

Evaluación completa de la actividad antibacteriana de nanomateriales

Comprehensive evaluation of the antibacterial activity of nanomaterials

Alejandro Huerta-Saquero*[†] y Anaid Meza-Villezcás*

ABSTRACT: Infectious diseases caused by pathogenic bacteria are one of the leading causes of death worldwide. Today, the acquisition of multi-antibiotic resistance by pathogenic bacteria increases the difficulty of treating microbial infections, creating a significant global health problem. Therefore, finding new therapeutic alternatives and new antimicrobial agents is essential. In this sense, nanomaterials with antimicrobial activity, or “nanoantibiotics,” represent a real and practical alternative against infectious agents, primarily of viral and bacterial origin. Among these materials, metallic nanoparticles stand out, exerting a generalized antimicrobial effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria and can also enhance the antimicrobial effect of existing antibiotics. For antibacterial nanomaterials, it is essential to characterize their properties using standardized protocols for their evaluation and comparison. These protocols include determining the minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, median lethal dose, bactericidal time of action, effective concentration, and the exposure time required to achieve antimicrobial activity against a specific bacterial load. Determining the reusability and bactericidal or bacteriostatic effect of nanomaterials is also essential. This paper describes some of these protocols in detail, emphasizing the scope of the techniques and their correct interpretation.

KEYWORDS: antibacterial nanomaterials, nanoantibiotics, antibacterial characterization.

RESUMEN: Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas son una de las principales causas de muerte en el mundo. La adquisición de multirresistencia a los antibióticos por bacterias patógenas incrementa la dificultad para tratar infecciones, lo cual origina un problema de salud de importancia mundial. Por lo tanto, encontrar nuevas alternativas terapéuticas y nuevos agentes antimicrobianos es fundamental. En este sentido, los nanomateriales con actividad antibacteriana o “nanoantibióticos” representan una alternativa real y efectiva contra agentes infecciosos, principalmente de origen viral y bacteriano. Entre estos materiales destacan las nanopartículas metálicas, por ejercer un efecto antimicrobiano generalizado sobre bacterias Gram positivas y negativas, además de tener la posibilidad de potenciar el efecto antimicrobiano de los antibióticos existentes. Para el uso de nanomateriales antibacterianos, es fundamental caracterizar sus propiedades con protocolos estandarizados que permitan su evaluación y comparación, tales como la determinación de la concentración mínima bactericida, la concentración mínima inhibitoria, la dosis letal media, el tiempo de acción bactericida, la concentración efectiva y el tiempo de exposición requerido para lograr actividad antimicrobiana frente a una carga bacteriana específica. Asimismo, es fundamental determinar la capacidad de reutilización y el efecto bactericida o bacteriostático de los nanomateriales. En este trabajo se

Recibido: 8 de mayo, 2025. Aceptado: 3 de noviembre, 2025. Publicado: __ de diciembre, 2025.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Nanociencias y Nanotecnología. Ensenada, Baja California, México.

[†] Autor de correspondencia y responsable de la publicación: saquero@ens.cnyn.unam.mx

describen con detalle algunos de esos protocolos, enfatizando los alcances de las técnicas y su correcta interpretación.

PALABRAS CLAVE: nanomateriales antibacterianos, nanoantibióticos, caracterización antibacteriana.

Introducción

Actualmente, la alta producción de nanomateriales en diferentes áreas y para múltiples aplicaciones afecta irremediablemente a los organismos, el ambiente y particularmente a las comunidades microbianas. La toxicidad de los nanomateriales es materia de preocupación a nivel mundial (Alizadeh, 2025). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de ciertos nanomateriales representa una alternativa real para el combate de microorganismos patógenos, particularmente bacterias con multirresistencia a los antibióticos convencionales. El fácil manejo y reproducción de bacterias como organismos modelo favorece su uso para evaluar la toxicidad y la actividad antibacteriana de los nanomateriales. Así, las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, representadas por *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, entre otras, se han consolidado como organismos modelo en la evaluación de la toxicidad relativa de diversos nanomateriales (Sezonov G., 2007) (Vázquez-Muñoz, 2019).

