H.; Nohi, A-A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42, 919-923.

Shao, F. (2014). Toxicity of silver nanoparticles on virus. *Journal of Materials and Environmental Science*. Sci. 5, 2 587-590.

Sharma, V. Yngard, R., Lin, Y., (2009) Silver nanoparticles:green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145, 83-96.

Shivaji, S., Madhu, S., & Singh, S. (2011). Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry*, 46(9), 1800-1807.

Sile-Yuksel, M. Tas, B. Koseoglu-Imer, D. Koyuncu, I. (2014). Effect of silver nanoparticles (AgNP) location in nanocomposite membrane matrix fabricated with different polymer type on membrane matrix fabricated with different polymer type on antibacterial mechanism. *Desalination*. 347, 120-130.

Singh, J. Dutta, T. Kim, K. Rawat, M. Samddar, P. Kumar, P. (2018). ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Nanobiotechnology*, 16:84

Srinivasan, R. Sorial, G. (2011). Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. *Journal of Environmental Sciences*. 23(1), 1-13.

Sunkar S, Nachiyar CV. (2012). Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2: 953–9

Sussman M. (1997). *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge: Cambridge University Press; 643.

Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*, 7(13), 1701503. doi:10.1002/adhm.201701503

Thakkar, K.N.; Mhatre, S.S.; Parikh, R.Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology* 6, 257–262.

Torres Lozada, P. Pérez, A. (2010) Actividad Metanogénica Específica: Una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de recursos naturales y del ambiente*. 9. 5-14.

Tseng, C. Wang, C. Chen, C. (2006). Polypropylene Fibers Modified by Plasma Treatment for Preparation of Ag Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry. B* 110, 4020-4029.

Turner, A. Filella, M. (2021). Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts. *Environmental International*. 156, 106622.

Van Houdt, R. Michiels, C. (2005). Role of bacterial cell surface structure in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology* 156, 626-633

Varnero-Moreno, M. T. (2011). Manual de Biogás. *Physiological Research*, 64(6), 883–890.

- Veerasamy R, Xin TZ, Gunasagaran S, Gunasagaran, S. Xiang, T. Yang, E. Jeyumar, N. Dhanaraj, S. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15, 2, 113-120.
- Veciana Galindo, C. Cortés Castell, E. Torro Montell, L. Sirvent Segura, E. Rizo Baeza, M. Gil Guillén V. (2014). *Nutrición Hospitalaria*. 29, 6, 1388-1393
- Vegosavá, O. Mraziková, A. (2017). Limitations and possibilities of green synthesis and Longterm stability of colloidal Ag Nanoparticles. *AIP Conference Proceedings* 020004-2
- Vieira-Marques, M. Constantino-Rocha, F. Juárez-Soto, N. (2008). Ethylene or Propylene Polymerization in the Presence of Macromonomers Employing Metallocene Catalysts. *Designed Monomers and Polymers*. 11:6, 547-563.
- Vo, Q. Phung, D. Nguyen, Q. Thi, H. Thi, N. Thi, P. Bach, L. Tan, L. (2019). Controlled Synthesis of Triangular Silver Nanoplates by Gelatin–Chitosan Mixture and the Influence of Their Shape on Antibacterial Activity. *Process*. 7, 873.
- Wahab, A., Soo, Ick., No, Q., (2019) Cellulose acetate nanofibers embedded with AgNPs anchored TiO₂ nanoparticles for long term excellent antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers* 207, 640-649.
- Weber, W. J. (1979). Control de la calidad del agua, Procesos fisicoquímicos. *Editorial Reverte*. España.
- Weininger, S. Stermitz, F. (1988). Química Orgánica. *Editorial Reverte.S.A.* España.
- Woo, S. Hee, J. Lamsal, K. Kim, Y. Min, J. Lee, Y. (2012). Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology*. 40(1):53-8.
- Xia, Q. Ma, Y. Wang, J. (2016). Biosynthesis of silver Nanoparticles Using *Taxus yunnanensis* Callus and their Antibacterial Activity and Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Nanomaterials*. 6, 160.
- Zhang, X. Liu, Z. Shen, W. Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications and Therapeutic Approaches. *Internationa. Journal of Molecular Science* 17, 1534.
- Zitko, V. (1999). Qualitative determination of 10,10'-oxybisphenoxarsine and decabromodiphenyl ether in plastics. *Chemosphere*, 38(3), 629–632. doi:10.1016/s0045-6535(98)00207-0
- Zivic, F., Grujovic, N., Mitrovic, S., Ahad, I. U., & Brabazon, D. (2017). Characteristics and Applications of Silver Nanoparticles. Commercialization of Nanotechnologies–A Case Study Approach, *Springer* 227–273.

