

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

## Escuela Politécnica Superior de Gandía

### Grado en Ciencias Ambientales

---



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA  
SUPERIOR DE GANDIA

## **“Método de caracterización y estudio del comportamiento biocida de materiales sólidos”**

### ***Trabajo Final de Grado***

Autor:

**Kevin Palmer Badia**

Tutores:

**María A.V. Pachés Giner**

**Jesús Mengual Cuquerella**

**GANDÍA, 2020**

## Resumen

El presente estudio trata de validar la puesta a punto de una metodología que permita obtener resultados cualitativos, de una manera menos costosa económicamente y menos compleja, de la capacidad de la plata como agente antimicrobiano. Esta metodología también permite llevar a cabo una selección inicial de un conjunto de muestras para posteriormente, sobre las más adecuadas, realizar los procedimientos de determinación de capacidad biocida recogidos en la literatura.

Para hacer posible este estudio, se ha empleado un agente biocida como es la plata soportado en zeolita. Las pruebas biocidas se han llevado a cabo sobre colonias de microorganismos, específicamente *Escherichia coli* (*E. coli*), estudiando, entre otros, el efecto de la carga de plata (especie activa) en el soporte, zeolita faujasita. Se pretende determinar, de forma comparativa, la dosis mínima de agente biocida necesaria para alcanzar un efecto antimicrobiano en el medio de cultivo.

La idea general sería la de disponer de un procedimiento rápido y sencillo para hacer una evaluación inicial de la capacidad biocida de un conjunto de muestras de forma cualitativa, para, posteriormente, centrarse con un análisis mucho más específico y cuantitativo sobre aquellas muestras más prometedoras.

**Palabras clave:** Antimicrobiano, zeolita, plata, *Escherichia coli*.

## Abstract

The present study tries to validate the development of a methodology that allows obtaining qualitative results, in a cheaper and less complex way, of the capacity of silver as an antimicrobial agent. This methodology also allows to carry out an initial selection of a set of samples and subsequently, on the most appropriate ones, carry out the biocidal capacity determination procedures in related scientific literature.

To make this study possible, a biocidal agent such as silver supported on zeolite was used. The biocidal tests have been carried out on colonies of microorganisms, specifically *Escherichia coli* (*E. coli*), studying, among others, the effect of silver (active species) on the carrier, faujasite zeolite. The aim is to determine, comparatively, the minimum dose of biocidal agent necessary to achieve an antimicrobial effect in the cultivable environment.

The general idea would be to have a quick and simple procedure to make an initial evaluation of the biocidal capacity of a set of samples in a qualitative way, and then focus with a much more specific and quantitative analysis on those most promising samples.

**Keywords:** Antimicrobial, zeolite, silver, *Escherichia coli*.

# Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Plata como antimicrobiano .....	3
1.3. Soportes biocidas .....	5
1.4. Técnicas de caracterización.....	8
1.4.1. Macrodilución en caldo: .....	8
1.4.2. Método del epsilómetro (E-test):.....	10
1.4.4. Método de difusión en Agar (Kirby-Bauer):.....	10
1.4.3. Ensayos <i>in vivo</i> con material polimérico:.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Material y métodos. ....	14
3.1. Soporte zeolítico empleado .....	14
3.2. Material biológico.....	15
3.3. Incorporación de plata en el soporte. Intercambio iónico. ....	15
3.4. Procedimiento experimental.....	16
3.4.1. Aislamiento y crecimiento de la población de <i>E. coli</i> .....	16
3.4.2. Determinación del volumen correcto de siembra en placa .....	19
3.4.3. Preparación de las suspensiones del material biocida en agua .....	19
3.4.4. Optimización de la incorporación del agente bactericida en la placa .....	22
3.4.5. Procedimiento experimental para la determinación de la capacidad biocida ....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Aislamiento y crecimiento de la población de <i>Escherichia coli</i> .....	24
4.2. Determinación del volumen correcto de siembra en las placas .....	25
4.3. Optimización del procedimiento de incorporación del agente bactericida en la placa sembrada.....	28
4.4. Estudio del posible efecto biocida del soporte sin fase activa.....	30
4.5. Capacidad biocida de la plata.....	31
5. CONCLUSIONES FINALES .....	35
6. Bibliografía.....	37

## Listado de Figuras

Figura 1. Principales países productores de plata en 2017 .....	4
Figura 2. Estructura de distintas zeolitas. ....	6
Figura 3. Método de macrodilución en caldo (Cecilia, 2014) .....	9
Figura 4. Método del epsilómetro (Murugesan, 2015).....	10
Figura 5. Método de Kirby-Bauer .....	11
Figura 6. Extrusora de espagueti + Granulador (William, 2009) .....	11
Figura 7. Resultado material polimérico (William, 2009).....	12
Figura 8. Zeolita Faujasita (Lutz, 2014) .....	14
Figura 9. Agar para coliformes.....	17
Figura 10. Disolución del producto .....	17
Figura 11. Placas de Petri preparadas.....	17
Figura 12. Equipo de filtración.....	18
Figura 13. Diluciones preparadas para la realización de un experimento .....	20
Figura 14. Primer rango de concentración .....	21
Figura 15. Segundo rango de concentración .....	21
Figura 16. Tercer rango de concentración .....	21
Figura 17. Agitador de vórtice empleado.....	22
Figura 18. Aislamiento y comprobación del crecimiento de E. coli .....	24
Figura 19. Ensayos de siembra sobre placa a diferentes volúmenes. ....	26
Figura 20. Dispersión de la gota en el medio de cultivo .....	27
Figura 21. Procedimientos de incorporación de muestra sobre placa sembrada .....	29
Figura 22. Ensayo de la capacidad biocida del soporte .....	31
Figura 23. Ensayos de capacidad biocida para diferente carga de plata en el soporte .....	32

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes

La humanidad lleva desde hace muchos años desarrollando métodos para controlar aquellos organismos vivos, tanto vertebrados, invertebrados como microorganismos que amenazan su producción de alimentos o incluso su propia salud.

Esto comenzó sobre el año 1000 a.C. cuando la cultura china introdujo el azufre como fungicida y, a lo largo del tiempo, se fueron desarrollando nuevos métodos, tales como el DDT (Dicloro difenil tricloroetano) como insecticida en 1874 o la penicilina como antibiótico en 1928 (García Martin, 2010). Hoy en día, se siguen buscando nuevos métodos para controlar las poblaciones de seres vivos que amenazan tanto la salud humana como otros bienes de interés.

Las enfermedades de transmisión por alimentos o de riesgo de contagio por contacto de superficies contaminadas constituyen una de las mayores amenazas presentes para cualquier tipo de ser vivo (Zhang, 2009). Para poder hacer frente a la cantidad de patógenos que existen, cada día surgen nuevas líneas de investigación, tanto para la prevención, como para la eliminación de los microorganismos que pueden desarrollar enfermedades infecciosas. Sin embargo, es importante tener en cuenta la peligrosidad que estos agentes potenciales tienen sobre el medio y sobre la propia salud humana. Una de esas líneas de investigación se fundamenta en el uso de ciertos metales como agentes antimicrobianos.

En la tabla 1, se puede observar un estudio en el cual se utilizan distintos metales u óxidos metálicos para combatir cepas de *Enterobacter asburie* y *Enterobacter cloacae*, en el que se ve la concentración mínima inhibitoria, que expresa la cantidad mínima del antimicrobiano que impide el crecimiento del microorganismo (Selvi, 2014).

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de metales pesados de cepas de *Enterobacter asburie* y *Enterobacter cloacae* (Selvi, 2014)

Metales	MIC <i>E. asburie</i> (µg/L)	MIC <i>E. cloacae</i> (µg/L)
Zn	17,5	20,5
Cr	16,5	17,8
Pb	16,0	18,0
Ni	15,5	18,5
Cu	11,5	13,5
Hg	6,5	7,5
Cd	1,8	2,0

Sabiendo que la MIC expresa la cantidad mínima del agente antimicrobiano que impide el crecimiento del microorganismo frente a las colonias de microorganismos concretas reflejadas en la tabla, se puede afirmar que, de los metales pesados que se representan en la tabla, el cadmio es el metal pesado que más capacidad antimicrobiana tiene, ya que requiere menor

cantidad para lograr la concentración mínima inhibitoria. Por contra, el cinc, sería el metal pesado con menor capacidad antimicrobiana, ya que haría falta, aproximadamente, diez veces más concentración de este material que de cadmio para lograr los mismos resultados.

Por otro lado, se realizó un estudio, cuyos resultados se pueden observar en la tabla 2, para comprobar la capacidad antimicrobiana de diversos metales pesados utilizando muestras de un agua residual de una industria láctea, donde principalmente se encuentra el microorganismo *Lactococcus lactis* (Mittal, 2009).

Los metales pesados utilizados fueron: cobalto, níquel, cobre, cinc, plata y cadmio. Para comprobar la capacidad antimicrobiana de estos metales pesados, se añadieron iones metálicos en distintas concentraciones en muestras del agua residual y a partir de valores obtenidos mediante la absorbancia se obtuvo la MIC de los diferentes metales pesados:

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de metales pesados de agua residual de una industria láctea (Mittal, 2009)

Metales	MIC Agua residual (mM)
Ni	6,0
Zn	4,5
Cu	4,5
Co	1,4
Cd	0,8
Ag	0,2

En esta tabla se puede observar que el metal pesado que mejores resultados a demostrado es la plata, ya que necesita 30 veces menor concentración que el níquel, que es el que peor resultado ha dado.

Comparando las tablas 1 y 2, se puede observar que los metales pesados que coinciden en ambas tablas tienen resultados similares, ya que, a pesar de que las unidades de volumen no sean las mismas, con la diferencia de resultados en una misma tabla se puede hacer una idea aproximada de la efectividad de cada material frente a distintos microorganismos. En el caso del cadmio, en ambas tablas demuestra tener una capacidad antimicrobiana alta, requiriendo menor concentración de este para controlar el crecimiento de distintas cepas. En cuanto al cinc, níquel y cobre, en ambas tablas los encontramos con valores elevados de MIC comparándolos al cadmio.

Teniendo en cuenta la información obtenida a partir de las tablas 1 y 2, solo quedaría tener presente la peligrosidad de estos metales pesados, ya que hay algunos metales pesados que tienen dosis de peligrosidad relativamente bajas y que pueden ser perjudiciales para la salud humana. Esto provocaría que, a pesar de tener estos elementos una alta capacidad antimicrobiana, no serían viables como agentes microbianos para muchos usos.

Dependiendo de los países, incluso la propia legislación restringe o prohíbe el uso de ciertos metales pesados. En España, existen numerosas medidas para reducir la exposición a ciertos metales pesados. Entre otros están el cadmio y el mercurio. Estos metales suponen un riesgo sanitario alto. En el caso del cadmio, se ha clasificado como cancerígeno, además, se acumula

en el tubo proximal provocando disfunción renal o incluso desmineralización en los huesos. En cuanto al mercurio, además de presentar diversas formas tóxicas que afectan a diversos órganos, también puede atravesar la placenta y afectar directamente al sistema nervioso central de un feto en desarrollo (Ministerio de consumo, 2015).

El plomo, a pesar de no haber una legislación tan estricta como con el cadmio y el mercurio, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha clasificado como uno de los diez productos químicos que causan mayores problemas de salud. Poco a poco, se espera ir eliminando el plomo de ciertos productos no necesarios, como pasó con la gasolina en 2002.

En cuanto a los demás metales pesados que aparecen en las tablas 1 y 2, todos son tóxicos en altas concentraciones, pero no suponen un riesgo a no ser que se esté expuesto a grandes cantidades del elemento. Es más, algunos de estos metales pesados son necesarios para el organismo en concentraciones muy bajas. Por lo que se puede deducir que, a pesar de que el cadmio y el mercurio tengan buenos resultados como agentes antimicrobianos, no deben ser utilizados a la ligera, ya que pueden provocar serios problemas de salud. En cambio, la plata, que ha sido la que mejor resultado ha obtenido en la tabla 2, se considera que tiene una toxicidad casi nula, por lo que puede llegar a ser una buena opción a la hora de utilizarla como agente antimicrobiano.

## 1.2. Plata como antimicrobiano

Las primeras evidencias históricas indican que los humanos aprendieron a separar la plata del plomo sobre el año 3000 a.C. en Anatolia (Turquía). A lo largo de la historia de la humanidad, la plata ha sido utilizada para varios usos, tales como la fabricación de monedas de cambio, para reducir su peso y tamaño, para la elaboración de armas de guerra, para la manufactura de utensilios y ornamentos, etc. (Joyería Plaor, 2016).

Este uso provocó un aumento de la producción de plata y que distintas regiones y países comenzaran a ser productores de plata, tales como España y Europa Central en la época romana, así como distintos países sudamericanos tras su descubrimiento. Hoy en día, entre los principales productores de plata se encuentran México, Perú, China y Rusia, tal y como se puede observar en la figura 1 (Sevilla, 2019).

Toda esta plata producida se utiliza principalmente en aparatos eléctricos y electrónicos, ya que la plata es un gran conductor térmico y eléctrico, lo que la hace óptima para la creación de condensadores, interruptores y circuitos.

Otro uso interesante de la plata es su capacidad antimicrobiana. Esta propiedad hace que sea indispensable en la medicina, ya que se utiliza en quirófanos y hospitales. Por lo tanto, todas estas características hacen que la plata se utilice en muchos otros sectores. Además, es difícil de sustituir debido a que la toxicidad de la plata en los humanos es casi nula, al contrario de otros agentes microbianos basados en metales, tal y como se ha mostrado en el apartado anterior.

En cuanto a su capacidad antimicrobiana, la plata se ha utilizado como antimicrobiano durante siglos. Egipcios y Fenicios utilizaban cisternas de plata para conservar el agua, y con el mismo objetivo los emperadores chinos empezaron a utilizar cubiertos de plata (Salud Revista, 2013).

