

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Síntesis de materiales porosos para la transportación y liberación controlada de
bacteriófagos en ambientes acuáticos

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del título de:

Biólogo

Presentado por:

Anthony Basilio Ocampo Figueroa

Guayaquil – Ecuador Año: 2023

Dedicatoria

A Dios.

A mis papás, mis hermanos y cuñada, por acompañarme en la vida.

A mi tutora de tesis y los tutores de Argentina que me guiaron.

A mi sobrina, por alegrarme mi vida cada día.

A quienes siempre me apoyaron.

A mis mejores amigos.

A mí.

Anthony Ocampo Figueroa

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que nos apoyaron e hicieron posible este proyecto. Especialmente a nuestra tutora, la PhD Marynes Montiel Romero, al PhD. Karim Sapag y a la PhD Deicy Barrera. También le damos las gracias a la ESPOL y al Laboratorio Sólidos Porosos por brindarnos sus instalaciones y recursos, dándonos la oportunidad de continuar aprendiendo y de alcanzar nuestras metas.

Declaración Expresa

“Los derechos de titularidad y explotación, corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Anthony Basilio Ocampo Figueroa y doy el consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Guayaquil, 15 de febrero de 2024.

X



Anthony Basilio Ocampo Figueroa

Evaluadores

Firmado electrónicamente por:

X

Diego Gallardo, Msc.
Profesor de Materia Integradora

X



Firmado electrónicamente por:
MARYNES MONTIEL
ROMERO

Marynes Montiel Romero, PhD
Tutora del Proyecto Integrador

Resumen

La resistencia antimicrobiana es un problema en la actualidad, debido a un mal control de los antibióticos que se desecha por los sistemas de saneamiento, lo que provoca que la demanda de antibióticos aumente. En las fuentes de agua se ha llegado a encontrar diferentes bacterias que son altamente resistentes a dosis altas de antibióticos. Este proyecto se enfoca en una alternativa para tratar bacterias resistentes en el ambiente, a través del uso de bacteriófagos adheridos a un material poroso sintetizado, el cual puede hacer la acción de controlar el crecimiento de estas bacterias y a su vez de remediar las fuentes de agua. Se uso un bacteriófago aislado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de ESPOL, el “bme3”, el cual es específico para *E. coli* y se hizo otra prueba con algas pardas para observar la sinergia entre estos dos. En cada prueba se evaluó la capacidad de adsorción y como afecta al ensayo. Este proyecto demostró la capacidad de adsorción al material y los efectos de la sinergia entre el material poroso y los diferentes microorganismos, sin embargo, es necesario hacer pruebas con diferentes condiciones para ver la mejor eficiencia del material poroso.

Palabras clave: Material poroso, bacteriófagos, capacidad de adsorción

Abstract

The antimicrobial resistance is a current issue, attributed to inadequate control of antibiotics disposed through sanitation systems, leading to an increased demand for antibiotics. Various bacteria highly resistant to high doses of antibiotics have been discovered in water sources. This project focuses on an alternative approach to address these resistant bacteria, utilizing bacteriophages attached to a synthesized porous material. This material can effectively control the growth of these resistant bacteria and remediate water sources. The bacteriophage "bme3," isolated in the Environmental Microbiology Laboratory at ESPOL, specific to *E. coli*, was used in the study. Another test was conducted with brown algae to observe the synergy between the two. Each test assessed the adsorption capacity and its impact on the assay. The project demonstrated the adsorption capacity of the material and the effects of synergy between the porous material and different microorganisms. However, further tests under different conditions are necessary to determine the optimal efficiency of the porous material.

Key words: Porous material, bacteriophages, adsorption capacity

Índice general

Dedicatoria	II
Agradecimientos.....	III
Declaración Expresa.....	IV
Evaluadores	V
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Índice general	3
Abreviaturas	5
Simbología	6
Índice de figuras	7
Capítulo 1	8
1.1 Introducción	9
1.2 Descripción del problema	11
1.3 Justificación del problema	11
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general	12
1.4.2 Objetivos específicos	13
1.5 Marco teórico	13
1.5.1 Resistencia antimicrobiana en Ecosistemas Acuáticos	13
1.5.2 Bacteriófagos para el control de bacterias en el ambiente	13
1.5.3 Elección del mineral arcilloso y método para la creación del oligocatió	14
1.5.4 Materiales porosos como herramienta de apoyo para la fagoterapia.....	15
1.5.5 Materiales porosos en sistemas acuáticos	16
Capítulo 2	18
2 Metodología.....	19
2.1 Síntesis del material poroso Al-PILC	19
2.2 Recolección para muestras de diatomeas	21
2.3 Montaje de la prueba de material poroso con diatomeas.....	21
2.4 Análisis de nitrato, fosfato, clorofila, pH y oxígeno disuelto	22
2.4.1 Análisis de nitrato	22
2.4.2 Análisis de fosfato	23
2.4.3 Análisis de clorofila.....	23
2.5 Cálculos para las concentraciones de clorofila a, b y c	24
2.6 Medición de pH.....	25

2.7	Medición de oxígeno disuelto	26
2.8	Cuantificación de diatomeas y <i>E. coli</i>	26
2.9	Análisis estadístico	27
2.10	Aislamiento de fagos y condiciones para el medio de cultivo	30
2.11	Enriquecimiento de fagos.....	30
2.12	Método “spot”	31
2.13	Ensayo de retención y liberación de fagos en material poroso.	31
2.14	Análisis de fagos después de los ensayos	32
Capítulo 3.....		33
3	Resultados y análisis	34
3.1	Caracterización del material poroso e Isotherma	34
3.2	Análisis estadístico por la prueba de ANOVA.....	35
3.3	Influencia del material poroso en los niveles de Nitratos.....	38
3.4	Influencia del material poroso en los niveles de fosfatos	39
3.5	Influencia del material poroso en los niveles de oxígeno disuelto.....	40
3.6	Influencia del material poroso en los niveles de pH	41
3.7	Influencia del material poroso en los niveles de clorofila	42
3.8	Influencia del material poroso en la cuantificación de diatomeas y <i>E.scherichia coli</i>	44
3.9	Enriquecimiento de bacteriófagos y comprobación de titulación de fagos ...	46
3.10	Análisis de titulación de bacteriófagos post-ensayo	47
Capítulo 4.....		49
4	Conclusiones y recomendaciones	50
4.1	Conclusiones	50
4.2	Recomendaciones	51
Bibliografía		52

