

Estudio de la actividad microbicida frente a *Eschericia coli* y *Streptococcus faecalis* de Oxihaluros de Bismuto (BiOBr y BiOI)

Study of the microbicidal activity against *Eschericia coli* and *Streptococcus faecalis* of Bismuth Oxyhalides (BiOBr and BiOI)

Presentación: xx/10/2024

Marisa J. Sandoval

Universidad Tecnológica Nacional, FRBB, Dto Cs. Básicas

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-INBIOSUR (UNS-CONICET)

msandova@criba.edu.ar

Ana Rossi

Departamento de Física, Universidad Nacional del Sur-IFISUR (UNS-CONICET)

ana.rossi@uns.edu.ar

Adrian Campelo

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur-INBIOSUR (UNS-CONICET)

acampelo@uns.edu.ar

Claudia A. Neyertz

Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (INCAPE)

cneyertz@fiq.unl.edu.ar

Cecilia Morgade

Universidad Tecnológica Nacional, FRBB, Dto Cs. Básicas

Departamento de Física, Universidad Nacional del Sur-IFISUR (UNS-CONICET)

cmorgade@frbb.utn.edu.ar

Resumen

Las bacterias, microorganismos que coexisten con los humanos, pueden causar graves enfermedades, particularmente cuando son ingeridas en aguas de bebida contaminadas. En este estudio, se seleccionaron dos bacterias pasibles de encontrarse en ambientes acuosos, cada una con formas y estructuras de pared celular diferentes, con la finalidad de estudiar la capacidad microbicida de materiales catalizadores emergentes como lo son los oxihaluros de bismuto. Estos materiales, a diferencia de los fotocatalizadores tradicionales, presentan una estructura en capas con un campo eléctrico estático interno perpendicular a las mismas, lo que potencialmente induce una separación efectiva en la generación de pares electrón-hueco. Las especies bacterianas patrón utilizadas en este estudio fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 25212). Además, como parte del mismo se midieron las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generadas durante la reacción fotocatalítica. Los resultados obtenidos mostraron para ambos oxihaluros, una excelente eficiencia bactericida, especialmente para BiOI y; una alta concentración de H_2O_2 , particularmente superior para el BiOBr.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, BiOBr, BiOI, actividad bactericida

Abstract

Bacteria, microorganisms that coexist with humans, can cause serious diseases, particularly when ingested in contaminated drinking water. Two bacteria with different cell wall shapes and structures, that can be found in aqueous environments, were selected in order to study the microbicidal capacity of emerging catalytic materials such as

bismuth oxyhalides. These materials, unlike traditional photocatalytic materials, have a layered structure with an internal static electric field perpendicular to them, which potentially induces an effective separation in the generation of electron-hole pairs. The standard species used in this study were, *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 25212). In addition, as part of the same, the concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) generated during the photocatalytic reaction were measured. The results obtained showed for both oxyhalides, an excellent bactericidal efficiency, especially for BiOI and a high concentration of H_2O_2 , particularly higher for BiOBr.

Keywords: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, BiOBr, BiOI, bactericidal activity

Introducción

La fotocatálisis implica una reacción fotoquímica que incorpora la absorción de luz y un catalizador semiconductor, lo que fomenta las reacciones de oxidación y reducción que generan especies reactivas de oxígeno (ROS), fundamentales para las reacciones catalíticas posteriores (Goodarzi et al, 2023:1-6). El uso de la fotocatálisis para la descontaminación se alinea con varios principios de la química verde, que abarcan la seguridad de los reactivos, la rentabilidad, las condiciones de reacción suaves y el bajo consumo de energía, entre otros. Las bacterias, microorganismos que coexisten con los humanos, particularmente en la microbiota del cuerpo humano, a veces pueden causar enfermedades graves. Entre ellas, *Escherichia coli*, una bacteria Gram-negativa que no forma esporas, reside en los sistemas digestivos de animales y humanos. Como parte de la flora intestinal, sirve como indicador de contaminación fecal en las evaluaciones de seguridad de los alimentos y el agua (Zhou et al, 2020:1-2). *Enterococcus faecalis*, por otro lado, son cocos Gram-positivos (Seifrtová et al, 2009:158-179). Las bacterias Gram-negativas poseen una capa de lipopolisacáridos en su membrana externa, que actúa como barrera contra la entrada de ROS con carga negativa (Russell, 2003:750-763). Por el contrario, la membrana celular de las bacterias Gram-positivas tiene una carga negativa menor, lo que permite la penetración de ROS con carga negativa (Gordon et al, 2011:6-7). En este estudio, se seleccionaron dos bacterias que se encuentran comúnmente en ambientes acuosos, cada una con formas y estructuras de pared celular distintas, con el propósito de enriquecer el estudio de la eficacia bactericida de los materiales estudiados. Se utilizaron oxihaluros sintetizados en nuestro laboratorio mediante síntesis solvotérmica utilizando $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ y KBr o KI como precursores.