Anexos

1. Cálculos de determinación de sólidos suspendidos volátiles

Siguiendo la metodología de APHA (1998), sección 3.1.3.

Tabla 1. Pesos de capsulas

Capsula	M (peso mg)	A (peso mg)	X (peso mg)	B G4 (peso mg)	C G5 (peso mg)
1	52.6863	52.6696	2.0744	52.826	52.7437
2	54.7495	54.732	2.0383	54.8875	54.8062

Tabla 2. Cálculos para determinar sólidos

Tipo de sólido	%sólidos totales	%sólidos volátiles	%sólidos fijos (cenizas)	ssv (g/L)	ssv (mg/L)
Formula	$(BG4-A)/x*100$	$(BG4-CG4)/X*100$	$(CG4-A)*100$	$(BG4-CG4)*1000/x$	ssv /1000
1	7.5395295	3.967412264	7.41	39.674122	0.039674
2	7.6289064	3.988617966	7.42	39.886179	0.039886
promedio	7.5842179	3.978015115	7.415	39.780151	0.039780

2. Cálculo de la masa de lodos a utilizar en experimentos de síntesis en lote

Una vez determinada la cantidad de sólidos en el lodo granular, se procedió a calcular la masa necesaria para obtener 2 g SV/L en los experimentos en lote, mediante la siguiente ecuación:

$$m_{lodo} = \frac{(2g \frac{SV}{L})(V)}{SV_{medios}}$$

Donde:

m_{lodo} = Masa de lodo necesaria (g)

SV_{medios} = Sólidos volátiles medidos en el lodo (g SV/g lodo)

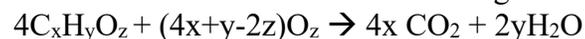
V = Volumen de medio mineral (mL)

Sustitución:

$$m_{lodo} = \frac{(2g \frac{SV}{L})(0.04 L)}{0.0397 g SV/g lodo} = 2.02 g de lodo$$

3. Cálculo de DQO equivalente

Para obtener 2 g DQO/L de medio mineral se calculo el equivalente teórico de DQO, con el volumen necesario de etanol. Los cálculos se hicieron con la siguiente ecuación:



Donde:

x = Número de carbonos en el sustrato
 y = Número de hidrógenos en el sustrato
 z = Número de oxígenos en el sustrato

Pesos moleculares:

H₂O = 18 g/mol

O₂ = 32 g/mol

Etanol (CH₃CH₂OH) = 46 g/mol

CO₂ = 44 g/mol

Sustitución:



$$4(46) + (8+6-2)(32) \rightarrow 4(44)+12(18)$$

$$184+384 \rightarrow 352 + 216, \text{ equivalente a: Etanol} + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$$

Para oxidar 184 g de etanol son necesarios 384g de oxígeno o DQO; por lo tanto, la relación para conocer cuánto etanol (en masa) es oxidado con 2 g de oxígeno o DQO es:

$$0.958 \text{ g de etanol} = \sim 1.213 \text{ mL de etanol/L de medio mineral}$$

4. Cálculo para preparación de soluciones de plata

Para la preparación de una solución de plata (Ag⁺) de 2000 mg/L, a partir de AgNO₃, se realiza el cálculo siguiente:

$$\left(\frac{2000 \text{ mg Ag}^+}{L}\right) \left(\frac{169800 \text{ mg AgNO}_3}{107900 \text{ mg Ag}^+}\right) = 1473.67 \text{ mg AgNO}_3/L = 1.47 \text{ g de AgNO}_3/L$$

Vol alícuota = Volumen de la alícuota tomada de la muestra (mL)

5. Determinación de la concentración de nitratos

Medadas de absorbancia por espectrometría UV-vis (sección 3.1.6) para construir la curva de calibración de nitratos, y su respectiva ecuación lineal, de modo que la absorbancia de los ensayos se ajuste a la curva y se determinó la concentración de nitratos en solución.

