



Evaluation of antibacterial potential $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ composite against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275).

Evaluación del potencial antibacteriano del compuesto $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ en *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275).

Gabriela Guadalupe Esquivel-Barajas¹, Luis Alberto Bretado-Aragón², Dioselina Álvarez-Bernal¹, Minerva Nuñez-Sánchez¹, Rebeca Flores-Magallón^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. Justo Sierra Ote. 28, Centro, CP 59510 Jiquilpan de Juárez, Michoacán, Mexico.

²Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Avenida Universidad 3000, Lomas de Universidad, C.P. 59103, Michoacán, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: rbk_fm@hotmail.com (R. Flores-Magallón)

Article history:

Received: 14 December 2018 / Received in revised form: 4 March 2019 /

Accepted: 18 March 2019 / Published online: 1 April 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.1>

ABSTRACT

Currently, water resources pollution is a worldwide problem generated by anthropogenic factors. It can be a result of inorganic factors such as heavy metals, or organic such as microorganisms, which use water as a means of transmission and may generate several health problems in different living organisms. Titanium oxide (TiO_2) is commonly used for treating wastewater, since it provides control in inorganic and organic factors due to its photocatalytic effect. In this research, the antibacterial effect of $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ composite against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275) was evaluated. The material was synthesized by sol gel method, several concentrations of TiO_2 and AgNO_3 (1, 5 and 10 %wt) were used. In order to enhance the photocatalytic effect of TiO_2 , the material was irradiated at 312 nm (30, 45 and 60 minutes) before the antibacterial test was carried out. The bacterial tests were made by microdilution in plate,

incubating the bacteria with material for 24 h before making the inhibition measurements. These results show that the anatase phase was obtained with a particle size <100 nm, and TiO₂/AgNO₃ composites irradiated for 60 minutes possessed the best photocatalytic performance.

Keywords: TiO₂/AgNO₃, *E. coli*, *S. typhimurium*, bacteriostatic, heterogeneous photocatalysis, semiconductor.

RESUMEN

Actualmente, existe un problema con la contaminación de recursos hídricos a nivel mundial generado por factores antropogénicos, los principales agentes pueden ser de origen inorgánico como metales pesados, u orgánicos como microorganismos, los cuales utilizan el agua como medio de transmisión pudiendo generar problemas de salud en diferentes seres vivos. Uno de los materiales empleados para dar tratamiento a aguas residuales es el óxido de titanio (TiO₂), ya que permite controlar tanto factores inorgánicos como orgánicos debido a su efecto fotocatalítico. Se reporta la aplicación del compuesto TiO₂/AgNO₃ frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275). El material fue sintetizado por sol gel con diferentes concentraciones óxido de titanio y AgNO₃ (1, 5 y 10% en peso), después de la obtención el material fue irradiado a 312 nm (30, 45 y 60 minutos) para activar el efecto fotocatalítico. Las pruebas con la bacteria se realizaron por microdilución en placa dejando el cultivo bacteria/material por 24 horas antes de hacer las mediciones de inhibición. Los resultados indicaron que la obtención de la fase anatasa, tamaños de partícula <100nm, y en cuanto a la evaluación con patógenos los materiales irradiados por 60 minutos fueron los mejores tratamientos.

Palabras clave: TiO₂/AgNO₃, *E. coli*, *S. typhimurium*, bacteriostático, fotocatalisis heterogénea, semiconductor.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso de vital importancia para todas las actividades del ser humano, sin embargo el agua dulce, que puede ser empleada para consumo, ha ido disminuyendo y a su vez se ha incrementado el volumen de agua residual que se vierte en arroyos, ríos, presas o en el mar, haciendo que el recurso hídrico sea no viable para su consumo, esta contaminación se genera principalmente en los sectores doméstico e industrial. El agua que se genera de descargas directas de los sectores domésticos se le conoce como agua residual cruda, y se caracteriza por presentar bajos niveles de oxígeno disuelto y la presencia de *E. coli*, la cual es un microorganismo indicador de presencia de materia fecal (Raffo, *et al.*, 2014; Ercilio *et al.*, 2005). La importancia de minimizar la presencia de agentes patógenos presentes en recursos hídricos, es debido a que estos pueden ser utilizados para diferentes actividades económicas como su uso para riego de

diferentes cultivos, lo que da como resultado un riesgo para el bienestar del ser humano y otros seres vivos. Además de *E. coli*, se han identificado otras especies como *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en agua de río.

