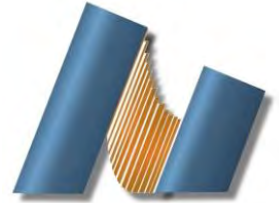




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOMATERIALES ANTIMICROBIANOS PARA SU USO EN
LA CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
RAMIRO MARTÍN MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. ALEJANDRO HUERTA SAQUERO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

*RAMIRO MARTÍN MARTÍNEZ
RODRÍGUEZ*

DEDICADO:

A ti que me diste tu vida, tu amor y tu espacio.

Y a ti semillero de vida, paz y amor.

**A ustedes 3 que son bases insustituibles de felicidad,
amistad y tolerancia.**

**A ustedes 6 y medio, el mundo es de ustedes vayan
por él.**

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Oscar Raymond y al Dr. Oscar Jaime por el apoyo para sintetizar el Ceobacter usado en este trabajo, gracias por la confianza y por su ayuda en cuestiones técnicas- científicas ya que siempre estuvieron abiertos a guiarme en el camino para encontrar la respuesta que necesitaba

A los técnicos de la Unidad de Nanocatacterización del CNyN. Francisco Ruiz, Jaime Mendoza. Israel Gradilla y Eloisa Aparicio, muchas gracias por su apoyo técnico y soportarme con las preguntas y por ayudarme a entender que es lo que quería y necesitaba con los equipos.

Anita Misquez muchísimas gracias por apoyarme cuando no tenía espacio en el bionanolab para poder trabajar, por los materiales prestados y por tu plática siempre amena y positiva.

Gracias a los encargados de cómputo Juan, Aritz y Aldo. A servicios generales, al jefe Efraín y al otro jefe Joaquín muchas gracias por esos cafés, pláticas, consejos, ayuda técnica.

A mis compañeros de la 1ra generación por tantos buenos y excelentes momentos. A mis compañeros de la 3ra generación por compartir conmigo esas clases de recursamiento. A los de las demás generaciones, ¡Sí se pudo!

A mis profesores que me ayudaron a entender todo esto de la nanotecnología pero sobre todo por enseñarme a ser alguien preocupado por la ciencia y la sociedad así como enseñarme que si no se haces lo que te gusta en mejor que no lo hagas.

A las técnicas de bionano, la Dra. Katrin Quester e Itandehui Betanzo muchas gracias por todo su apoyo en las actividades del laboratorio y sobre todo gracias por entender mi falta de amor por las mañanas y mi llegada tarde. A los compañeros de bionano que sin duda siempre que pudieron estaban apoyándome. Ana Rodríguez muchas gracias por todo, por estar en esos momentos personales de tan mal sabor y por las palabras que me permitieron mantener la vista hacia adelante y con la cabeza en alto gracias infinitas.

A los meros meros de bionano: Dr. Rafael Vázquez muchas gracias por formar parte del comité de tesis y gracias por invitarme al proyecto del barco por el golfo que me hizo abrir

la mente y ver otra manera de hacer ciencia. Dr. Rubén Cadena, gracias por formar parte del comité y por aquellas pláticas no solo de ciencia sino de política, comedia, películas, comida y SALSAS. (Me falta uno pero ese va después).

A los compañeros del grupo de Alejandro, los que estuvieron y los que están, pero en especial los que estamos ahorita, Cris, Iván, Anaíd (millones de gracias por ser quien me enseñó todos los qué sí hacer y qué no hacer en el laboratorio), Roberto gracias por formar parte del comité, por las interesantes pláticas y por ensuciar mi mesa siempre xD.

Gracias a mis amigos los gorditos 2.0 que sin duda alguna fueron parte importante de este trabajo. Raúl, Josué, Roberto, Juan, Paco, Dieguito, Belman, Karla, Laura, Cinthya, Flor y Iván.

Agradecimiento muy especial a mis amigos de Pulso Urbano que fueron sin duda un motivo para seguir aquí, en especial a Angy y Alan muchas gracias por tooooooo, absolutamente todo.

Agradecimiento super extra especial a Wendy y Silvia. NO tendré forma alguna, jamás de pagar **TODO** el apoyo que me brindaron desde que llegué, este trabajo es tan suyo como mío, miles y millones de gracias hoy, mañana y hasta el día que me muera.

Al Dr. Alejandro Huerta, gracias jefe por ser un maestro, amigo, hermano, por el apoyo, la confianza que me tuviste en un momento ni yo mismo me tenía, por las risas, los permisos para salir al barco, por los regaños, por las chelas y por ser un ejemplo a seguir.

A mis papás y hermanos que siempre fueron un sostén enorme para que pudiera llegar hasta este momento, sin ustedes no estaría hoy escribiendo esto, esto es suyo también, gracias por la vida, las risas, las lágrimas, por soportar esa despedida en 2011 tan difícil pero que nos volvió mucho más fuertes. Los quiero, los amo y los llevo conmigo en cualquier instante.

Al proyecto PAPIIT IN204815 y al proyecto UC-Mexus CONACYT CN1546 por el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.

Y por último pero no menos importante muchas gracias a ti mi UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Por ser mi casa desde el 2008, por dejarme ser parte de ti, por

formarme como ciudadano, estudiante y científico. Por demostrarme a siempre luchar y no rendirse, por enseñarme que siempre, hasta el fin el de los tiempos POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

Y aquellos que se le olvidaron a esta mente cansada de escribir. GRACIAS.

Contenido

Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Patrimonio cultural	1
1.2 Deterioro.....	2
1.3 Biodeterioro	4
1.3.1 Biodeterioro por microorganismos	5
1.3.2 Formación de biopelículas	7
1.4 Restauración.....	8
1.4.1 Métodos físicos.....	9
1.4.2 Métodos biológicos	9
1.4.3 Métodos químicos.....	10
1.5 Nanotecnología y restauración	11
1.5.3 CEOBACTER	12
Capítulo 2.....	15
2.1 Hipótesis.....	15
2.2 Objetivo General.....	15
2.3 Objetivos particulares	15
Capítulo 3 Técnicas y procedimiento experimentales.....	16
3.1 Síntesis de Ceobacter.....	16
3.2 Procedimiento de adición de Ca	16
3.3 Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida	16
3.4 Ensayo en probetas.....	18
3.4.5.1 Crecimiento de Cianobacterias	19
3.4.5.2 Crecimiento de E. coli	19
3.4.5.3 EMCA	19
3.4.5.4 Protocolo conservación.....	20
Capítulo 4 Resultados y discusión.....	22
4.1 Análisis estructural de los nanocompuestos mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	22
4.2 Análisis estructural de los nanocompuestos, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)	25
4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) de los nanocompuestos Ceobacter y Ceobacter+Ca.....	27
4.5 Ensayo de inhibición de crecimiento microbiano sobre Probetas pétreas obtenidas de monumento histórico	29

4.6 Comprobación del crecimiento microbiano sobre las probetas, mediante Estampados en medios de cultivos sólidos.....	38
Capítulo 5 CONCLUSIONES	44
Capítulo 6 PERSPECTIVAS.....	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	49
ANEXO 1 PROTOCOLO MEDIO DE CULTIVO LURIA BERTANI (LB) LÍQUIDO Y SÓLIDO.....	49
ANEXO 2 PROTOCOLO MEDIO DE CULTIVO BG11 LÍQUIDO Y BG11A SÓLIDO	51
ANEXO 3 RESULTADOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE CEObACTER Y CEObACTER+CA	54
ÍNDICE DE FIGURAS	57
ÍNDICE DE TABLAS	58

Capítulo 1 Introducción

1.1 Patrimonio cultural

La Real Academia Española (RAE) define el Patrimonio Histórico como un: —Conjunto de bienes de una nación acumulado a lo largo de los siglos, que por su significado artístico, arqueológico, etc., son objeto de protección especial por la legislación

(Hutnik, 2012) menciona que el patrimonio cultural de un pueblo, lo comprenden todas las obras materiales y no materiales que surgen del alma popular, del conjunto de valores que dan sentido a la vida y que expresan la creatividad de ese pueblo. Por lo que el Patrimonio Cultural está constituido por aquellos monumentos o lugares que tienen valor universal desde un punto histórico del arte y la ciencia.

Las definiciones de la RAE como la de Hutnick son correctas y aceptadas. La definición como tal de patrimonio cultural es un tema aún controversial y de investigación actual; ya que surgen preguntas sobre qué es y qué no es patrimonio cultural, si un patrimonio pertenece a un país o a toda la humanidad, etc. (Vecco, 2010) (CONACULTA, 2013).

En la figura 1 se muestra la clasificación del patrimonio cultural que se divide en patrimonio tangible e intangible, del mismo modo el patrimonio tangible se subdivide en mueble e inmueble. En este trabajo se usará el término patrimonio cultura o simplemente patrimonio, para referirnos al patrimonio cultural tangible inmueble.

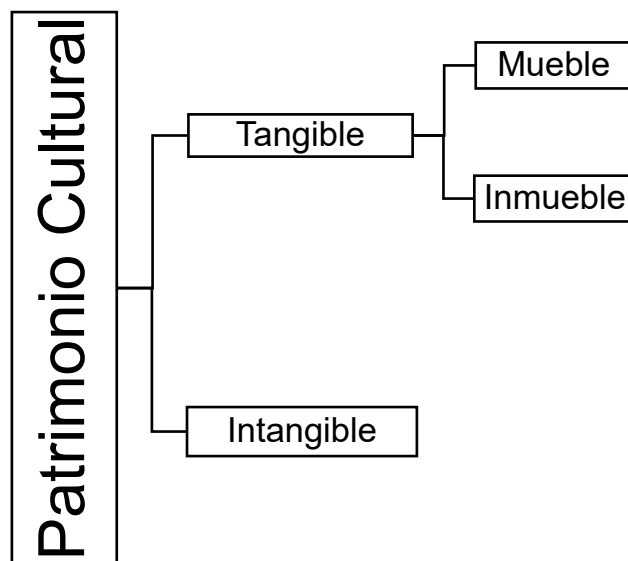


Figura 1 clasificación del patrimonio cultural

La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO por sus siglas en inglés) es un organismo intergubernamental que se encarga de la difusión y reconocimiento del patrimonio cultural, a través de la Lista del Patrimonio Mundial. Hasta el año 2016 México tenía 32 sitios del patrimonio mundial de los cuales 25 son patrimonio cultural tangible y los otros 7 son patrimonios naturales (UNESCO, 2016).

México es un país que tiene un pasado lleno de historia y además posee una gran cantidad de bienes culturales de carácter arqueológico, histórico y artístico que incluyen: documentos, arquitectura, pinturas, esculturas, etc. (UNESCO, 2016). Por lo anterior es que México es un país rico en patrimonio cultural y por lo tanto este trabajo representa una gran importancia.

1.2 Deterioro

El patrimonio cultural se degrada con el paso del tiempo, esto es debido a factores intrínsecos y extrínsecos véase Tabla 1.

Los factores intrínsecos, son aquellos que producen deterioro en el patrimonio debido al tipo y la calidad del material, técnica de manufactura, etc. Por ejemplo, la composición química y mineralógica afecta cuando hay un cambio de pH que propicia un cambio en la solubilidad del material. El fenómeno de cambio iónico, también depende de la composición química. La capacidad de filtración del agua depende de la textura, estructura, la distribución y tamaño de poro del material del patrimonio (Rives & Garcia-Talegon, 2006).

El deterioro por factores extrínsecos es producido por factores externos, causado por circunstancias ambientales, antropogénicas, biológicas o catastróficas (Bringas, 2008).

Los factores extrínsecos tales como la presencia de agua, las sustancias que cambian el pH, los organismos vivos (hongos, bacterias, líquenes, etc.) y finalmente la acción antropogénica, se consideran factores que tienen mayor incidencia en el deterioro del patrimonio.

Degradación de patrimonio cultural	
<i>Factores Intrínsecos</i>	<i>Factores Extrínsecos</i>
Composición	Condiciones ambientales
Estructura	Antropogénicos
Textura	Biológicos
Porosidad	Catastróficos
Tamaño de partícula	

Tabla 1 Factores que determinan la degradación de patrimonio cultural (Rives & Garcia-Talegon, 2006)

El agua es, por ejemplo, un agente dañino debido a que interviene como vehículo para transportar otras sustancias como sales solubles, sustancias contaminantes atmosféricas, también es el medio para el desarrollo de

reacciones químicas o procesos físico-químicos y además favorece el crecimiento de organismos vivos.

1.3 Biodeterioro

El crecimiento de organismos vivos y su interacción con el patrimonio es conocido como biodeterioro. En este proceso ocurren cambios no deseado en las propiedades de un material, causado por la actividad metabólica de los organismos (Borestein, 1994) (Sterflinger & Piñar, 2013) (Saiz Jimenez & Ariño, 1995).

El biodeterioro se ha observado en construcciones a través de la historia, incluso se menciona en la biblia en *Levítico 14:36-37* como la presencia de manchas verdes o rojizas en paredes, eran nombradas como “elpra de casa” y posiblemente eran causadas por hongos (Sterflinger & Piñar, 2013) (Saiz Jimenez & Ariño, 1995).

El biodeterioro se clasifica según su causa, por procesos mecánicos o procesos químicos. El biodeterioro mecánico es causado principalmente por el movimiento o crecimiento de un organismo. Por ejemplo, el crecimiento de algunos microorganismos entre capas de piedras que causa una erosión de su superficie. Aunque el biodeterioro mecánico es observado de forma más común en organismos superiores. (Sterflinger & Piñar, 2013) (Caneva, et al., 2008) (Allsopp, et al., 2004) (Ranalli, et al., 2009).

El biodeterioro químico es causado por la interacción entre la composición química del material y las sustancias químicas originadas por la actividad metabólica de organismos. Por ejemplo, el estuco hecho de cal en contacto con ácido sulfúrico forman yeso y ácido carbónico (ecuación 1) que es mucho más soluble que la cal. (Allsopp, et al., 2004)



El biodeterioro estético se observa como una mancha de mugre o suciedad y como su nombre lo sugiere afecta visualmente el material. Además, esta mancha contribuye al desarrollo de microorganismos que posteriormente deteriorarán el material del patrimonio al liberar varios metabolitos intermediarios. Este tipo de biodeterioro se observa con el guano procedente de aves (Urzi & De Leo, 2015), o con el hongo oscuro que crece sobre restos de jabón en cortinas y azulejos del baño (Allsopp, et al., 2004).

1.3.1 Biodeterioro por microorganismos

Existen crecimientos microbianos en forma manchas denominadas *biopelículas* que contienen consorcios de microorganismos y productos derivados de su metabolismo (Allsopp, et al., 2004).