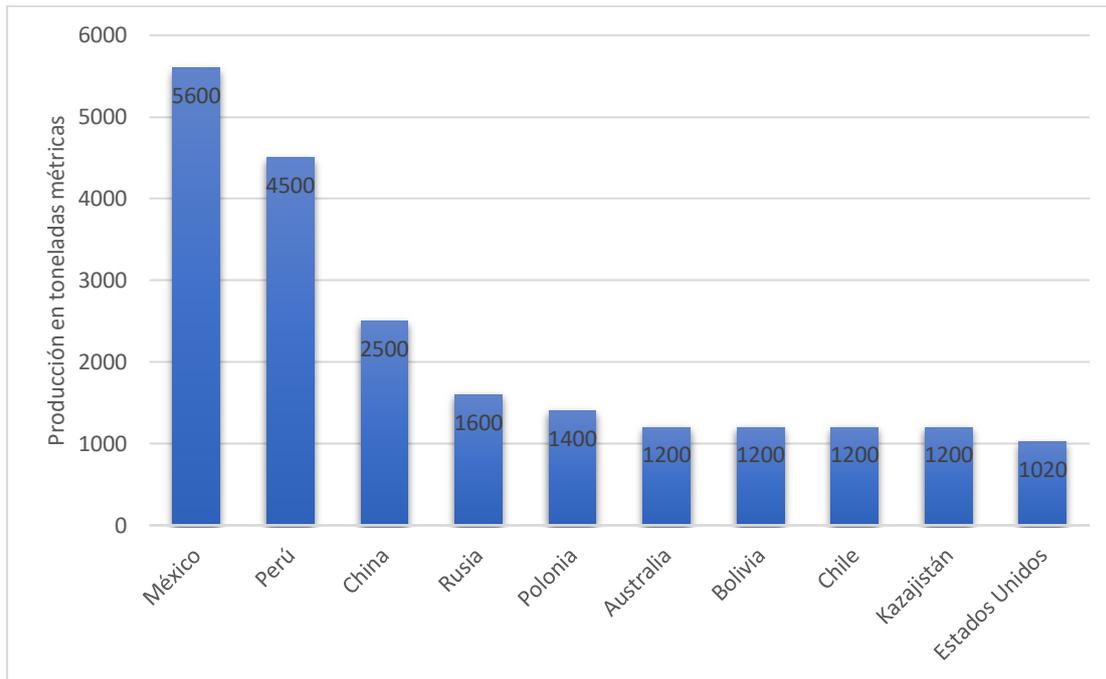


Figura 1. Principales países productores de plata en 2017 (Sevilla, 2019)

La utilización de la plata como protección contra las infecciones fue aumentando cada vez más durante el paso del tiempo, pero no fue hasta 1893 cuando un botánico suizo llamado Karl Wilhelm von Nageli publicó la primera investigación, demostrando las características microbianas de la plata (Schmidt-Braekling, 2017). A partir de ese momento, se empezó a introducir todavía más la plata para este uso como, por ejemplo, poniendo monedas de plata en tanques de agua o leche en medicina o, incluso, la NASA utilizó iones de plata para proteger el agua en los viajes espaciales.

Por toda esta historia, la plata ha llegado a ser conocida como uno de los mejores biocidas de la actualidad, siendo efectiva contra distintas bacterias, hongos, levaduras y algunos virus (Monteiro, 2009). Esta capacidad biocida de la plata se ha evaluado en numerosos estudios. En un estudio en concreto, se puso a prueba la capacidad biocida de la plata frente a *Staphylococcus aureus*, que se trata de una bacteria muy resistente frente antimicrobianos. En el estudio, utilizan la plata en distintas formas:  $\text{AgNO}_3$ , Ag-ZSM-5,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , zeolitas con plata comercializada y nanopartículas de plata. Se demostró que el  $\text{AgNO}_3$  obtenía los mejores resultados, pero siendo eficaz contra microorganismos en todas sus formas, lo que fue un gran avance ya que se convirtió en uno de los pocos agentes antimicrobianos capaz de combatir esta cepa sin necesidad de concentraciones desorbitadas del agente antimicrobiano (Laluzza, 2011).

En cuanto a los virus, los estudios de la capacidad biocida de la plata frente a estos son más escasos. Existe un estudio con resultados prometedores en el que se utilizan nanopartículas de plata para combatir el VIH-1 (última fase del VIH). El estudio se centra en el uso de distintos rangos de nanopartículas de plata con el fin de ver que rango es más óptimo para que estas nanopartículas actúen frente al VIH. En el estudio se llega a la conclusión de que con

nanopartículas de plata con un rango de 1-10nm se impide la extensión del virus a otras células (Elechiguerra, 2005).

Otro estudio trata de demostrar el potencial tóxico de la plata; para ello, incorpora nanopartículas de plata en distintas concentraciones en ratones de laboratorio. Las nanopartículas de plata fueron inyectadas de manera intraperitoneal. Sorprendentemente, se encontraron varios datos positivos: Estas nanopartículas demostraron no ser tóxicas, se observó un aumento en la vida media de la sangre, se incrementó las neurotransmisiones, no se mostraron respuestas inmunológicas y a los microorganismos les fue más costoso desarrollar resistencias a este elemento que a los antibióticos. Por todo eso, se llegó a la conclusión de que las nanopartículas de plata podrían llegar a ser, en un futuro, una alternativa a la quimioterapia para cualquier órgano, con posiblemente mejores resultados en el cerebro y en los pulmones, ya que se encontraron nanopartículas de plata en estas zonas en los ratones (Kiruba, 2009).

Hoy en día, siguiendo la búsqueda de tratamientos y protección contra bacterias y virus resistentes, se está empezando a trabajar con nanopartículas de plata como agente antibacteriano. Estas nanopartículas de plata hacen que, al ponerse en contacto con la membrana de las bacterias, haya un intercambio de los iones de plata haciendo que estos iones entren en las bacterias y reaccionen con sus enzimas haciéndoles perder su funcionalidad, de manera que en apenas unas horas las funciones básicas de las bacterias sean frenadas o incluso impedidas (IBEC, 2017).

### 1.3. Soportes biocidas

Un soporte o «carrier» es un compuesto, normalmente inorgánico, que permite, en el ámbito de este trabajo, albergar en su interior agentes antimicrobianos para su almacenamiento y posterior liberación. Además, debido a sus características estructurales y su composición, es posible controlar la liberación de los agentes antimicrobianos almacenados con el fin de adaptar su actividad biocida en función del caso, permitiendo que los agentes antimicrobianos duren el mayor tiempo posible con un rendimiento de acción determinado; es decir, permite almacenar una mayor cantidad de agente biocida que será liberado lentamente y en un periodo de tiempo superior.

Además, las características estructurales del «carrier» también pueden servir de medio de protección físico-química y mecánica para estos agentes antimicrobianos durante la manufactura de aquellos materiales que los incorporan en su estructura (por ejemplo, mezcla y extrusión de piezas plásticas que incorporan estos agentes).

Este es uno de los puntos clave que mantiene el interés en estas líneas de investigación, dado que el objetivo perseguido es que la capacidad biocida del material obtenido, suma del material normal y el agente biocida, perdure durante la vida útil de la pieza finalmente conformada.

Ahora bien, existen numerosos materiales que han sido empleados con el fin perseguido en este trabajo, tales como arcillas modificadas y pilarizadas (empleo de un agente para reducir el volumen de agua), óxidos metálicos y zeolitas, entre otros. Por ejemplo, en un estudio, se exponen los resultados satisfactorios obtenidos al utilizar arcillas modificadas portando sales de

amino para la adsorción y retención de fenol presente en soluciones acuosas (Lazo, 2007). Por otro lado, existe un estudio en el que se utilizaron distintos tipos de óxidos en cepas de *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus anthracis*, en el que los resultados mostraron que todos los óxidos utilizados tuvieron cierto efecto sobre los microorganismos en cuestión, reduciendo el número de colonias o incluso matándolas completamente (Haggstrom, 2009).

Estos soportes deben tener una serie de propiedades que les permitan ser adecuados, entre las que se pueden destacar la de ser inocuos, no alterar los posteriores usos del material finalmente obtenido y tener la capacidad para almacenar y liberar estas especies biocidas.

Entre los diferentes soportes que se pueden emplear, las zeolitas presentan interesantes características como materiales potenciales, debido, entre otras, a que son más fáciles de utilizar y menos costosas.

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos hidratados, formados por tetraedros de aluminio ( $AlO_4$ ) y sílice ( $SiO_4$ ) interconectados, formando estructuras tridimensionales de diferente configuración y alta área superficial. En la figura 2, se pueden observar diferentes configuraciones que conforman distintas estructuras de zeolitas. Como puede observarse, estas zeolitas tienen una estructura abierta, parecido a una jaula, lo que permite que las moléculas de pequeño tamaño puedan pasar mientras que las de mayor tamaño queden retenidas (selectividad de forma). Las zeolitas, debido al defecto de carga producido por la sustitución de un silicio por un aluminio, también son capaces de realizar intercambios catiónicos. El defecto de carga generado al incorporar aluminio en su estructura es compensado por iones cargados positivamente, pudiendo ser iones metálicos atrapados dentro de sus cavidades. Además, las zeolitas son sólidos muy estables que resisten condiciones ambientales muy complejas. Tienen puntos de fusión de más de  $1000^{\circ}C$ , por lo que aguantan temperaturas muy altas y no son comburentes, tienen puntos de presión muy altos y no se disuelven en agua. También es interesante añadir que debido a que no son radioactivas y están basadas en minerales naturales, no se cree que puedan tener ningún efecto negativo sobre la salud humana y el medioambiente (Woodford, 2019).

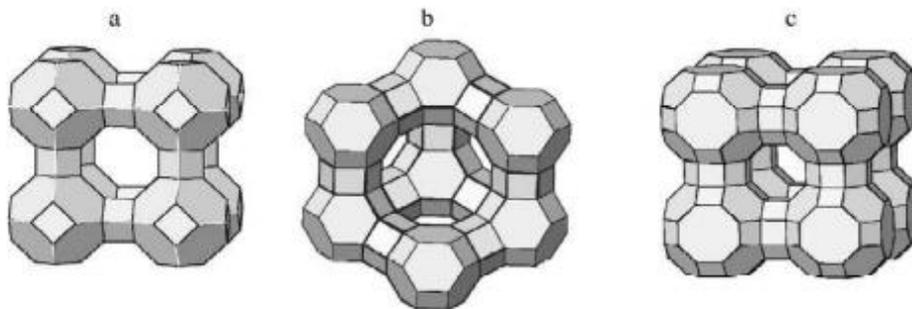


Figura 2. Estructura de distintas zeolitas. a) zeolita Z (LTA); b) zeolita X e Y (Faujasita); c) zeolita RHO (Ismail, 2011)

En cuanto a los usos en los que se aplican las zeolitas, uno de los más importantes es en los cultivos, ya sea adicionando las zeolitas directamente sobre el suelo, provocando una mejoría de la capacidad de intercambio catiónico del suelo, junto a su pH o añadiéndolas a los

fertilizantes, reduciendo las pérdidas de nitrógeno del fertilizante, favoreciendo la acumulación de nitrógeno en las plantas además de reducir la concentración de nitrógeno presente en la lixiviación del suelo (Toro, 2006).

Un uso muy importante de estas zeolitas, que cada vez está ganando más fuerza debido a sus resultados prometedores, es la de reducir los contaminantes del agua. Existe un trabajo en el que se explica los exitosos resultados que tienen las zeolitas en los usos de eliminación de metales pesados del agua, pudiéndose incluso recuperar estos metales pesados de las zeolitas, en aplicaciones para el tratamiento de aguas procedentes de las industrias textiles, ya que las zeolitas son capaces, incluso, de absorber los tintes y, por último, para el tratamiento de lixiviados y de aguas residuales, ya que las zeolitas tienen gran capacidad para reducir el amonio, los sólidos suspendidos y la demanda química de oxígeno (Koshy, 2016).

Otro uso muy importante de estas es el de su uso como catalizadores, como por ejemplo en las unidades de craqueo catalítico, que trata de romper grandes moléculas orgánicas con poco valor añadido (biomasa, subproducto de petróleo, etc.) en moléculas más pequeñas, pero con un mayor valor económico. Existe un estudio, que utiliza zeolitas en unidades de craqueo catalíticos para producir alquenos con resultados muy prometedores (Rahimi, 2011). Además, el uso de zeolitas podría superar un avance en comparación con las unidades de craqueo convencional, ya que superarían ciertas desventajas que proporcionan las unidades convencionales como la alta temperatura de reacción que es requerida, la gran cantidad de emisiones de CO<sub>2</sub> que es liberada y el bajo ratio de precio-beneficio.

Como usos comunes e interesantes de las zeolitas, también se utilizan en el control de olores y basura, atrapando líquidos lixiviados y moléculas de mal olor (Torres, 2005).

Por último, debido a la diversidad de estructuras existentes, la variedad de tamaños de poro, la capacidad para controlar su relación Si/Al (capacidad de intercambio iónico) así como su inocuidad para los seres humanos, también se están realizando varios estudios donde se usan estas zeolitas portando biocidas con el fin de usarlas como aditivos en materiales con capacidad biocida.

En la actualidad existen productos antibacterianos comerciales basados en zeolitas con plata. Por ejemplo, Agion®. Este material es incorporado a diversos materiales aportándoles propiedades biocidas. Además, la European Food Safety Authority incluye la zeolita A-plata como un aditivo aceptado para tecnologías biocidas (Boschetto, 2012).

En la literatura se pueden encontrar trabajos donde se usan distintas zeolitas incorporando plata para el control de bacterias y hongos. Chiericatti et al. (2014) estudiaron la capacidad biocida de mordenitas con plata frente a 3 bacterias y 3 hongos, obteniendo muy buenos resultados en todos los experimentos. Lalueza et al. (2011) estudiaron el uso de zeolitas tipo ZSM-5, con un 0,2% en peso de plata frente a *Staphylococcus aureus*, obteniendo muy buena capacidad biocida.

En otro estudio, se utilizó la zeolita X con iones de plata, añadidos a la zeolita por intercambio iónico. La capacidad biocida de estas zeolitas se puso a prueba con colonias de microorganismos, concretamente con las especies *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. En los tres casos las zeolitas demostraron tener capacidad biocida reduciendo el crecimiento de las colonias o

incluso matándolas por completo en función de la concentración de plata que se fuera liberando en el tiempo (Kwakye-Awuah, 2007).