Existen diferentes tratamientos para reducir los contaminantes en el agua, sin embargo no todos dan buenos resultados o son costosos. Una alternativa para abordar esta problemática es usar la fotocatalisis heterogénea, debido a que mediante este proceso se puede generar un descenso de contaminantes orgánicos o inorgánicos utilizando radiación solar o artificial. Para poder llevar a cabo el proceso de fotocatalisis es necesario partir de un material semiconductor como por ejemplo dióxido de titanio (TiO_2), el cual se activa al exponerse ante radiación lumínica (luz solar o artificial) desencadenando una serie de reacciones primarias de oxidación y reducción, dando paso a la formación de radicales libres hidroxilo (OH), al producirse cantidades elevadas de radicales libres favorecen la inhibición microbiana, diversos autores reportan la mineralización absoluta (Adams e Impellitteri, 2009; An *et al.*, 2011; Amarjargal *et al.*, 2012; Bohórquez *et al.*, 2016; Boroski *et al.*, 2009; Carp *et al.*, 2009, Dalrymple *et al.*, 2011). Por otra parte, diferentes compuestos de plata han sido utilizados desde hace tiempo por sus propiedades antibacterianas. Con base a lo anterior, el objetivo de este proyecto fue comprobar el efecto antibacterial del compuesto $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ frente a cepas de bacterias que se pueden encontrar en aguas residuales como *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la investigación se dividió en dos etapas: a) Síntesis y caracterización del compuesto $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$, y b) Evaluación del $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ ante microorganismos patógenos.

2.1 Síntesis de compuesto $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$

Para la obtención del $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ se empleó la síntesis sol-gel. Se utilizaron isopropóxido de titanio (Sigma-Aldrich) y AgNO_3 (Sigma Aldrich) como precursores de titanio y plata, respectivamente; alcohol etílico (Sigma-Aldrich) y agua como solventes; y NH_4OH (Sigma-Aldrich), la relación empleada fue 1 mol de isopropóxido, 4 moles de agua y 4 moles de alcohol. La síntesis inicio con la disolución del isopropóxido de titanio en alcohol con una homogeneización de 1400 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se hicieron adiciones de las soluciones de NH_4OH y de AgNO_3 al 1M manteniendo concentraciones de 1, 5 y 10% en peso, la homogeneización se mantuvo a 1400rpm por 60 minutos. Después de transcurrida la agitación el gel se envejeció durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se dio un tratamiento térmico a 500 °C por dos horas, con el propósito de obtener la fase anatasa.

Para la caracterización de la superficie de las muestras se empleó microscopia electrónica de barrido, se realizó el análisis elemental mediante espectroscopia

por dispersión de energía de rayos X (EDS por sus siglas en inglés), además de difracción de rayos X.

2.2 Evaluación del efecto de inhibición de $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ ante cepas control de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275)

Para evaluar el efecto antibacterial del composito, se trabajó con cepas de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275) adquiridas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares), para fines de este trabajo se emplearon dos inóculos uno alto (10^8 UFC/mL) y otro bajo (10^4 UFC/mL).

Para la evaluación del composito con los diferentes microorganismos patógenos se utilizó la técnica de microdilución en placa, usando como medio agar soja tripticaseína (BIOXON). Los tratamientos fueron preparados con una concentración de $15\mu\text{g/L}$ de $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$, con y sin radiación ultravioleta, en agua estéril con las concentraciones obtenidas en la síntesis (1, 5 y 10% en peso). Para realizar la activación del efecto fotocatalítico, los materiales fueron irradiados a una longitud de onda de 312 nm por 30, 45 y 60 min, en el caso de la muestra de cuenta inicial se utilizó agua estéril y patógeno. Después de la adición de los tratamientos a los cultivos bacterianos, se dejaron en incubación por 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 . Posteriormente, se realizaron las lecturas de inhibición.