En este sentido, es fundamental realizar una caracterización y evaluación completa de la toxicidad de los nanomateriales (Slavin, Asnis, Häfeli y Bach, 2017) (Cheeseman *et al.*, 2020). El principal parámetro para evaluar la toxicidad de los nanomateriales es su efecto sobre la viabilidad microbiana (Jaime-Acuña, 2016) (Maillard J. Y., 2013) (Dong, B. 2014). Sin embargo, hoy en día no existen protocolos estandarizados para la evaluación toxicológica de nanomateriales en microorganismos (Rozhin *et al.*, 2021), limitando la comparación entre estudios y dificultando la interpretación global de los resultados.

Para avanzar hacia una comprensión más integrada de su impacto, es esencial establecer criterios uniformes que incluyan una caracterización fisicoquímica detallada de los nanomateriales (tamaño, morfología, carga superficial, composición, entre otros), así como condiciones de cultivo estandarizadas de las bacterias a evaluar, concentraciones iniciales del inóculo bacteriano y parámetros experimentales definidos (Jaime-Acuña, 2016). Solo a partir de esta homogeneización metodológica será posible realizar metanálisis comparativos entre diferentes estudios, permitiendo evaluar de manera más precisa la toxicidad relativa de los nanomateriales desarrollados a nivel global.

Además de las pruebas de viabilidad microbiana, la evaluación toxicológica de nanomateriales en modelos bacterianos debe considerar una serie de parámetros clínicamente relevantes, como la concentración mínima bactericida (CMB), la concentración mínima inhibitoria (CMI), la dosis letal media (DL50), el tiempo de acción bactericida, la concentración efectiva y el tiempo de exposición requerido para lograr actividad antimicrobiana frente a una carga bacteriana específica (Madigan, 2014) (Murray, 2012). Asimismo, es fundamental

determinar la capacidad de reutilización y el efecto bactericida o bacteriostático de los nanomateriales (Ferreira L., 2012; Matsumura Y., 2015; Jiraroj D., 2014), así como establecer un estudio sistemático de sus propiedades antimicrobianas considerando su estabilidad, gestión y recuperación, con el fin de evaluar su impacto ambiental. Aunado a ello, los modelos bacterianos permiten aplicar técnicas complementarias para detectar la actividad metabólica, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los cambios en el potencial de membrana, los cuales afectan su permeabilidad, proporcionando una visión más completa del efecto tóxico de los nanomateriales (Vázquez-Muñoz, 2019).

A continuación, se describen los parámetros de evaluación de la actividad antibacteriana de nanomateriales aplicables tanto a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas, junto con una propuesta de protocolos orientados a homogenizar metodologías, con el objetivo de facilitar la comparación entre estudios y avanzar hacia una estandarización en la evaluación toxicológica de los nanomateriales.

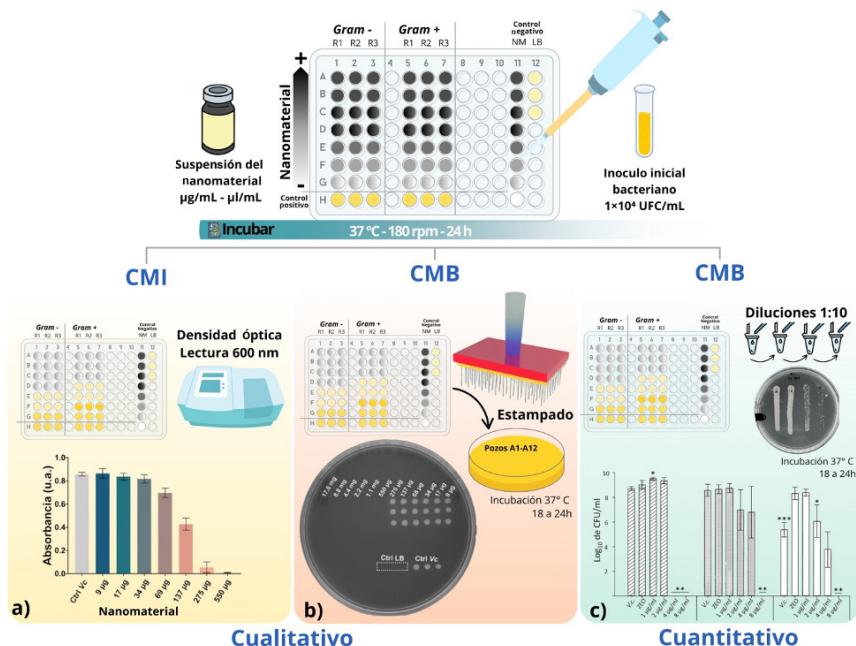
Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de los nanomateriales mediante ensayos de microdilución