Tras realizar una revisión bibliográfica, se puede deducir que las especies de plata soportadas sobre zeolitas son excelentes materiales biocidas frente a una gran cantidad de microorganismos. En todos estos estudios, el medio de cultivo empleado fue in vitro. Dada la gran variedad de estructuras, la diversidad de cantidad de plata incorporada, así como el resto de variables que pueden modificar la capacidad de estos materiales, es importante la elección y realización de este tipo de estudios in vitro para obtener de forma rápida y fiable resultados.

#### 1.4. Técnicas de caracterización

La capacidad biocida de estos materiales debe ser evaluada para poder estudiar los posibles efectos que las diferentes propiedades, tanto del agente biocida elegido como del soporte utilizado, tienen sobre la misma.

En la literatura se recogen diferentes técnicas de caracterización de la capacidad biocida de materiales sólidos y líquidos. A continuación, se muestran las técnicas de caracterización de agentes biocidas más comunes empleadas en los estudios:

##### 1.4.1. Macrodilución en caldo:

Se trata de una técnica para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC), que describe la cantidad mínima de biocida necesario para impedir el crecimiento de una colonia de microorganismos (IDEX, 2018).

Esta técnica parte de un tubo de ensayo en el que se ha hecho crecer un cultivo de microorganismos en suspensión. Se coloca 1 mL de este tubo de ensayo en varios tubos de ensayo en los que se encuentra 1 mL de caldo con el agente antimicrobiano a distintas concentraciones. Además, se deja un tubo de ensayo sin agente antimicrobiano como control. Estos tubos de ensayo se incuban a 37°C durante 24 horas (Figura 3).

Pasado el tiempo, se añade 0,1 mL de estos últimos en placas con agar y se vuelven a incubar durante 24 horas. Por último, se realiza un conteo de las colonias formadas y se obtiene la MIC por comparación con la muestra de control.

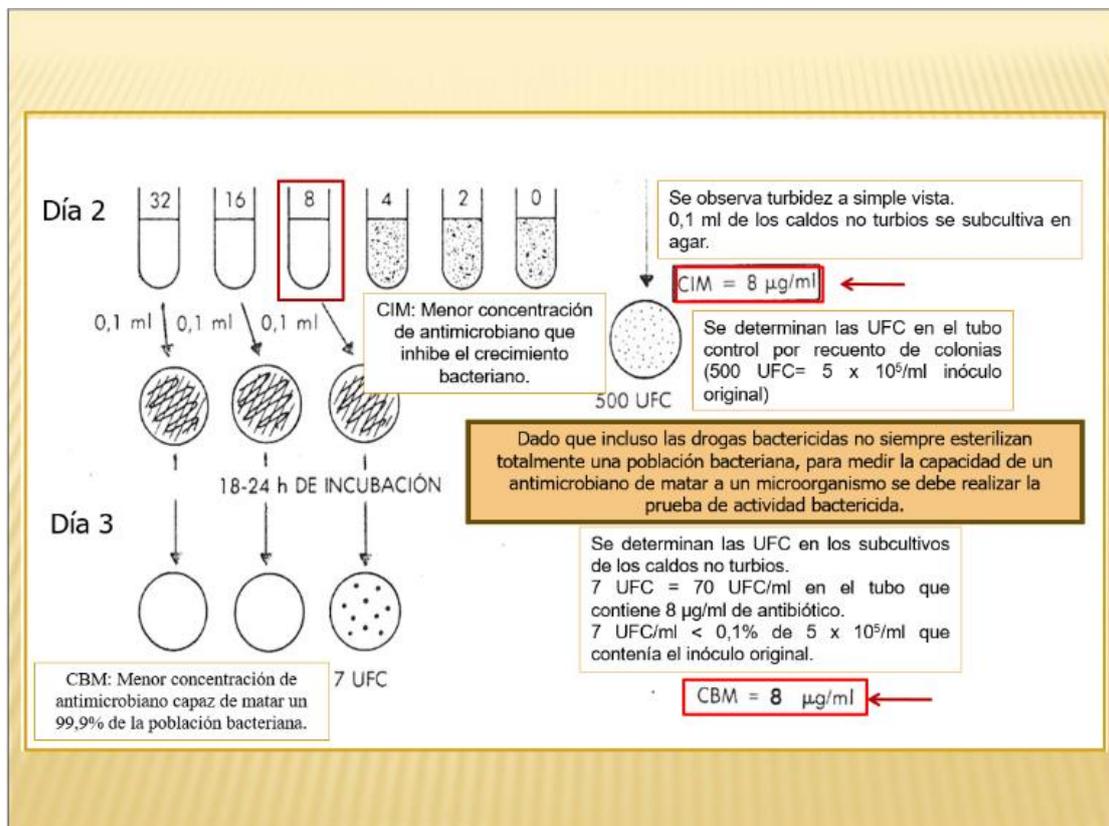
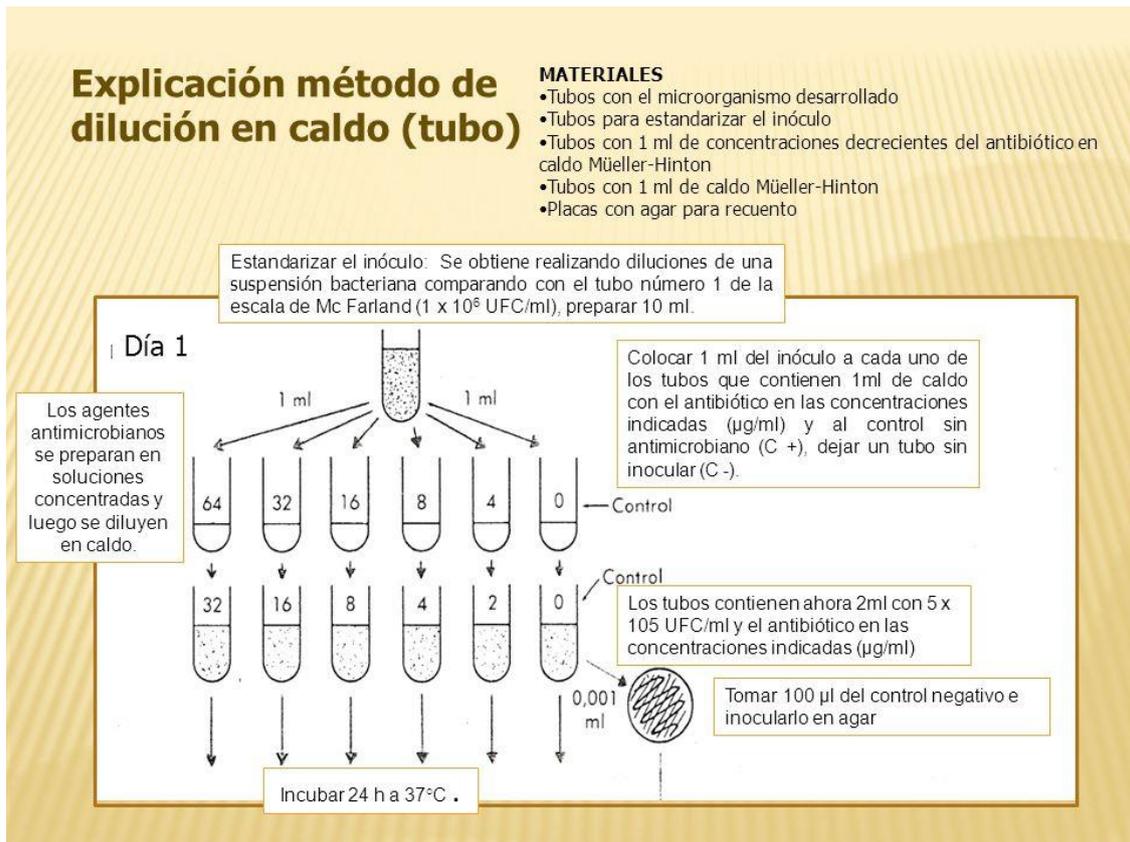


Figura 3. Método de macrodilución en caldo (Cecilia, 2014)

#### 1.4.2. Método del epsilómetro (E-test):

Esta técnica consiste en una tira plástica estéril, diferenciada por dos partes: En su parte inferior, se encuentra el agente antimicrobiano con una gradiente exponencial continua que cubre las concentraciones adecuadas para realizar 20 diluciones dobles seriadas. En su parte superior, posee una escala de lectura.

Para utilizar esta técnica, simplemente se ha de colocar la tira sobre una placa con agar y la siembra de microorganismos a estudiar y una vez pase el tiempo de incubación requerido se observará una elipse de inhibición, la cual marcará el valor de la concentración mínima inhibitoria en la escala de la parte superior de la propia tira (Figura 4).



Figura 4. Método del epsilómetro (Murugesan, 2015)

#### 1.4.4. Método de difusión en Agar (Kirby-Bauer):

Consiste en el uso de discos de papel a los que se le impregnan con cierta cantidad de antibióticos que se aplican directamente sobre una placa con agar y una siembra de microorganismos a estudiar y dejar incubar a 37°C durante 24 horas. Por último, mediante tablas proporcionadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) se podrán interpretar el tamaño de los diámetros (Cecilia, 2014).

Este método es el más común en los laboratorios de diagnóstico clínico, dada su simplicidad y cantidad de información obtenida por análisis realizado. Sin embargo, se suele utilizar para agentes biocidas en estado líquido.

En la figura 5, se puede observar el resultado final de este método.



Figura 5. Método de Kirby-Bauer (Sulaiman, 2012)

#### 1.4.3. Ensayos *in vivo* con material polimérico:

En esta técnica se incorpora el biocida a un material polimérico. Esta técnica se puede realizar de diferentes formas y distintos materiales, pero lo más común es utilizar gránulos de polipropileno. En un estudio, incorporaron biocida al polipropileno. Esto lo hicieron mediante mezclado con una maquinaria que mezcló el polipropileno con un 0,5% y otra muestra con un 1% de biocida durante 4 minutos a 35 rpm. Seguidamente, se añadió a una maquina específica que le aumentaba la temperatura con el fin de descomprimir y desgasificar la muestra para seguidamente entrar en una extrusora de espagueti que le daría a la muestra la forma de espagueti para acabar en un granulador que le dará su forma final granulada. En la figura 6, se puede observar un esquema de la maquinaria utilizada en cuestión, en la primera zona de la figura se producirán los cambios de temperatura y le darán la forma de espagueti al material, para en la segunda zona de la figura se le dará su forma final granulada.

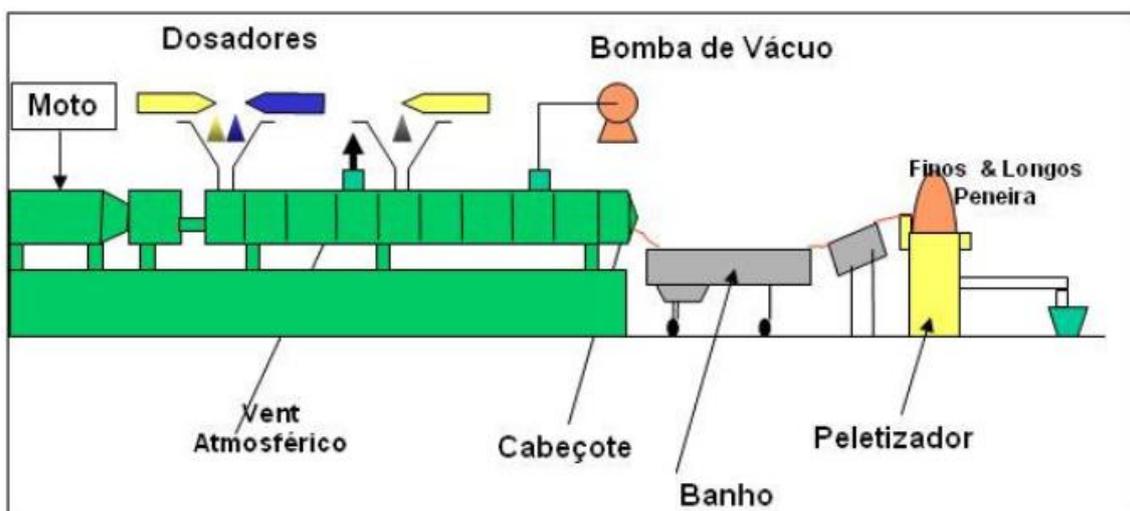
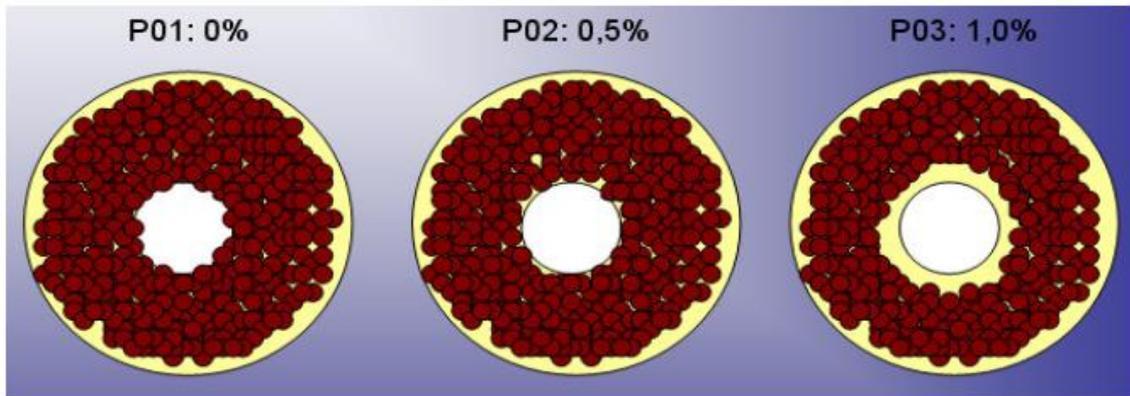


Figura 6. Extrusora de espagueti + Granulador (William, 2009)

Seguidamente, se prensa la muestra con el fin de darle una forma circular. Una vez el material está listo para ser utilizado, se añade en una placa Petri con medio de cultivo y los microorganismos a estudiar y se deja durante una semana a una temperatura de 20°C. Pasado el tiempo se obtienen los resultados descritos en la figura 7 (William, 2009).