Tabla 3. Absorciones por UV-vis para distintas concentraciones de nitratos

[NO ₃ -]	220 nm	275 nm	diferencia
0	0	0	0
2	0.278	0.018	0.26
4	0.46	0.024	0.436
6	0.665	0.025	0.64
8	0.87	0.024	0.846
10	1.083	0.02	1.063

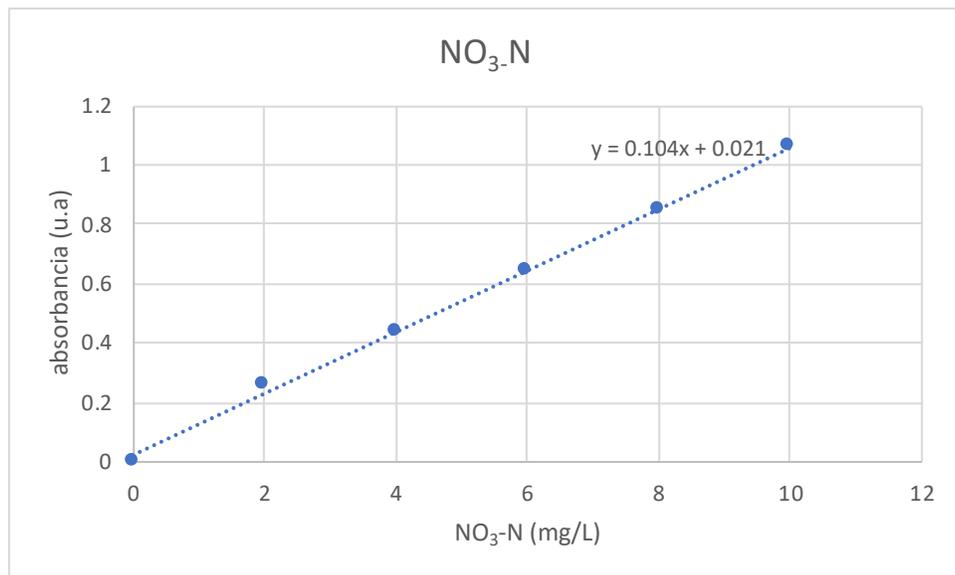


Figura 1. Curva de calibración de nitratos, y su respectiva ecuación lineal, para la determinación de la concentración de nitratos en solución.

6. Preparación de estándares para la Escala de McFarland para determinación de concentración de bacterias en suspensión

Tabla 4. Relación de volúmenes para la preparación de estándares de la Escala McFarland.

Estándar	Vol. BaCl 1% (mL)	Vol. H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Concentración bacterias (1x10 ⁸ bact/mL)	620
0.5	0.05	9.95	1	0.076
1	0.1	9.9	3	0.1378
2	0.2	9.8	6	0.2296
3	0.3	9.7	9	0.3214
4	0.4	9.6	12	0.4132
5	0.5	9.5	15	0.505
6	0.6	9.4	18	0.5968
7	0.7	9.3	21	0.6886
8	0.8	9.2	24	0.7804
9	0.9	9.1	27	0.8722
10	1	9	30	0.964