La prueba de microdilución es una metodología utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana de nanomateriales, al permitir determinar tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la mínima cantidad de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de una determinada cepa bacteriana en comparación con su crecimiento control (Madigan, 2014); así como la concentración mínima bactericida (CMB), definida como la cantidad mínima del antimicrobiano capaz de eliminar el 99.99 % de las bacterias inoculadas en condiciones estandarizadas (Murray, 2012) de manera controlada y reproducible. Este método consiste en exponer una concentración conocida de bacterias, generalmente *E. coli* como modelo de bacteria Gram-negativa y *B. subtilis* como modelo de bacteria Gram-positiva a una serie de diluciones del nanomaterial en placas de microtitulación en medio líquido (Guerra R., 2012; Delgado-Beleño, 2021; Meza-Villezcas *et al.*, 2019; Jaime-Acuña, 2016). A lo largo del ensayo, se obtienen resultados cualitativos, al observar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano visible y resultados cuantitativos, mediante la medición de la densidad óptica o el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (figura 1). La combinación de ambos enfoques permite una caracterización más precisa de la actividad antimicrobiana, así como una mejor comparación entre diferentes tipos de nanomateriales y condiciones experimentales.

a) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caldo

Se muestra el diseño experimental con bacterias Gram- y Gram+, el uso de controles negativos y positivos, y la medición de densidad óptica a 600 nm

Figura 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de nanomateriales mediante ensayos microbiológicos cuantitativos y cualitativos.



Fuente: Elaboración de los autores.

para determinar la inhibición del crecimiento microbiano. b) Determinación cualitativa de la concentración mínima bactericida (CMB) mediante el estampado en medio sólido desde los pozos de la microdilución. La ausencia de crecimiento bacteriano indica un efecto bactericida. c) Evaluación cuantitativa de la CMB mediante siembra por diluciones seriadas (1:10) en agar y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para establecer la letalidad del nanomaterial.

b) Determinación de la CMI mediante ensayos de microdilución con lectura espectrofotométrica

Este protocolo consiste en preparar una suspensión bacteriana ajustada a una concentración conocida, generalmente de 1×10^4 UFC/mL, y distribuirla en una microplaca de 96 pozos, agregando en cada uno distintas concentraciones del nanomaterial a evaluar (por ejemplo: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 µg/mL, o bien diluciones seriadas de un nanomaterial en suspensión líquida si no se conoce su concentración en peso). El volumen final por pozo es de 200 µL, usando un medio de cultivo adecuado para la cepa bacteriana empleada (LB, MHB, caldo nutritivo). Se incluyen controles positivos (bacterias sin nanomaterial) y negativos (solo medio y medio con el nanomaterial), y la

placa se incubaba durante 24 horas a 37 °C con agitación para promover la aeración. Posteriormente, se mide la densidad óptica a 600 nm utilizando un lector de microplacas. La CMI se define como la concentración mínima del nanomaterial en la cual no se observa crecimiento aparente, es decir, donde la absorbancia se mantiene similar a la del control negativo. Dentro del diseño experimental, se recomienda incluir al menos tres réplicas técnicas por cada concentración del nanomaterial evaluado, con el fin de asegurar la precisión y reproducibilidad de los datos obtenidos. Para permitir análisis estadísticos robustos y con validez biológica, se sugiere realizar un mínimo de tres réplicas biológicas independientes, cada una con sus respectivas réplicas técnicas. Esto permite evaluar tanto la variabilidad técnica como la biológica del sistema y fortalece la interpretación de los resultados.