3. RESULTADOS

En la Figura 1 se presentan los resultados correspondientes al análisis de la superficie de los compósitos con diferentes adiciones de AgNO_3 después del tratamiento térmico. De forma general, se puede apreciar que la morfología fue similar en todos los casos, ya que se presentan aglomerados de partículas casi esféricas de diferentes tamaños, además es posible observar en los espectros EDS que la cantidad de plata detectada en las muestras fue mayor en la (Fig. 1c), con respecto a los otros dos materiales, la importancia de este análisis radica en que se comprueba que se tenía plata como parte del compósito y que no se segregó o precipitó durante la síntesis. En el caso particular de la morfología es una morfología típica de la síntesis por sol gel y los aglomerados pudieron ser promovidos por la temperatura de tratamiento térmico.

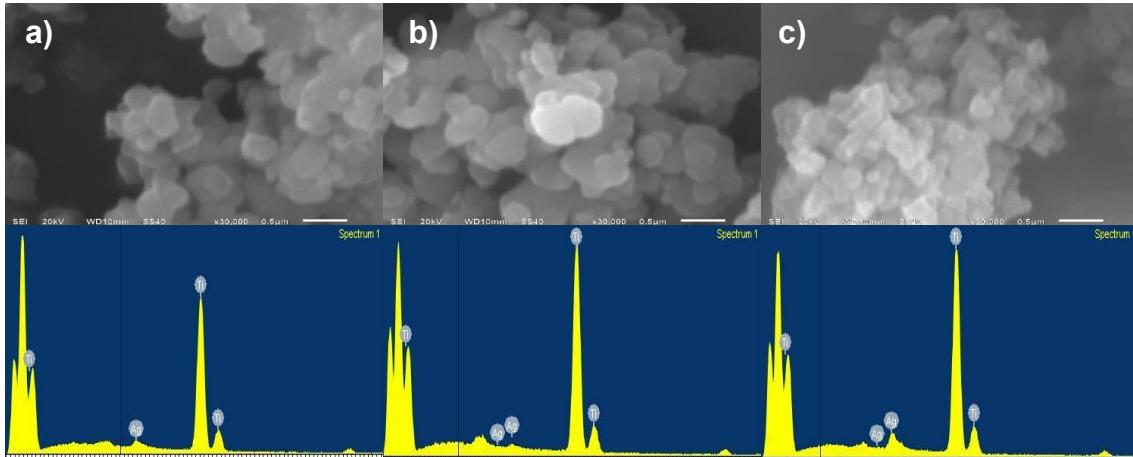


Fig. 1. Micrografías tomadas de la superficie del compuesto $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ mediante microscopía electrónica de barrido a 30,000 magnificaciones y su correspondiente espectro EDS. a) $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ 1%, b) $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ 5%, c) $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ 10%.

En la Figura 2 se presenta el patrón de difracción de rayos X obtenido de la muestra con 10% en peso de AgNO_3 , se puede observar que la fase detectada al analizar el patrón, en la base de datos EVA con que cuenta el equipo, fue la anatasa (PDF 00-004-0477), sin embargo el pico observado a aproximadamente 37 grados en 2^θ puede ser atribuido a la fase de titanio o bien de la plata.