A éstos microorganismos se les conoce como biodeteriόgenos: éstos participan en el biodeterioro y son tanto autótrofos como heterótrofos y colonizan materiales orgánicos e inorgánicos (Caneva, et al., 2008) (Ranalli, et al., 2009). Actualmente se han encontrado una gran cantidad de microorganismos biodeteriόgenos.

A continuación se presenta una tabla con los microorganismos que se les relaciona con el biodeterioro.

Microbial group	Family/genus/species
	<i>Bacillus circulans</i> , <i>B. badius</i> , <i>B. licheni</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. barbaricus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. firmus</i> .
Actinomycetes	<i>Arthrobacter</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microellabosporium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microphylospora</i> , <i>Modestobacter</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardiodes</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> .
Fungi	<i>Arthrobacter (Micrococcus) agilis</i> , <i>Geodermatophilus</i> <i>obscurus</i> , <i>Kocuria rosea</i> , <i>Marmoricola aurantiacus</i> , <i>M. lylae</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. varians</i> , <i>M. halobius</i> , <i>M. agilis</i> , <i>Nocardia restricta</i> , <i>Saccharothrix flava</i> . <i>Acremonium (Cephalosporium)</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Candida</i> , <i>Capnobotryella</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Coniosporium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Dictyodesmium</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Hortaea</i> , <i>Lichentheria</i> , <i>Mucor</i> , <i>Nectria</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phaeococcomyces</i> , <i>Phaeosclera</i> , <i>Phaeotheca</i> , <i>Phoma</i> , <i>Phialostele</i> , <i>Pseudotaeniolina</i> , <i>Rhinocladiella</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Sarcinomyces</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Sporotrichum</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trimmatostroma</i> , <i>Ulocladium</i> . <i>Acremonium murorum</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Capnobotryella</i> <i>renispora</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> , <i>Coniosporium apollinis</i> , <i>C. perforans</i> , <i>C. uncinatus</i> , <i>Exophiala jeanselmei</i> , <i>E. monileae</i> , <i>Hortaea werneckii</i> , <i>Phialophora melinii</i> , <i>Sarcinomyces</i> <i>petricola</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trimmatostroma</i> <i>abietis</i> , <i>Verticillium nigrescens</i> . <i>Aspicilia</i> , <i>Caloplaca</i> , <i>Lecanora</i> , <i>Protoplastenia</i> , <i>Thyrea</i> , <i>Verrucaria</i> , <i>Xanthoria</i> . <i>Caloplaca aurantiaca</i> , <i>C. ceria</i> , <i>C. citrina</i> , <i>C. holocarpa</i> , <i>C. trachyphylla</i> , <i>C. concolor</i> , <i>C. vitellina</i> , <i>Collera</i> <i>crispum</i> , <i>Diploicia canescens</i> , <i>Dirina massiliensis</i> , <i>Lecania rabenhorstii</i> , <i>Lecanora hageni</i> , <i>Ochrolechia</i> <i>parella</i> , <i>Phaeophyscia hirsute</i> , <i>Tephronella atra</i>
Lichens	
Microbial group	Family/genus/species
Algae	<i>Apatococcus</i> , <i>Asterococcus</i> , <i>Cladophora</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Chlorococcum</i> , <i>Coccomyxa</i> , <i>Chrysocapsa</i> , <i>Cyanidium</i> , <i>Dimorphococcus</i> , <i>Eustigmatos</i> , <i>Fragilaria</i> , <i>Gongrosira</i> , <i>Heterococcus</i> , <i>Hormidium</i> , <i>Klebsormidium</i> , <i>Muriella</i> , <i>Nanochlorum</i> , <i>Navicula</i> , <i>Nitzschia</i> , <i>Planktospheria</i> , <i>Pleurococcus</i> , <i>Protococcus</i> , <i>Protoderma</i> , <i>Rhizothallus</i> , <i>Stichococcus</i> , <i>Trentepohlia</i> , <i>Ulothrix</i> . <i>Apatococcus lobatus</i> , <i>Botryochloris minima</i> , <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> , <i>C. elipsoidea</i> , <i>Monodus unipapilla</i> , <i>Oocystis</i> <i>parva</i> , <i>O. marssoni</i> , <i>Protococcus viridis</i> , <i>Stichococcus</i> <i>baciliaris</i> , <i>T. umbrina</i> , <i>Ulothrix punctata</i> .
Cyanobacteria	<i>Arthrospira</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Chlorogloeopsis</i> , Chroococcales, <i>Chroococcidiopsis</i> , <i>Chroococcus</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Gloeocapsa</i> , <i>Gloethece</i> , <i>Hyella</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Mastigocladopsis</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Myxosarcina</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , Oscillatoriales, <i>Phormidium</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Pleurocapsa-group</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Stanieria</i> , <i>Stigonematales</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Xenococcus</i> . <i>Acaryochloris marina</i> , <i>Anabaena variabilis</i> , <i>Gloeocapsa</i> <i>helvetica</i> , <i>G. kuetzingiana</i> , <i>G. rupestris</i> , <i>Lyngbya</i> <i>matensiana</i> , <i>L. aerugineoerulea</i> , <i>Oscillatoria</i> <i>pseudogeminata</i> , <i>O. terebriformis</i> , <i>O. subtilissima</i> , <i>Phormidium lignicola</i> , <i>Stigonema ocellatum</i> , <i>S. hormoides</i> .
Other photosynthetic bacteria	Chloroflexi.
Archaea	<i>Rhodoplanes elegans</i> . Halophilic bacteria: <i>Halobacillus</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Natronobacterium</i>
Chemolithotrophic bacteria	Methanogenic bacteria, methanotrophic bacteria Nitrogen cycle: <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrococcus</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrosoglobus</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospora</i> , <i>Nitrosovibrio</i> , <i>Nitrospira</i> . <i>Nitrobacter vulgaris</i> , <i>Nitrosomonas ureae</i> , <i>Nitrospira</i> <i>moscoviensis</i> . Sulfur cycle: <i>Thiobacillus</i> .
Chemoorganotrophic bacteria	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>T. thiosporus</i> , <i>T. albertis</i> , <i>T. neapolitanus</i> , <i>T. denitrificans</i> . Acidobacteria, <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Holophaga</i> , <i>Melittangium</i> , <i>Pseudomonas</i> , sulfate-reducing bacteria.

Tabla 2 Microorganismos relacionados con el biodeterioro (Scheerer, et al., 2009)

Las cianobacterias son uno de los microorganismos más relacionados con el biodeterioro y la formación de biopelículas, debido a que son fotótrofos, es decir, que utilizan la luz solar como fuente de energía y usan el dióxido de carbono del aire como fuente de carbono (Gaylarde, et al., 2003). Además el crecimiento adecuado de las cianobacterias se ve mejorado cuando hay humedad relativa y temperatura elevadas (Li, et al., 2016).

1.3.2 Formación de biopelículas

El crecimiento de cianobacterias sobre superficies del patrimonio cultural permite la aparición de una biopelícula en forma de un consorcio complejo dividida en microcolonias incrustadas en una matriz polimérica de origen microbiano (Martino, 2016).

Las cianobacterias filamentosas tienen la capacidad de crear estructuras especializadas conocidas como heterocistos (son células sin pigmento que permiten fijar nitrógeno directamente desde el aire), estas estructuras, así como la producción de vainas protectoras, les permiten subsistir en ambientes hostiles, creando una biopelícula (Coutinho, et al., 2015).

La formación de biopelículas es un proceso de desarrollo que implica una serie de pasos continuos: en primer lugar la adsorción de moléculas orgánicas, inorgánicas y iones que acondicionan la superficie para dar paso a la llegada de los microorganismos pioneros que se adhieren al sustrato, ya fijados los microorganismos pioneros en el sustrato, se forman las microcolonias, además, comienza la producción de materia orgánica y sustancias poliméricas extracelulares (SPE), después sigue la incorporación de colonizadores heterotróficos secundarios y al final se lleva el proceso de maduración de la biopelícula con el desarrollo de heterocistos en la biopelícula. (Figura 2)

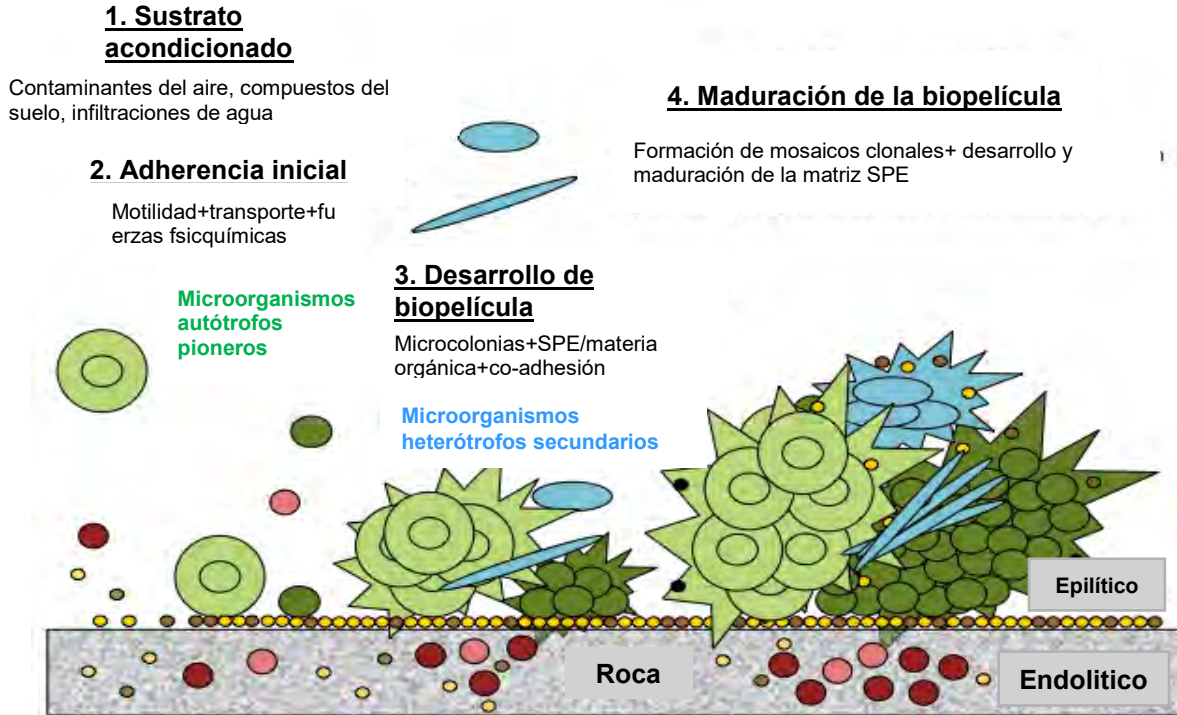


Figura 2 Formación de biopelículas (Martino, 2016). SPE: sustancias poliméricas extracelulares.

La biopelícula es un espacio en el que las células y desecho de la matriz son reciclados y permiten el crecimiento y metabolismo microbiano. Esta manera consorcial de vivir les brinda a los microorganismos, varias ventajas para la resistencia a las tensiones ambientales, también existe un aumento en la comunicación y el intercambio genético entre microorganismos y además crean una resistencia a antibióticos (Hoiby, et al., 2010) (Martino, 2016) (Bridger, et al., 2011).

1.4 Restauración

La restauración del patrimonio cultural se refiere a la intervención humana cuyo objetivo es frenar el deterioro y también proponer soluciones de conservación para mejorar la resistencia de los bienes contra las agresiones del ambiente durante un periodo de tiempo razonable.

En estas intervenciones de restauración contra el biodeterioro se ejerce una acción directa contra los organismos responsables del biodeterioro. Sin embargo, posterior a la restauración, los materiales son colonizados nuevamente. Por lo antes mencionado se reconoce que estos métodos son útiles solo por un periodo corto de tiempo.

La intervención mecánica es el principal método usado contra los biodeteriogenos, es decir, se usan instrumentos manuales como: bisturí, espátulas, cepillos, etc., para la remoción de los microorganismos. Este es un método muy usado ya que no daña el sustrato y es económico, sin embargo no se obtiene una eliminación completa de los biodeteriogenos, además de ser un proceso difícil y prolongado.

Actualmente existen otros métodos que funcionan en la remoción de microorganismos causantes del biodeterioro, métodos clasificados por su principio de funcionalidad: métodos físicos, biológicos y químicos.

1.4.1 Métodos físicos

Estos métodos están basados en el uso de radiaciones electromagnéticas con fines microbicidas usando rayos gamma, rayos UV y las microondas. Los rayos gamma se han utilizado, por ejemplo, para tratar libros con crecimiento fúngico producido después de una inundación. La radiación electromagnética penetra el material a esterilizar. (Sarmiento-Puerto, 2003)

1.4.2 Métodos biológicos

Para estos métodos se utilizan especies parasitarias competitivas para que limiten el crecimiento de otras especies de animales o vegetales, por ejemplo, para evitar la producción de guano y bajar la cantidad de avifauna se utilizan especies que reducen la población de aves.

Se han usado también microorganismos modificados para la restauración del patrimonio, como es el caso de bacterias modificadas que producen carbonatos de calcio, el cual penetra en el material y consolida el patrimonio en un proceso llamado biomineralización (Anbu, et al., 2016).

1.4.3 Métodos químicos

Estos métodos son los más utilizados pero también son los que requieren un mayor cuidado para su aplicación. Para su uso en el control del biodeterioro, éstos químicos se encuentran en forma de gases (fumigantes), polvos y líquidos. Su utilización debe cumplir con ciertos requisitos ya que una gran cantidad de factores influyen en su eficacia.