Desarrollo

Síntesis y caracterización de los materiales

Los oxihaluros fueron sintetizados utilizando $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (Tetrahedron) y KBr (ACS, Anedra) o KI (ACS, Cicarelli) como precursores de BiOBr o BiOI, respectivamente. El $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ se diluyó en agua desionizada a una concentración de 0.011 g/mL y se agregaron las sales de KBr o KI con relación molar 1:1, ajustando el pH a 1 por HCl 1M. La solución se agitó durante 3 h a temperatura ambiente y luego se calentó a 180 °C durante 24 h en autoclave. Posteriormente se lavó con agua desionizada hasta pH neutro, se centrifugó y se secó a 60 °C.

Los tamaños de partícula se determinaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), (JEOL, modelo: 100 CX II), operado a un voltaje de aceleración de 100 kV y aumentos de 20.000x y 50.000x. Las mediciones de tamaño se realizaron utilizando el software Digital Micrograph, versión 1.8.

Los espectros de difracción de rayos X en polvo (DRX) se recopilaban utilizando un difractómetro de DRX Malvern-Panalytical Empyrean III equipado con un detector PIXcel3D y filtrado de Ni. Este instrumento utiliza la fuente de radiación Cu K α 1 (1.5406 Å) operada a 45 kV y una corriente de emisión de 40 mA. Los datos se recopilaban utilizando una rendija de divergencia de 0.5°, un tamaño de paso de 0.013° y un tiempo de conteo de 80 s por paso en una ventana de 2 θ de 20° a 70°. La morfología y el tamaño de las partículas se determinaron con un microscopio electrónico de transmisión (TEM), (JEOL, 100 CX II), operado a un voltaje de aceleración de 100 kV y aumentos de 10.000x, 20.000x y 50.000x. Las mediciones de tamaño se realizaron utilizando el software Digital Micrograph (versión 1.8). El área superficial específica y el tamaño de poro se investigaron mediante adsorción-desorción de nitrógeno (N_2). Las isotermas se llevaron a cabo en un analizador de superficies Quantachrome modelo Autosorb iQ con su software de control y análisis de datos (ASiQwin 6.0). Las muestras se sometieron a un pretratamiento térmico y de vacío, sometiéndolas a 150 °C y 1×10^{-2} Torr durante 12 horas en una celda de análisis de vidrio de 9 mm de diámetro. El rango de datos de volumen de N_2 absorbido se cubrió en el rango de 7,6 a 760 Torr ($P/P_0 = 1 \times 10^{-2}$ a 1) y se analizó utilizando la teoría de Brunauer-Emmett-Teller (BET) en el rango de presión relativa $0,05 < P/P_0 < 0,35$. Para

encontrar la distribución del tamaño de poro, los datos de isoterma de adsorción y desorción se ajustaron con el modelo BJH (Barrett-Joyner-Halenda).

A continuación, se observa la Figura 1 donde se muestran los respectivos patrones de difracción con los correspondientes picos representativos de los materiales utilizados.