*Figura 7. Resultado material polimérico (William, 2009)*

Debido a las características del material biocida a emplear (diferentes tipos de sólidos), el método in vitro habitualmente empleado es el de diluciones en caldo, en el que se observa el efecto de suspensiones de diferente concentración de sólidos sobre el crecimiento microbiano. Sin embargo, dicho procedimiento resulta complejo y, sobre todo, costoso. El ensayo in vivo con material real, aunque puede aportar una información mucho más próxima a la realidad, también requiere de maquinaria para adaptar el biocida al material polimérico, con lo que el procedimiento también se complica y encarece. Estos dos métodos pueden ser adecuados para casos especiales o como métodos de referencia para estudios que requieran de valores exactos.

Sin embargo, el método de Kirby-Bauer, permite obtener resultados más cualitativos, pero simplificando en gran medida el apartado experimental, aunque está más orientado a ensayar compuestos líquidos que difundan fácilmente en la placa de cultivo.

Con todo esto, el desarrollo y puesta a punto de un método con la base del método de Kirby-Bauer pero aplicado a materiales sólidos permitiría llevar a cabo, de forma simple y rápida, una primera clasificación de los diferentes materiales biocidas a clasificar. Posteriormente, sobre los materiales más prometedores, se podrían realizar ensayos de carácter más cuantitativos, pero también más costosos, para poder elegir, finalmente, el material o conjunto de materiales, más adecuados.

## 2. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es el intentar poner a punto una técnica de caracterización cualitativa de la capacidad biocida de materiales sólidos, mediante una técnica de caracterización simple y rápida, en contraposición con las técnicas existentes y más habitualmente empleadas en la literatura, más complejas y laboriosas.

La idea principal es la de disponer de una metodología válida para poder llevar a cabo, de una manera rápida y económica, una selección inicial de los materiales preparados más prometedores respecto de un conjunto posibles, para así, en una segunda prueba, poder determinar de forma cuantitativa, a través de los métodos convencionales de caracterización, la capacidad biocida de los materiales finales seleccionados y determinar el mejor del conjunto inicial.

En este trabajo se pretende estudiar materiales zeolíticos intercambiados con plata como agentes antimicrobianos frente a la bacteria *E. coli*, empleando un método de caracterización adaptado para poder obtener una clasificación inicial en cuanto a su capacidad biocida.

Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Aislar y desarrollar un cultivo de *E. coli*.
- Obtener las condiciones óptimas de siembra en placa.
- Analizar y seleccionar el tipo de siembra más adecuado para la consecución del objetivo.
- Analizar y comparar el resultado obtenido de diferentes materiales biocidas mediante esta metodología con datos obtenidos en estudios convencionales cuantitativos.

### 3. Material y métodos.

En el siguiente trabajo se han empleado un conjunto de materiales para poderlo llevar a cabo que a continuación serán descritos. Todas las diluciones que se han llevado a cabo de la especie activa se han realizado empleando agua Milli-Q de alta pureza.

#### 3.1. Soporte zeolítico empleado

Para este trabajo se ha utilizado como soporte inorgánico una zeolita comercial de tipo Faujasita (FAU) y relación Si/Al 2,4 (zeolita Y) en su forma sódica, de la casa comercial Zeolyst (CBV100).

Su estructura (figura 8) consiste en cajas de sodalita, con una forma isométrica y una geometría octaédrica y simétrica, conectadas de manera cúbica sobre anillos dobles de seis miembros, generando una supercavidad de 16,3 Å y presentando un tamaño de poro de 7,4 Å (IZA, 2005), lo que se considera un tamaño de poros razonablemente grande comparado a otras zeolitas. Su color es entre blanco y gris con un tono entre transparente y translucido. En las cajas de sodalita se encuentran, aproximadamente, el 50% de las moléculas de H<sub>2</sub>O y el 50% de los cationes, encontrándose los restantes en las cavidades que unen las cajas. Este mineral es usado principalmente como catalizador en los craqueos catalíticos (Lutz, 2014), debido a que permite craquear moléculas de gran tamaño (poros grandes) para obtener otras más pequeñas y con mayor valor económico.

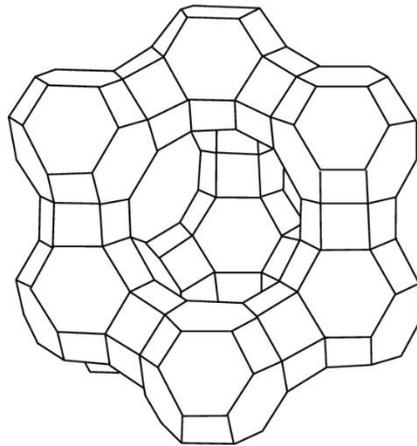


Figura 8. Zeolita Faujasita (Lutz, 2014)

### 3.2. Material biológico

Para la realización de este estudio se han empleado los siguientes medios de cultivo, así como organismos biológicos:

- *Escherichia coli* (*E. coli*)
- Agua peptonada tamponada como medio de cultivo (BPW). Preparación mediante la suspensión de 16,1 g del producto en 1,0 litro de agua destilada. Se mezcla bien y se disuelve calentando en agitación. Hervir la mezcla por un minuto hasta su completa disolución. Disponer en los recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Composición en g/L: 7,20 de hidrógenofosfato disódico dihidratado, 4,30 de cloruro sódico, 3,60 de dihidrógenofosfato potásico y 1,00 de digerido pancreático de caseína.
- Agar para coliformes como medio de cultivo enriquecido. Este medio gelifica a temperatura ambiente tras haber sido llevado a ebullición. Preparación mediante la disolución de 26,5 gramos en 1,0 litro de agua desmineralizada en baño de agua hirviendo bajo agitación por balanceo regular hasta que el medio de cultivo se haya disuelto completamente. No tratar en autoclave ni sobrecalentar. Enfriar el medio a temperatura 45-50 °C y verter en placas. Está compuesto por (g/L): 3,0 de peptona, 5,0 de cloruro sódico, 2,2 de dihidrógenofosfato sódico, 2,70 de hidrogenofosfato disódico, 1,0 de triptófano, 1,0 de piruvato sódico, 0,15 de Tergitol™ 7, 1,0 de sorbitol, 0,4 de mezcla cromógena y 10,0 de agar-agar.
- Agar nutritivo en placa Petri como medio de cultivo. Al igual que el anterior, este medio gelifica a temperatura ambiente tras haber sido llevado a ebullición. Preparación mediante la suspensión de 17,5 gramos de producto en 1 litro de agua destilada. Disolver calentando hasta ebullición agitando. Mezclar y distribuir en los recipientes finales. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Está compuesto por (g/L): 5,0 de triptona, 2,5 de extracto de levadura, 9,0 de agar y 1,0 de dextrosa.

### 3.3. Incorporación de plata en el soporte. Intercambio iónico.

Existen diferentes procedimientos para la incorporación de la fase activa en el interior del soporte (impregnación húmeda, a volumen de poro, intercambio iónico, etc.). Sin embargo, en este trabajo dicha incorporación ha sido realizada mediante intercambio iónico.

El objetivo de esta técnica es la de transferir iones a partir de una fase fluida concentrada a una fase sólida. Esto se logra mediante un intercambio o desplazamiento que provocan los iones de la misma carga unidos por fuerzas electrostáticas. En 1858, Eichhorne fue el primero que evidenció la capacidad de las zeolitas de intercambiar sus constituyentes catiónicos (Rodríguez-Fuentes, 1997).

El comportamiento como intercambiadores iónicos de las propias zeolitas, depende de varios factores que determinan la selectividad hacia determinados cationes: naturaleza de los cationes (tamaño, carga, forma, concentración, etc.), temperatura, concentración de los cationes en solución, estructura de la zeolita, etc. (Rodríguez-Fuentes, 1997).

El método de intercambio iónico se fundamenta en la preparación de una disolución acuosa de concentración conocida de la sal precursora del catión, en este caso plata, que se desea intercambiar. En dicha disolución se suspende el soporte a intercambiar. Uno de los parámetros a controlar en este tipo de procesos es la proporción entre la masa de disolución y la masa de sólido, que en el caso de este trabajo siempre se mantuvo en un valor de 100 ( $m_{\text{líquido}}/m_{\text{sólido}}$ ).

La disolución de intercambio se prepara a partir de la sal soluble de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) en agua Milli-Q. La concentración final de dicha disolución se calcula para alcanzar el grado de intercambio que se pretende conseguir. Durante este proceso, los iones de compensación que tiene la zeolita comercial,  $\text{Na}^+$ , son intercambiados por los iones  $\text{Ag}^+$  presentes en la disolución.

Preparada la disolución con la concentración requerida, se introduce el volumen de disolución calculado en un matraz de fondo redondo en el cual se ha introducido, previamente, la masa concreta de zeolita Y a intercambiar. Esta suspensión se deja en agitación, potencia media-alta, durante 16 horas a temperatura ambiente. Pasado dicho periodo de tiempo, se lava y filtra hasta ausencia de plata en las aguas de lavado, recuperando el sólido intercambiado y se deja secar en estufa a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante una noche (12 horas).

En este trabajo se han realizado varias disoluciones de nitrato de plata en agua destilada con el fin de alcanzar distintos grados de intercambio, siendo estos de 15%, 30%, 50%, 70% y 100%. Durante todo este proceso, es importante proteger la suspensión de plata de la luz (trabajo en oscuridad) ya que la  $\text{Ag}^+$  es inestable frente a la luz, lo que haría que ennegreciera y perdiera parte de sus propiedades.

Los materiales así obtenidos ya están listos, con sus distintos grados de intercambio, para ser ensayados como materiales biocidas. Por el mismo motivo que se ha indicado en el párrafo anterior, estos materiales se guardaran en frascos tapados protegidos de la luz, además de recubrir el recipiente con papel de aluminio.

### 3.4. Procedimiento experimental.

#### 3.4.1. Aislamiento y crecimiento de la población de *E. coli*

El primer paso es poder aislar la bacteria en cuestión para poder, posteriormente reproducirla. Durante todo el trabajo se tomaron las medidas de seguridad necesarias para el trabajo con microorganismos. Para aislar la bacteria en cuestión, se utiliza un agar cromógeno como medio de cultivo, indicado para el crecimiento de este tipo de bacterias y su diferenciación (figura 9). Siguiendo las instrucciones de uso del agar, se pesan 26,5 gramos del agar cromógeno y se añaden a un litro de agua desionizada, la cual se llevará a ebullición en un erlenmeyer calentándose en una placa calefactora con agitación, como se puede observar en la figura 10. Añadir también que es recomendable añadir el agar en medio litro de agua Milli-Q y luego añadir el resto de agua repasando las paredes del Erlenmeyer, así no quedarán restos de agar en las paredes del Erlenmeyer.

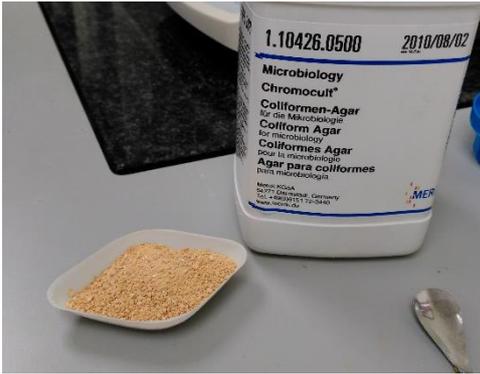


Figura 9. Agar para coliformes



Figura 10. Disolución del producto

Una vez acabada la ebullición y disuelto el producto, se reparte el mismo directamente en las placas de Petri. Se añade a cada placa una cantidad aproximada de 50 mililitros (figura 11). Una vez tenemos el agar dentro de las placas, se dejan enfriar en una nevera con el fin de que solidifique. Estos medios de cultivo permitirán el crecimiento de las bacterias y, por las características de los componentes que las conforman, permitirán diferenciar de entre las bacterias coliformes, las bacterias *E. coli*, objetivo de este trabajo.

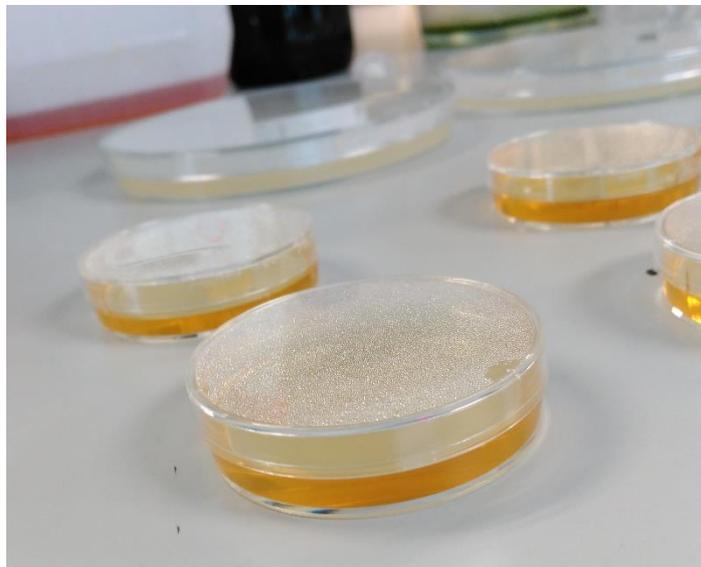


Figura 11. Placas de Petri preparadas

Una vez realizado el medio de cultivo para el crecimiento y selección del tipo de bacteria buscada, se debe hacer crecer en el mismo las colonias bacterianas, entre ellas las de *E. coli*. Para ello, el procedimiento seguido ha sido filtrar un agua que posea, entre otras, este tipo de bacterias. En el caso de este trabajo se ha utilizado agua de la acequia que hay junto a la EPSG en Gandía.

El procedimiento seguido ha sido filtrar a vacío un volumen de 100 mL de dicha agua a través de un filtro estéril (figura 12). Dependiendo de la concentración esperada de bacterias en este tipo de medio, se han llevado a cabo diferentes diluciones (factor de 10) de la muestra original, con el fin de poder diferenciar claramente los distintos tipos de colonias que pudiesen existir y, así, poder aislar las de interés. Los filtros obtenidos tras la filtración se colocan en las placas de Petri con el medio de cultivo preparado anteriormente y se llevan a incubación a la temperatura de 37 °C. Pasadas 24 horas se podrán observar las colonias que hayan crecido a partir de una bacteria como puntos, en el papel de filtro, de colores rosa y azul-violeta. Los puntos de color rosa son las bacterias coliformes sin tener en cuenta a las *E. coli*, mientras que los de color azul-violeta son colonias de *E. coli*. Esto es debido a que las bacterias coliformes (incluida la *E. coli*) presentan una enzima llamada  $\beta$ -D-Galactosidasa, la unión de esta encima y el sustrato que se encuentra en el medio de cultivo es el que causa este color rosa en las colonias de coliformes. La razón de que las bacterias de tipo *E. coli* no tengan este color es que, además, tienen otra enzima característica llamada  $\beta$ -D-Glucuronidasa, que es la que causa que sus colonias sean de color azul.