Los requisitos para el uso de un producto y los factores que influyen en la eficacia se mencionan en las Figuras 3 y 4 respectivamente

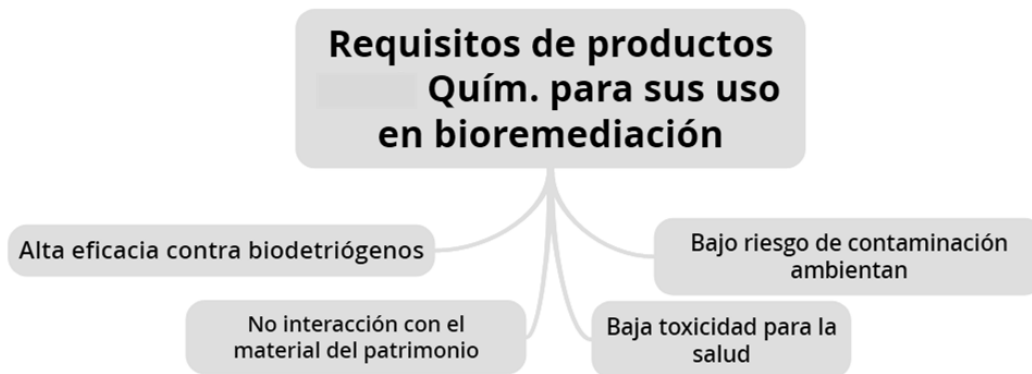


Figura 3 Requisitos de productos químicos para ser utilizados en bioremediación

El cloro es uno de los biocidas más usados debido a su bajo costo, sin embargo a pH alcalino su efectividad es menor. Otros productos biocidas oxidantes también han sido probados como el peróxido de hidrógeno y el ozono, así como otros compuestos halogenados. Compuestos inorgánicos, fenólicos y de amonio cuaternario son usados como bactericidas, fungicidas y alguicidas. Derivados de la urea, diazinas, triazinas piridinas y compuestos

organofosforados son usados como herbicidas. (Allsopp, et al., 2004)
(Sarmiento-Puerto, 2003)

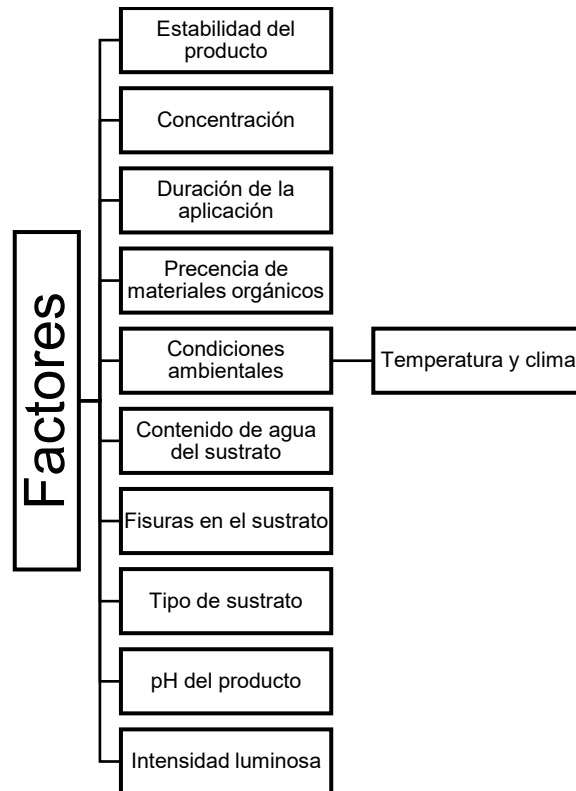


Figura 4 Factores que influyen en la eficacia de los productos químicos

1.5 Nanotecnología y restauración

La nanotecnología en los últimos años ha tomado una gran importancia, de tal manera que es muy común ver desde champús con nanopartículas de plata hasta incluso lubricantes con nanotubos de carbono. Ésta revolución de los materiales ha abierto una posibilidad para aplicaciones que antes no se pensaban, tal es el caso de la ciencia de la restauración de patrimonio cultural (Baglioni, et al., 2015).

La nanotecnología utiliza materiales en una escala comprendida entre los 1 y 100 nm, debido a que a este tamaño, los materiales presentan propiedades

fisicoquímicas diferentes a el material en escala macro (material en bulto) (CCRSERI, 2017).

—b) nanomaterial es aquel que contiene partículas, en un estado no unido o como agregado o como aglomerado y donde, para 50% o más de las partículas en la distribución de tamaños numéricos, una o más dimensiones externas está en el intervalo de tamaños 1 nm - 100 nm.” (Anon., 2017).

Uno de los nanomateriales más estudiados para la restauración de patrimonio cultural son las nanopartículas de hidróxido de calcio, comúnmente usada para consolidación y para desacidificación de frescos y de estuco; es un material a base de cal muy usado por las civilizaciones prehispánicas (Chelazzi, et al., 2012). Las nanopartículas de dióxido de titanio y dióxido de silicio se han utilizado para consolidación de artículos de cerámica (Barberio, et al., 2015). Se han realizado también estudios sobre películas protectoras basadas en un nanocompuesto formado con dióxido de titanio y policarbonato de uretano (D'Orazio & Grippo, 2015).l

1.5.3 CEObACTER

Las zeolitas son aluminosilicatos hidratados cristalinos, con una estructura porosa que tienen un sistema de canales y cavidades uniformes, en los que se encuentran iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} así como moléculas de agua con libertad de movimiento, lo que permite el intercambio iónico y la deshidratación reversible. Poseen un alto grado de hidratación, gran estabilidad en su estructura cristalina, alta capacidad de adsorción física y una baja densidad y un gran volumen de espacios vacíos cuando es deshidratada (Raymond Herrera, et al., 2014).

Las zeolitas son de gran interés económico por su estructura cristalina porosa, estos poros tienen un diámetro muy pequeño entre 0.2 nm y 0.8 nm orientados en dos o tres direcciones, por lo que son usados como tamiz molecular. Así

también son muy utilizadas por la capacidad de intercambiar iones situados en sus poros y canales. Existen casi 40 especies diferentes de zeolitas entre las cuales destaca la mordenita, esta especie tiene una fórmula química $(8\text{Na}^+)(\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96})\cdot 24\text{H}_2\text{O}$, tiene una relación $\text{Si}/\text{Al} = 5$ y se caracteriza por la presencia de dos canales. Uno de 12 miembros con una apertura de 0.65×0.7 nm, y otro de 8 miembros con una apertura de 0.26×0.57 nm. (Hernandez, et al., 2013) (Jaime Acuña, et al., 2016).

Las nanopartículas (AgNPs) de plata son uno de los materiales más estudiados debido a amplia gama de posibilidades de aplicaciones. Las AgNPs son materiales con un alto grado de comercialización en términos porcentuales hasta 2013 el 30% de los productos registrados en las bases de datos de productos con nanomateriales usan AgNPs, esto es debido a que las AgNPs presentan propiedades antibióticas y antivirales (Reidy, et al., 2013) (Vazquez Muñoz, et al., 2017) .

Ceobacter es nanocompuesto formado por nanopartículas de plata adheridas fuertemente en una matriz zeolítica tipo mordenita, en forma de polvo color gris oscuro, con granos en forma esférica de $40 \mu\text{m}$ de diámetro promedio. Este material es sintetizado por un método de Sol-Gel, modificado y se caracteriza porque las nanopartículas de plata se sintetizan cuando se forma el enrejado cristalino en sus poros y nanocanales internos interconectados característicos de las zeolitas (Raymond Herrera, et al., 2014) (Jaime Acuña, et al., 2016).

Las AgNPs embebidas en la matriz zeolítica presentan una ventaja en comparación de las AgNPs libres, debido a que la matriz le proporciona estabilidad química y térmica a las AgNPs, además evita la oxidación y la aglomeración de las AgNPs ofreciendo un nanocompuesto con actividad microbiana en un periodo de tiempo largo (Lv, et al., 2010) (Jaime Acuña, et al., 2016).

Las características que proporciona la matriz zeolítica a las AgNPs descritas anteriormente hacen que Ceobacter sea un candidato excepcional para usarse en intemperie en condiciones de temperatura y humedad relativa altas, estas condiciones condiciones que favorecen el crecimiento de microorganismos (McNamara, et al., 2006).

El color gris oscuro del Ceobacter es un problema cuando se piensa en su uso para la restauración de patrimonio cultural. Los materiales que se usan en la restauración de patrimonio cultural no deben alterar el color o la apariencia del sustrato al cual se aplica.

El tratamiento de calcio para Ceobacter propuesto en este trabajo, pretende brindarle un cambio de coloración, además de proporcionarle propiedades características de los consolidantes como: actuar sin disminuir la porosidad del sustrato, permitir la permeabilidad y aumentar la adherencia de una capa pictórica del sustrato así como tener una alta penetración a la superficie donde se aplica. (Villaseñor, 2016)

Capítulo 2

2.1 Hipótesis

La combinación Ceobacter con calcio dará lugar a un nanocompuesto óptimo para evitar o retrasar el biodeterioro causado por microorganismos en el patrimonio cultural, sin alterar su aspecto.

2.2 Objetivo General

Obtener un nanocompuesto eficaz para combatir el biodeterioro basado en la combinación de las propiedades de Ceobacter y calcio para su aplicación sobre superficies de monumentos históricos.

2.3 Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar de Ceobacter
- Suplementación de Ceobacter con calcio
- Caracterización de las propiedades antimicrobianas de Ceobacter y Ceobacter+Ca por el método de microdiluciones
- Evaluación de la eficacia microbicida contra el establecimiento de un (consorcio de bacterias y cianobacterias) en probetas pétreas de monumentos históricos.

Capítulo 3 Técnicas y procedimiento experimentales

3.1 Síntesis de Ceobacter

Ceobacter fue sintetizado por una variante de Sol-Gel. Se preparó una solución de 110 mL de una mezcla de soluciones acuosas 0.1 M de silicato sódico y sulfato de aluminio (con relación molar $\text{SiO}_2 / \text{Al}_2\text{O}_3$ de 15) que se agitó durante 30 min, posteriormente se mezclaron 30 mL de una solución acuosa 0.25 M de AgNO_3 con la primera solución, al final se le añadió 3 ml de H_2SO_4 . La solución final se metió a una autoclave a 160°C durante 48 h. Posteriormente, la mezcla se lavó a fondo y luego se secó en un horno a 60°C durante 6-8 h.

3.2 Procedimiento de adición de Ca

Para la adición de calcio se preparó una solución 0.25 M de una sal de calcio, en este caso cloruro de calcio CaCl_2 .

Se tomó 500 μg de Ceobacter y se mezcló con 100 mL de la solución 0.25 M de CaCl_2 , se mantuvo en agitación durante 8 h. Posteriormente se filtró con un embudo de buncher, se lavó y se secó en un horno a 60°C durante 8 h.

Tanto Ceobacter como Ceobacter+Ca se caracterizaron por Microscopia Electrónica de Barrido (JEOL JSM-5300), por Microscopia Electrónica de Transmisión (JEOL JEM-2010) y por Difracción de Rayos X (Philips X'pert MPD).

3.3 Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de un antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano y la concentración mínima

bactericida (CMB) es la menor concentración que mata las células bacterianas. Para la determinación de la CMI y la CMB se realizó el siguiente procedimiento de microdiluciones:

Se preparó un stock con CEOBACTER y CEOBACTER-Ca a 500 µg/mL, colocando 17.3 mg de CEOBACTER en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL junto con 1 mL de medio LB estéril. Posteriormente se hizo una dilución 1:5 para tener un stock final de 100 µg/mL. Después a partir del stock final de 100 µg/mL se prepararon los stocks experimentales (tabla 3).

Stock exp.	2 µg/mL	4 µg/mL	6 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL
Stock f.	20 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL
LB	980 µL	960 µL	940 µL	920 µL	900 µL

Tabla 3 Preparación de stock de nanocompuestos

Ya obtenidos los stocks experimentales se preparó el inóculo inicial de 2×10^4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Posterior a esto, se puso en cajas multipozos en orden ascendente 100 µL de cada solución stock y 100 µL del inóculo inicial como lo indica la Tabla 4

#Pozo	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5
100 µL Stock E	2 µg/mL	4 µg/mL	6 µg/mL	8 µg/mL	10 µg/mL
	+	+	+	+	+
100 µL inoc. Inic.	2×10^4 UFC	2×10^4 UFC	2×10^4 UFC	2×10^4 UFC	2×10^4 UFC
	1 µg/ml, 1×10^4 UFC	2 µg/ml, 1×10^4 UFC	3 µg/ml, 1×10^4 UFC	4 µg/ml, 1×10^4 UFC	5 µg/ml, 1×10^4 UFC

Tabla 4 nanocompuesto con *E. coli*

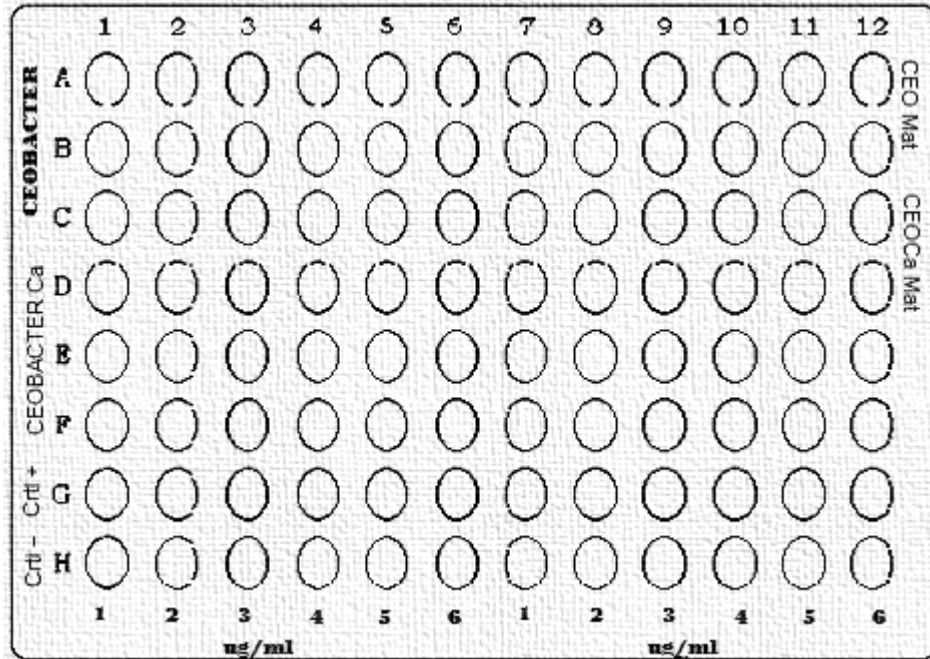


Figura 5 Configuración de la placa multipozo

Una vez realizado el acomodo como lo indica la Figura 5, la placa se incubó a condiciones estándar por 18 horas. Posterior a este tiempo se estampó el contenido de la placa en una caja Petri con medio LBA, para evaluar el crecimiento bacteriano y obtener así la CMB y después se analizó la placa por espectrofotometría a 600 nm, para determinar la CMI

3.4 Ensayo en probetas

Este ensayo consiste en colocar probetas pétreas de aproximadamente 2x1x1 cm inoculadas con un consorcio de bacterias y cianobacterias por un tiempo determinado (11 semanas) en un sistema aislado bajo condiciones ambientales definidas (35°C y 99% HR).