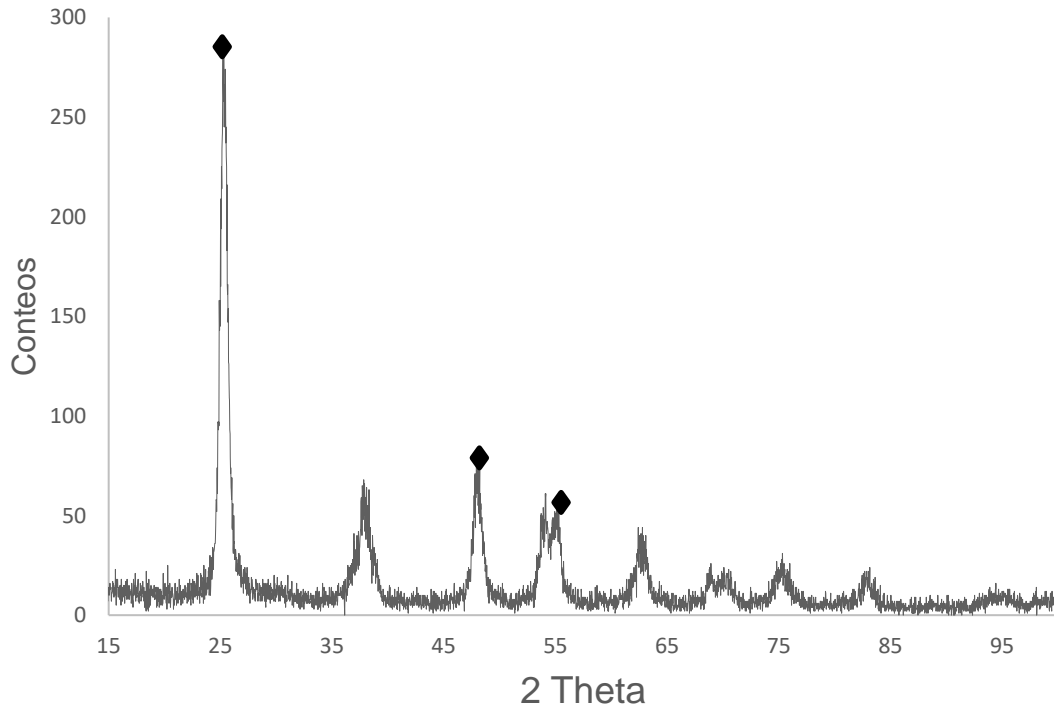


Fig. 2. Patrón de difracción de la muestra $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ con 10% en peso de AgNO_3 . Se muestran los picos característicos de la fase anatasa (♦).

Tabla 1. Evaluación de TiO₂/AgNO₃ como agente antibacteriano frente a *E. coli* ATCC (25922)

Concentración de TiO ₂ /AgNO ₃	TiO ₂ /AgNO ₃ sin exposición a radiación UV									
	CTI	SD	T ₀	SD	T ₁	SD	T ₂	SD	T ₃	SD
1%/p	3X10 ⁹		3X10 ⁹		2X10 ⁶		2X10 ⁵		8X10 ²	
5%/p	3X10 ⁹	57735026.9	2X10 ⁹	7767453.5	1X10 ⁶	453578.4	3X10 ⁵	297838.9	7X10 ²	64.0
10%/p	3X10 ⁹		3X10 ⁹		2X10 ⁶		8X10 ⁸		8X10 ²	
Concentración de TiO ₂ /AgNO ₃	TiO ₂ /AgNO ₃ con exposición a radiación UV									
	CTI	SD	T ₀	SD	T ₁	SD	T ₂	SD	T ₃	SD
1%/p	3X10 ⁹		3X10 ⁹		2X10 ⁶		1x10 ⁵		7X10 ³	
5%/p	3X10 ⁹	57735026	3X10 ⁹	7767453	3X10 ⁶	5692978	1x10 ⁵	9712535	7X10 ³	6110
10%/p	3X10 ⁹		3X10 ⁹		2X10 ⁶		1x10 ⁵		6X10 ³	

• Cuenta Total Inicial UFC/ml (CTI), Desviación estándar (SD), Tiempo cero de exposición del TiO₂/AgNO₃ frente al patógeno (T₀), 30 minutos de irradiación (T₁), 45 minutos de irradiación (T₂) y 60 minutos de irradiación (T₃).