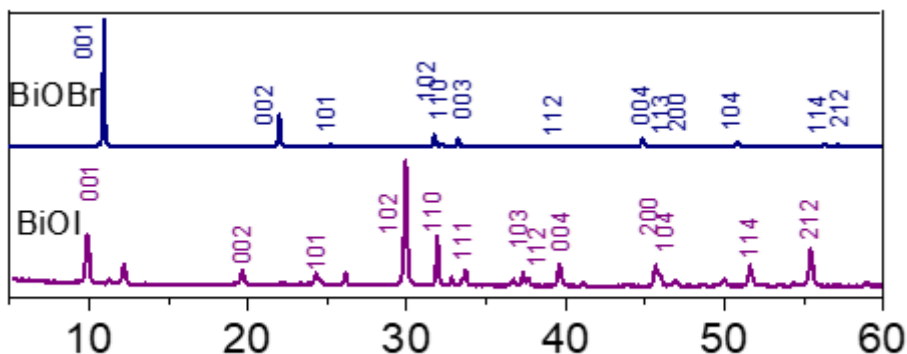


Figura 1. Espectros de difracción de rayos X de oxihaluros BiOBr y BiOI.

En la Fig.2 se muestran las curvas del estudio de isoterma de adsorción –desorción de nitrógeno.

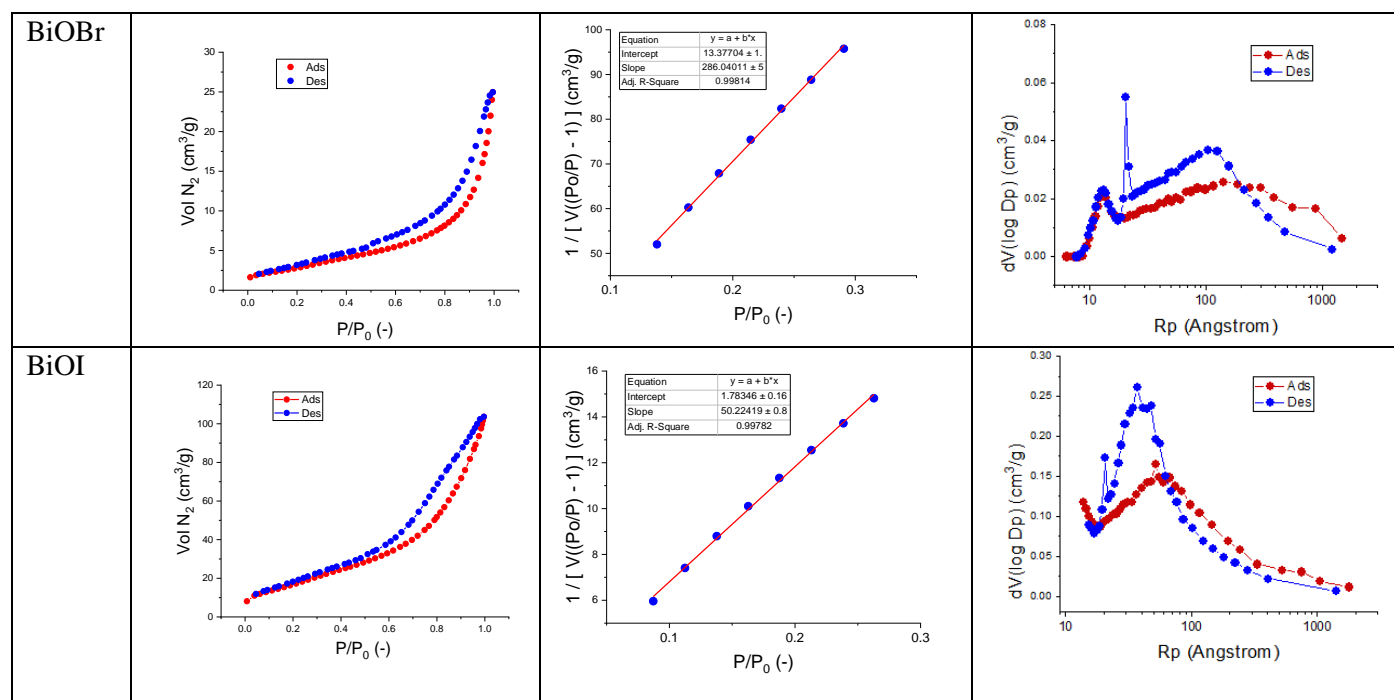


Figura. 2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno, determinación de la superficie específica y distribución del tamaño de poro mediante el modelo BJH. P/P0: presión relativa; Rp: radio de poro. Todas las isotermas son de Tipo II según la clasificación IUPAC, con un bucle de histéresis.