3.4.5 Materiales y Método para ensayo en probetas

- Probetas pétreas
- Medio de cultivo LB (Anexo 1)
- Medio de cultivo BG11 (Anexo 2)

- Cianobacterias (*Nodosilinea spp*)
- *E. coli* (DH5α)
- Pintura mineral con Ceobacter en diferentes concentraciones (10 mg/mL, 20 mg/mL y 40 mg/mL)
- Estación de Medición y Control Ambiental

3.4.5.1 Crecimiento de Cianobacterias

- Cianobacterias del género *Nodosilinea spp.* se crecieron en medio de cultivo BG11 líquido en condiciones estáticas con periodos de luz 12/12 a temperatura ambiente, hasta formar una biopelícula (una semana).
- La biopelícula se resuspendió y se puso en agitación a 180 rpm en las mismas condiciones de luz y temperatura.
- Para dispersar la biopelícula cianobacterias se usó un tubo de ensayo y una varilla de lisis.
- Se filtró en una gasa estéril y se tomó aproximadamente el 25% de la solución final del consorcio.

3.4.5.2 Crecimiento de *E. coli*

- Se creció en medio LB líquido en condiciones estándar
 - 180 rpm, 37 °C, 16-24 h

3.4.5.3 EMCA

La Estación de Medición y Control Ambiental (EMCA) es un dispositivo que controla la Humedad Relativa (HR) y la temperatura en un ambiente aislado, con la finalidad de imitar ambientes naturales para la investigación relacionada con la conservación de materiales.

Consta de dos partes, la Estación de Control Ambiental (ECA) que es la encargada de crear las condiciones de humedad relativa y temperaturas

preestablecidas. Y la Estación de Medición Ambiental (EMA) que es el cerebro de la EMCA y por medio de ella se puede conocer las variaciones de HR y temperatura.

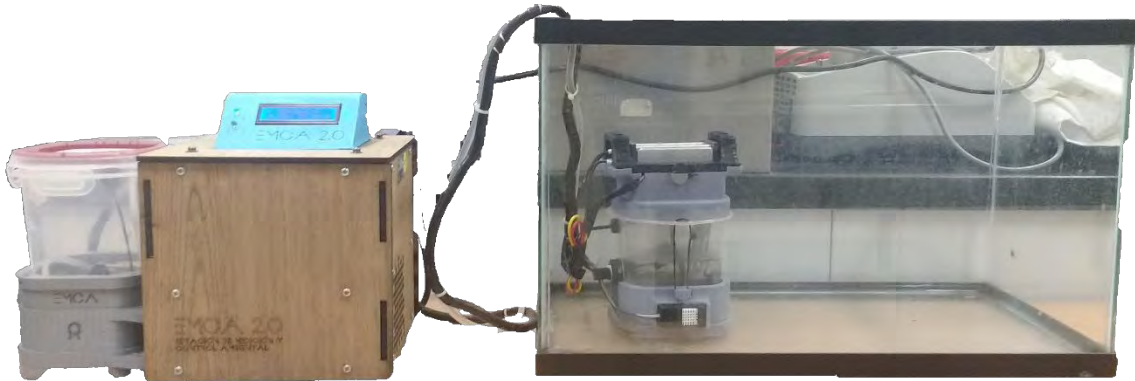


Figura 6 Estación de Medición y Control Ambiental (EMCA)

3.4.5.4 Protocolo conservación

- Se pintaron las probetas pétreas con la pintura mineral en diferentes concentraciones 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$. De Ceobacter y Ceobacter+Ca
- Se ajustó el cultivo *E.coli* a 0.1 U.D.O. a una absorbancia de 600 nm.
 - Para *E.coli* se realizó una dilución 1/100 para obtener una concentración inicial de 1×10^6 bacterias/mL.
- Las probetas pétreas con y sin tratamientos se inocularon con 250 μL de cultivos bacterianos previamente ajustados
- Las probetas se incubaron en la cámara con la EMCA 2.0 con las siguientes condiciones:
 - $T=35^\circ\text{C}$ HR=99%
- Se realizó un análisis fotográfico de cambios cromáticos notables sobre la superficie de las probetas cada tercer día durante aproximadamente 3 meses. Con una cámara Nikon Coolpix P500 con luz artificial y configurada con: ISO 800, apertura F 5.0 y tiempo de exposición de 1/40 segundos.
- Las probetas pétreas se estamparon en medios de cultivos sólidos:
 - LBA (ver anexo 1) se incubaron a condiciones estándar por 24 h.

- BG11A (ver anexo2) se incubaron por 8 semanas a temperatura ambiente con cambios periodos de luz naturales

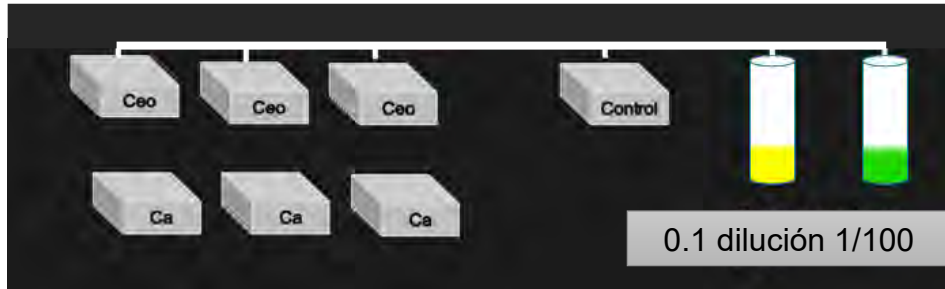


Figura 7 Procedimiento experimental (inoculación de *E. coli* y *Nodosilinea* spp.

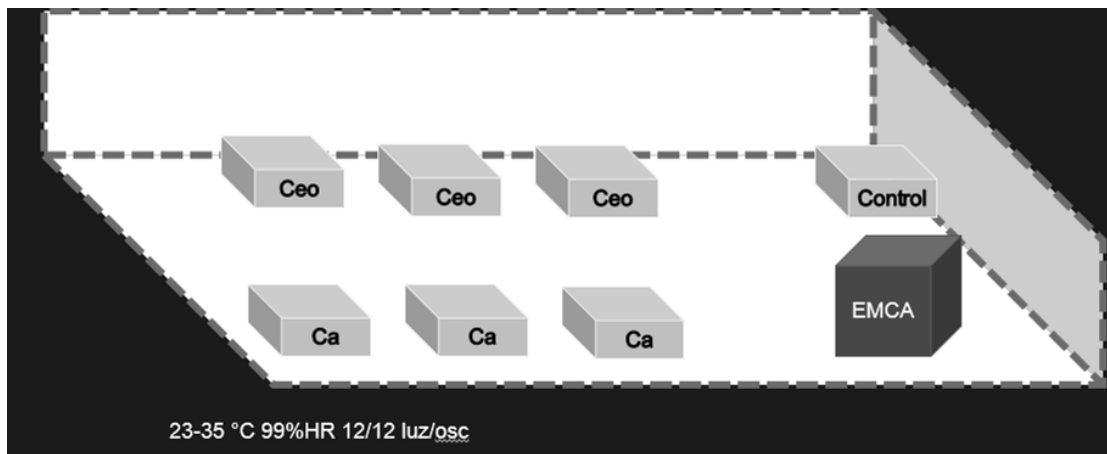


Figura 8 Diagrama del sistema aislado con la EMCA

Capítulo 4 Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica y biológica del Ceobacter y el Ceobacter+Ca sintetizado en este trabajo así como los resultados del ensayo de inhibición de la colonización microbiana en probetas pétreas.

Como primer resultado se presenta en la Figura 9 el aspecto de los nanomateriales sintetizados. Se observa un cambio de color del Ceobacter después del tratamiento con calcio. Se observa que Ceobacter+Ca tiene un color gris claro debido al tratamiento.

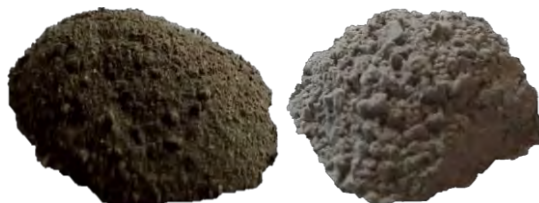


Figura 9 Color de Ceobacter (izquierda) y Ceobacter+Ca (derecha)

4.1 Análisis estructural de los nanocompuestos mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Del análisis de las imágenes obtenidas por MEB de Ceobacter y Ceobacter Ca, podemos observar que presentan una morfología microscópica de polvos cuasi-esféricos de entre 5 y 60 μm (Figura 8 A-F), correspondiente a lo reportado por (Jaime Acuña, y otros, 2016). En la Figura 10B, podemos observar con mayor detalle que el nanocompuesto sintetizado presenta estructuras de aguja características de Ceobacter. En la Figura 10C se presenta una imagen de Ceobacter sintetizado en este trabajo obtenida con la técnica MEB con electrones retrodispersados. En esta imagen se observan dos zonas con diferente contraste: en la zona más clara se muestra la plata que se encuentra en la superficie del material.

De todos los elementos constituyentes de Ceobacter, la Plata es el elemento más pesado. Se identifica dicho elemento por la intensidad de emisión de los electrones retrodispersados que depende del número atómico promedio de los átomos de la muestra, de manera que los átomos más pesados producen una mayor cantidad de electrones retrodispersados y revelan diferencias en la composición química. De esta forma se puede determinar que la zona clara corresponde al elemento Plata.

En la Figura 10D se observa que después del tratamiento de Ceobacter en el que se le adicionó Calcio, no se modifica la morfología de Ceobacter y se mantienen como polvo con forma y estructura similares. En la Figura 10E, se observan capas que representan al empaquetamiento cristalográfico en forma de agujas. La diferencia de texturas con respecto a Ceobacter sin Calcio (Figura 10B), probablemente se deba al recubrimiento superficial de Calcio. Finalmente, en la Figura 10F se observa una imagen de Ceobacter-Ca con electrones retrodispersados, que muestra menor cantidad de zonas claras, correspondientes a la presencia de Plata, en comparación con Ceobacter (Figura 10C), lo que posiblemente se deba al recubrimiento de Calcio.

Para determinar la composición elemental de la superficie de los nanocompuestos Ceobacter y Ceobacter-Ca. Se llevó a cabo un análisis por Espectroscopía de Energía Dispersiva (EED). En la Figura 11 se presentan los resultados correspondientes a Ceobacter, donde se observa que tiene 2.88% de Ag. (Figura 11A); mientras que para Ceobacter-Ca, la composición de Ag es de 0.89%. Esta discrepancia en el porcentaje superficial de Ag quizás se deba a que el recubrimiento con Ca interfiere con la espectroscopía, por lo que consideramos que el porcentaje de Ag en ambas muestras debe ser similar.

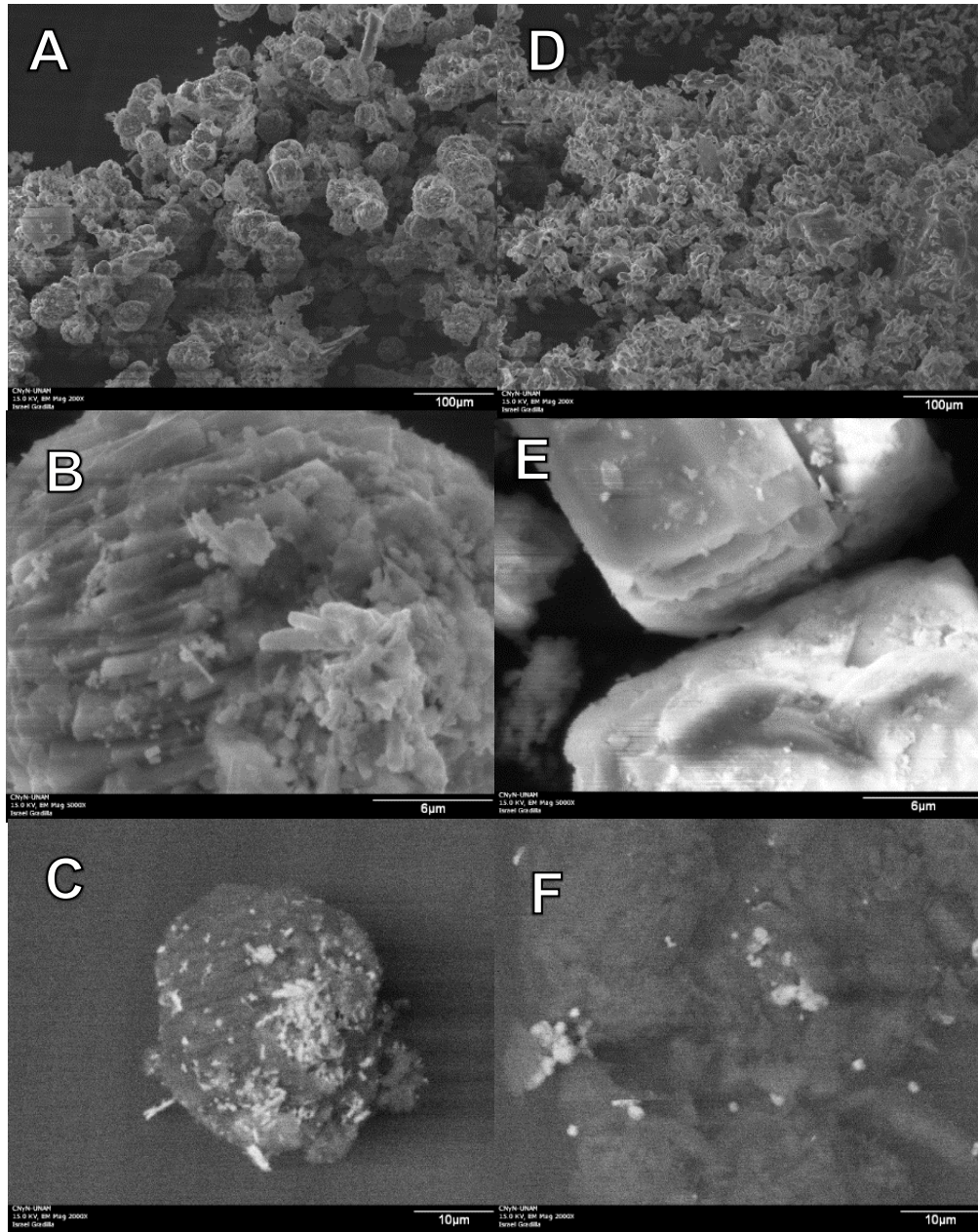


Figura 10 Imágenes obtenidas con MEB A) B) y C) *Ceobacter* y D) E) y F) *Ceobacter*+Ca