c) Determinación cualitativa de la CMB mediante ensayos de microdilución y estampe en medio de cultivo sólido

Una vez finalizada la prueba de microdilución, se procede a evaluar si las bacterias que no mostraron crecimiento visible en el ensayo anterior están realmente muertas o simplemente inhibidas. Para ello, se toma una alícuota de cada pozo (usualmente entre 5 y 10 µL) y se deposita manualmente o con un estampador multipunta sobre placas de Petri con medio de cultivo fresco, sin la presencia de nanomaterial. Estas placas se incuban durante toda la noche a 37 °C. La CMB cualitativa se define como la concentración mínima del nanomaterial que no permite el crecimiento de ninguna colonia visible después de la incubación. Esta prueba requiere la interpretación visual del crecimiento y puede reforzarse con réplicas para confirmar los resultados.

d) Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante diluciones seriadas (CMB cuantitativa)

Este protocolo cuantitativo permite estimar con mayor precisión la capacidad bactericida de un nanomaterial. Las bacterias son expuestas a distintas concentraciones del nanomaterial durante un tiempo de incubación definido (usualmente 24 horas), en condiciones estandarizadas. Al finalizar la incubación, se toman muestras de cada concentración y se realizan diluciones seriadas en medio de cultivo libre de nanomaterial (típicamente de 10^{-1} a 10^{-6}). De cada dilución se siembran alícuotas conocidas (por ejemplo, 10 µL o 100 µL) sobre placas con medio nutritivo sólido (como TSA o LB agar), empleando técnicas como el sembrado por extensión superficial o por el método de siembra por dilución seriada en línea en una sola placa (del método *single plate–serial dilution spotting* / SP-SDS) (Pious *et al.*, 2015).

Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C y, posteriormente, se cuenta el número de colonias desarrolladas. El número de UFC/mL se calcula multiplicando el número de colonias por el inverso del factor de dilución, considerando el volumen sembrado. La CMB cuantitativa se define como la concentración mínima del nanomaterial que logra una reducción $\geq 99.99\%$

de la población bacteriana inicial, en comparación con el control positivo sin nanomaterial.

Determinación de las dosis subletales y dosis letal media (DL50) de nanomateriales antimicrobianos

La determinación de la dosis letal media (DL50) para un nanomaterial antimicrobiano se basa en protocolos similares a los utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando ensayos de microdilución en medio de cultivo líquido. En este procedimiento, se expone una concentración conocida de bacterias a diferentes concentraciones del nanomaterial y se incuban durante toda la noche. Posteriormente, se cuantifica el crecimiento bacteriano ya sea de forma indirecta, mediante absorbancia a 600 nm o de manera directa y cuantitativa, mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). En ambos casos, el control positivo (cultivo sin nanomaterial) se considera como el 100 % del crecimiento bacteriano, lo cual permite expresar los resultados en términos porcentuales para calcular la concentración a la cual se alcanza una reducción del 50 % del crecimiento, es decir, la DL50. Asimismo, pueden determinarse dosis letales parciales (por ejemplo, DL10, DL25 o DL90), las cuales resultan útiles dependiendo del tipo de análisis que se pretenda realizar.

El conocimiento preciso de estas dosis subletales no solo permite caracterizar el potencial antimicrobiano del nanomaterial, sino que también es fundamental para estudiar las respuestas celulares a nivel transcriptómico, proteómico y metabolómico, lo cual ha permitido explorar los efectos de los nanomateriales a un nivel molecular y adaptativo (Meza-Villezcás *et al.*, 2019 y 2022). Estas aproximaciones han contribuido a describir mecanismos de respuesta, adaptación y resistencia de los microorganismos frente a la exposición a nanomateriales, siendo esto clave para entender su modo de acción, sus implicaciones ecológicas y su impacto potencial en la salud pública y el medio ambiente. Con la adecuada interpretación biológica de estos datos, es posible predecir escenarios de resistencia emergente o de adaptación fisiológica ante nanomateriales, fortaleciendo así el diseño de estrategias más seguras y eficientes en aplicaciones antimicrobianas.