Por otra parte, en la Tabla 1 se resumen valores de la distribución del tamaño de las partículas y un promedio de los respectivos valores de área superficial y tamaño de poro. De los mismos puede observarse que las partículas presentan un tamaño considerable lo que habitualmente no es beneficioso para reacciones catalíticas que se producen en las respectivas superficies. Asimismo, de la figura 2 donde se muestran micrográficas no solo es apreciable el gran tamaño de las respectivas partículas sino también su agregación particularmente en el BiOBr donde ésta es en general más evidente. Sin embargo, a pesar de presentar un gran tamaño son partículas, particularmente las de BiOI, con elevada área superficial e importante volumen de sus poros.

Sample	Constant C	Pendiente (1/g)	Area Superficial (m ² /g)	Vp × 10 ² (cm ³ /g) × 10 ²	Tamaño promedio (nm)
BiOBr	22.384	286.04	11.63	2.878	2400
BiOI	29.167	50.23	66.96	13.820	3400

Tabla 1.
Resultados obtenidos de los gráficos de la Fig. 2 y microscopia TEM para la determinación del área superficial específica (mg²/g), volumen de poros (cm³/g) y tamaño promedio de partículas (nm),.

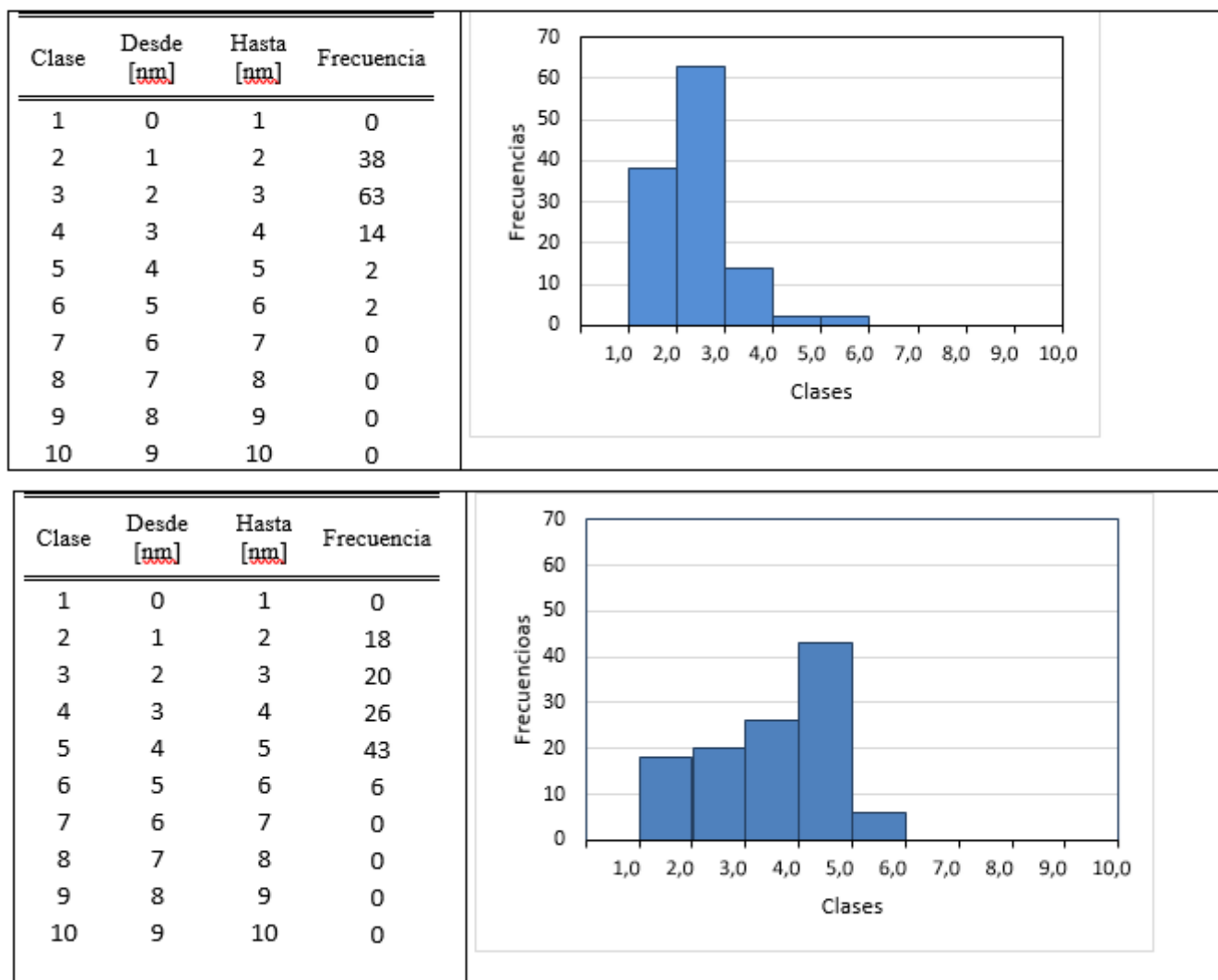


Figura 3: Distribución de tamaños de partículas estudiadas por microscopia TEM, arrib:a BiOBr, abajo: BiOI

Las distribuciones estadísticas de tamaños obtenidas responden a las características de una distribución normal con asimetría a izquierda para la muestra BiOI y ligera asimetría a derecha para BiOBr. En esta última muestra se halló un tamaño promedio menor que BiOI.

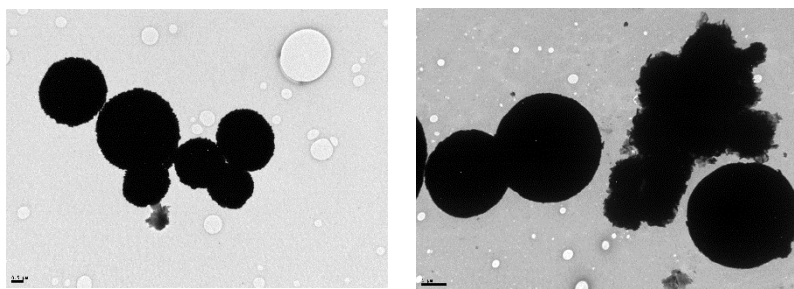


Figura 4: Micrografías TEM de los fotocatalizadores usados.

Estudio bactericida