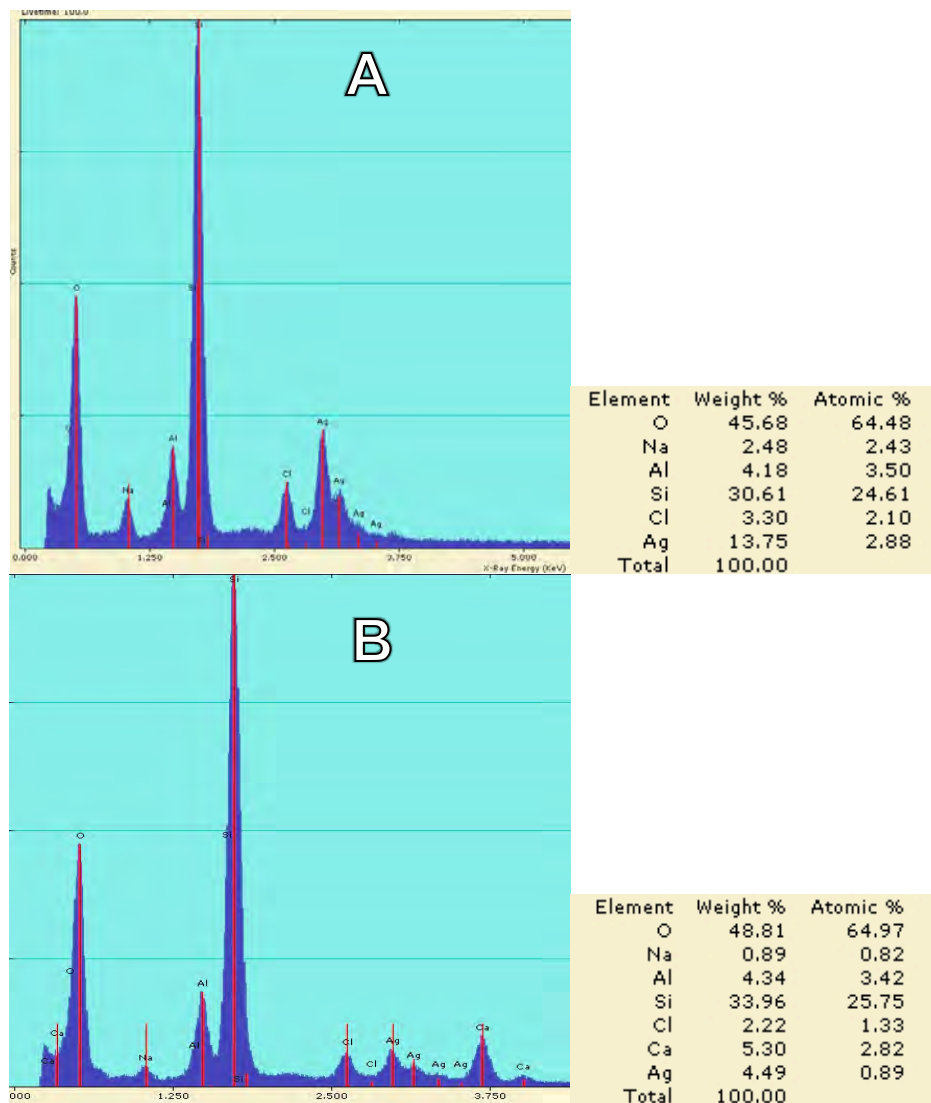


Figura 11 Análisis de EED en MEB de Ceobacter (A) y Ceobacter+Ca (B)

4.2 Análisis estructural de los nanocompuestos, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

En la Figura 12 se muestran en A) y B) micrografías de Ceobacter obtenidas con MET en las que se observan las AgNPs de forma cuasi-esférica en su mayoría de un tamaño entre 2 y 14 nm, distribuidas en la matriz de Zeolita.

En la Figura 12C) y D) se observan las imágenes de Ceobacter+Ca obtenidas con MET y se muestra que el tratamiento de la adición de Calcio no modifica la forma ni la presencia de las AgNPs.

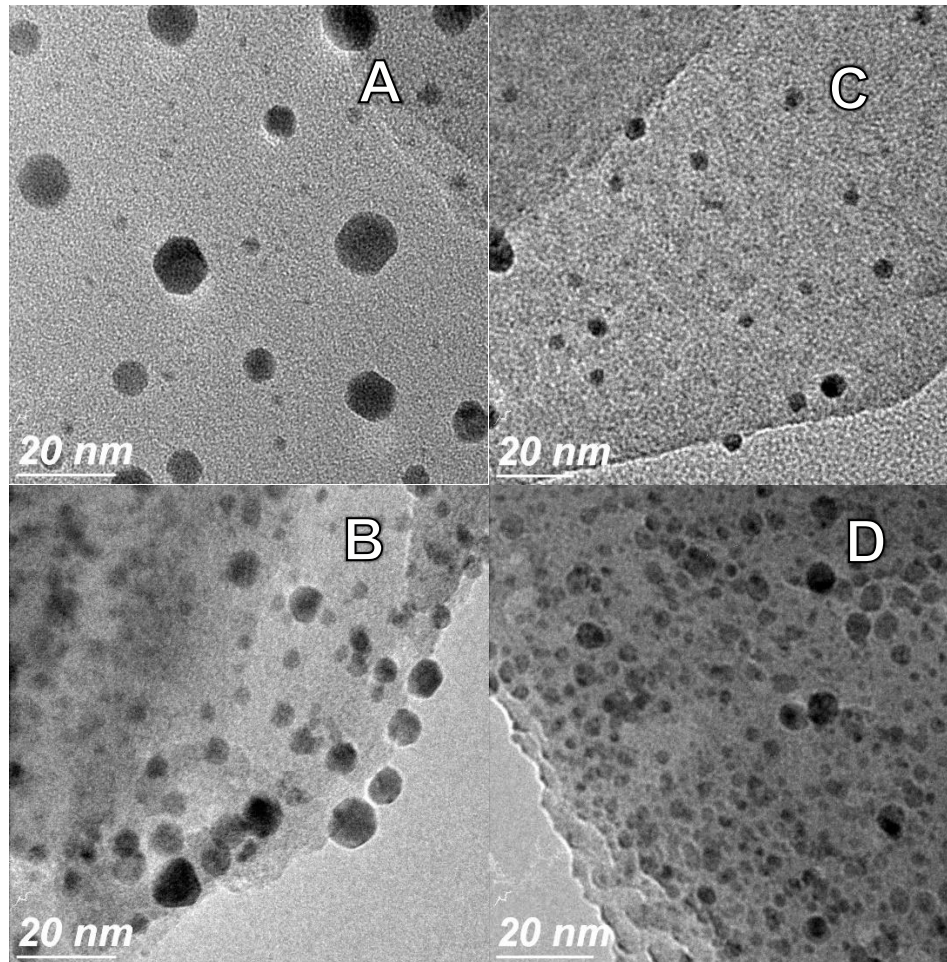


Figura 12 Imágenes obtenidas con MET A) y B) muestra de Ceobacter. C) y D) corresponden a Ceobacter+Ca. Las zonas más densas (oscuras) corresponden a la presencia de AgNPs distribuidas en la superficie de la matriz de Zeolita.

Por medio de análisis en micrografías se pudo determinar que en Ceobacter la mayor cantidad de nanopartículas miden 5 nm de diámetro, aunque se encontraron nanopartículas mayores a 45 nm. (Figura 13). Mientras que para Ceobacter+Ca, se puede observar en la gráfica de la Figura 14 que las AgNPs tienen un tamaño entre 2 y 30 nm. y la mayor cantidad de nanopartículas son las de 4 nm.

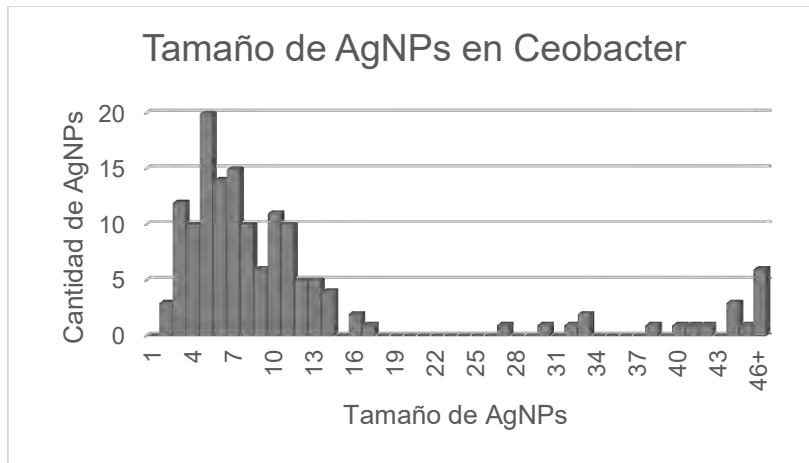


Figura 13 Histograma de frecuencia de tamaños de AgNPs de Ceobacter

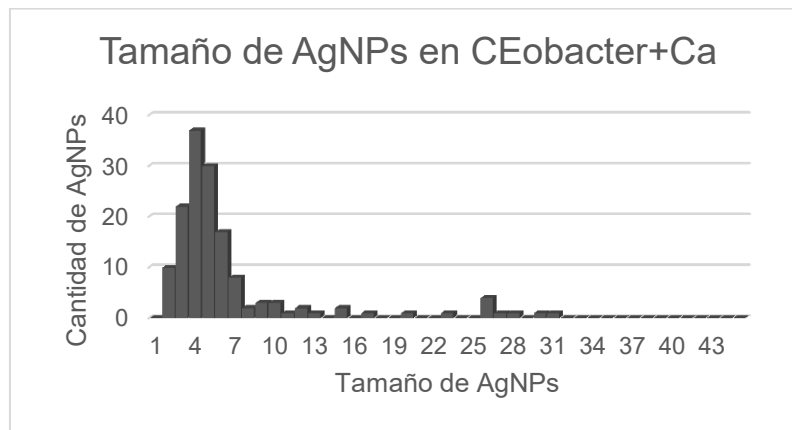


Figura 14 Histograma de frecuencia de tamaños de AgNPs de Ceobacter+Ca

4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) de los nanocompuestos Ceobacter y Ceobacter+Ca

De acuerdo a la literatura, Ceobacter presenta propiedades antimicrobianas (Jaime Acuña, et al., 2016). Mediante la técnica de microdiluciones, se determinó la CMI de los nanomateriales, utilizando a *E.coli* como bacteria modelo. En la Figura 15, se muestra la densidad del crecimiento bacteriano medido mediante espectrofotometría a 600 nm, de cultivos expuestos a diferentes concentraciones de los nanomateriales. Se observa que el Ceobacter sintetizado en este trabajo presenta una CMI de 3 µg/mL, mientras que Ceobacter+Ca tiene una CMI de 2 µg/mL. Lo cual evidencia una mejoría en la

actividad bactericida de Ceobacter después del tratamiento de calcio sobre *E.coli*.

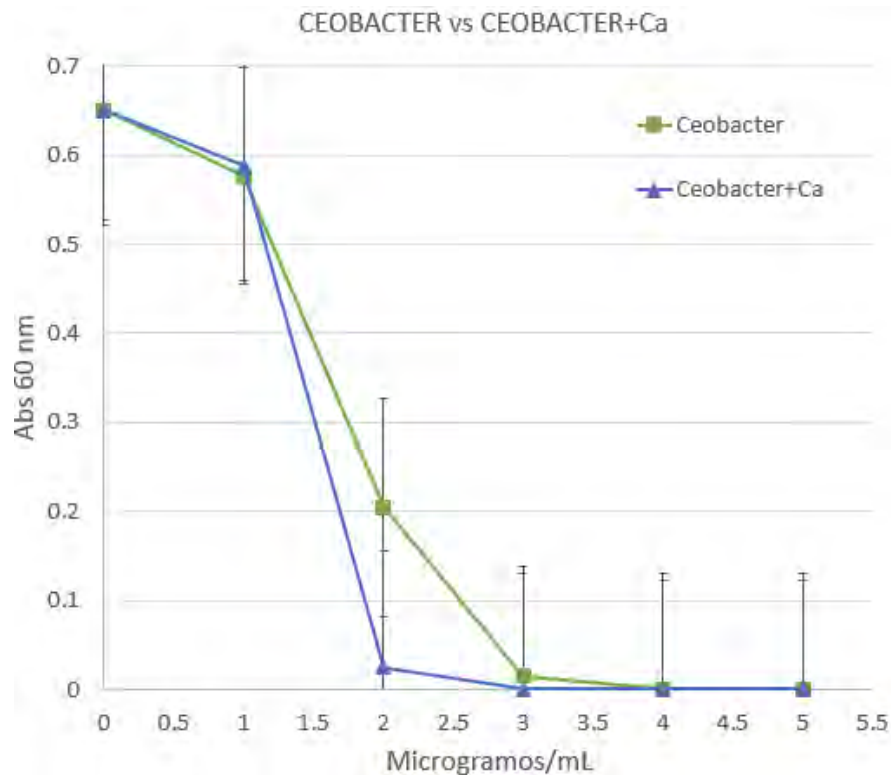


Figura 15 Inhibición del crecimiento de *E. coli* en tratamientos con Ceobacter y Ceobacter+Ca

Por otro lado, se determinó la CMB de Ceobacter y Ceobacter-Ca mediante el cultivo de células expuestas a las diferentes concentraciones de los nanomateriales. Para el caso de Ceobacter, *E. coli* deja de crecer cuando se expone a los 4 µg/mL por lo que esa es la CMB del Ceobacter sintetizado en este trabajo, mientras que Ceobacter+Ca tiene una CMB evidenciada a los 2 µg/mL. Una vez más se muestra una mejora de Ceobacter-Ca, ahora en la actividad microbicida (Figura 16).

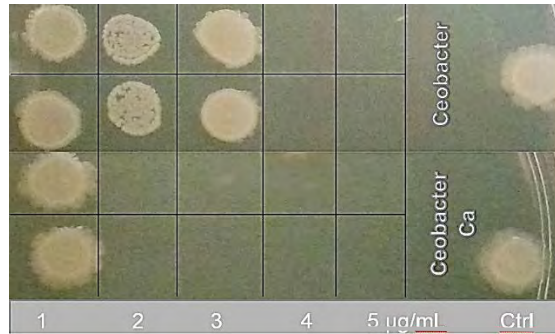


Figura 16 Determinación de CMB de Ceobacter y Ceobacter+Ca

4.5 Ensayo de inhibición de crecimiento microbiano sobre Probetas pétreas obtenidas de monumento histórico

Se realizó un seguimiento fotográfico de las probetas tratadas con Ceobacter y Ceobacter+Ca en las concentraciones de 10, 20, 40 µg/mL. Este seguimiento fotográfico se muestra en las Figuras 17-22.