Tabla 2. Evaluación de TiO₂/AgNO₃ como agente antibacteriano frente a *Salmonella typhimurium* ATCC (2275)

Concentración de TiO ₂ /AgNO ₃	TiO ₂ /AgNO ₃ sin exposición a radiación UV									
	CTI	SD	T ₀	SD	T ₁	SD	T ₂	SD	T ₃	SD
1%/p	1X10 ⁸		5X10 ⁶		1X10 ⁵		5X10 ⁵		5X10 ⁵	
5%/p	1X10 ⁸	7637626	5X10 ⁶	2203028	1X10 ⁵	6453165	7X10 ⁵	1352331	3X10 ⁵	7234178
10%/p	1X10 ⁸		5X10 ⁶		2X10 ⁶		5X10 ⁵		3X10 ⁵	
Concentración de TiO ₂ /AgNO ₃	TiO ₂ /AgNO ₃ con exposición a radiación UV									
	CTI	SD	T ₀	SD	T ₁	SD	T ₂	SD	T ₃	SD
1%/p	1X10 ⁸		5X10 ⁶		3X10 ⁴		5x10 ³		7X10 ²	
5%/p	1X10 ⁸	7637626	5X10 ⁶	2203028	3X10 ⁴	6148984	5x10 ³	1316359	5X10 ²	7234178
10%/p	1X10 ⁸		5X10 ⁶		2X10 ⁴		5x10 ³		6X10 ²	

• Cuenta Total Inicial UFC/ml (CTI), Desviación estándar (SD), Tiempo cero de exposición del TiO₂/AgNO₃ frente al patógeno (T₀), 30 minutos de irradiación (T₁), 45 minutos de irradiación (T₂) y 60 minutos de irradiación (T₃).

4. DISCUSIONES

De acuerdo a lo observado en las micrografías correspondientes a los compósitos con diferentes adiciones de AgNO_3 , fue posible evidenciar rasgos comunes en todas las muestras, por ejemplo la formación de aglomerados de partículas semiesféricas con tamaños menores a los 100nm, es importante mencionar que el tratamiento térmico influyó para la generación de los aglomerados y un posible crecimiento en el tamaño de partícula (Amajargal *et al.*, 2012).

La importancia del tratamiento térmico radica en obtener la fase anatasa del óxido de titanio, ya que es la que presenta el efecto antibacterial. En este mismo sentido, la presencia de plata en la síntesis da como resultado un crecimiento preferencial de la anatasa, sobre otras variedades alotrópicas del TiO_2 como el rutilo (Kiran *et al.*, 2013), este efecto se observó en este trabajo. Los resultados obtenidos de las muestras mediante DRX revelan que los picos característicos presentes a 25, 48 y 57° en 2^o corresponden con la carta de la fase anatasa (PDF 00-004-0477), lo que concuerda con lo reportado por Mosquera *et al.*, 2015.

Sánchez *et al.* (2010) evaluaron dióxido de titanio ante *E. coli*, mencionan que iniciaron con una cuenta inicial de 1×10^3 y 5×10^3 UFC/100 ml, y emplearon el material irradiándolo durante 150 minutos antes de la prueba con el patógeno, reportando una inhibición absoluta después de la prueba, atribuyen el comportamiento del material a la liberación de radicales hidroxilos, debido a la activación originada por la radiación, los cuales atacan los microorganismos, conllevando a una degradación de los mismos. En cuanto a lo descrito en la Tabla 1, se observa que se inició con una cuenta inicial de 9 logaritmos pero al emplear el material irradiado por 45 minutos se presentó un descenso de 3 logaritmos y continuó disminuyendo con el material irradiado por 60 minutos.