Escherichia coli ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 25212 se cultivaron en caldo de soja Trycase (TSB, Biokar) incubado durante 18 h a 37 °C. Las suspensiones celulares se recogieron por centrifugación a 4000 × g durante 10 min (Labofuge 200, Kendro, Alemania) y los pellets celulares se lavaron posteriormente dos veces con agua tridestilada estéril. La concentración celular se ajustó a 1x10⁷ células/mL. Posteriormente, 1 mL de dicha suspensión se diluyó en 99 mL de agua tridestilada estéril de pH 6,5 (S-H₂O) o en 99 mL de suspensión de BiOBr o BiOI respectivamente. Para evaluar la actividad bactericida de los óxidos inactivados, se determinó el contenido bacteriano mediante siembra en placa de agar de recuento de placas (PCA, Britania), seguida de incubación durante 24 h a 37°C. Para estudiar el efecto de la fotocatálisis, las muestras preparadas se colocaron en las mismas condiciones que las anteriores bajo el efecto de la lámpara UVA con agitación controlada y se tomaron alícuotas de 1 mL en diferentes tiempos (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min.). Las muestras tratadas como se describe (1 mL de cada tiempo) se sembraron para el recuento incubándolas a 37 °C durante 24-48 h. Los recuentos de colonias microbianas se expresaron como UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra) y se convirtieron en una razón de supervivencia (N/N₀) donde N₀ es el valor de (UFC)/mL en el tiempo 0 y N representa el mismo valor en un tiempo de exposición dado. El espesor del vidrio de borosilicato utilizado es de 2 mm en promedio. Las distancias entre la fuente de radiación y la suspensión bacteriana fueron de 15 y 30 cm. Como no se registraron diferencias en la tasa de supervivencia bacteriana (datos no mostrados), los conteos reportados vinieron de la distancia más alta, como lo reportan los estudios de Duarte y colaboradores (Duarte et al, 2009:182). La determinación de la generación de peróxido de los fotocatalizadores con mayor poder bactericida se realizó utilizando la sonda fluorogénica 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.).