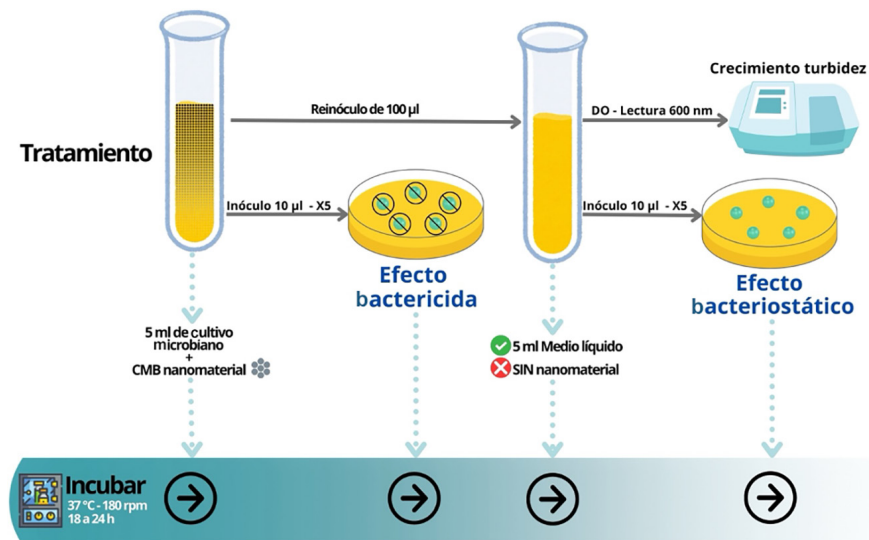
Efecto bactericida o bacteriostático de los nanomateriales

Es fundamental discernir si el efecto de los nanomateriales sobre las bacterias es bacteriostático o verdaderamente bactericida. Un nanomaterial con efecto bacteriostático inhibe el crecimiento bacteriano, manteniendo las células vivas en fase estacionaria, mientras que un nanomaterial con efecto bactericida elimina las bacterias, impidiendo su posterior proliferación (Pankey G. A., 2004; Jaime-Acuña, 2016). Este análisis permite entender mejor el mecanis-

mo de acción de los nanomateriales, pues algunos pueden inhibir temporalmente el crecimiento sin eliminar completamente la viabilidad celular, lo cual tiene implicaciones importantes en el diseño de tratamientos antimicrobianos y en el estudio de adaptaciones bacterianas.

Una vez determinada la concentración mínima bactericida (CMB) de cada nanomaterial, se evalúa si su efecto es bacteriostático o bactericida mediante un ensayo de reinoculación (figura 2). Si bien, la CMB es determinada por la capacidad de eliminar el 99.9% de células en el tratamiento, este protocolo de reinoculación nos permite confirmar la eficacia bactericida del nanomaterial (Madigan, 2014). Para ello, se expone una suspensión bacteriana a la CMB del nanomaterial en 5 mL de medio LB líquido, incubando durante toda la noche a 37 °C con agitación constante a 180 rpm. Al día siguiente, se toman 100 µL del cultivo tratado y se inoculan en 5 mL de medio LB fresco sin nanomaterial y en placa de agar, incubando nuevamente bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se evalúa el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica a 600 nm. En paralelo, se siembran 10 µL del mismo cultivo en placas de agar LB, las cuales se incuban durante la noche a 37 °C. Si se observa crecimiento en el medio líquido o en las placas, se considera que el nanomaterial tiene un efecto bacteriostático; en cambio, si no se detecta crecimiento, se concluye que el nanomaterial tiene un efecto bactericida.

Figura 2. Discriminación entre efecto bacteriostático y bactericida tras tratamiento con nanomateriales.



Cultivos bacterianos tratados con la CMB del nanomaterial son reincubados en medio fresco sin nanomaterial. La presencia o ausencia de crecimiento en medio líquido (medido por DO600) y en medio sólido permite identificar si el efecto fue bacteriostático (recuperación del crecimiento) o bactericida (ausencia de crecimiento).