Figura 12. Equipo de filtración

Para finalizar, una vez aisladas las colonias de bacterias *E. coli* faltaría desarrollar el cultivo de este tipo de microorganismos de forma aislada. Para ello, se rasca una de las colonias de *E. coli* identificadas en la etapa previa con un asa de siembra y se hace crecer en un medio líquido (agua peptonada tamponada), añadiendo la colonia de *E. coli* rascada en un erlenmeyer con esta preparación, con el fin de que el cultivo tenga sustrato para poder reproducirse. Este Erlenmeyer se tapa con algodón y papel de plata para evitar la posible contaminación y se pone en la incubadora a una temperatura de 37 °C. Para comprobar cómo ha sido el aislamiento de esta bacteria, pasadas 24 horas, se volvería a filtrar un volumen de 100 mL de la disolución de crecimiento, con la dilución adecuada, a través de un nuevo filtro estéril. Este filtro se volvería a

colocar sobre una placa de Petri como en el caso anterior y se volvería a incubar para ver qué tipo de colonias estarían presentes en dicho medio de crecimiento de *E. coli*. Si las colonias que crecen son todas de color azul-violeta, se puede indicar que el medio de crecimiento está formado, fundamentalmente, por bacterias tipo *E. coli*, mientras que, si se detectaran colonias de color rosa, se debería volver a rascar colonias de color azul y volver a realizar la siembra. Este proceso se repetiría hasta conseguir que el medio de crecimiento fuese, fundamentalmente, de bacterias *E. coli*.

Esta disolución de crecimiento debe renovarse en un plazo de 48-72 horas. Para ello se seguiría el procedimiento anteriormente descrito de filtración, rascado de colonia azul y siembra en medio de cultivo nuevo. El objetivo de la renovación es tener una población de bacterias en etapa de crecimiento y evitar la muerte y el envejecimiento del cultivo. Este procedimiento se realizará hasta el final del estudio con el fin de mantener con vida el cultivo de microorganismos el tiempo que sea necesario para realizar todas las pruebas contempladas en el trabajo.

#### 3.4.2. Determinación del volumen correcto de siembra en placa

Tal y como se verá en este documento, para alcanzar el objetivo perseguido se requiere de un crecimiento de las bacterias en toda la placa de Petri de forma uniforme, que el crecimiento de las bacterias forme una fina película blanquecina sobre la placa. Para alcanzar este objetivo, será necesario determinar el volumen del medio de crecimiento a adicionar sobre estas placas para que se dé esa fina película.

Para su determinación, se realizan una serie de pruebas, previas a la realización de cualquier prueba posterior, en las que se añaden diferentes volúmenes de este medio sobre placas de 150 mm de diámetro. Los volúmenes ensayados son de 0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL y 2 mL del cultivo de microorganismos en medio líquido disponible en dicho momento. Este volumen es esparcido por todo el medio de cultivo haciendo uso de una espátula drigalsky. Estas pruebas se realizan por duplicado. Por último, se incuban las placas en una estufa a 37°C durante 24 horas.

#### 3.4.3. Preparación de las suspensiones del material biocida en agua

Es necesario, para alcanzar los objetivos perseguidos en este trabajo, realizar suspensiones en agua del material sólido biocida a ensayar con diferente concentración. Estas diluciones permitirán discernir entre dos muestras diferentes, siendo que aquellas que requieran menor concentración en la suspensión de biocida presentarán una mayor capacidad inhibitoria.

A lo largo del trabajo se han realizado diferentes pruebas con diferentes rangos de concentración de sólido. Las concentraciones ensayadas se encuentran en el intervalo de 0,001-5,0% en peso de sólido en el líquido.

Los tres rangos típicos estudiados a lo largo de las diferentes pruebas llevadas a cabo son:

- 5% - 2,5% - 1% - 0,5% - 0,2% - 0,1%
- 1% - 0,5% - 0,2% - 0,1% - 0,01% - 0,005%
- 0,5% - 0,2% - 0,1% - 0,01% - 0,005% - 0,001%

Un detalle importante a la hora de trabajar con compuestos de plata es que es fotosensible, por lo que el contacto con la luz hace que se oscurezca y pierda parte de sus propiedades, por lo que a la hora de trabajar con estos materiales es recomendable que se protejan de la luz directa y cuando no estén en uso, se guarden en un lugar sin luz, en recipiente opaco, si es posible, y recubierto de papel de aluminio.

En el caso de este trabajo, que se utilizan tubos de ensayo transparentes, se enrollan con papel de aluminio con el fin de que entre la mínima luz posible (figura 13).



Figura 13. Diluciones preparadas para la realización de un experimento

Para realizar las diluciones de cada uno de los tres rangos indicados, se ha seguido el siguiente procedimiento:

- Para el primer rango realizado, cuya dilución máxima tiene una concentración de 5%, se pesan 0,100 gramos de sólido y se añaden 2,0 mL de agua Milli-Q. Para realizar la dilución siguiente de 2,5%, se añade 1,0 mL de la dilución anterior y 1,0 mL de agua. Para realizar la dilución de 1%, se añaden 0,5 mL de la dilución de 5% y 2,0 mL de agua. Para realizar la dilución de 0,5%, se añade 1,0 mL de la dilución anterior y 1,0 mL de agua. Para realizar la dilución de 0,2% se añade 1,0 mL de la dilución de 0,5% y 1,5 mL de agua. Para la última dilución, la de 0,1%, se utilizan 0,5 mL de la dilución de 0,5% y 2,0 mL de agua. En la figura 14 se puede observar este proceso de una manera más esquemática.
- Para el segundo rango realizado, las diluciones se realizan a partir de una dilución máxima del 1%, que se prepara pesando 0,100 gramos de sólido y añadiendo 10,0 mL de agua Milli-Q. Para realizar la concentración de 0,5%, se utilizaron 5,0 mL de la muestra anterior y 5,0 mL de agua. Para realizar las siguientes diluciones se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en la primera prueba, teniendo en cuenta las

concentraciones que se requieren. En la figura 15 se puede observar de una manera visual y más simple el proceso utilizado, así como los volúmenes empleados.

- Para el tercer rango realizado, cuya dilución máxima tiene una concentración de 0,5%, se pesan 0,050 gramos de sólido y se añaden 10,0 mL agua Milli-Q. A partir de esta dilución de 0,5%, se realizan las diluciones de 0,2% y 0,1% añadiendo 2,0 mL de la dilución de 0,5% y 3,0 mL de agua para obtener la concentración de 0,2% y añadiendo 1,0 mL de la dilución de 0,5% y 4,0 mL de agua para obtener la concentración de 0,1%. Al igual que anteriormente, el resto de diluciones se llevan a cabo de forma similar, teniendo en cuenta las concentraciones objetivo. En la figura 16 se puede observar este proceso de una manera más simple.

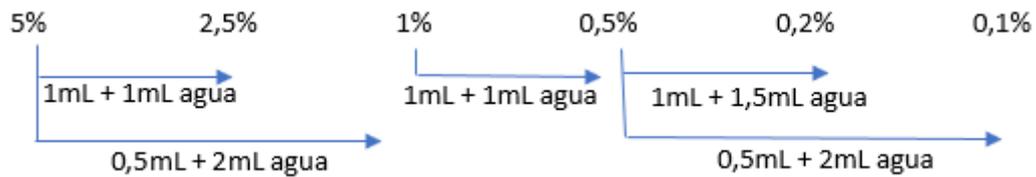


Figura 14. Primer rango de concentración

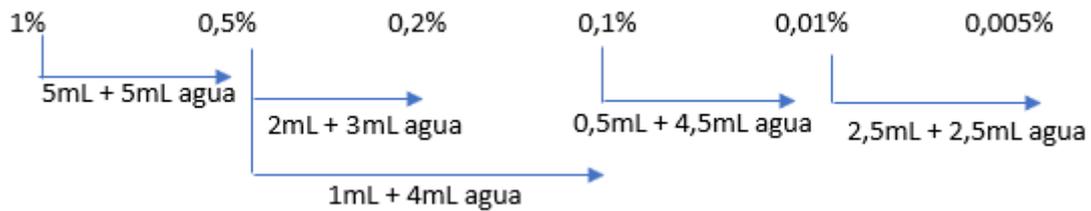


Figura 15. Segundo rango de concentración

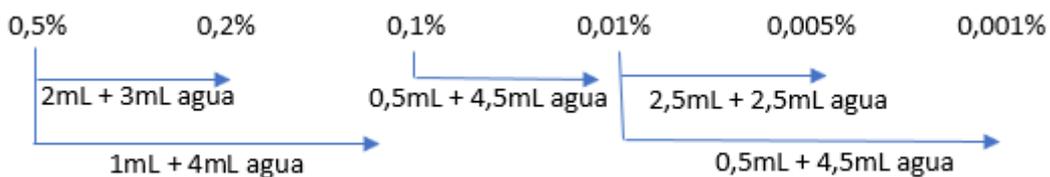


Figura 16. Tercer rango de concentración

El rango de concentraciones habitualmente empleado a lo largo de este trabajo ha sido el segundo, que abarca concentraciones en el intervalo de 0,005-1,0%.

Uno de los mayores inconvenientes de este proceso se basa en que se tienen que preparar suspensiones homogéneas de un sólido en un líquido. El método de dilución propuesto conlleva que a partir de una dilución previa se preparan las siguientes. El problema que puede ocasionar no tener una suspensión homogénea es relevante y hay que tenerlo muy presente.

Por lo tanto, es importante agitar bien las diferentes diluciones antes de emplearlas, con el fin de que sea lo más homogénea posible y disminuir los errores experimentales. Para mejorar la agitación, se hace uso de un agitador de vórtice (figura 17), en el que antes de trabajar con cualquier dilución obtenida, ya sea para hacer una nueva dilución o para realizar un experimento de inhibición, se debe agitar perfectamente el contenido de dicho tubo de ensayo y ser lo más rápido posible en la toma de la muestra. También añadir que se ha tenido en cuenta el volumen total necesario, para optimizar la cantidad de sólido empleada; el hecho de que haya distintos volúmenes en cada tubo de ensayo no influye, ya que para cada prueba de inhibición solo se necesitan 20 $\mu$ L de disolución (40 $\mu$ L al hacerlo por duplicado).



*Figura 17. Agitador de vórtice empleado*

#### 3.4.4. Optimización de la incorporación del agente bactericida en la placa

La suspensión del material biocida obtenida debe ponerse en contacto con el cultivo de bacterias para poder observar su capacidad de inhibición. El procedimiento elegido, para llevar a cabo la puesta a punto de este método de trabajo para compuestos sólidos, se basa en una adaptación del método de difusión previamente descrito.

El método de difusión se fundamenta en la deposición sobre la placa sembrada de filtros de papel de diámetro pequeño sobre los cuales se deja caer un volumen determinado del agente inhibitorio líquido que se desea estudiar. Por un efecto de difusión de este compuesto en el medio de cultivo, se observa la generación de un halo alrededor del filtro, mayor cuanto más capacidad biocida tiene ese agente, en el que se produce la inhibición del crecimiento bacteriano.

Sin embargo, en el presente trabajo se empleará como agente biocida un compuesto sólido, soporte, el cual tiene el componente activo en su interior. Este hecho puede modificar el comportamiento durante este tipo de pruebas y que los resultados obtenidos no se desarrollen de igual medida que cuando se emplea un agente líquido. Debido a este motivo, se plantea el estudio y optimización de la introducción de este agente en la placa sembrada, para poder observar el halo de inhibición de la mejor forma posible. Para ello, se plantearon tres posibles formas de introducir dicho compuesto.

En la primera prueba, la idea era seguir el procedimiento general, tal y como se lleva a cabo con compuestos líquidos; se deja caer un volumen de 20µL directamente sobre el filtro que ha sido depositado antes en la placa sembrada con *E. coli*.

En la segunda prueba, y dado que el producto activo es un sólido, para poner en contacto más íntimo dicho producto con el medio de cultivo en la placa, se depositó un volumen de 20µL de la suspensión sobre una cara del filtro. Posteriormente, esta cara es la que se pone en contacto directo con el medio de cultivo de la placa, dándole la vuelta al filtro.

Por último, en la tercera prueba, se deja caer un volumen de 20µL directamente sobre el medio de cultivo, sin la presencia de papel de filtro.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado y se utiliza el soporte con un grado de intercambio del 100% en plata y con un rango de concentraciones de 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,01% y 0,005% en peso.

#### 3.4.5. Procedimiento experimental para la determinación de la capacidad biocida

La metodología seguida, para la realización de las pruebas de determinación cualitativa de la capacidad biocida de un compuesto sólido, tiene que tener en cuenta todos los aspectos anteriormente comentados. En este sentido, el procedimiento final seguido se puede resumir en los siguientes pasos:

- Un nuevo cultivo de *E. coli*, obtenido por aislamiento de una colonia bien identificada, es llevado a fase de crecimiento durante 24-48 horas (renovación del cultivo).
- Con este nuevo cultivo, se determina el volumen óptimo de siembra sobre placa, siguiendo el procedimiento descrito previamente, obteniendo resultados a las 24 horas.
- Se preparan las diferentes diluciones de los agentes biocidas objeto de estudio, en el rango de concentraciones definido (6 puntos habitualmente).
- Comprobado el volumen de siembra adecuado, se adiciona ese volumen a tantas placas de Petri como experimentos se deban llevar a cabo (realizar por duplicado para cada componente a estudiar). Dicho volumen de líquido debe ser incorporado por el medio de cultivo, para lo que se le deja un tiempo determinado.
- Sobre la placa sembrada, se adicionan 20µL de cada una de las diluciones preparadas a distinta concentración de cada compuesto a analizar (un compuesto por placa). El procedimiento de incorporación será el determinado tras la optimización. Se adiciona en el centro de la placa, a modo de comprobación, un volumen idéntico del agua empleada para realizar las diluciones. La placa así preparada se incuba en estufa a 37 °C durante 24 horas.