Es ampliamente reconocido que el tamaño de las nanopartículas influye significativamente en el rendimiento de los materiales fotocatalíticos. El tamaño y la morfología del catalizador desempeñan un papel fundamental en la determinación de su estructura superficial y las energías de brecha de banda, lo que afecta su rendimiento general [18-19]. Como se describe en la sección de materiales y métodos, todas las demás variables, incluido el pH, la temperatura, la radiación y los tiempos de exposición, se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

La Tabla 2 muestra los valores recuento de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) y la relación de sobrevida respectiva (Log N/No)

Tiempo (min.)	BiOBr				BiOI			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	UFC/mL	Log N/No	UFC/mL	Log N/No	UFC/mL	Log N/No	UFC/mL	Log N/No
0	4.3 x 10 ⁵	0.00	5.8 x 10 ⁵	0.00	4.3 x 10 ⁵	0.00	5.8 x 10 ⁵	0.00
15	3.7 x 10 ⁴	-1.27	4.6 x 10 ⁴	-1.10	3.2 x 10 ¹	-4.13	5.8 x 10 ¹	-4.00
30	2.5 x 10 ³	-2.24	2.3 x 10 ⁴	-1.40	0	indefinido	0	indefinido
45	3.2 x 10 ²	-3.13	3.3 x 10 ³	-2.24	0	indefinido	0	indefinido

60	2.2 x 10 ¹	-4.29	2.1 x 10 ²	-3.12	0	indefinid o	0	indefinido
120	0	Indefinido	0	indefinido	0	indefinid o	0	indefinido
180	0	indefinido	0	indefinido	0	indefinid o	0	indefinido
240	0	indefinido	0	indefinido	0	indefinid o	0	indefinido
300	0	indefinido	0	indefinido	0	indefinid o	0	indefinido
1440	Sin crecimiento							

Tabla 2. valores recuento de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) y relación de sobrevivencia respectiva (Log N/No) desde 0 a 1440 minutos.

Con la finalidad de explicar una posible causa de eficiencia bactericida se midieron las concentraciones de peróxido de hidrogeno liberados producto de la excitación lumínica de los materiales estudiados. La Tabla 3 presenta los valores promedio de H₂O₂, los que se obtuvieron con una suspensión de los fotocatalizadores de 1g/L y se expusieron a radiación UVA, la misma utilizada para los estudios bactericidas reportados en Tabla 2. De los resultados obtenidos se desprende que estos valores no explican por si solos la actividad bactericida reportada. Los estudios se hicieron por triplicado con una totalidad de cuatro muestras (n=4) en cada experiencia.

Time (min.)	BiOBr		BiOI	
	Mean	SD	Mean	SD
0	3835.86	305.14	3893.63	378.77
15	4009.19	402.50	3951.41	345.50
30	5395.83	450.50	3835.86	368.60
45	5164.72	488.92	3778.08	375.48
60	4991.39	466.56	3951.41	328.19

Tabla 3. Concentraciones de H₂O₂ obtenidas por radiación UVA de suspensiones de los respectivos fotocatalizadores. Valores medios y desviaciones típicas de tres experimentos independientes (n= 4).