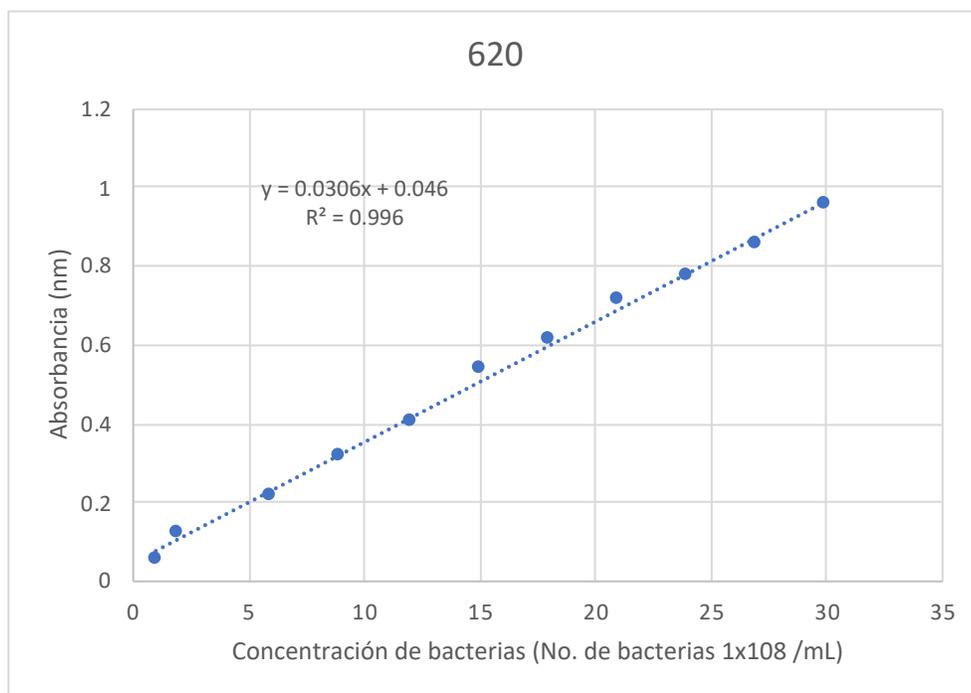


Figura 2. Curvas de calibración de McFarland para la determinación de la concentración de bacterias de Escherichia coli por turbidimetría, a 620 nm

De cada una de las curvas se obtiene la ecuación de la recta, y por la Ley Lambert Beer, se tiene:
 $y = mx + c$

$$y = 0.0306x + 0.047$$

$$x = (y - 0.046) / 0.0307$$

y = Absorbancia (nm)

m = Pendiente de la recta

x = Concentración de bacterias (No. De bacterias 1×10^8 /mL)

7. Ajuste de volúmenes y concentraciones para la evaluación de la CMI de las AgNP sintetizadas

La metodología que se llevo a cabo fue por medio de la técnica de microdilución en placa de micropocillos, se hizo una serie de diluciones a partir de una concentración principal, La Figura 3 muestra la solución de la cual se partió y la Figura 4 muestra la distribución de esta solución en los micropocillos.