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
UNSL	Universidad Nacional de San Luis
OMS	Organización Mundial de la Salud
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para Alimentos y Agricultura
MSP	Ministerio de Salud Pública
SHU	Síndrome hemolítico urémico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Simbología

g	Gramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
°C	Grados centígrados
spp.	Varias especies
nm	Nanómetro
U/ml	Unidades por m lilitro
ul	Microlitro
h	Hora
atm	Atmosfera

Índice de figuras

Figura 2. 1	Esquema de síntesis de Al-PILC adaptado de E. Roca Jalil et al., 2015.....	20
Figura 2. 2	Esquema prueba de material poroso en diatomeas	22
Figura 2. 3	Cálculo de concentraciones de clorofila a,b y c (Franson, 1980).....	24
Figura 2. 4	Cálculo de clorofila a total (Franson, 1980).....	25
Figura 2. 5	Distribución de datos de nitrato	27
Figura 2. 6	Distribución de datos de clorofila a.....	28
Figura 2. 7	Distribución de datos de pH.....	28
Figura 2. 8	Distribución de datos de fosfato.....	29
Figura 2. 9	Distribución de datos de oxígeno disuelto	30
Figura 2. 10	Metodo "Spot"	31
Figura 2. 11	Esquema del ensayo de retención y liberación de fagos en material poroso.....	32
Figura 3. 1	Isoterma del material poroso	34
Figura 3. 2	Gráfico de caja de bigotes de los niveles de clorofila a.....	35
Figura 3. 3	Gráfico de intervalos de pH.....	36
Figura 3. 4	Gráfico de intervalos de nitrato.....	36
Figura 3. 5	Gráfico de intervalos de fósforo.....	37
Figura 3. 6	Gráfico de intervalos de oxígeno	38
Figura 3. 7	Niveles de nitrato en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días	39
Figura 3. 8	Niveles de fósforo en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días	40
Figura 3. 9	Niveles de oxígeno disuelto en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días	41
Figura 3. 10	Niveles de pH en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días	42
Figura 3. 11	Niveles de clorofila a en los diferentes ensayos en un período de 14 días.....	43
Figura 3. 12	Crecimiento de E.coli en los diferentes ensayos en un período de 7 días.....	44
Figura 3. 13	Cuantificación de diatomeas en un período de 14 días y.....	45
Figura 3. 14	Observación de la longitud de una melosira	45
Figura 3. 15	Comprobación del método doble capa a través del método “spot”	46
Figura 3. 16	Comprobación del método de barrido a través del método “spot”	46
Figura 3. 17	Comprobación de titulación de bacteriófagos post-ensayo en diferentes tiempos de retención.....	48

Capítulo 1

1.1 Introducción

Las enfermedades patógenas son más recurrentes debido a que son transmitidas por alimentos o bebidas, es un problema que abarca a nivel global, debido a las malas técnicas de los alimentos al momento de prepararse.

En muchos países que están en vías de desarrollo hay un mal manejo del control y detección de *Escherichia coli*, lo que puede conllevar a problemas de salud en las personas, es por esto que la Organización de las Naciones Unidas para Alimentos y Agricultura (FAO) trabajan en que estos países aprendan las técnicas de control de alimentos para disminuir los casos de personas infectadas por este tipo de bacterias.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que la enfermedad más ocurrente producida por la *E. coli*, es el síndrome hemolítico urémico (SHU) que afecta a personas con insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia, aunque las cifras de estas enfermedades no son alarmantes, las organizaciones tratan de mitigarlas.

De acuerdo con la OMS los brotes son originados de los productos animal crudos, poco cocinadas, leche cruda y verduras contaminadas con materia fecal o por actividades ganaderas que no tienen un correcto manejo de sus actividades. La OMS junto con la FAO han tomado la decisión de crear nuevas técnicas o herramientas para la correcta manipulación de alimentos y detección de microorganismos en el agua.

Uno de los mayores problemas para el Ministerio de Salud Pública (MSP) es la resistencia bacteriana a antibióticos, afectando a la población ecuatoriana, por este motivo, se ha planteado a nivel nacional el tratamiento y ayuda en dar a conocer la importancia de los procesos de manipulación que deben ser cumplido de forma correcta.

El agua que llega a las personas a nivel nacional en su totalidad tiene presente *E. coli* en un 20.7 %, mientras que el otro 79,3% está libre. Este dato se obtuvo gracias la medición de

Agua, Saneamiento e Higiene (ASH) realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en base a una submuestra de la Encuesta de Empleo, Desempleo y Subempleo de diciembre del 2016 (Hidalgo Villón, 2019).

Los bacteriófagos o fagos fueron descubiertos en 1917, son virus que infectan y parasitan a las bacterias, son capaces de regular la población bacteriana. Los fagos tienen una relación simbiótica con las bacterias, en términos de evolución, es por esto por lo que los bacteriófagos están siendo considerados como método para controlar a las bacterias que son resistentes a los antibióticos, como la *E. coli*. La fagoterapia ya fue usada hace más de 100 años en Francia y Bélgica, antes del descubrimiento de la penicilina, provocando que se olvide la fagoterapia en el 1940 por los avances en la antibioticoterapia.

Los materiales porosos se basan en materiales naturales, como rocas, suelos, tejidos vivos, espumas, cerámicos y productos de papel. La síntesis de materiales porosos como sílices, resinas, carbones, arcilla pilareada, entre otros, han demostrado que ayuda a la remediación de contaminantes como disolventes orgánicos, aceites como petróleo y sus derivados (Hernández-López et al., 2022). El uso de materiales porosos ha demostrado ser eficaces, pero su inconveniente, es el costo de producción, siendo costosos al momento de sintetizarlos.