Fuente: Elaboración de los autores.

Tiempo de acción y capacidad de reúso de los nanomateriales como microbicidas

La efectividad de un nanomaterial como agente antimicrobiano depende tanto de su concentración como del tiempo de exposición requerido para eliminar los microorganismos (Jaime-Acuña, 2016). Comprender el tiempo de acción bactericida y la capacidad de reúso de los nanomateriales es clave para su aplicación en procesos sostenibles de descontaminación, tratamiento de agua, sanitización y desinfección. Un nanomaterial ideal no solo debe ser efectivo contra bacterias, sino también mantener su actividad en el tiempo, poder ser recuperado del medio, reutilizado en múltiples ciclos, y confinado en sistemas cerrados o reutilizables, con el fin de evitar su dispersión y reducir su impacto ecológico. Estas características permiten diseñar metodologías que tengan un uso racional y seguro de los nanomateriales, prolongando su vida útil y reduciendo la generación de residuos tóxicos.

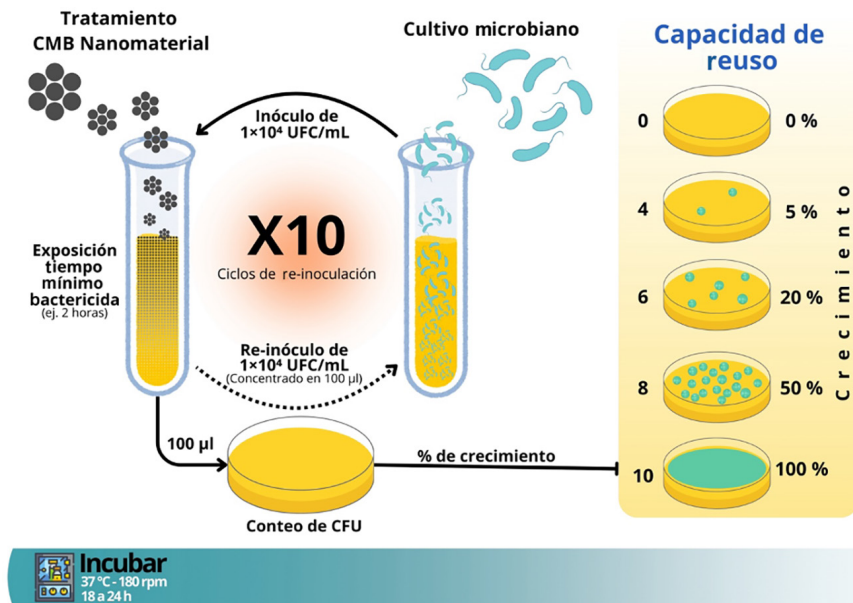
Para determinar el tiempo de acción bactericida, se expone un cultivo bacteriano ajustado a una densidad conocida (1×10^4 UFC/mL) a la concentración mínima bactericida (CMB) previamente establecida del nanomaterial. A partir de ese momento, se toman muestras del cultivo cada hora durante un periodo de 12 a 16 horas. Cada alícuota se siembra en placas con agar nutritivo (por ejemplo, LB agar) y se incuba toda la noche a 37 °C. El tiempo mínimo en el cual no se observa crecimiento bacteriano en las placas se define como el tiempo de acción bactericida del nanomaterial.

En cuanto a la capacidad de reúso, esta se evalúa midiendo cuántos ciclos de exposición bacteriana puede resistir el nanomaterial manteniendo su actividad antimicrobiana. Para ello, un cultivo bacteriano ajustado a 1×10^4 UFC/mL se expone a distintas concentraciones del nanomaterial (por ejemplo, CMB, $\text{CMB} \times 2$ y $\text{CMB} \times 3$). Cada 2 horas, durante un periodo de hasta 20 horas, se toma una muestra de 10 μL del cultivo para inocular en LB agar y evaluar la viabilidad bacteriana mediante el crecimiento. Simultáneamente, justo después de la toma de muestra, se reinocula el cultivo con la misma cantidad de bacterias iniciales, permitiendo así desafiar continuamente al nanomaterial con una nueva carga microbiana. El número de ciclos en los cuales el nanomaterial mantiene su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano determina su potencial de reúso. Esta metodología permite valorar de forma experimental la duración funcional del nanomaterial y su posible integración en plataformas de aplicación continua o reciclable (Jaime-Acuña, 2016).