En la Tabla 2 se presenta el efecto del $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ ante *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275). Donde se observa que se partió de una cuenta inicial de 8 logaritmos pero al emplear el material con una hora de radiación y sin radiación se presentó un descenso de 3 y 6 logaritmos, respectivamente; estos resultados resultan muy importantes ya que no hay referencias en la literatura del uso de este material contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 2275). Losasso *et al.*, (2014), evaluaron el efecto de nanopartículas de plata con distintos serovares de *Salmonella* como *S. enteritidis*, *S. Senftenberg* y *S. Hadar* donde emplearon 200mg de Ag ante los distintos patógenos obteniendo inactivación de los mismos entre 4 a 48 horas respectivamente, en este trabajo se emplearon concentraciones menores del compósito y se potencializó la eliminación del material con la activación fotocatalítica del material.

Con base a los resultados presentados se concluye que el compósito $\text{TiO}_2/\text{AgNO}_3$ obtenido presentaba morfologías de partículas semicirculares aglomeradas, formadas por la fase anatasa, y que el mejor tratamiento para ambas bacterias fueron los materiales irradiado a 312 nm por 45 min y con una dosis de 15µg/L.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al I. Q. Francisco Javier Reynoso Marín, al Dr. Julio César Hernández Herrejón y a la M. en C. Martha Salinas Sandoval por apoyar en la caracterización de los compósitos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Adams W. & Impellitteri C. 2009. The Photocatalysis Of N, N-Diethyl-M-Toluamide (DEET) Using Dispersions Of Degussa P-25 TiO₂ Particles. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A: (202)*, 28–32.

Amarjargal A., Tijing L., Mi-Hwa Y., Chae-Hwa K., Chan-Hee P., Dong-Won K., & Cheol-Sang K. 2012. Characterization and photocatalytic efficiency of TiO₂/Ti beads fabricated by simple heat-treatment. *Journal. Materials Science Technology. 28(2)*: 184–192.

An T., An J., Yang H., Li G., Feng H & Nie X. 2011. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of antiviral drug-lamivudine in TiO₂ dispersion. *Journal of Hazardous. Materials. (197)*: 229–236.

Bohórquez A., Quiroz H., & Dussan A. 2016. Propiedades estructurales y ópticas de nanoestructuras de TiO₂ depositadas por el método de deposición en baño químico para aplicaciones en sensores UV. *Información Tecnológica. 27(6)*: 186.

Boroski, M., Rodrigues A., Garcia J., Sampaio, L, Nozaki J. & Hioka, N. 2009 combined electrocoagulation and TiO₂ photoassisted treatment applied to wastewater effluents from pharmaceutical and cosmetic industries. *Journal of Hazard. Materials. (162)*: 448–454.

Carp O., Huisman C. & Reller A. 2004. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in solid state chemistry. Progress in solid state chemistry. 32(1)*: 58-59.

Dalrymple O., Issacs W., Stefanakos E., Trotz, M., & Goswami, D. 2011. Lipid vesicles as model membranes in photocatalytic disinfection studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. (221)*: 64-70.

Ercilio F., Rodríguez S., Cabel W., Ortiz I., Noriega P. & Tejada-Gamarra M. 2005 *Desafíos del Derecho Humano al Agua en el Perú. 2da Edición. Lima Perú. pp 19, 20, 220, 234.*

Kiran G., Singh R., Pandey A. & Pandey A. 2013. Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Beilstein Journal of Nanotechnology. (4): 345-451.

Losasso C., Belluco S., Cibin V., Zavagnin P., Mičetić I., Gallochio F., Zanella M., Bregoli L. Biancotto G. & Ricci A. 2014. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. Frontiers in Microbiology: 5(227) 3-6.

Mosquera E., Rosas N., Debut A. & Guerrero V. 2015. Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas por el método de Sol-Gel. Revista Politécnica 36 (3).

Navarro M. E. & Bretado-Aragón L.A. 2015. Recubrimientos antibacteriales con el compuesto TiO₂-Ag y su evaluación empleando *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. XXXVI Encuentro Nacional Retos de la AMIDIQ, Cancún Quintana Roo, México.

Raffo E. & Ruiz E. 2014. Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. Industrial Data. Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial17 (1): 73-74.

Sánchez M., Rivero M., Ortiz I. 2010. Photocatalytic oxidation of grey water over titanium dioxide suspensions. Desalination. (262) 141–146.