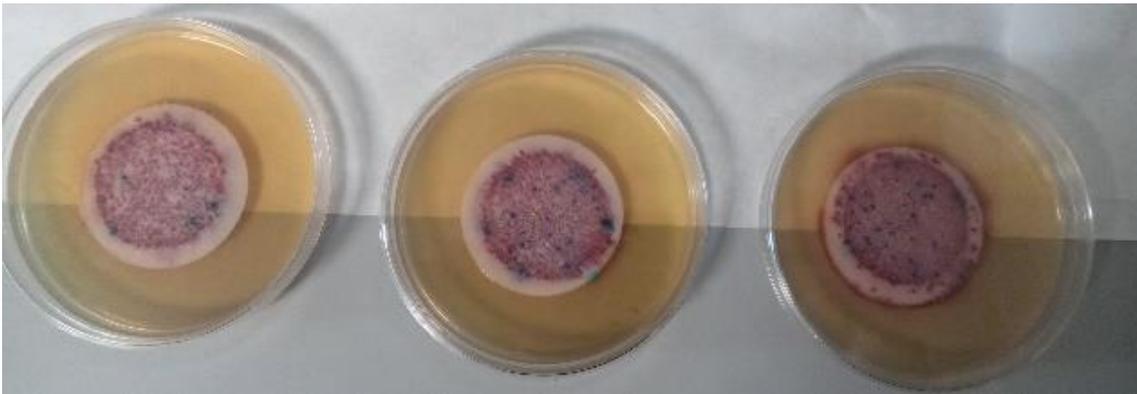
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aislamiento y crecimiento de la población de *Escherichia coli*

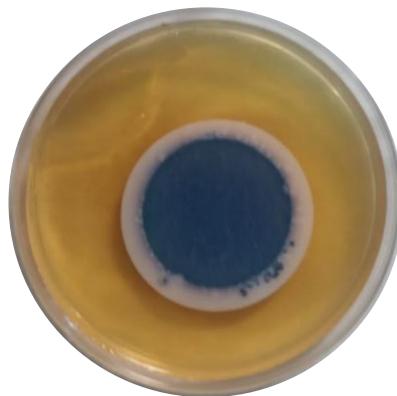
Tal y como se ha descrito anteriormente, para la obtención del cultivo de *E. coli*, se ha trabajado a partir de muestras de agua que circulaban por la acequia contigua a la Escuela Politécnica Superior de Gandia. También se han tomado las medidas de seguridad correspondientes, tal y como se ha comentado el procedimiento experimental.

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria Gram-Negativa, de la familia de las enterobacterias. Se trata de una bacteria anaerobia facultativa, es decir, no requieren de oxígeno para generar energía, aunque la presencia de este no les es tóxico. Esta bacteria se encuentra en el colon de los humanos, ya que coloniza el tracto gastrointestinal de los bebés con pocas horas de vida obteniendo, tanto la bacteria como el bebé, beneficios mutuos (Nataro, 1998).

Estas bacterias tienen una velocidad de crecimiento rápida y requieren de pocos nutrientes, por eso mismo es una bacteria muy utilizada en estudios de laboratorio, tal y como se puede observar en estudios nombrados anteriormente (Haggstrom, 2009) y (Kwaky-Awuah, 2007), que utilizaron cepas de *E. coli* para demostrar la capacidad biocida de distintos elementos.



A



B

Figura 18. Aislamiento y comprobación del crecimiento de *E. coli*. A) Colonias de distintos coliformes  
B) Colonias exclusivamente de *E. coli*

Tomada la muestra de agua de la acequia junto a la Escuela Politécnica Superior de Gandía, se siguió el procedimiento indicado en apartados anteriores para su aislamiento y posterior crecimiento.

A modo de ejemplo, en la anterior figura, Figura 18A, se pueden observar las muestras obtenidas durante la etapa de filtración para llevar a cabo la determinación del tipo de bacteria y su aislamiento. Como puede observarse, las colonias obtenidas de color azul muestran el crecimiento de bacterias de tipo *E. coli*, mientras que el resto (colonias rosadas) forman parte de las coliformes totales.

Adicionalmente, en la Figura 18B se muestra una prueba acerca del crecimiento obtenido de la bacteria *E. coli*, obtenida en la etapa previa, y que es utilizada como disolución de siembra para llevar a cabo los diferentes experimentos. Como puede observarse, todas las colonias obtenidas dan la coloración azul características de las bacterias *E. coli*.

#### 4.2. Determinación del volumen correcto de siembra en las placas

El fundamento del procedimiento experimental que se va a llevar a cabo se basa en el método de difusión, anteriormente descrito. Para ello, es necesario realizar una siembra lo más homogénea posible en la totalidad de la placa, con el objetivo que se produzca un crecimiento bacteriano simultáneo en la misma y la obtención de una fina capa de bacterias.

El tamaño normalmente empleado de placa de Petri empleado fue de 150 mm, por lo que, una vez preparada con el medio de cultivo previamente descrito, debía sembrarse con un volumen de siembra determinado. El medio de cultivo, el cual se iba regenerando de forma periódica, se resembraba un par de días antes de llevar a cabo la prueba, para favorecer el crecimiento de las bacterias y que estas se encontraran activas y en etapa de crecimiento.

Una vez obtenido el medio bacteriano, se estudiaron diferentes volúmenes de siembra sobre placa de Petri, 0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL y 2,0 mL, extendidos con el asa drigalsky. Las muestras, por duplicado, se incubaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Estas pruebas se llevaron a cabo siempre antes de realizar cualquier tipo de experimento para la determinación de la capacidad biocida, como comprobación del medio de cultivo y de obtención del crecimiento homogéneo de las bacterias en la placa.

En la Figura 19, se muestran algunos de los resultados obtenidos en esta primera fase, para los 4 volúmenes habitualmente ensayados.

Como puede apreciarse en dicha figura, el volumen que mejores resultados solía dar a lo largo de la realización de las diferentes pruebas que fueron llevadas a cabo y para este tamaño de placa de 150 mm fue el de 1 mL, obteniéndose una distribución del crecimiento bacteriano más uniforme a lo largo de toda la placa de Petri, Figura 19C.

Para volúmenes más pequeños, 0,25 mL y 0,5 mL, Figura 19A y B, las siembras que se solían obtener eran incompletas en toda la superficie de la placa, por lo que, posteriormente, el procedimiento planteado para determinar la capacidad biocida no podría haberse llevado a cabo de forma adecuada.

Para volúmenes mayores, 2 mL, Figura 19D, también se obtiene una buena cobertura, como es lógico, pero en algunos casos eran excesivas, provocando que se acumulara mayor crecimiento en determinadas zonas del medio de cultivo, provocando una menor uniformidad en el desarrollo de la película bacteriana.

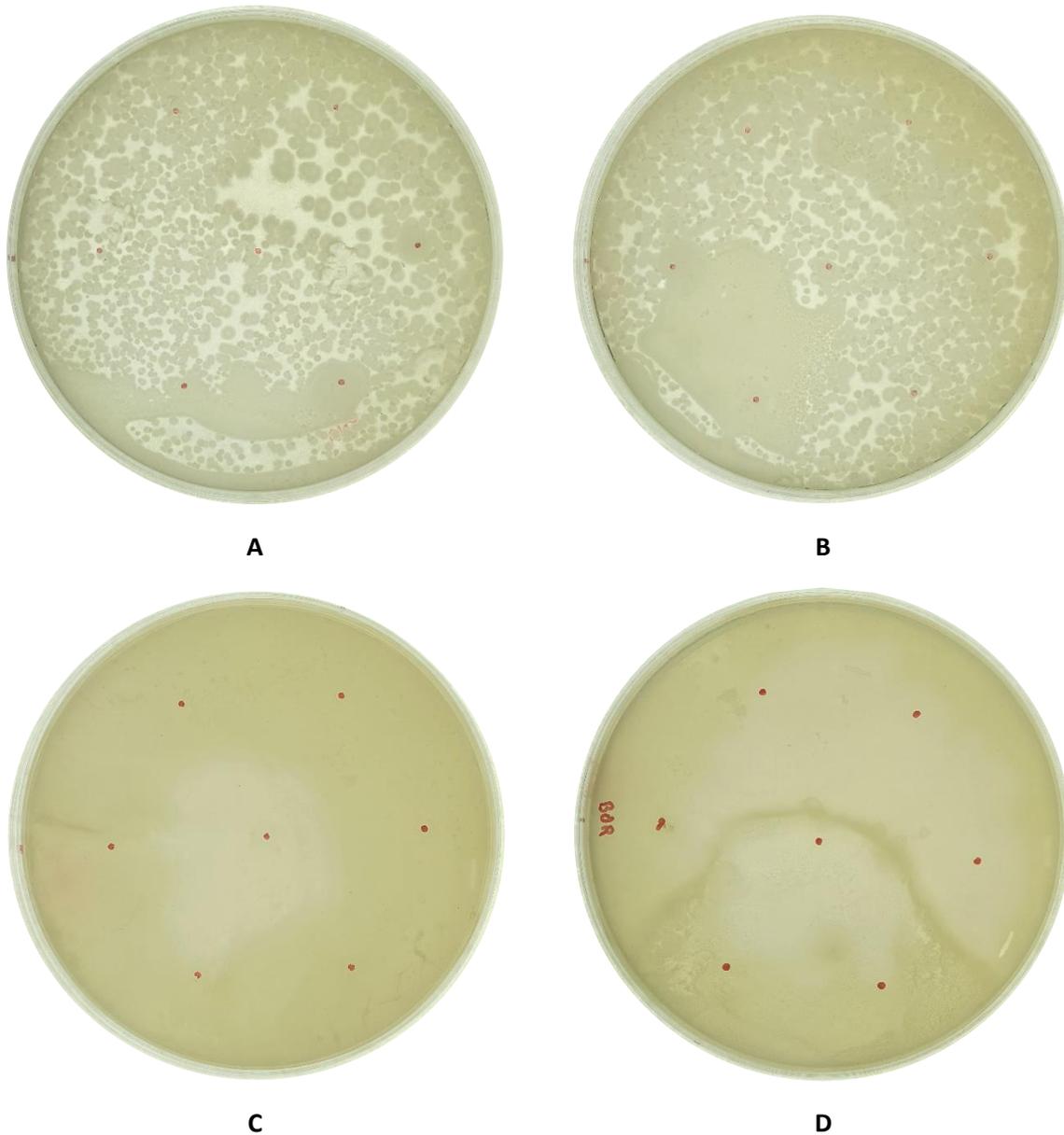


Figura 19. Ensayos de siembra sobre placa a diferentes volúmenes. A) 0,25 mL B) 0,5 mL C) 1,0 mL y D) 2,0 mL

Un efecto que también ha sido estudiado y está relacionado con el que se está tratando se basa en el volumen de suspensión biocida incorporada. Se pudo observar cómo el volumen de muestra correcto fue el de 20  $\mu\text{L}$ . Volúmenes mayores acompañado, también, de un mayor volumen de siembra, provocaban que la gota depositada no quedase suficientemente uniforme sobre la placa, dificultando la posterior discusión de los resultados observados. Este efecto puede observarse en la siguiente figura.



*Figura 20. Dispersión de la gota en el medio de cultivo*

#### 4.3. Optimización del procedimiento de incorporación del agente bactericida en la placa sembrada

Una vez determinadas las condiciones óptimas del volumen de siembra en placa, así como definido el volumen de suspensión biocida a emplear, se necesita definir la mejor forma de introducir el agente antimicrobiano en las placas.

El procedimiento habitual recogido en la literatura se basa en la deposición del agente bactericida en un disco de papel, el cual está depositado sobre la placa sembrada con el microorganismo que se pretende estudiar. Debido al efecto de difusión del propio agente bactericida, este va formando un halo de inhibición alrededor del disco de papel. Dicho halo será más grande cuanto mayor capacidad bactericida tenga la muestra.

Sin embargo, en el caso que nos ocupa, el agente bactericida viene presentado en un sólido, el cual puede ponerse en suspensión en agua. Sin embargo, el componente activo se encuentra en el interior de la zeolita, que deberá ser intercambiado y posteriormente difundir.

Debido a esa característica se realizaron una serie de pruebas para determinar la forma más adecuada de incorporar dicho agente para obtener resultados representativos y visibles. Se plantearon tres procedimientos, fundamentalmente, basados dos de ellos en el empleo de discos de papel y uno de aplicación directa de la suspensión de estudio sobre el medio de cultivo.

En la Figura 21 se muestran tres de los resultados que se obtuvieron durante esta fase del trabajo. En ella se puede observar los tres tipos de pruebas que fueron llevadas a cabo para la obtención del procedimiento óptimo: a) adición de la suspensión sobre el papel depositado sobre el medio sembrado, b) adición de la suspensión sobre el papel, al que se da la vuelta y se pone en contacto posteriormente con el medio de siembra y c) adición directa de la suspensión, en forma de gota, sobre el medio con la siembra realizada.

Todas estas pruebas fueron realizadas por duplicado para garantizar la reproducibilidad y la obtención de conclusiones. Como agente bactericida se utilizó la muestra de zeolita con un intercambio de plata al 100%. Se llevaron a cabo diferentes diluciones de la suspensión original para tener las siguientes concentraciones en peso de sólido en la suspensión: 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,01% y 0,005%. La disposición de las concentraciones, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, es la muestra más concentrada en la posición de la marca y se va disminuyendo de forma gradual la concentración en sentido antihorario.