Concentración efectiva

Para evaluar la influencia de la densidad celular inicial en la eficacia antimicrobiana, se diseñó un protocolo en donde cultivos bacterianos ajustados a diferentes concentraciones de inóculo (1×10^4 hasta 7×10^8 UFC/mL) fueron expuestos a la concentración mínima bactericida (CMB) previamente deter-

Figura 3. Evaluación de la capacidad de reutilización del nanomaterial con actividad antimicrobiana.



Se sometió a los nanomateriales a 10 ciclos consecutivos de exposición a cultivos microbianos (*Gram+* o *Gram-*), seguidos de reinóculo con una concentración estándar (1×10^4 UFC/mL). Se determinó el efecto residual antimicrobiano mediante conteo de UFC y análisis del porcentaje de crecimiento microbiano tras cada ciclo.

Fuente: Elaboración de los autores.

minada para el nanomaterial. Posteriormente, se realizaron inoculaciones en agar LB e incubaciones en condiciones estándar (37 °C, 18–24 h), con el objetivo de registrar el crecimiento residual y estimar la efectividad bactericida.

Este protocolo evidencia que la actividad bactericida de un nanomaterial depende directamente de la densidad inicial del inóculo. A manera de ejemplo, Jaime-Acuña *et al.* (2016) reportaron que mientras a 1×10^8 UFC/mL se observa un efecto inhibitorio parcial, a 7×10^8 UFC/mL la acción del nanomaterial fue comparable al control negativo (crecimiento bacteriano), indicando que la CMB resulta ineficiente a concentraciones tan elevadas. Además, en los casos en que la CMB inicial no logró inhibir completamente el crecimiento, se determinó una nueva CMB ajustada para cada inóculo alto, obteniéndose valores de 9 µg/mL y 15 µg/mL de nanomaterial para inóculos de 1×10^8 y 7×10^8 UFC/mL, respectivamente, confirmando que la efectividad bactericida de un nanomaterial depende directamente de la densidad inicial del inóculo.

La relevancia de este ensayo radica en que establece los límites de acción de los nanomateriales frente a diferentes cargas microbianas, un aspecto crítico para su aplicación en escenarios reales de desinfección, tratamiento de agua o sanitización, donde las densidades bacterianas pueden variar conside-

rablemente. Asimismo, aporta información esencial para determinar dosis más realistas y ajustadas al contexto de uso, evitando tanto la subestimación de la toxicidad como la sobreexposición innecesaria al nanomaterial.

Conclusión

El uso de bacterias como modelos biológicos se ha consolidado como una herramienta valiosa y accesible para evaluar la toxicidad de nanomateriales con potencial antimicrobiano. Para que estos estudios generen resultados confiables y comparables, es clave adoptar metodologías estandarizadas, como las pruebas de microdilución, determinación de concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas, así como ensayos que permitan distinguir entre efectos bacteriostáticos o bactericidas.

Estos protocolos no solo permiten describir con mayor precisión los efectos tóxicos de los nanomateriales, sino que también abren la puerta a investigaciones más profundas sobre sus mecanismos de acción y las posibles respuestas adaptativas de los microorganismos expuestos.

Además, para avanzar hacia una comprensión más integral de su impacto ecológico y clínico, es indispensable establecer criterios uniformes. Esto incluye una caracterización fisicoquímica detallada del nanomaterial —como tamaño, forma, carga superficial y composición— hasta condiciones experimentales consistentes: medios de cultivo, concentración del inóculo bacteriano y parámetros definidos de exposición.

Contar con estas bases comunes permitirá no solo realizar comparaciones más precisas entre estudios y tecnologías, sino también optimizar el desarrollo de aplicaciones más seguras.