Los materiales porosos logran hacer sinergia con los bacteriófagos a través de diferencias de cargas como se observa en la revisión de Bales et al., 1991 y Hornberger et al., 1992, en donde se observa que usan materiales porosos con carga positiva para conseguir una adsorción de los fagos. A su vez, mencionan que a ciertas condiciones como pH, temperatura y fuerza iónica (Bradford et al., 2006).

En esta investigación se propone una metodología sencilla para el desarrollo de un material poroso de bajo costo, el cual se basa en la arcilla bentonita, el cual junto a ciertas condiciones provoque que adsorba a los bacteriófagos, de esta manera poder transportarlos y

poder liberarse de manera controlada en ecosistemas acuáticos y de agua de consumo para controlar el crecimiento poblacional de las *Escherichia coli*.

1.2 Descripción del problema

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha experimentado un aumento significativo en las últimas décadas. Esto ha llevado a la necesidad de administrar dosis cada vez más elevadas de antibióticos para lograr afectar a las bacterias. Esta tendencia plantea un desafío significativo, ya que se vuelve más difícil combatir las bacterias multirresistentes, como es el caso de *Escherichia coli*. Esta bacteria es conocida por causar diversas enfermedades, como infecciones urinarias, diarreas e insuficiencia renal.

La incidencia de estas enfermedades afecta particularmente a la población que no tiene acceso a fuentes de agua y alimentos limpios y seguros. En este contexto, resulta crucial que diversas organizaciones busquen alternativas eficaces para hacer frente a las bacterias multirresistentes. Por tanto, la búsqueda de soluciones y estrategias innovadoras para combatir la resistencia bacteriana se presenta como una prioridad para garantizar la salud y bienestar de la población ciudadana.

1.3 Justificación del problema

La resistencia bacteriana se puede resolver mediante aumento en las concentraciones de los antibióticos, pero esto sería más costoso y provocaría que las bacterias lleguen a volver ser resistentes a estos antibióticos, por otro lado, se podría realizar nuevas investigaciones de medicamentos que puedan combatir contra las bacterias super-resistentes, este método también es costoso debido a los procedimientos para sintetizar el medicamento. El uso de bacteriófagos para combatir a las bacterias se ha propuesto como un método más económico el cual con el apoyo de los materiales porosos pueden ser usados en diferentes ecosistemas y de diferentes modos, facilitando la dispersión de los bacteriófagos y a la vez controlar el crecimiento

bacteriano. Además, el control del crecimiento bacteriano no solo se limita en la *E. coli* sino a todas las bacterias perjudiciales para el ser humano y para los ecosistemas.

La utilización de un material poroso para el transporte y la liberación controlada de bacteriófagos en entornos acuáticos representa una estrategia sumamente efectiva y sostenible en la lucha contra el aumento de bacterias super-resistentes. Esta aproximación innovadora no solo se alinea directamente con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), sino que también refuerza de manera contundente los objetivos específicos de dos ODS clave: ODS 3 (Salud y Bienestar) y ODS 6 (Agua Limpia y Saneamiento) (*Objetivos de Desarrollo Sostenible*, 2023).

En primer lugar, al abordar el ODS 3, la salud y el bienestar de las poblaciones se ven beneficiados significativamente mediante la reducción de la carga de enfermedades asociadas a las bacterias resistentes a los antibióticos. La acción selectiva de los bacteriófagos, liberados de manera controlada a través del material poroso, apunta directamente a combatir estas bacterias sin afectar organismos beneficiosos, contribuyendo así a la mejora de la salud pública.

En segundo lugar, al centrarse en el ODS 6, la implementación de esta tecnología promueve el acceso a agua limpia y saneamiento al prevenir la proliferación de bacterias perjudiciales en entornos acuáticos. La eficacia del material poroso garantiza una liberación gradual y sostenible de bacteriófagos, protegiendo los recursos hídricos y facilitando la obtención de agua limpia para consumo humano y actividades relacionadas.(Gamez, s. f.).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el material poroso para la encapsulación y liberación de bacteriófagos, que permita el incremento de la eficacia de tratamientos contra bacterias en entornos acuáticos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar material poroso que mejoren la estabilidad y persistencia de los bacteriófagos en condiciones acuáticas, asegurando su viabilidad y eficacia a lo largo del tiempo.
- Analizar la efectividad del material poroso al retener los bacteriófagos para la transportación de los fagos.
- Realizar prueba al material poroso para ver las capacidades de adsorción de microorganismos.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Resistencia antimicrobiana en Ecosistemas Acuáticos

Es un fenómeno preocupante que ha aumentado en los últimos años. Es la capacidad de las bacterias para adaptarse a los efectos de los medicamentos antimicrobianos. Los ecosistemas acuáticos como ríos, lagos, mares y océanos tienen una gran cantidad de microorganismos, como bacterias, virus y otros.

En el 2019 se registró más de 4 millones de muertes relacionada por la resistencia antimicrobiana, además que la OMS decreto que para el año 2050 esta cifra aumentara a 10 millones de muertes. En Ecuador, en el año 2017 se registró un 61% de bacterias que ya poseen resistencia a varios antibióticos. (*Gaceta ram2018 - Apuntes - REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014- - Studocu, 2018*)

1.5.2 Bacteriófagos para el control de bacterias en el ambiente

Los bacteriófagos, virus que infectan y replican dentro de bacterias específicas, han emergido como una potencial alternativa terapéutica para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos. Esta estrategia, conocida como terapia con fagos o fagoterapia, aprovecha la capacidad de los bacteriófagos para infectar bacterias específicas y multiplicarse, causando su lisis celular. La resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema global de salud pública, generando una urgente necesidad de encontrar nuevas formas de combatir las

infecciones. Los bacteriófagos presentan ventajas significativas, como su especificidad hacia ciertos tipos de bacterias, su capacidad para multiplicarse en el sitio de la infección y su potencial para ser manipulados genéticamente para mejorar su eficacia terapéutica (Sarker et al., 2012).