En la Figura 17 se observa que las probetas tratadas con 10 µg/mL a partir del día 29 en la réplica 1 y 2 se presentan cambios de un color blanco, a un color blanco con tonos grises y con detalles naranjas apenas visibles, que sugieren el inicio de colonización microbiana.

En la Figura 18 se muestra las probetas tratadas con Ceobacter a 20 µg/mL de concentración. En ella se observa un cambio de coloración más evidente que en el tratamiento de 10 µg/mL de Ceobacter. En el día 29 se observa que el material comienza a volverse opaco y en día 59 se puede observar un cambio de color a un rosa tenue, signo de colonización microbiana.

En la Figura 19 se presentan las probetas con Ceobacter a 40 µg/mL. En la réplica 2 en los días 40 y 59 se puede observar en la parte superior derecha una mancha color amarillo que posteriormente se elimina, posiblemente se deba a que se tomaron posterior a la inoculación con cianobacterias. Posterior a eso se observa un cambio de opacidad en las réplicas.

Las probetas con el tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración de Ceobacter+Ca, se muestran en la Figura 20. Las réplicas muestran un cambio notable de coloración con manchas de color naranja a partir del día 59. Sin embargo, en la réplica 2 se observa un cambio aunque menos evidente a menor tiempo, es decir, a partir del día 29 se presenta un cambio en la coloración hasta el final del experimento.

La Figura 21 muestra las probetas tratadas con Ceobacter+Ca a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En las réplicas se observan manchas de color naranja a partir del día 59. Presenta un patrón de decoloración similar al tratamiento de Ceobacter+Ca a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El tratamiento de las probetas con Ceobacter+Ca a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se puede ver en la Figura 22, en la cual, las réplicas 1 y 2 presentan cambios de opacidad desde el día 22.

En la Figura 23 se muestran los controles. En la réplica 1 se observa la formación de manchas de color naranja desde el día 59. En la réplica 2 no se logra apreciar ningún cambio.

Estos cambios de coloración en todas las probetas son debidos a la contaminación con hongos, debido a que las probetas se mantuvieron permanentemente expuestas al medio ambiente y continuamente reinoculadas con el consorcio bacteriano.

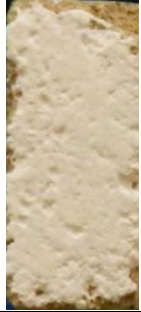
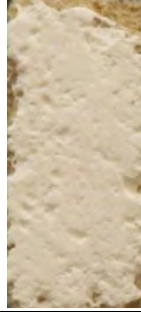








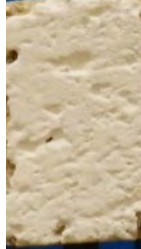
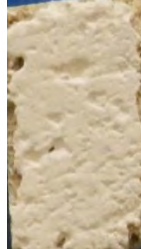
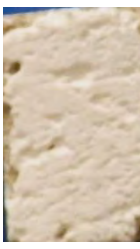

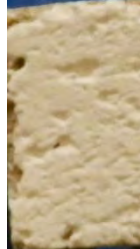





Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 17 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 10ug/mL











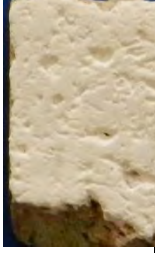









Día R	1	7	10	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 18 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 20 ug/mL











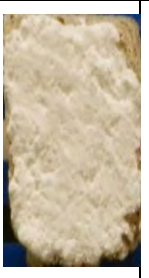








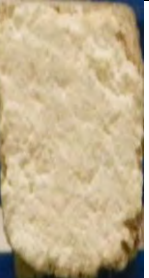
Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 19 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 40 ug/mL
















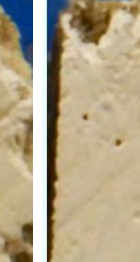




Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 20 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 10ug/mL


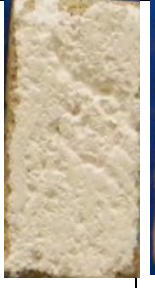








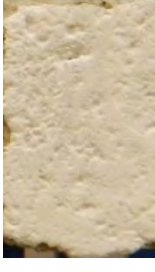



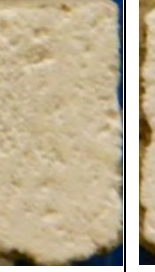
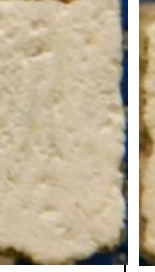




Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 21 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 20 ug/mL












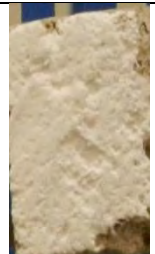






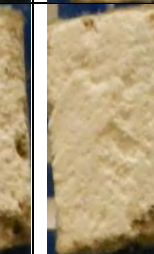

Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 22 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 40 ug/mL



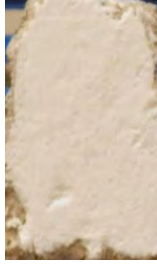

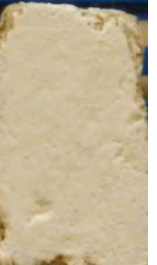
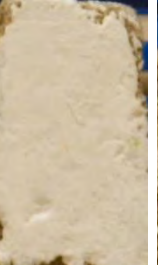

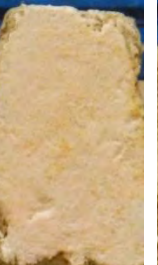







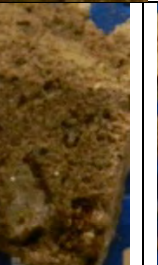




Día R	1	7	13	22	29	40	59	71	80	85
1										
2										

Figura 23 Evidencia fotográfica de los controles

4.6 Comprobación del crecimiento microbiano sobre las probetas, mediante Estampados en medios de cultivos sólidos

Las probetas tratadas con Ceobacter y Ceobacter+Ca, se estamparon en medio LBA, a fin de determinar crecimiento bacteriano y/o fúngico y medio BG11A, para determinar la presencia de la cianobacteria *Nodosilinea spp.*; y se incubaron. Éstos medios sólidos se muestran en las Figuras 24 y 25 respectivamente.

En la Figura 24 se observa que posterior a la incubación y estampado de las probetas tratadas con Ceobacter a sus diferentes concentraciones, se presenta crecimiento microbiano. Mientras que en los estampados de las probetas tratadas con Ceobacter+Ca a 10 µg/mL hay una evidente presencia de microorganismos, en las tratadas con 20 µg/mL de Ceobacter+Ca disminuye visiblemente esta presencia. Más aún, en el estampado de las probetas con 40 µg/mL de Ceobacter+Ca, la presencia de microorganismos es nula.

La Figura 25 representa los estampados después de 8 semanas de incubación de las cajas de medio de cultivo bajo condiciones de luz natural y temperatura ambiente. Se puede observar que en las probetas tratadas con Ceobacter y Ceobacter+Ca a 10 µg/mL y a 20 µg/mL se tiene presencia de microorganismos y son muy similares, mientras que a 40 µg/mL se vuelve evidente que Ceobacter+Ca es mucho más efectivo al reducir significativamente la presencia de microorganismos con respecto a Ceobacter.

En la Figura 26A y 26B se muestran los controles de la réplica 1 y 2 respectivamente en medio LBA 24 horas después del estampado. Se observa que hay presencia de microorganismos. En la Figura 26C y 26D se presentan nuevamente las réplicas 1 y 2 respectivamente en medio BG11A, 8 semanas después del estampado. En la réplica 1 se ve un ligero crecimiento de

microorganismos, sin embargo, en la réplica 2 hay presencia de *Nodosilinea spp.*

Se desconoce la información taxonómica de los microorganismos adheridos a las probetas debido a que sale de los objetivos de este trabajo.

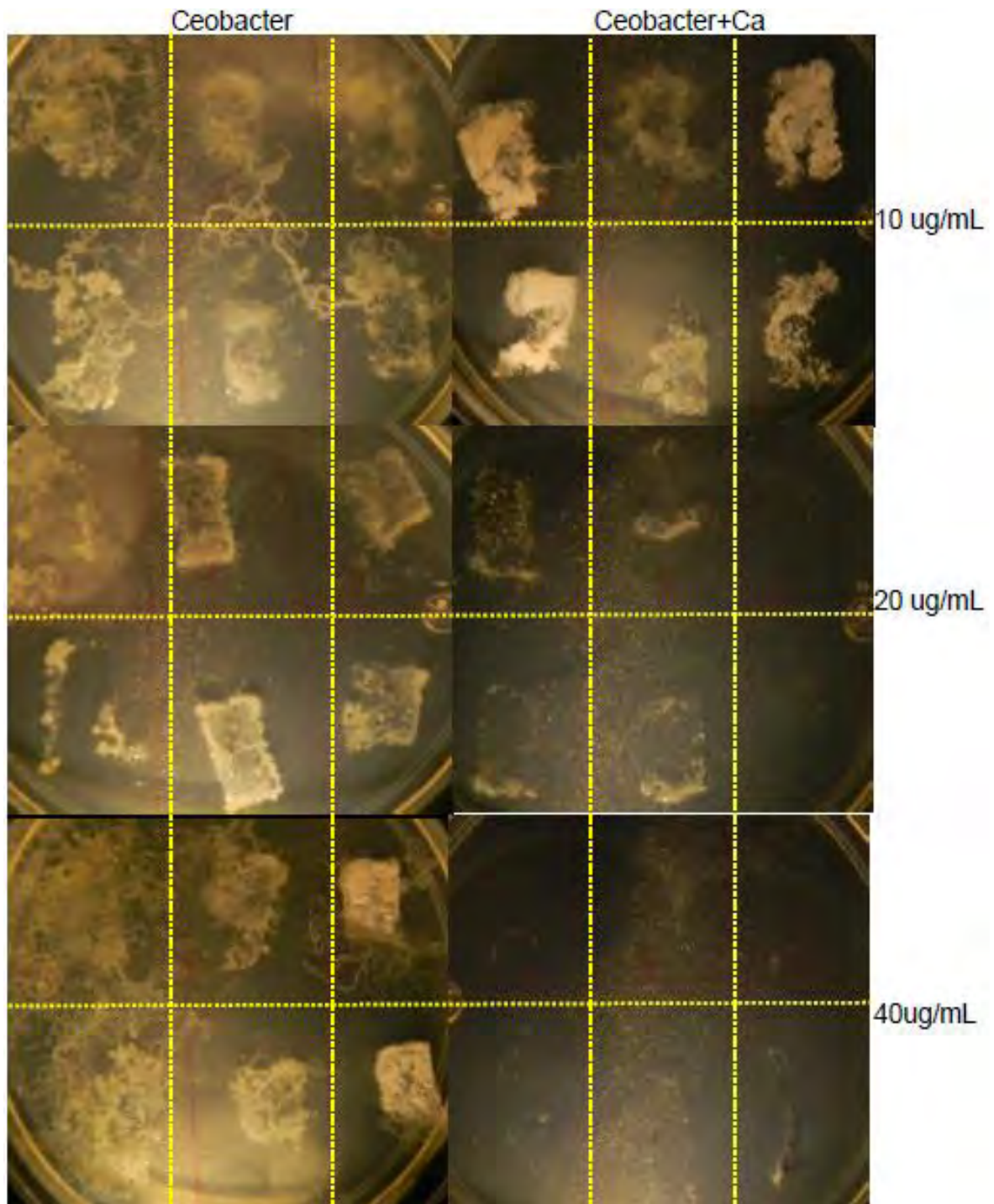


Figura 24 Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio LBA. Comparación entre Ceobacter y Ceobacter+Ca 24 horas después del estampado

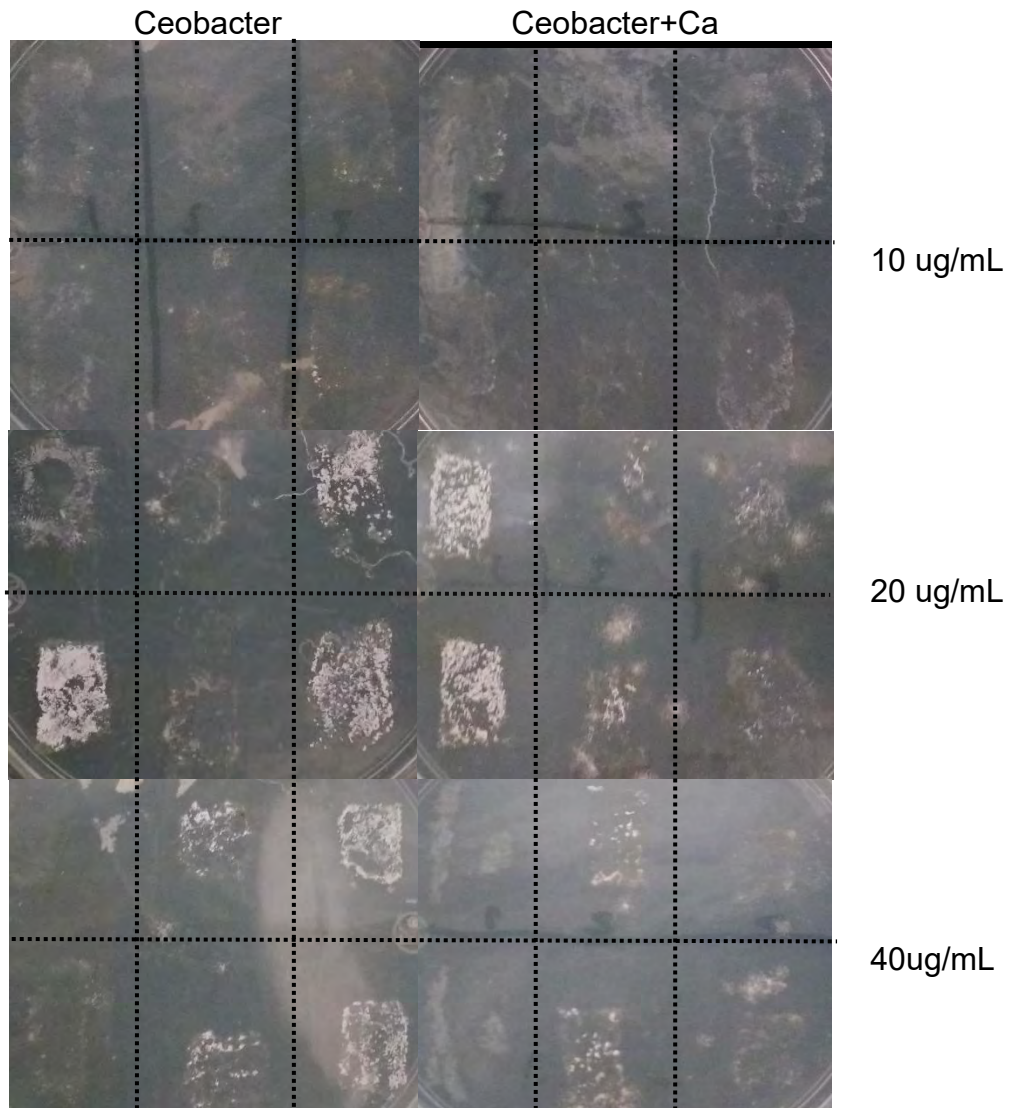


Figura 25 Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio BG11. Comparación entre Ceobacter y Ceobacter+Ca 8 semanas después del estampado