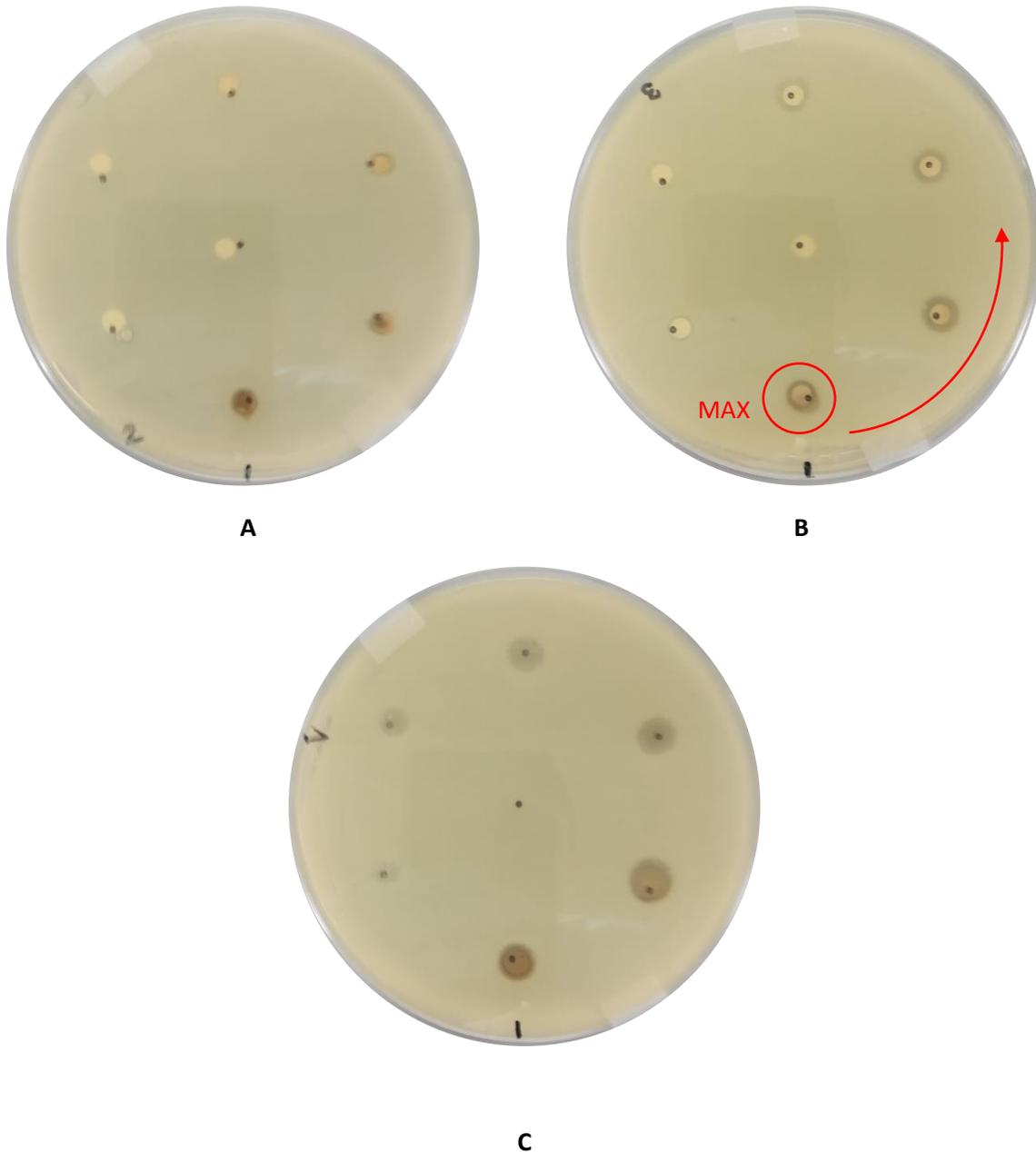


Figura 21. Procedimientos de incorporación de muestra sobre placa sembrada

A) incorporación sobre disco, previamente depositado este en placa sembrada

B) incorporación sobre disco y posterior deposición del disco en placa

C) incorporación en forma de gota directamente sobre la placa

Como se puede apreciar en la imagen anterior, el empleo del procedimiento habitual, Figura 21A, no conduce a resultados satisfactorios. La presencia del filtro dificulta la observación del halo de inhibición además de que no se observa como tal dicho halo en la mayoría de los puntos.

Una posible explicación a dicha observación se debe a que el material biocida que se está empleando se trata de un compuesto sólido y no líquido, por lo que el agua de la suspensión sería la que empaparía el filtro, pero el sólido se quedaría, principalmente, en la parte alta del

filtro sin entrar en contacto con el medio de siembra, por lo que los efectos biocidas serían muy limitados.

Esta hipótesis puede reforzarse si se observa el comportamiento obtenido en el segundo experimento realizado, Figura 21B. En esta, una vez adicionado la suspensión bactericida sobre el papel de filtro, se le da la vuelta y se pone en contacto directamente con el medio de siembra. La presencia del papel de filtro continúa dificultando la observación del halo de inhibición, pero puede observarse como en este caso sí que se observa un halo mayor que en el experimento anterior. Se supone que esto es debido al mayor contacto del agente bactericida con los microorganismos.

Finalmente, analizando los resultados mostrados en las pruebas previas, se decidió eliminar el papel de filtro y añadir la suspensión con el agente bactericida directamente sobre el medio de siembra en forma de gota, Figura 21C. Como puede observarse, en este caso se puede apreciar perfectamente la capacidad biocida de la muestra, sin el entorpecimiento por parte del filtro. También se puede observar cómo, conforme disminuye la concentración de la suspensión preparada, dicho halo empieza a difuminarse, lo que permitiría, además, tener un valor cualitativo sobre concentraciones efectivas de inhibición.

En todos estos ensayos se utilizó el punto central como punto de control, en el que se adicionaba 20  $\mu$ L de agua Milli-Q, para poder tener también el valor de un blanco. En todos los experimentos que se han llevado a cabo, el agua nunca ha presentado ningún tipo de efecto inhibitorio, como era de esperar.

En función de los resultados obtenidos, se decidió utilizar este último procedimiento, deposición directa sobre placa en forma de gota, como el más adecuado para llevar a cabo los experimentos de caracterización de la capacidad biocida de materiales sólidos.

#### 4.4. Estudio del posible efecto biocida del soporte sin fase activa

En todo momento, durante la redacción del presente documento, se ha asociado la capacidad biocida de los materiales a la presencia de plata en el interior del soporte. En ningún momento se ha planteado la posibilidad de que el propio soporte tenga algún tipo de efecto sobre la placa de siembra y ese efecto pueda dificultar la comprensión de los resultados que se obtengan.

Al igual que se ha indicado en el punto anterior, en el que se ha comprobado que el agua de dilución no tiene ningún tipo de efecto sobre la siembra, se ve necesario comprobar cuál es el efecto que el soporte, sin fase activa, puede tener sobre la misma.

En ese sentido se llevaron a cabo diferentes experimentos empleando únicamente zeolita original (CBV 720) sin intercambiarla con plata, para poder obtener conclusiones.

Al igual que en las pruebas anteriores, se estudiaron suspensiones de zeolita original con diferente concentración en peso de zeolita: 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,01% y 0,005%. Este hecho permitiría determinar si no solo el material, sino la concentración del mismo tiene efecto sobre el medio. En la siguiente figura se muestra un ensayo por duplicado de esta prueba.

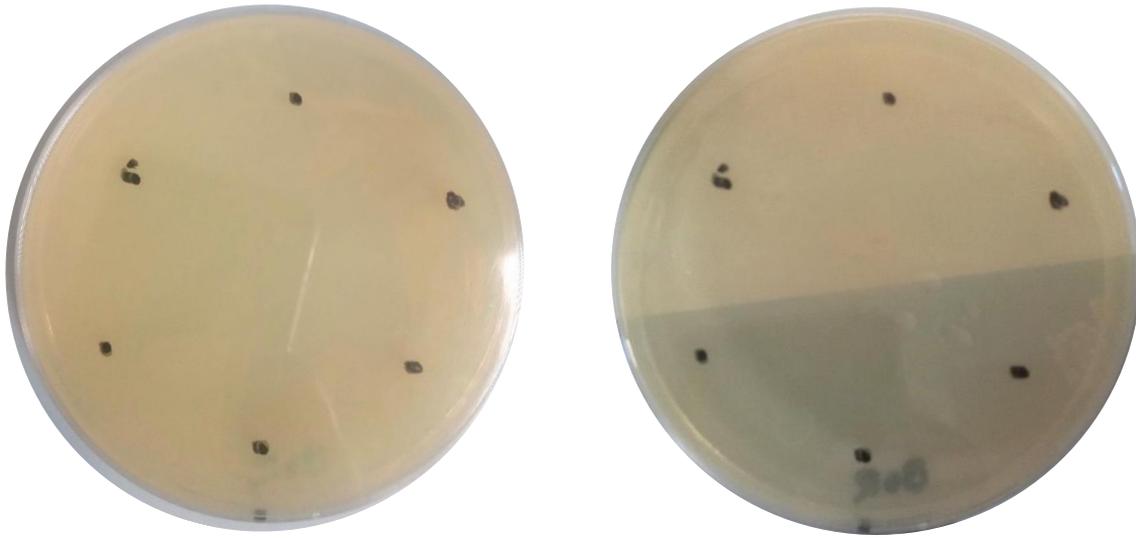


Figura 22. Ensayo de la capacidad biocida del soporte

Como puede observarse, no existe ningún tipo de efecto apreciable sobre el medio de siembra, incluso con la mayor de las concentraciones empleada del 1,0% en peso. Este resultado indica que la especie activa es únicamente la plata, y que el soporte no tiene ningún tipo de efecto por sí solo. El efecto que cabría esperar del mismo sería en cómo afectase a la liberación controlada de la especie activa sobre el medio, es decir, cómo el soporte permitirá el intercambio de

#### 4.5. Capacidad biocida de la plata

Llegados a este punto y habiendo optimizado el procedimiento seguido para la determinación cualitativa de la capacidad biocida de una muestra sólida, se realizará el estudio de dicha capacidad en función de la carga de especie activa, plata, que presenta el soporte.

El objetivo perseguido, tal y como se ha comentado en el consiguiente apartado, se basa en que, a través de este tipo de experimentos simples y con los resultados de los halos de inhibición que se establecen en función de cada concentración de suspensión de agente biocida, se pueda llegar a una clasificación inicial cualitativa que permita descartar, de forma sencilla y rápida, las muestras con menor capacidad, seleccionando aquellas más prometedoras.

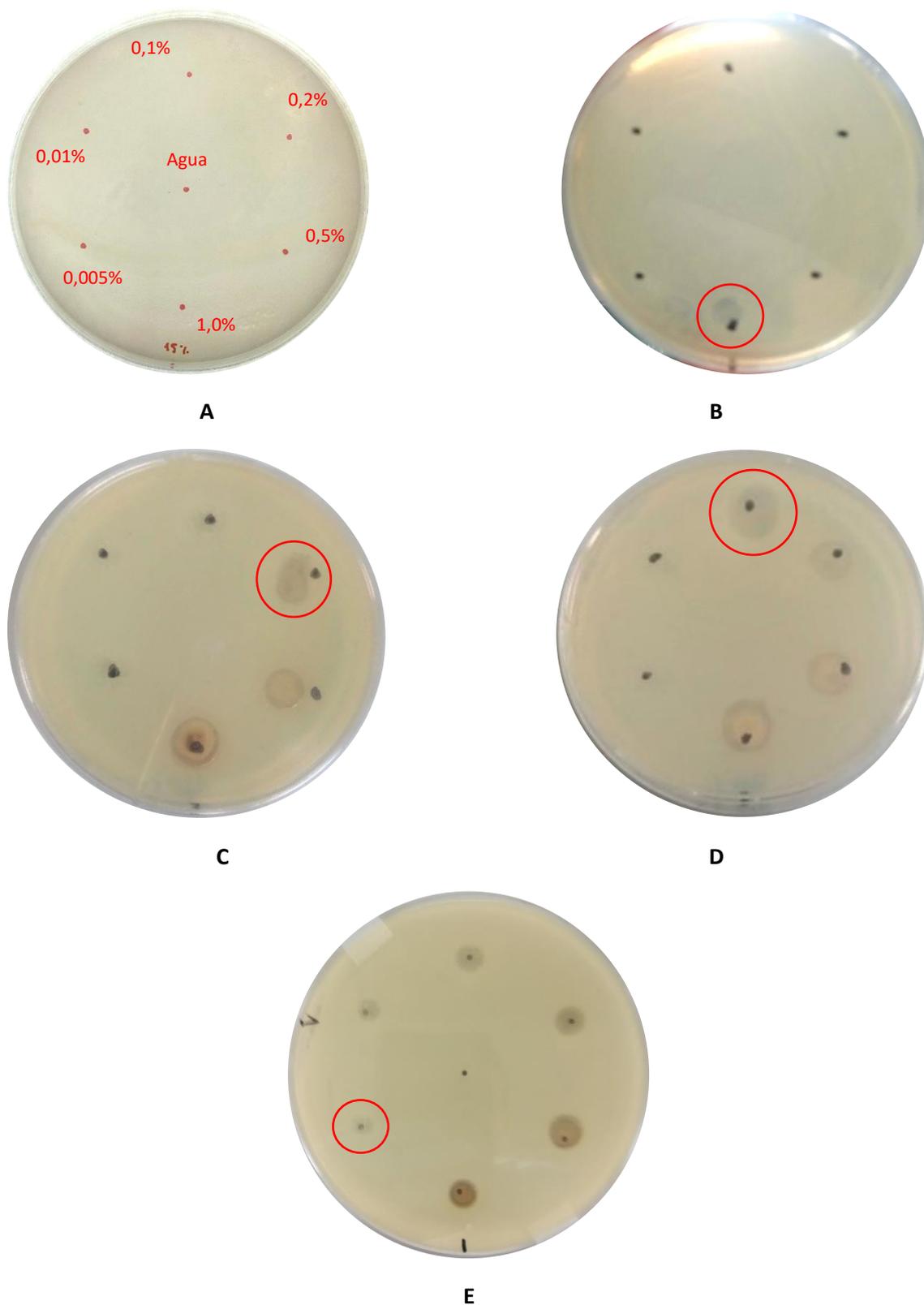


Figura 23. Ensayos de capacidad biocida para diferente carga de plata en el soporte  
A) 15% B) 30% C) 50% D) 70% y E) 100%

A estas muestras mejores, posteriormente, se les podrá llevar a cabo los ensayos de caracterización cuantitativos descritos en la literatura, tanto in vitro como in vivo, mucho más complejos y tediosos, para obtener conclusiones finales más concretas y exactas.