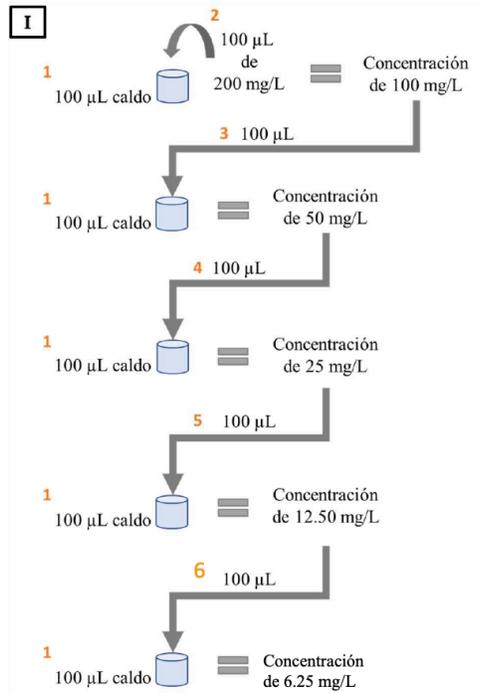


Figura 3. Técnica de microdilución

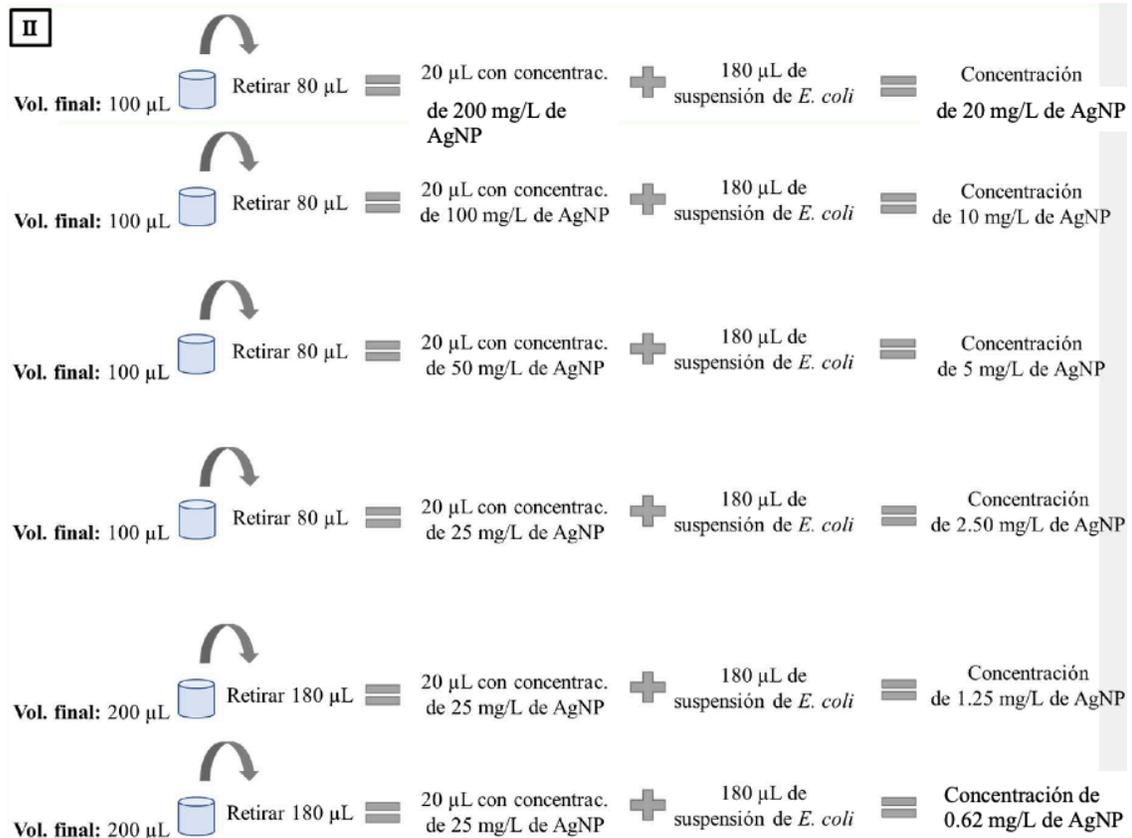


Figura 4. Preparación de concentraciones en pocillos

8. Cálculos de tiempo de vida de las geomembranas

Siguiendo la metodología de la sección 3.6 se mide la concentración por EAA plata en solución.

Tabla 4. Resultados de concentración de plata desprendida semanalmente

	PE	PP	PE 300-1	PE 300-2	PE 300-3	promedio	Acumulado	PP 200-1	PP 200-2	PP 200-3	promedio	acumulado
inicial	0.03	0.06	137.5	132.5	137.5	135.83		112.5	105	110	109.17	
S1	0.08	0.05	0.06	1.04	0.97	0.69	0.69	0.94	2.05	4.67	2.55	2.55
S2	0.02	0.03	0.05	0.19	0.03	0.09	0.78	0.06	0.08	0.03	0.06	2.61
S3	0.03	0.04	0.24	0.13	0.2	0.19	0.97	0.14	0.23	0.18	0.18	2.79
S4	0.05	0.06	0.2	0.1	0.2	0.17	1.14	0.16	0.2	0.1	0.15	2.95
S5	0.04	0.03	0.6	0.2	0.14	0.31	1.45	0.1	0.6	0.2	0.30	3.25
S6	0.03	0.02	0.3	0.6	0.2	0.37	1.82	0.2	0.3	0.5	0.33	3.58
S7	0.03	0.01	0.8	0.1	0.1	0.33	2.15	0.1	0.2	0.6	0.30	3.88
S8	0.02	0.02	0.4	0.5	0.2	0.37	2.52	0.5	0.7	0.13	0.44	4.32