La Figura 5 ilustra los datos reportados en la Tabla 2

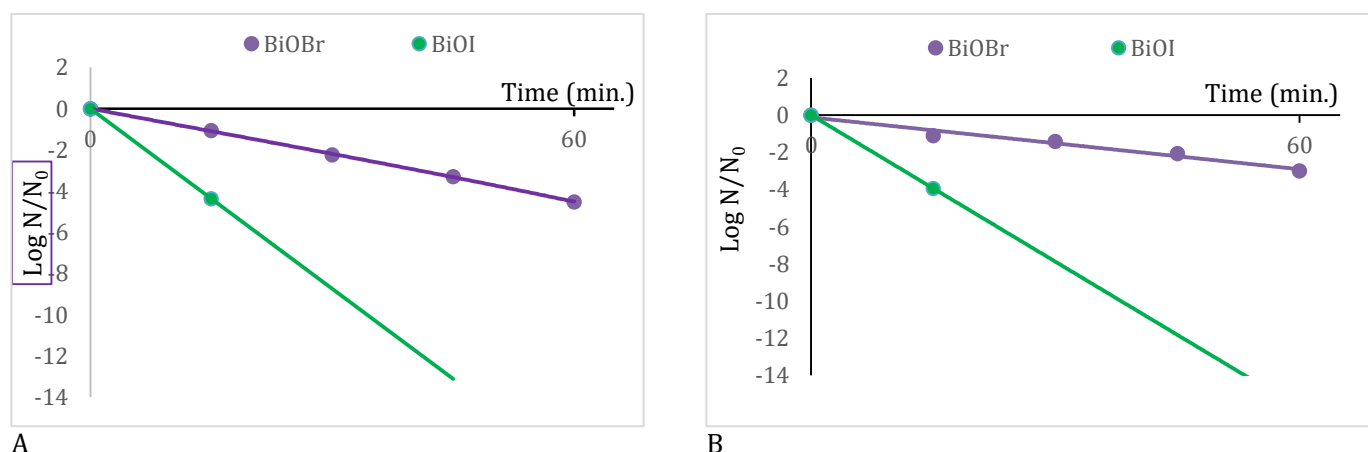


Figura 5: Tasas de supervivencia de Escherichia coli (ATCC 25922) (A) y Enterococcus faecalis (ATCC 25212) mostradas (B) para cada oxihaluro detallado en las Tablas 2 y 3.

En la Fig. 5 se evidencia una disminución sustancial en la tasa de supervivencia de ambos tipos de bacterias para BiOBr y BiOI. BiOI exhibe una notable eficiencia bactericida dentro de los 15 minutos de exposición, particularmente

contra cocos Gram-positivos. Es ampliamente reconocido que la integridad de las paredes celulares y las membranas juegan un papel crucial en la preservación de la viabilidad bacteriana. Los transportadores de electrones y las enzimas responsables de las reacciones redox deben mantener una unión adecuada dentro de la membrana celular para acoplar efectivamente el cambio de energía libre a la síntesis de ATP. Por lo tanto, cualquier alteración puede interrumpir el potencial de membrana, lo que resulta en efectos perjudiciales para la supervivencia celular. La literatura sugiere que el impacto de la fotocatalisis se origina en la oxidación de las paredes y membranas de los microorganismos expuestos debido a las ROS generadas (Pasquet et al, 2014:1-4).

Conclusiones

Los oxihaluros estudiados, BiOBr y BiOI demuestran importante actividad microbicida. Curiosamente, a pesar de que BiOBr genera la mayor concentración de H_2O_2 muestra la menor eficiencia. Esta paradoja podría dilucidarse por la posible sinergia bactericida resultante de la posible liberación de yoduro por BiOI. En ambos casos, se observó una mayor eficacia bactericida contra cocos grampositivos en comparación con bacilos gramnegativos, lo que refleja distintas sensibilidades a las especies de ROS exhibidas por estos dos tipos de paredes celulares.

Agradecimientos

Los investigadores agradecen el apoyo de esta investigación mediante los proyectos de la Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Bahía Blanca (UTN FRBB/UTN7758), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET/ PIP 11220200100722CO), Universidad Nacional del Sur (UNS/PGI: 24/F081 y IGP: 24/Q084).

Referencias

- Duarte, I., Rotter, A., Malvestiti, A., & Silva, M. (2009). The role of glass as a barrier against the transmission of ultraviolet radiation: An experimental study. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 25(4), 181-184. doi: 10.1111/j.1600-0781.2009.00434.x
- Goodarzi, N., Ashrafi-Peyman, Z., Khani, E., & Moshfegh, A. Z. (2023). Recent progress on semiconductor heterogeneous photocatalysts in clean energy production and environmental applications. *Catalysts*, 13(11), 1102. doi: 10.3390/catal13071102
- Gordon, T., Perlstein, B., Houbara, O., Felner, I., Banin, E., & Margel, S. (2011). Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374(1-3), 1-8. doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.015
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M. A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 447, 263-274. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.05.057
- Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750-763. doi: 10.1093/jac/dkg422
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., & Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, 609(1), 158-179. doi: 10.1016/j.aca.2009.07.031
- Zhou, B., Yuan, Y., Zhang, S., Guo, C., Li, X., Li, G., Xiong, W., & Zeng, Z. (2020). Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract. *Frontiers in Immunology*, 11, 575. doi: 10.3389/fimmu.2020.00575