Por tanto, para llevar a cabo este primer estudio sobre la capacidad biocida del soporte elegido con las cinco cargas de plata seleccionadas, lo que se hizo fue seguir el procedimiento anteriormente descrito, preparando suspensiones de cada una de las muestras con diferente concentración en masa de sólido; esto es 1,0%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,01% y 0,005% de zeolita con plata en agua Milli-Q.

Con este primer experimento lo que se pretende es estudiar el efecto de la carga de plata en el soporte sobre su efecto biocida, dado que el soporte, al ser el mismo en todas las muestras, no tendrá un efecto diferenciador entre ellas. Además, permitirá poner a prueba la metodología desarrollada y poder sacar conclusiones preliminares. Dichos experimentos se realizaron por duplicado e incluso por triplicado para comprobar la reproducibilidad de los mismos.

En la Figura 23 se muestra una selección de aquellos resultados más interesantes obtenidos siguiendo todo el procedimiento elaborado a lo largo de este trabajo para cada una de las muestras sólidas inicialmente estudiadas. La disposición de las diferentes concentraciones de suspensiones para cada uno de los materiales sólidos ha sido idéntica a la representada en la Figura 23A.

Como puede observarse en esta figura, para la muestra con una carga de plata correspondiente a un grado de intercambio del 15%, Figura 23A no se ha observado ningún tipo de efecto inhibitor (halo de inhibición) para ninguna de las concentraciones ensayadas. Según dichos resultados, esta muestra no tendría, en las condiciones en las que se ha llevado a cabo el experimento, capacidad biocida para impedir el crecimiento microbiano en el medio de siembra.

Sin embargo, para la muestra al 30% de intercambio, Figura 23B, se observa un halo de forma clara para la concentración más elevada, la de un 1,0%. Por tanto, se puede concluir que esta muestra presenta una mayor capacidad biocida que la anterior, que actúa para concentraciones de un 1,0% en peso de suspensión sólida, en las condiciones de operación.

Si seguimos aumentando la carga de plata en el soporte, podemos ver como cada vez el material requiere de menor concentración de la suspensión para mostrar el halo de inhibición (señalado en la Figura 23 mediante un círculo rojo). En este sentido, la muestra con un grado de intercambio del 50% muestra efecto bactericida con una concentración mínima de en torno al 0,2%, Figura 23 C, mientras que con la muestra al 70%, Figura 23D, se obtiene dicho efecto con una concentración mínima de un 0,1%.

Finalmente, la muestra con el grado de intercambio del 100%, Figura 23E, es capaz de generar dicho halo de inhibición con la concentración mínima ensayada de 0,005%. En todas estas muestras, el posible efecto del agua de dilución ha sido inexistente.

El comportamiento mostrado en este experimento indica que conforme mayor grado de intercambio con la especie activa y, por lo tanto, mayor concentración de plata posea el soporte, como cabría esperar, el efecto biocida será más relevante o, lo que es lo mismo, se requerirá de una menor concentración de dicho material para obtener inhibición en el crecimiento microbiológico.

Estos resultados están en línea con lo que se ha podido observar en otros estudios realizados y recogidos en la literatura, en los que se observa cómo, para un mismo soporte, al aumentar la cantidad de plata acumulada en el mismo se produce una disminución de la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima de la sustancia biocida que impide el crecimiento bacteriano (Cerrillo, 2018; Cerrillo, 2020).

Por tanto, en base a los resultados preliminares mostrados en la figura anterior, se puede concluir que este procedimiento parece adecuado para realizar test rápidos de materiales sólidos con propiedades biocidas, permitiendo una rápida clasificación inicial de un conjunto de materiales para la selección de aquellos más prometedores y la posterior determinación de parámetros más concretos y específicos sobre los seleccionados.

## 5. CONCLUSIONES FINALES

El objetivo de este TFG ha sido el poner a punto una técnica de caracterización cualitativa de la capacidad biocida de materiales sólidos, mediante una técnica de caracterización simple y rápida, en contraposición con las técnicas existentes y más empleadas en la literatura, las cuales son más complejas y laboriosas.

En esta técnica, se han realizado pruebas con materiales zeolíticos intercambiados con plata, la cual actuaba como agente antimicrobiano frente a la bacteria *E. coli*. Estas pruebas han dado un resultado positivo, dando una respuesta cualitativa a la actuación de los materiales zeolíticos intercambiados con plata frente a estas bacterias, observándose una mayor respuesta cuánto más grande era la cantidad de la plata intercambiada en el soporte, lo que está en consonancia con otros estudios existentes en la literatura especializada.

Durante la realización de este trabajo se ha llegado a otras conclusiones secundarias, interesantes también de resaltar:

- El volumen de siembra adecuado que se ha determinado es de 1,0mL para placas de 150mm.
- Cuando se trabaja con agentes biocidas sólidos, la incorporación óptima de los mismos sobre el medio de cultivo es de forma directa, sin emplear papel de filtro.
- El soporte zeolítico empleado no presenta ningún tipo de efecto biocida o inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. La inhibición obtenida se debe de forma exclusiva a la presencia de la plata en el interior del mismo.
- Para un mismo soporte zeolítico, idéntica estructura del soporte, a mayor grado de intercambio de plata, mayor concentración de la misma en el soporte, mayor capacidad biocida se obtiene.

Por lo que, finalmente, se puede concluir que, a través de este procedimiento, se ha podido obtener una clasificación inicial en cuanto a la capacidad biocida que posee un conjunto de materiales.

Un estudio en más profundidad requeriría continuar trabajando para analizar el efecto que pudiesen tener otros tipos de parámetros sobre la metodología desarrollada. En ese sentido, sería interesante desarrollar estudios posteriores para conocer, entre otros, el efecto de otras variables, tales como:

- Número de bacterias en la disolución de crecimiento empleada para llevar a cabo los experimentos. Efecto sobre el halo obtenido.
- Efecto de la estructura tridimensional del soporte. Pruebas de otros soportes.
- Relación de esta metodología cualitativa con las metodologías cuantitativas existentes en la literatura.

Inicialmente, algunos de los estudios que se indican en el párrafo anterior estaban previstos para su realización, pero debido a la situación excepcional actual no se han podido realizar y, así poder confirmar la idoneidad del empleo de esta metodología, disminuir al máximo el número de

pruebas a realizar debido a un mal resultado (mejorar la reproducibilidad), así como su posible cuantificación mediante el estudio, más intensivo del tipo y tamaño del halo que se obtenía tras la realización del experimento.

## 6. Bibliografía

Boschetto, D.L. et al. 2012. Preparation and antimicrobial activity of polyethylene composite films with silver exchanged zeolite-Y. Chem. Eng. J., pp. 204-206.

Cecilia, M. 2013. Prueba de sensibilidad a antibióticos. Difusión en agar (Kirby-Bauer). <https://slideplayer.es/: https://slideplayer.es/slide/4087041/> Fecha de consulta: 12-04-2020.

Cerrillo, J.L. et al. 2018. Functional Ag-Exchanged Zeolites as Biocide Agents, ChemistrySelect, 3 pp. 69-76.

Cerrillo, J.L., Palomares, A.E., Rey, F. 2020. Silver exchanged zeolites as bactericidal additives in polymeric materials. Microporous and Mesoporous Materials, 305 pp. 50-89.

Chiericatti, et al. 2014. Antifungal activity of silver ions exchanged in mordenite. Microporous and Mesoporous Materials, 188 pp. 118-125.

De Muynek, W., De Belie, N., Verstraete, W. (2010) Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. J Appl Microbiol 108 pp. 62–72.

Elechiguerra, J. L., Burt, J. et al. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. Journal of Nanobiotechnology, 3, 6 pp. 1-10.

García Martín, S. 2010. *Los biocidas: incidencia normativa y social: situación en la comunidad de Madrid*. Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

Haggstrom, J., Kenneth, J., George L. 2009. Biocidal properties of metal oxidenanoparticles and their halogenadducts. Royal Society of Chemistry, 2, pp. 399-405.

IBEC, 2017. Nanopartículas de plata, el terror de las bacterias. [divulga.ibecbarcelona.eu: http://divulga.ibecbarcelona.eu/nanopartículas-de-plata-el-terror-de-las-bacterias/](http://divulga.ibecbarcelona.eu/nanopartículas-de-plata-el-terror-de-las-bacterias/) Fecha de consulta 29-02-2020.

IDEX, 2018. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Idexx.es: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf> Fecha de consulta 12/03/2020.

Ismail, M. 2011. Modification of light-metal hydrie properties for hydrogen-energy applications. University of Wollongong Thesis Collection.

IZA, 2005. Faujasite. [iza-online.org](http://www.iza-online.org). <http://www.iza-online.org/natural/Datasheets/Faujasite/faujasite.htm>. Fecha de consulta: 22-03-2020.

Joyeriplaor. 2016. La plata, Historia, origen y yacimientos. Joyeriaplaor.com: <https://www.joyeriplaor.com/blog/la-plata-historia-origen-y-yacimientos/>. Fecha de consulta 27-02-2020.

Kiruba Daniel, S.C.G., Tharmaraj, V., Anitha Sironmani, T., Pitchumani, K. 2010. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles. Applied Clay Science, 48, 4 pp. 547-551.

- Koshy, N. 2016. Fly ash zeolites for water treatment applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4, 2 pp. 1460-1472.
- Kwakye-Awuah, B., Williams, C., Kenward, M.A., Radecka, I. 2007. Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 5 pp. 1516-1524.
- Lalueza, P., Monzon, M., Arruebo, M., Santamaría, J. 2011. Bactericidal effects of different silver-containing materials. *Materials Research Bulletin*, 46, 11 pp. 2070-2076.
- Lalueza, P. et al. 2011. Antibacterial action of Ag-containing MFI zeolite at low Ag loadings. *Chem. Commun.*, 47 pp. 680-682.
- Lazo, J., Navarro, E. et al. 2007. Empleo de arcillas modificadas para la adsorción de fenol presente en soluciones acuosas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73, 3 pp. 166-170.
- Lutz, W. 2014. Zeolite Y: Synthesis, Modification, and Properties—A Case Revisited. *Review Article Hindawi*, pp. 1-20.
- Mineral Data publishing. 2001. Faujasite. <https://rruff.info/https://rruff.info/doclib/hom/faujasitena.pdf/>. Fecha de consulta: 19-03-2020.
- Ministerio de consumo, 2015. Metales pesados. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/metales\\_pesados.htm#:~:text=La%20peligrosidad%20de%20los%20metales,plantas%20y%20los%20tejidos%20org%C3%A1nicos](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.htm#:~:text=La%20peligrosidad%20de%20los%20metales,plantas%20y%20los%20tejidos%20org%C3%A1nicos). Fecha de consulta 26/06/2020.
- Mittal, S. K., Goel, S. 2009. BOD Exertion and OD600 Measurements in Presence of Heavy Metal Ions Using Microbes from Dairy Wastewater as a Seed. *J. Water resource and protection*, 2, 5 pp. 478-488.
- Monteiro, D.R. et al. 2009. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 2 pp. 103-110.
- Murugesan, M. 2015. Antibiotic susceptibility testing. <https://www.slideshare.net/https://www.slideshare.net/drmalathi13/antibiotic-susceptibility-testing-46682610>. Fecha de consulta: 28-06-2020.
- Nataro, J., Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11 pp. 142-201.
- Rahimi, N., Karimzadeh, R. 2011. Catalytic cracking of hydrocarbons over modified ZSM-5 zeolites to produce light olefins: A review. *Journal ELSEVIER*, 398, 1-2 pp. 1-17.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rodríguez-Iznaga, I. 1997. Eliminación de metales tóxicos mediante zeolitas naturales. 5a Conferencia Internacional sobre Zeolitas Naturales, Nápoles.
- Salud Revista.es 2013. Descubren por qué la plata es tóxica para las bacterias. [www.elcorreo.com](http://www.elcorreo.com): <https://www.elcorreo.com/salud/investigacion/20130623/plata-antibioticos-csic-201306232239-rc.html>. Fecha de consulta: 29-02-2020.
- Schmidt-Braekling, T., Streitbuerger, A. et al. 2017. Silver-coated megaprotheses: review of the literature. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 27 pp. 483–489.

Selvi, M., Sundaresan, S., Sivasamy, G., Prabhakaran Pillai, R., Sasikumar, P., Sadasivam, S. 2014. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from agricultural soil, and their potential for arsenic bioremediation. International Journal of Agricultural Policy and Research, 2 pp. 393-405.

Sevilla, B. 2019. Ranking de los principales países productores de plata a nivel mundial en 2018 (en toneladas métricas). Es.estatista.com: <https://es.statista.com/estadisticas/635365/paises-lideres-en-la-produccion-de-plata-a-nivel-mundial/>. Fecha de consulta: 27-02-2020.

Sulaiman, M. 2012. The Kirby-Bauer Method. Recuperado de [https://www.researchgate.net/figure/The-Kirby-Bauer-method\\_fig9\\_257380059](https://www.researchgate.net/figure/The-Kirby-Bauer-method_fig9_257380059). Fecha de consulta: 27-03-2020.

Toro, C., De Jesús, F. et al. 2006. La zeolita en la mitigación ambiental. Revista Lasallista de Investigación, 3, 1 pp. 30-34.

Torres, D. 2005. Justificación de La Zeolita Como Absorbente de Malos Olores. es.scribd.com: <https://es.scribd.com/document/206333673/Justificacion-de-La-Zeolita-Como-Absorbente-de-Malos-Olores-Tomado-de-La-Pagina-de-Internet-Http> Fecha de consulta: 07-03-2020.

Villanueva, A. 2014. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD Y LOCALIZACIÓN DE Pt EN CATALIZADORES Pt/HBETA PARA HIDROCRAQUEO DE POLIESTIRENO. Trabajo fin de grado en ingeniería química. Universidad del País Vasco.

William, E., Gramolelli, F. 2009. INCORPORAÇÃO DE BIOCIDA EM POLIPROPILENO. Revista Engenho, 1, 1 pp. 1-10.

Woodford, C. 2019. Zeolites. Explainthatstuff.com: <https://www.explainthatstuff.com/zeolites.html>. Fecha de consulta: 07-03-2020.

Zhang, Y. et al. 2009. Antibacterial activity of silver-loaded zeolite A prepared by a fast microwave-loading method. Journal of Materials Science, 44 pp. 457-462.