De acuerdo con Golkar et al., 2014, los bacteriófagos han sido objeto de investigación como una alternativa prometedora para superar la resistencia bacteriana, siendo utilizados tanto en la medicina humana como veterinaria. En estudios clínicos, se ha observado su eficacia contra bacterias resistentes, como *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) y cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos. Sin embargo, el uso terapéutico de bacteriófagos también plantea desafíos, como la selección de bacteriófagos específicos y la posible aparición de resistencia a los fagos por parte de las bacterias. A pesar de estos desafíos, el potencial terapéutico de los bacteriófagos para el control de bacterias resistentes destaca como un área de investigación crucial en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

1.5.3 Elección del mineral arcilloso y método para la creación del oligocatión

La síntesis de la arcilla pilareada tiene un proceso de elaboración con etapas simples pero que pueden durar días. Según las referencias de Gil, Sapag, Mendioroz, Tomul y Balci, este proceso tiene varios factores que influyen en la síntesis. Por ejemplo, la selección del método que se usará para introducir el oligocatión (agente pilareante), las condiciones de calcinación, entre otros. Otros factores pueden ser las características del mineral arcilloso con el cual se va a partir, la composición, sus propiedades fisicoquímicas y el comportamiento coloidal. Por último, se debe tener un cuidado especial en las temperaturas, pH, el tiempo de envejecimiento del agente pilareante, debido que se debe considerar el elemento con el que se desea pilarear (Sapag & Mendioroz, 2001) (Gil et al., 1995) (Tomul & Balci, 2010).

Se pueden emplear dos enfoques para introducir el oligocatión en la interlámina del material natural. En primer lugar, el método de titulación consiste en utilizar arcilla

homoionizada con un catión hidrolizado en la suspensión arcillosa. Esto da lugar a la generación del agente pilareante en el espacio preliminar, resultando en polihidroxidaciones que se convierten en los pilares deseados. Por otro lado, el método de cambio implica la adición de un agente pilareante previamente obtenido en la suspensión arcillosa, facilitando el intercambio de oligocaciones por los cationes de la arcilla. No se observa una preferencia clara entre estos dos métodos según la revisión bibliográfica de *De Souza Santos*, 1992.

La naturaleza del mineral arcilloso que se usara como punto de partida se debe analizar a profundidad, debido a que esto influye en la pilarización del mismo, se considera composición y carga que son los que influirán en la estabilización de la síntesis del material. Dependiendo de la estructuración del mineral puede provocar que su comportamiento en suspensiones acuosas tome más tiempo en el proceso de intercambio catiónico. Los minerales más usados según la bibliografía son la esmécticas y las montmorillonitas sódicas, debido a que la carga elemental no es elevada y se origina en la hoja octaédrica (M. E. Roca Jalil et al., 2014).

1.5.4 Materiales porosos como herramienta de apoyo para la fagoterapia

Los materiales porosos han demostrado ser una herramienta valiosa en el campo de la fagoterapia al ofrecer un entorno propicio para la inmovilización, protección y liberación controlada de bacteriófagos. Estos materiales, como geles, membranas y matrices poliméricas porosas, presentan características que los hacen idóneos para el soporte de bacteriófagos. La estructura porosa permite la retención física de los virus, preservando su viabilidad y actividad durante períodos prolongados, además de facilitar su liberación gradual, lo que puede mejorar la eficacia terapéutica al mantener concentraciones efectivas en el sitio de la infección (Zhao et al., 2023). Además, la capacidad de modificar las propiedades superficiales de estos materiales porosos permite la adaptación a diferentes tipos de bacteriófagos, maximizando su interacción específica con las bacterias diana.

Investigaciones recientes han destacado la relevancia de los materiales porosos como vehículos de administración de bacteriófagos en terapias contra infecciones bacterianas resistentes. La versatilidad de estos materiales para proporcionar una liberación sostenida de los fagos ha mostrado resultados prometedores en la reducción de la carga bacteriana y en la potenciación de la eficacia terapéutica (Chhibber et al., 2008). Sin embargo, es crucial considerar la selección de materiales porosos apropiados que no solo mantengan la estabilidad y actividad de los bacteriófagos, sino que también sean biocompatibles y seguros para su uso en aplicaciones clínicas y ambientales. El aprovechamiento de materiales porosos como soporte para la fagoterapia representa un área de investigación en expansión con el potencial de mejorar significativamente el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes.

1.5.5 Materiales porosos en sistemas acuáticos

Los materiales porosos desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos al influir en la dinámica de los flujos de nutrientes, la retención de sedimentos, la filtración del agua y la biodiversidad. Estos materiales, como los sedimentos lacustres, lechos de ríos con grava y arenas porosas, presentan una estructura permeable que facilita procesos claves para la salud y la funcionalidad de los sistemas acuáticos. La porosidad de estos materiales permite la retención y liberación gradual de nutrientes, influyendo en la disponibilidad de elementos esenciales para el crecimiento de organismos acuáticos y regulando así la productividad biológica en estos ecosistemas (Espinal, 2012). Además, los materiales porosos actúan como hábitats para una diversidad de organismos acuáticos, desde bacterias hasta invertebrados, contribuyendo significativamente a la biodiversidad y al ciclo de la materia en entornos acuáticos.

La porosidad del material poroso lo convierte en un producto efectivo para la restauración de ecosistemas acuáticos. Su capacidad para albergar y preservar bacteriófagos y otros microorganismos con habilidades para remediar estos ecosistemas contribuye

significativamente a mejorar la eficacia en el control y la eliminación de contaminantes presentes en diversos entornos acuáticos.

La interacción entre los materiales porosos y los ecosistemas acuáticos es crucial para entender la calidad del agua, la provisión de servicios ecosistémicos y la respuesta a perturbaciones ambientales. Estos materiales no solo sirven como sitios de almacenamiento y transporte de nutrientes, sino que también desempeñan un papel clave en la mitigación de impactos adversos, como la retención de contaminantes y la regulación de la erosión en los lechos de los ríos y lagos (Younes et al., 2021).