Contribución de autorías

Alejandro Huerta-Saquero y Anaid Meza-Villezcás: concepción y diseño del artículo; desarrollo metodológico; minería de datos, análisis e interpretación; revisión y edición final del texto.

Alejandro Huerta-Saquero: redacción del borrador original.

Referencias

- Alizadeh, M. Q. (2025). Understanding the ecological impacts of nanoparticles: risks, monitoring, and mitigation strategies. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 10(6). <https://doi.org/10.1007/s41204-024-00403-7>.
- Cheeseman, S., Christofferson, A., Kariuki, R., Cozzolino, D., Daeneke, T., Crawford, R., Elbourne, A. *et al.* (2020). Antimicrobial metal nanomaterials: from passive to stimuli-activated applications. *Advanced Science*, 7(10). <https://doi.org/10.1002/advs.201902913>.
- Delgado-Beleño, Y., C. E. Martínez Núñez, N. S. Flores López, A. Mesa-Villezcás *et al.*

- (2021). Characterization of silver nanoparticles encapsulated using an ion-exchange-mediated method and their application as antimicrobial agents. *Journal of Electronic Materials*, 50: 5632-5638. <https://doi.org/10.1007/s11664-021-09089-y>.
- Dong B., B. S. (2014). Silver confined within zeolite EMT nanoparticles: preparation and antibacterial properties. *Nanoscale*, 18. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4NR03169E>.
- Ferreira L., F. A. (2012). Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous Mesoporous Mater.* Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.006>.
- Guerra R., L. E. (2012). Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolites. *Microporous Mesoporous Mater.* Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.06.031>.
- Jaime-Acuña, A. Meza-Villezcás, M. Vasquez-Peña, O. Raymond-Herrera, H. Villavicencio-García, V. Petranovskii, R. Vázquez-Duhalt, A. Huerta-Saquero. (2016). Synthesis and complete antimicrobial characterization of CEOBACTER, an Ag-based nanocomposite. *PLOS One*, 11(11), e=166205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166205>.
- Jiraroj D., T. S. (2014). Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity. *Powder Technology*, 264(septiembre): 418-422. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591014005166>.
- Madigan, Michael T., J. M. (2014). *Brock biology of microorganisms*. <http://www.pearsonhighered.com/bookseller/product/Brock-Biology-of-Microorganisms-14E/9780321897398.page>.
- Maillard J. Y., Philippe Hartemann. (2013). Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4). <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/1040841X.2012.713323>.
- Matsumura Y., Y. K. (2015). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4278-4281.2003>.
- Meza-Villezcás, Anaïd, Ana L. Gallego-Hernández, Fitnat H. Yildiz, Oscar E. Jaime-Acuña, Oscar Raymond-Herrera, Alejandro Huerta-Saquero. (2019). Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholera* lifestyles: pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. *PLOS One*, 14(6), e0217869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217869>.
- Meza-Villezcás, Anaïd, Rommel A. Catrballo-Castañeda, Aldo Moreno Ulloa, Alejandro Huerta-Saquero. (2022). Metabolomic profiling of the responses of planktonic and biofilm *Vibrio cholerae* to silver nanoparticles. *Antibiotics*, 11(11), 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111534>.
- Murray, Patrick, K. R. (2012). *Medical microbiology*. <http://www.elsevier.com/books/medical-microbiology/murray/978-0-323-08692-9>.
- Pankey G. A., S. L. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6): 864-870. <https://doi.org/10.1086/381972>.
- Pious, Thomas, Aparna C. Sekhar, Reshmi Upreti, Mohammad M. Mujawar, Sadiq S.

- Pasha. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8: 45-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003> .
- Rozhin, A., Batasheva, S., Kruchkova, M., Cherednichenko, Y., Rozhina, E. y Fakhrullin, R. (2021). Biogenic silver nanoparticles: synthesis and application as antibacterial and antifungal agents. *Micromachines*, (12)12, 1480. <https://doi.org/10.3390/mi12121480>.
- Sezonov G., J.-P. D. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23). <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>.
- Vázquez-Muñoz, R., A. Meza-Villezcás, P. G. J. Fournier, E. Soria Castro, K. Juárez Moreno *et al.* (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLOS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904>.