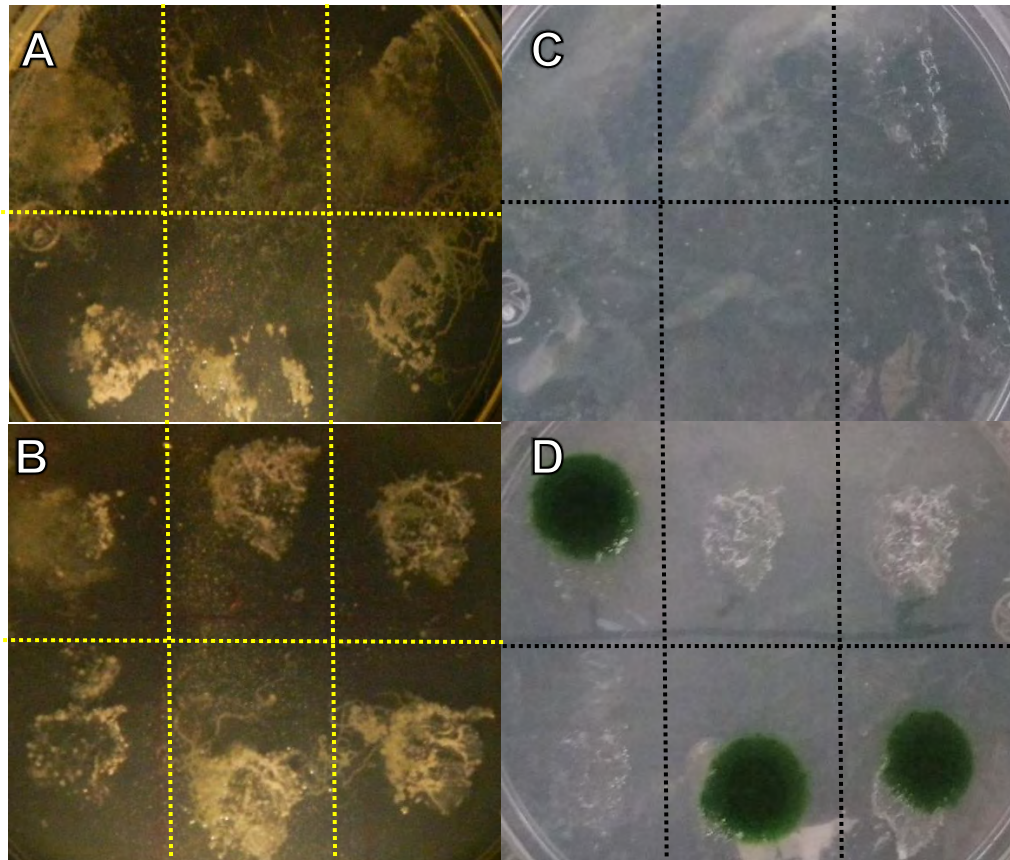


Figura 26 *Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio LBA (A,B) y BG11 (C,D). Comparación entre Ceobacter y Ceobacter+Ca. Controles réplica 1 (A,C) y réplica 2 (B,D)*

Ceobacter+Ca presenta una mejora en sus propiedades microbicidas en comparación con el Ceobacter sintetizado en este trabajo e incluso con el Ceobacter de la literatura (Jaime Acuña, et al., 2016). Esto está basado en los resultados de la CMI y CMB así como los resultados de la comprobación del crecimiento microbiano sobre las probetas, mediante estampados en medios de cultivos sólidos de este capítulo.

Este aumento en las propiedades microbicidas con el tratamiento de calcio podría deberse a la interacción de los iones de calcio con los canales de calcio, actualmente solo se tienen conocimiento empíricos acerca de cómo se ve afectada la célula por el calcio.

El cloruro de calcio añadido a Ceobacter al tener contacto con el medio líquido LB se descompone en iones, estos iones afectan a las bombas de calcio encargadas de mantener una concentración baja de este ion en el espacio intracelular en comparación con el espacio extracelular, al existir una diferencia en el gradiente de concentración se genera un gran aumento de la presión osmótica intra y extra celular causando que los iones calcio entren a la célula. El agua y los cloruros se redistribuyen de tal manera que ocasionan un incremento de tamaño celular el cual sobrepasa la resistencia de la estructura celular, ocasionando el rompimiento de la misma. Se ha observado también que debido a la acumulación de calcio cambia en la permeabilidad de la membrana celular. (Farber, 1990) (Farber, 1990) (O, 2000)

Por otra parte, desde tiempos antiguos se han utilizado pinturas y agua con cal (Hidróxido de Calcio), las cuales poseen propiedades microbidas, atribuidas principalmente a la alcalinidad que mantienen en solución. Si bien la adición de Calcio a CEOBACTER se llevó a cabo mediante Cloruro de Calcio, esta adición podría generar microambientes alcalinos en la estructura zeolítica, que faciliten la liberación de iones de Plata de las nanopartículas, y así potenciar su efecto microbida. Estas posibilidades son objetivo de futuras investigaciones.

Ceobacter que es nanocompuesto de color gris oscuro debido a la plata que se encuentra embebida en la matriz zeolítica. Posterior al tratamiento de calcio Ceobacter presenta un color gris claro (Ceobacter+Ca), sin modificar la estructura del Ceobacter, como se muestra en los resultados de MEB y MET. Además, los resultados del ensayo de inhibición de crecimiento microbiano sobre probetas pétreas obtenidas de monumento histórico, muestran la mayor eficacia de Ceobacter+Ca en comparación con el Ceobacter sintetizado en este trabajo, asimismo se demostró la eficacia del nanocompuesto a temperatura y humedad relativa altas por lo que se propone como un posible material para usarse en restauración y preservación de patrimonio cultural.

Capítulo 5 CONCLUSIONES

- Se logró sintetizar Ceobacter, un nanocompuesto conformado por AgNPs embebidas en una matriz zeolítica.
- Se obtuvo un nuevo nanomaterial nombrado para éste trabajo como **Ceobacter+Ca**, mediante un tratamiento con CaCl_2
- Ceobacter presenta una CMI de $3 \mu\text{g/mL}$ y una CMB de $4 \mu\text{g/mL}$ para cultivos de *Escherichia coli*, mientras que Ceobacter+Ca presenta una CMI y CMB de $2 \mu\text{g/mL}$.
- Ceobacter+Ca presentó actividad antimicrobiana cuando se realizó la evaluación de inhibición en probetas pétreas a partir de una concentración de $20 \mu\text{g/mL}$. Retrasando el crecimiento de microorganismos e incluso la formación de biopelículas.
- Ceobacter+Ca presenta un color gris claro y funciona en condiciones de temperatura y humedad relativa altas, lo que nos permite proponerlo como un posible material para usarse en restauración de patrimonio cultural.

Capítulo 6 PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos para comprobar si Ceobacter+Ca presenta características propias de un material consolidante.
- Debido a que la manera de aplicación es con una pintura de origen mineral y altera el color en superficies pétreas, buscar una alternativa de aplicación en un polímero o con una sustancia incolora.
- Evaluar la eficacia de Ceobacter+Ca para eliminar biopelículas ya consolidadas sobre superficies pétreas.
- Evaluar las propiedades microbidas de Ceobacter+Ca, en la EMCA agregando otras variables como: gases contaminantes, radiación UV, lluvia ácida.
- Evaluar la eficacia de Ceobacter+Ca *in situ* a la intemperie bajo las condiciones reales de un sitio de patrimonio cultural.
- Evaluar el tiempo medio de vida de Ceobacter *in situ*.

BIBLIOGRAFÍA

- Allsopp, D., Seal, K. J. & Gaylarde, C. C., 2004. *Introdution to Biodeterioration*. Cambrige, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J. & So, J.-S., 2016. Formations of calcium carbonate mineral by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, 5(250).
- Anon., 2017. *Definition of nanomaterial*. [En línea] Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm [Último acceso: 17 7 2017].
- Baglioni, P., Giorgi, R. & Chelazzi, D., 2015. *Nanotechnologies in the conservation of cultural heritage*. London: Springer.
- Barberio, M. y otros, 2015. TiO₂ and SiO₂ nanoparticles film for cultural heritage: Conservation and consolidation of cerami artifacts. *Surfaces and coatings technology*, pp. 174-180.
- Borestein, S. W., 1994. *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Pub.
- Brider, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F., 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), pp. 1017-1032.
- Bringas, J. L., 2008. *Apoyo al desarrollo de archivos y bibliotecas de México*. [En línea] Disponible en: <http://www.adabi.org.mx/content/Notas.jsfx?id=389> [Último acceso: 21 02 2016].
- Caneva, G., Nugari, M. P. & Salvadori, O., 2008. *Plant biology for cultural heritage: biodeterioration and conservation*. Los Angeles: Getty Publications.
- CCRSERI, 2017. *Comisión Europea de Salud Pública*. [En línea] Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/es/index.htm [Último acceso: 17 7 2017].
- Chelazzi, D., Poggi, G., Jaidar, Y. & Baglioni, P., 2012. Hydroxide nanoparticles for cultural heritage: consolidation and protection of wall paitings and carbonate materials. *Journal of Colloid and interfaces science*, Volumen 392, pp. 42-49.
- CONACULTA, 2013. *Patrimonio cultural y turismo. Cuadrenos #20 Vigías del patrimonio cultural. Funcamentos para la acción*, México D.F.: CONACULTA.
- Coutinho, M., Miller, A. Z. & Macedo, M. F., 2015. Biological coloniation and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. *Journal of cultural heritage*, Volumen 16, pp. 759-777.

- D'Orazio, L. & Grippo, A., 2015. A water dispersed Titanium dioxide/poly(carbonate urethane) nanocomposite for protecting cultural heritage: -Preparation and properties. *Progress in Organic Coatings*, pp. 1-7.
- Farber, J. L., 1990. The role of calcium in lethal cell injury. *Chemical Research in Toxicology*, Volumen 6, pp. 503-508.
- Farber, J. L., 1990. The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environ Health Perspect.*, Volumen 84, pp. 107-111.
- Gaylarde, C., Ribas Silva, M. & Waescheid, T., 2003. Microbial impact on building materials: an overview. *Materials and Structures*, Volumen 36, pp. 342-352.
- Hernandez, M. A. y otros, 2013. Estructura porosa y propiedades estructurales de mordenita y clinoptilolita. *Superficies y Vacío*, pp. 51-56.
- Hoiby, N. y otros, 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, Volumen 35, pp. 322-332.
- Hutnik, E., 2012. *El patrimonio editorial en la era de la globalización*. [En línea] Disponible en:
<http://www.revistadepatrimonio.es/revistas/numero10/concepto/estudios/articulo.php>
 [Último acceso: 09 07 2016].
- Jaime Acuña, O. E. y otros, 2016. Synthesis and complete antimicrobial characterization of CEObACTER, an Ag-based composite. *PLoS ONE*.
- Li, Q., Zhang, B., He, Z. & Yang, X., 2016. Distribution and diversity of bacteria and fungi colonization in stone monuments analyzed by High Throughput Sequencing. *Plos One*, 11(9).
- Lv, M. y otros, 2010. Long-term antimicrobial effect of silicin nanowires decorated with silver nanoparticles. *Advanced Materials*, Volumen 22, pp. 5463-5467.
- Martino, P. D., 2016. What about biofilms on the surface of stone monuments?. *The open conference proceedings journal*, Volumen 7, pp. 14-28.
- McNamara, C. J. y otros, 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from maya archeological site. *Microbial Ecology*, 51(1), pp. 51-64.
- O, P., 2000. *How does calcium chloride affect the permeability of cell membranes?*. [En línea] Disponible en:
<http://www.madsci.org/posts/archives/2000-02/950902447.Cb.r.html>
 [Último acceso: 05 12 2017].
- Ranalli, G., Zanardini, E. & Sorlini, C., 2009. Biodeterioration – Including Cultural Heritage. En: *Topics in Ecological and Environmental Microbiology*. San Diego: Elsevier, pp. 565-581.
- Raymond Herrera, O. y otros, 2014. Mexico, Patente nº MX2012013218A.

- Reidy, B. y otros, 2013. Mechanisms of silver nanoparticles release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, pp. 2295-2350.
- Rives, V. & Garcia-Talegon, J., 2006. Decay and consevation of building stones on cultural heritage monuments. *Material Science Forum*, Volumen 514-516, pp. 1689-1694.
- Saiz Jimenez, C. & Ariño, X., 1995. Colonización bilógica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos. *Materiales de construcción*, pp. 5-16.
- Sarmiento-Puerto, M., 2003. Factores biológicos de alteración. En: *Metodología de diagnóstico y evaluación de tratamientos para la conservación de los edificios históricos*. Andalucía: Comares, pp. 72-94.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O. & Gaylarde, C., 2009. Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview. En: *Advances in Applied - Microbiology*. s.l.:Elsevier, pp. 98-128.
- Sterflinger, K. & Piñar, G., 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art-tilting windmills?. *Applied Microbiology and Biotechnology* , p. 9637–9646.
- UNESCO, 2016. *Oficina de la UNESCO en México*. [En línea]
Disponible en: <http://www.unesco.org/new/es/mexico/work-areas/culture/world-heritage/>
[Último acceso: 20 02 2016].
- Urzi, C. & De Leo, F., 2015. *Biodeterioration of cultural heritage in Italy: state of art*. [En línea]
Disponible en: http://www.arcchip.cz/w08/w08_de_leo.pdf
[Último acceso: 24 octubre 2015].
- Vazquez Muñoz, R. y otros, 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity or biological systems matters?. *Toxicology Letters*.
- Vecco, M., 2010. A definition of cultural heritage: From the tangible to the intangible. *Journal of cultural heritage*, Volumen 11, pp. 321-324.
- Villaseñor, I., 2016. *Protocolo de trabajo*. (comunicación personal) Ciudad de México: s.n.