Capítulo 2

2 Metodología

Se desarrolló un material poroso denominado Al-PILC, el cual fue sometido a un riguroso conjunto de pruebas con diversos microorganismos. El objetivo principal de estas pruebas fue evaluar la capacidad de adsorción del material y analizar la influencia que ejerce en la sinergia con los microorganismos seleccionados. Cada fase experimental se llevó a cabo con meticulosidad, asegurándonos de utilizar un enfoque integral.

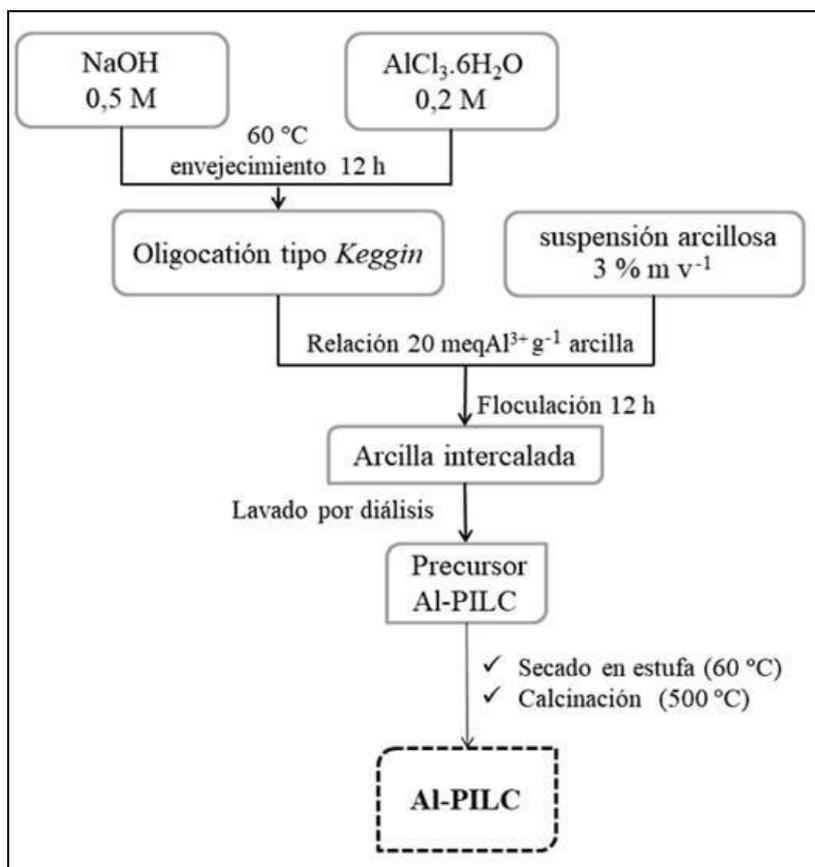
Cada prueba, meticulosamente diseñada, contó con una serie de tratamientos específicos que permitieron explorar diferentes escenarios de interacción entre el Al-PILC y los microorganismos. Este enfoque multifacético no solo nos proporcionó una comprensión más profunda de la capacidad de adsorción del material, sino que también nos permitió analizar de manera exhaustiva los efectos de la sinergia entre el material poroso y los microorganismos involucrados.

2.1 Síntesis del material poroso Al-PILC

El material poroso se sintetizó utilizando el método de cambio, descrito en el marco teórico **índice 1.5.5**. La figura 2.1 ilustra el proceso, que comenzó con la obtención del agente pilareante (oligocación) mediante la hidrólisis de una solución 0,2 M de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con solución de NaOH 0,5 M manteniendo una relación de 2 entre el $\text{OH}^-/\text{Al}^{3+}$. La solución del NaOH fue agregada lentamente en la solución $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por el método de gota a gota, mientras que se mantenía en agitación constante y a una temperatura de 60°C . Una vez que se terminó de agregar, se mantuvo en agitación toda la noche (12 horas). La suspensión de la arcilla bentonita usada fue de 3% p.v⁻¹ y se preparó 1 hora antes de la incorporación para tener una buena dispersión de la arcilla en el oligocación (Karim Sapag, 1997).

Figura 2. 1

Esquema de síntesis de Al-PILC adaptado de E. Roca Jalil et al., 2015



Al igual que la preparación del agente pilareante, se debió incorporar por el método de gota a gota en la suspensión de bentonita, mientras tenía una agitación constante y a temperatura ambiente que era de 20°C a 1 atm. Después de agregar el oligocación, se mantuvo en agitación durante una hora y posteriormente se dejó reposar para su correcta floculación durante 12 horas. Una vez transcurridas las 12 horas, se retiró el sobrenadante de la mezcla y se procedió a realizar un lavado del sólido para retirar las sales en exceso.

El lavado de la mezcla se llevó a cabo mediante membranas de diálisis en agua destilada hasta que la conductividad fuera igual a la del agua destilada, que era de 04 μS (aproximadamente 2 días cambiando el agua cada 12 horas). Una vez estabilizada la

conductividad, se procedió a colocar el sólido lavado en la estufa a 60°C durante toda la noche para secarlo, obteniendo así los precursores correspondientes al material.

Posterior al secado, se procedió a usar una MUFFLA que podía llegar hasta 1250°C, pero en el caso de nuestra arcilla solo se alcanzó hasta 500°C por una hora, con una rampa de calentamiento de 10 °C.min⁻¹. Una vez finalizado este último paso, ya se obtuvo nuestra Al-PILC (E. Roca Jalil et al., 2015).

2.2 Recolección para muestras de diatomeas

La recolección de diatomeas se llevó a cabo en el Río San Luis, Argentina, utilizando frascos previamente autoclavados de aproximadamente 500 mL. Se seleccionó cuidadosamente una zona con el menor impacto ambiental en el río para la recolección. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a una temperatura óptima para garantizar su supervivencia y preservar la integridad de las diatomeas recolectadas. Este enfoque meticuloso en la elección de la ubicación y las condiciones de recolección no solo asegura la calidad de las muestras, sino que también respalda la integridad de los datos obtenidos durante el estudio Pardo et al., 2019.