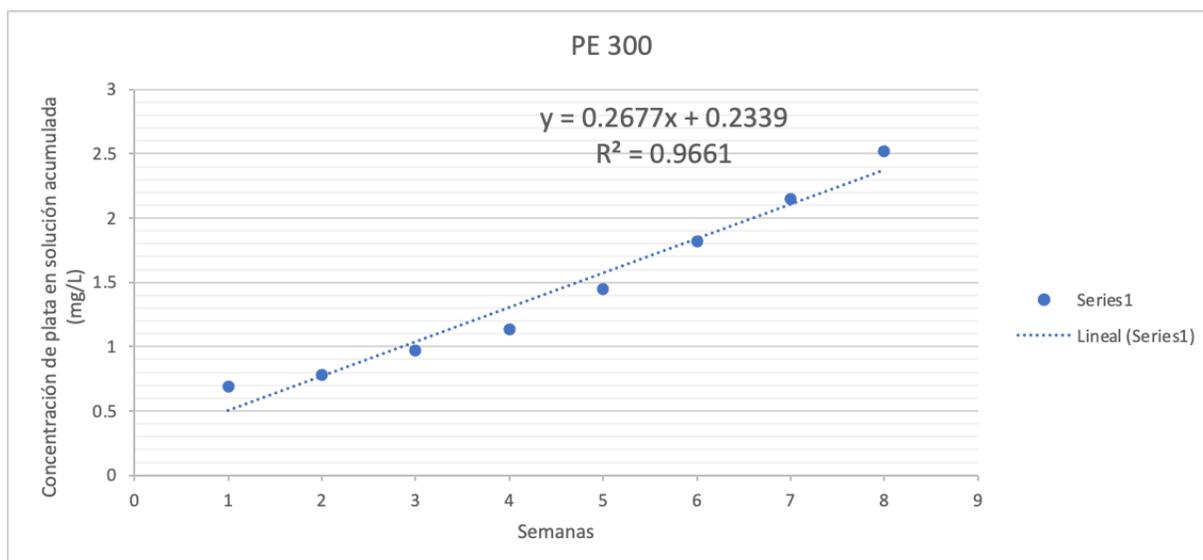


Figura 5. Liberación de plata para geomembranas de polietileno con 300 mg/L de AgNPs

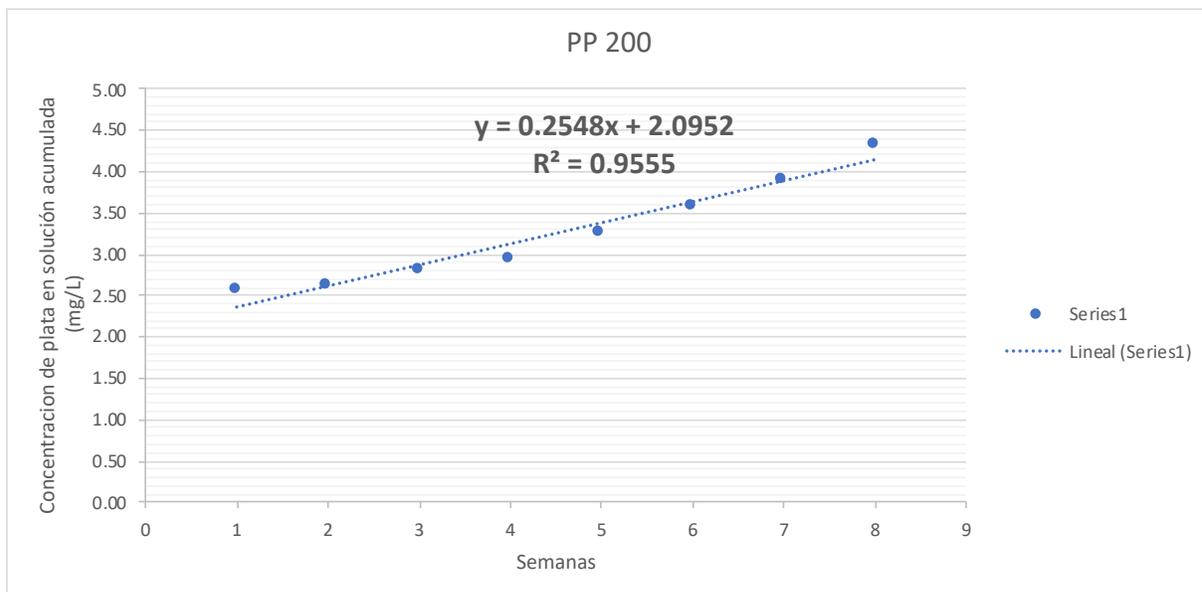


Figura 6. Liberación de plata para geomembranas de polipropileno con 200 mg/L de AgNPs

	Poliétileno		Polipropileno	
x (semanas)	506.5226	años 9.74081923	x (semanas) 420.230769	años 8.08136095
y (total)	135.83		109.17	
m	0.2677		0.2548	
b	0.2339		2.0952	