ANEXOS

ANEXO 1 PROTOCOLO MEDIO DE CULTIVO LURIA BERTANI (LB) LÍQUIDO Y SÓLIDO

Medio LB Líquido

Reactivos:

- | | |
|------------------------------|---------|
| • Cloruro de sodio | 10 g |
| • Triptona | 10 g |
| • Extracto de levadura | 5 g |
| • H ₂ O destilada | 1000 mL |

Procedimiento

- Colocar en un recipiente con tapa o corcho con la capacidad del volumen final deseado (botella o matraz Erlenmeyer) los reactivos y poner en agitación hasta disolver completamente
- Ajustar el pH a 7.5 con HCl si el medio tiene un pH alcalino y con NaOH si el medio tiene un pH ácido.
- Una vez ajustado, tapar el recipiente y esterilizar a 121°C, 15 psi de presión durante 25 minutos.
- Después de esterilizado se deja enfriar a temperatura ambiente, cuando la temperatura ambiente es alcanzada por el medio LB se puede utilizar.

Medio LB Sólido

Reactivos:

- | | |
|------------------------------|---------|
| • Cloruro de sodio | 10 g |
| • Triptona | 10 g |
| • Extracto de levadura | 5 g |
| • H ₂ O destilada | 1000 mL |
| • Agar | 20 g |

Procedimiento

- Colocar en un recipiente con tapa o corcho con la capacidad del volumen final deseado (botella o matraz Erlenmeyer) los reactivos y poner en agitación hasta disolver completamente. El agar se dispersa, sin embargo, no se disuelve.
- Ajustar el pH a 7.5 con HCl si el medio tiene un pH alcalino y con NaOH si el medio tiene un pH ácido.
- Una vez ajustado, tapar el recipiente y esterilizar a 121°C, 15 psi de presión durante 25 minutos.
- Después de esterilizado se deja enfriar a temperatura ambiente, cuando la temperatura se pueda soportar al tacto se coloca en cajas Petri estériles y se deja enfriar hasta solidificar.

ANEXO 2 PROTOCOLO MEDIO DE CULTIVO BG11 LÍQUIDO Y BG11A SÓLIDO

Medio BG11 Líquido.

Reactivos:

- NaNO_3 1.5 g
- K_2HPO_4 0.04 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g
- Ácido cítrico 0.006 g
- Citrato férrico amoniacal 0.006 g
- EDTA (Sal disódica) 0.001 g
- Na_2CO_3 0.02 g
- Micronutrientes (mezcla de metales traza A5) 1 mL
- H_2O destilada 1000 mL

Micronutrientes (mezcla de metales traza A5)

Reactivos:

- H_3BO_3 2.86 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 g
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079 g
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 49.4 mg
- H_2O destilada 1000 mL

Procedimiento

- Colocar en un recipiente con tapa o corcho con la capacidad del volumen final deseado menos 5 ml de H₂O destilada (botella o matraz Erlenmeyer) los reactivos a excepción del Na₂CO₃ y poner en agitación hasta disolver completamente.
- El Na₂CO₃ se esteriliza por separado en los 5 ml de H₂O.
- Tapar los recipientes y esterilizar a 121°C, 15 psi de presión durante 25 minutos.
- Después de esterilizado se deja enfriar a temperatura ambiente y se le agrega el Na₂CO₃ decantando lentamente para evitar la formación de sedimentos
- Ajustar el pH a 7.1 con HCl si el medio tiene un pH alcalino y con NaOH si el medio tiene un pH ácido, después de esterilizar el medio
- Dejar enfriar a temperatura ambiente

Medio BG11 Sólido.

Reactivos:

- | | |
|--|---------|
| • NaNO ₃ | 1.5 g |
| • K ₂ HPO ₄ | 0.04 g |
| • MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.075 g |
| • CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.036 g |
| • Ácido cítrico | 0.006 g |
| • Citrato férrico amoniacal | 0.006 g |
| • EDTA (Sal disódica) | 0.001 g |
| • Na ₂ CO ₃ | 0.02 g |
| • Micronutrientes (mezcla de metales traza A5) | 1 mL |
| • Agar | 20 g |
| • H ₂ O destilada | 1000 mL |

Micronutrientes (mezcla de metales traza A5)

Reactivos:

• H_3BO_3	2.86 g
• $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222 g
• $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39 g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g
• $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	49.4 mg
• H_2O destilada	1000 mL

Procedimiento

- Colocar en un recipiente con tapón con la capacidad del volumen final deseado menos 5 ml de H_2O destilada (botella o matraz Erlenmeyer) los reactivos a excepción del Na_2CO_3 y poner en agitación hasta disolver completamente. El agar se dispersa, sin embargo, no se disuelve.
- El Na_2CO_3 se esteriliza por separado en los 5 ml de H_2O .
- Tapar los recipientes y esterilizar a 121°C , 15 psi de presión durante 25 minutos.
- Después de esterilizado se deja enfriar a temperatura ambiente y se le agrega el Na_2CO_3 decantando lentamente para evitar la formación de sedimentos
- Ajustar el pH a 7.1 con HCl si el medio tiene un pH alcalino y con NaOH si el medio tiene un pH ácido, después de esterilizar el medio
- Dejar enfriar hasta que la temperatura se pueda soportar al tacto. Se coloca en cajas Petri estériles y se deja enfriar hasta solidificar.

ANEXO 3 RESULTADOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE CEOBACTER Y CEOBACTER+CA

En la Figura 27 se observa el patrón de difracción de rayos x comparado con la tarjeta ICSD 68445 característica de la Mordenita presentada por Jaime Acuña (2017).

En la Figura 28 se presenta el difractograma de Ceobacter comparado con la misma tarjeta que el Ceobacter de Jaime Acuña (2017). Se presentan dos picos de señales en 5.8 (2θ) y 6.9 (2θ) que no se pertenecen a las señales de la mordenita. Así como en el pico característico a 25.5 (2θ) aumenta la señal.

Probablemente esas variaciones se deban a que existe otra configuración cristalográfica del aluminosilicato, debido a la variabilidad de la temperatura causada por la inestabilidad térmica del horno donde se sintetizó el material.

En la Figura 29 se presenta la comparación entre los patrones de Ceobacter+Ca y la tarjeta de la mordenita. Se observa que en comparación con el Ceobacter sintetizado en este trabajo los dos picos de señales en 5.8 (2θ) y 6.9 (2θ) no aparecen, además las señales en 8.6 (2θ) y 14.5 son apenas visibles. En 29.2 (2θ) se presenta un pico que no es característico de la mordenita y que no se presenta en la Figura 28. Estos cambios podrían deberse al tratamiento para la adición de calcio.

En general, la caracterización del Ceobacter sintetizado en este trabajo es muy similar al sintetizado por Jaime Acuña (2017). Posterior al tratamiento de calcio se presentan algunas modificaciones en el difractograma sin embargo en términos generales no se modifica completamente la estructura cristalina del Ceobacter.

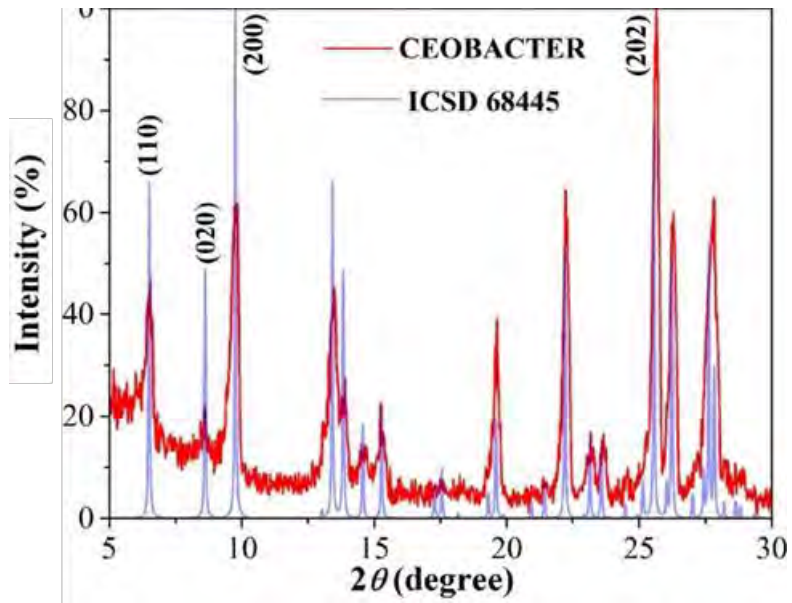


FIGURA 27 DIFRACTOGRAMA DE CEObACTER PRESENTADO EN (JAIME ACUÑA, ET AL., 2016)

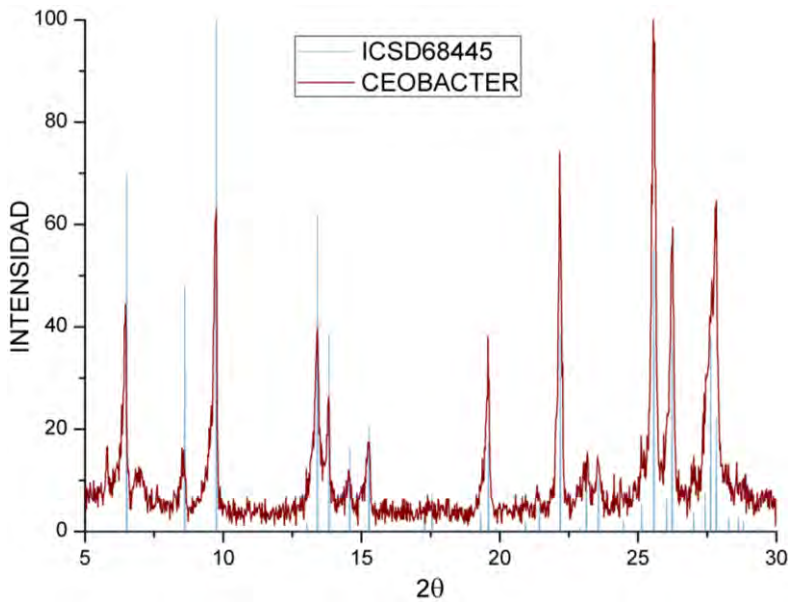


FIGURA 28 DIFRACTOGRAMA DE CEObACTER SINTETIZADO EN ESTE TRABAJO COMPARADO CON LA TARJETA ICSD 68445

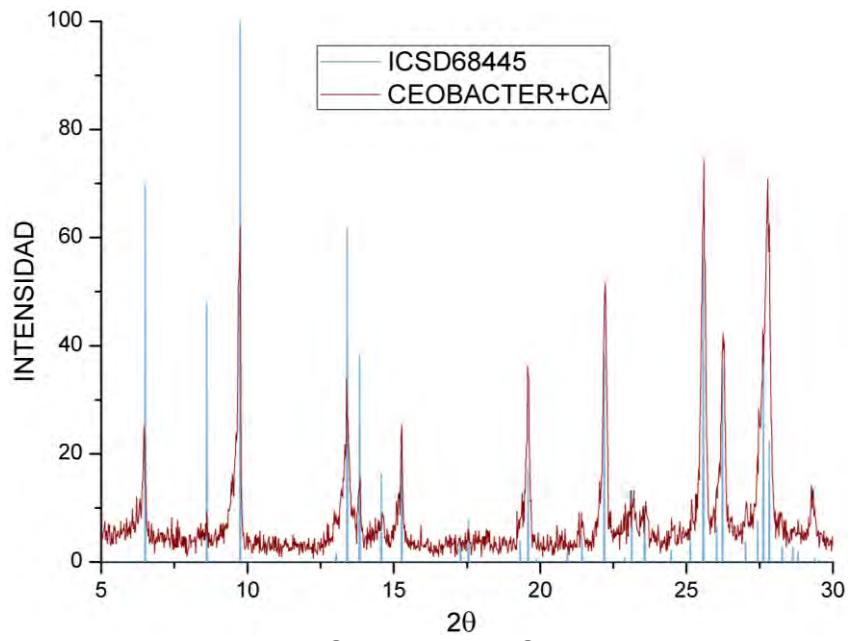


FIGURA 29 DIFRACTOGRAMA DE CEObacter+Ca COMPARADO CON LA TARJETA ICSD 68445

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación del patrimonio cultural	2
Figura 2 Formación de biopelículas	8
Figura 3 Requisitos de productos químicos para ser utilizados en bioremediación	10
Figura 4 Factores que influyen en la eficacia de los productos químicos	11
Figura 5 Configuración de la placa multipozo	18
Figura 6 Estación de Medición y Control Ambiental (EMCA)	20
Figura 7 Procedimiento experimental.....	21
Figura 8 Diagrama del sistema aislado con la EMCA	21
Figura 9 Coloración de Ceobacter sin y con tratamiento de calcio	22
Figura 10 Imágenes obtenidas con MEB	24
Figura 11 Análisis de EED en MEB de Ceobacter y Ceobacter+Ca	25
Figura 12 Imágenes obtenidas con MET de Ceobacter y Ceobacter+Ca.....	26
Figura 13 Histograma de frecuencia de tamaños de AgNPs de Ceobacter	27
Figura 14 Histograma de frecuencia de tamaños de AgNPs de Ceobacter+Ca	27
Figura 15 Inhibición del crecimiento de <i>E.coli</i> en tratamientos con Ceobacter y Ceobacter+Ca	28
Figura 16 Determinación de CMB de Ceobacter y Ceobacter+Ca.....	29
Figura 17 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 10ug/mL	31
Figura 18 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 20 ug/mL	32
Figura 19 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter a 40 ug/mL	33
Figura 20 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 10ug/mL	34
Figura 21 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 20 ug/mL	35
Figura 22 Evidencia fotográfica del tratamiento con Ceobacter+Ca a 40 ug/mL	36
Figura 23 Evidencia fotográfica de los controles.....	37
Figura 24 Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio LBA.....	40
Figura 25 Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio BG11	41
Figura 26 Crecimiento microbiano del estampado de las probetas pétreas en medio LBA y BG11.....	42
Figura 27 Difractograma de Ceobacter presentado en (Jaime Acuña, et al., 2016).....	55
Figura 28 Difractograma de ceobacter sintetizado en este trabajo comparado con la tarjeta ICSD 68445	55
Figura 29 Difractograma de Ceobacter+Ca comparado con la tarjeta ICSD 68445	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Factores que determinan la degradación de patrimonio cultural (Rives & Garcia-Talegon, 2006)	3
Tabla 2 Microorganismos relacionados con el biodeterioro (Scheerer, et al., 2009)	6
Tabla 3 Preparación de stock de nanocompuestos	17
Tabla 4 nanocompuesto con <i>E. coli</i>	17