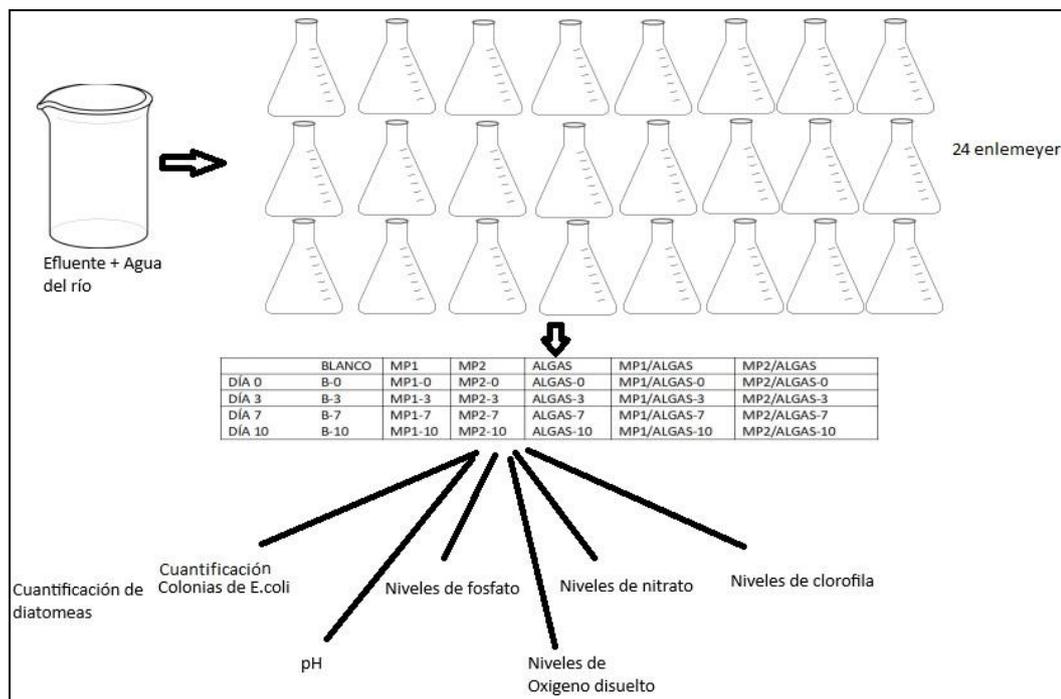
2.3 Montaje de la prueba de material poroso con diatomeas

La metodología fue adaptada a partir de Mantoura & Llewellyn, debido a que, se dividió por días de referencias como se indica en la **figura 2.3**, siendo día 0, día 3, día 7 y día 14. Cada día contaba con 6 ensayos diferentes. Siendo el primero de control (Blanco) que contenía agua del río San Luis junto el efluente; el segundo ensayo contenía agua del río San Luis con efluente y la arcilla bentonita natural; el tercer ensayo contenía la arcilla pilareada en vez de la arcilla bentonita natural; el cuarto ensayo contenía agua del río San Luis con efluente y algas (diatomeas); el quinto ensayo contenía agua del río San Luis con efluente más la arcilla bentonita y algas, mientras que el sexto ensayo contenía la arcilla pilareada. La cantidad que se colocó de los materiales porosos (arcilla bentonita y arcilla pilareada) fue tomado de diferentes fuentes bibliográficas (Pandey, 2017). Se colocó 100 mg de los materiales porosos

en los ensayos correspondientes (MP1, MP2, ALGAS/MP1, ALGAS/MP2) y en los ensayos que contenga algas se colocó 180 mL de algas. La cantidad de agua del río de San Luis y efluente es una proporción del Laboratorio InteQUI de la universidad de San Luis. Siendo 90 mL de agua de río y 30 mL de efluente.

Figura 2. 2

Esquema prueba de material poroso en diatomeas



NOTA. Metodología adaptado de Mantoura & Llewellyn, 1983

2.4 Análisis de nitrato, fosfato, clorofila, pH y oxígeno disuelto

2.4.1 Análisis de nitrato

Para el análisis de nitrato de los ensayos realizados, se usó el equipo de “HACH DR2800” el cual es un espectrofotómetro que se encargara en medir la absorbancia de las muestras. Se prepararon las muestras de agua de los ensayos, se tomó 10 mL de cada matraz Erlenmeyer. A cada muestra se le colocó 30 mg de un reactivo de la marca “HACH PERMACHEM REAGENTS NitraVer 5 Nitrate Reagent Powder Pillows, 10 mL, pk/100”,

este es un método conocido como reducción de cadmio. Se tuvo que construir la curva de calibración para el espectrofotómetro a partir de las absorbancias de las soluciones estándar con la ayuda de un software especializado como indica el manual del espectrofotómetro HACH DR2800 (Green, 2017). Una vez que se tuvo la curva de calibración se procedió a medir las muestras. Por último, se hizo un análisis estadístico (*DR 2800 Spectrophotometer Procedures Manual.pdf*, s. f.).

2.4.2 Análisis de fosfato

En el análisis de fosfato de los tratamientos mencionados anteriormente, se hizo por el método de reactivos y luego se pasó por un espectrofotómetro, el cual se encargó de leer la absorbancia. El método de reactivos fue desarrollado por varios científicos a lo largo del tiempo. Los reactivos que se usó fueron el ácido ascórbico, molibdato de amonio y el ácido sulfúrico. Se prepararon las soluciones estándar y las muestras para añadir los reactivos, en un orden específico y volumen necesario para cada muestra. Una vez que fueron añadidos, se esperó a que los reactivos reaccionasen con la muestra. Una vez que los reactivos empezasen con su reacción, se procedió a medir la absorbancia, para ver la concentración de fosfato y realizar un análisis estadístico (Jenkins, 1982).

2.4.3 Análisis de clorofila

El análisis de clorofila por espectrofotometría se basa en la capacidad de absorber luz en diferentes longitudes de ondas en el espectro visible. El fundamento de este método se basa en la relación entre la cantidad de luz absorbida por la clorofila y la concentración de la muestra. Dependiendo a que longitud de onda se mida la clorofila absorberá selectivamente 400 a 500 nm (azul) y 600 a 700 nm (rojo). Estos respectivamente indican el rango de absorción de la clorofila a y b. El uso de la acetona en la muestra de clorofila es para disolución de los pigmentos liposolubles como la clorofila, tejidos vegetales y otras muestras biológicas. En base a este método se procedió a preparar cada muestra añadiendo 1 mL de acetona a 1 mL de

muestra y dejando que repose aproximadamente 12 horas. Una vez pasado las 12 horas, se hizo centrifugación para usar el sobrenadante y medirlo en el espectrofotómetro “Rayleigh UV-1800” a diferentes longitudes de ondas siendo 750 nm para la turbidez, 664 nm para la clorofila A, 647 nm para la clorofila B, 630 nm para la clorofila C y 430 nm para los carotenoides para el cálculo del índice de Margalef (*UV-1800 UV/VIS Spectrophotometer, Rayleigh_specification/price/image_Bio-Equip in China*, s. f.).

2.5 Cálculos para las concentraciones de clorofila a, b y c

La fórmula para calcular las concentraciones se extrajo de referencias analizadas. En ella, se realiza un cálculo específico para cada concentración de clorofila, utilizando valores de longitud de onda como 664nm, 647nm y 630nm. Dependiendo de la clorofila que se esté evaluando, se introduce el valor correspondiente en primer lugar. Las constantes utilizadas varían según el método aplicado, pero se emplean para establecer una correlación precisa entre las lecturas de absorbancia y la concentración real de la muestra.

Antes de utilizar los valores de las lecturas, fue necesario restarles el valor de 750nm, que representa la turbidez. Esta corrección de la turbidez es extremadamente sensible a los cambios en la proporción de agua-acetona. La fórmula para el cálculo de las concentraciones de clorofila se encuentra detallada en la **figura 2.4**. Es importante señalar que los resultados de las concentraciones pueden ser negativos, especialmente en casos de concentraciones bajas de clorofila, donde la multiplicación por los valores de las constantes tiende a generar valores negativos. (Franson, 1980).

Con base en los valores de las concentraciones de clorofila A, se aplicó la siguiente fórmula, como se observa en la **figura 2.5**, para determinar la concentración del pigmento extraído. Esta fórmula implicaba la multiplicación de la concentración de clorofila A por el volumen analizado en unidades de litros y posteriormente se dividía el valor obtenido por el

volumen total de la muestra, expresado en metros cúbicos, dando como resultado los valores finales en mg/m³.

Figura 2. 3

Cálculo de concentraciones de clorofila a,b y c (Franson, 1980)

$$\begin{aligned} \text{a) } C_a &= 11.85(\text{absorbance } 664) - 1.54(\text{absorbance } 647) \\ &\quad - 0.08(\text{absorbance } 630) \\ \text{b) } C_b &= 21.03(\text{absorbance } 647) - 5.43(\text{absorbance } 664) \\ &\quad - 2.66(\text{absorbance } 630) \\ \text{c) } C_c &= 24.52(\text{absorbance } 630) - 7.60(\text{absorbance } 647) \\ &\quad - 1.67(\text{absorbance } 664) \end{aligned}$$

Figura 2. 4

Cálculo de clorofila a total (Franson, 1980)

$$\text{Chlorophyll } a, \text{ mg/m}^3 = \frac{C_a \times \text{extract volume, L}}{\text{Volume of sample, m}^3}$$

2.6 Medición de pH

El fundamento para la medición de pH se basa en el electrodo de vidrio que tiene una membrana delgada que permite el paso de iones de hidrogeno, haciendo que cada vez que se sumerge en una solución, los iones de H⁺ en la muestra interactúan con la membrana provocando una diferencia potencial eléctrico que es proporcional al pH de la solución. La escala de pH es de 0-14, donde es acido los pH menor a 7, neutral cuando es pH 7 y alcalino si el pH es mayor a 7.

La medición pH se hizo una calibración, esto se realizó con soluciones con pH conocidos, las soluciones eran de pH 4, 7 y 10. Se prepararon las muestras dejando que llegue a temperatura ambiente, en ciertos casos hay que agitar la muestra para que los iones se distribuyan uniformemente. Por último, se sumerge el electrodo dentro de la muestra y se empieza a hacer la lectura del pH.

2.7 Medición de oxígeno disuelto

La medición del oxígeno disuelto se basa en la ley de Faraday, que se basa que la cantidad liberada en un electrodo es proporcional a la carga eléctrica transferida. El electrodo del oxígeno, se reduce el oxígeno disuelto en el cátodo, provocando una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en la muestra.

Se uso el equipo SX716 Model Dissolved Oxygen Meter, el cual tiene el cátodo recubierto de un material que reduce el oxígeno a iones hidróxido cuando esta con corriente eléctrica. Para medir el oxígeno disuelto, se tuvo que calibrar el equipo con soluciones de referencias, luego se preparan las muestras y se asegura que no contengan burbujas de aire o haber sido agitado recientemente, par que al sumergir el cátodo no mida falsos niveles de oxígeno disuelto, una vez medido el oxígeno, se procede a lavar el cátodo y a cubrirlo con el material recubierto (*SX716-EN-1.pdf*, s. f.).

2.8 Cuantificación de diatomeas y *E. coli*

La cuantificación de diatomeas y *E. coli* se realizaron por microscopio y cuantificación visual por medio *Chromocult* respectivamente. Para la contabilización de las diatomeas se separaron en los tres tipos que más se observaba, siendo *Navicolas*, *Melosira* y *Cocconeis*. Se colocaba 1 mL de la mezcla para ver el crecimiento de las diatomeas. En la cuantificación de *E. coli* se tomaba 25 mL del ensayo y se pasaba por un sistema de bomba de vacío con membrana de 0.45 μm y luego colocarlo en una placa con medio *Chromocult* hidratados previamente con solución salina, posteriormente se dejó a 37°C por 24 horas y se procedió a contabilizar de manera normal para ver si hay un crecimiento o disminución del *E. coli* (Jenkins, 1982).

2.9 Análisis estadístico

Para comprender mejor los resultados de los análisis realizados anteriormente, se procedió a hacer análisis estadísticos de los 6 tratamientos realizados. Así podemos ver diferencias significativas entre los tratamientos y que día fue que hubo más diferencias.

Se realizó la estadística por cada análisis debido a que son diferentes datos que se tiene en cada uno. Para esto, se hizo el análisis estadístico entre los programas de Excel y el programa Minitab. Para el análisis estadístico se consideró dos hipótesis:

Hipótesis nula: *Todas las medias son iguales.*

Hipótesis alterna: *La mayoría de las medias no son iguales.*

Los datos del análisis de nitrato, clorofila, pH y oxígeno disuelto no fueron normales, como se observa en la **figura 2.5**, **figura 2.6** y **figura 2.7** y **figura 2.8** por ende, se va a normalizar los datos.

Figura 2. 5

Distribución de datos de nitrato

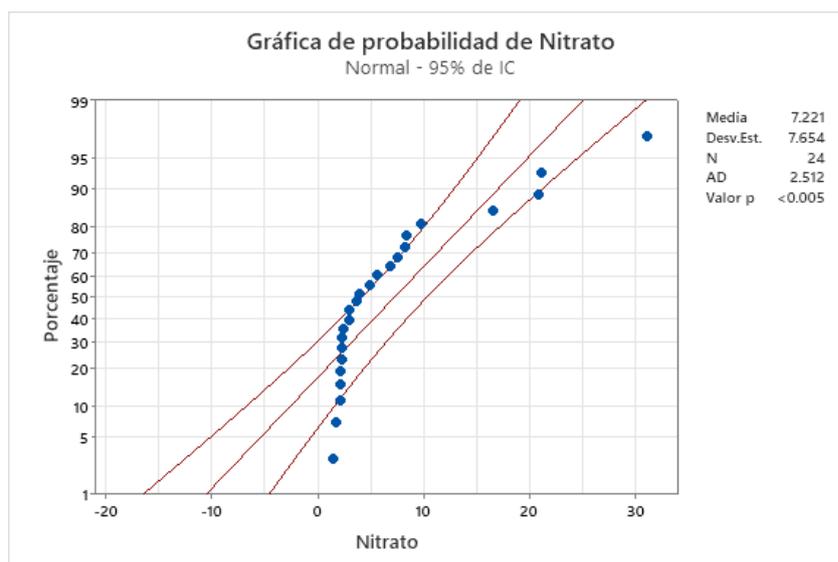


Figura 2. 6

Distribución de datos de clorofila a

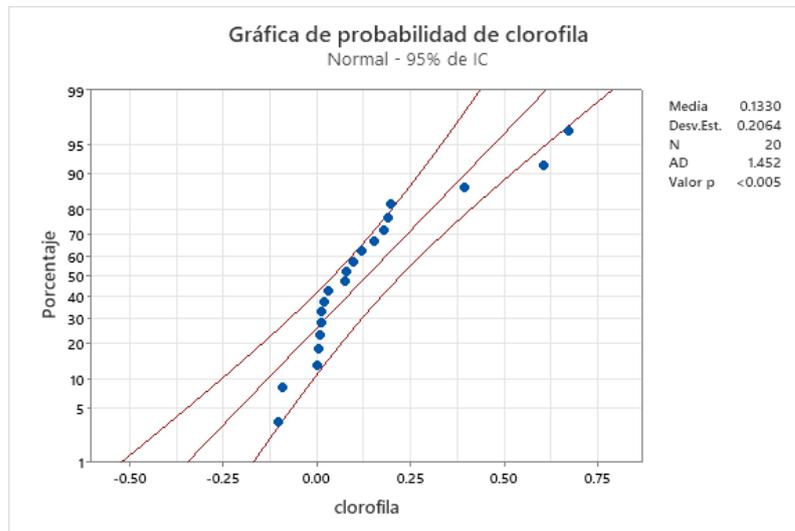


Figura 2. 7

Distribución de datos de pH

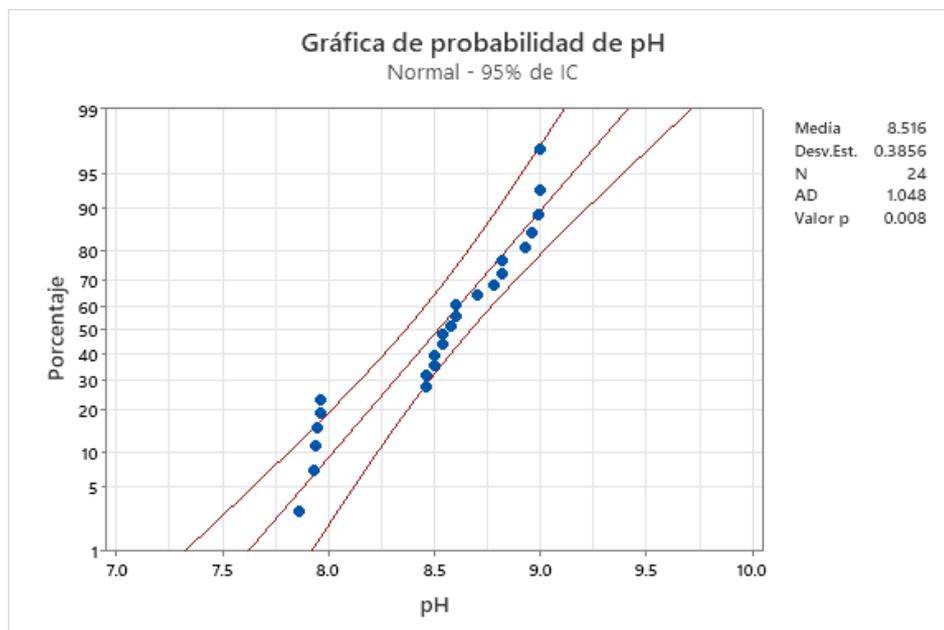
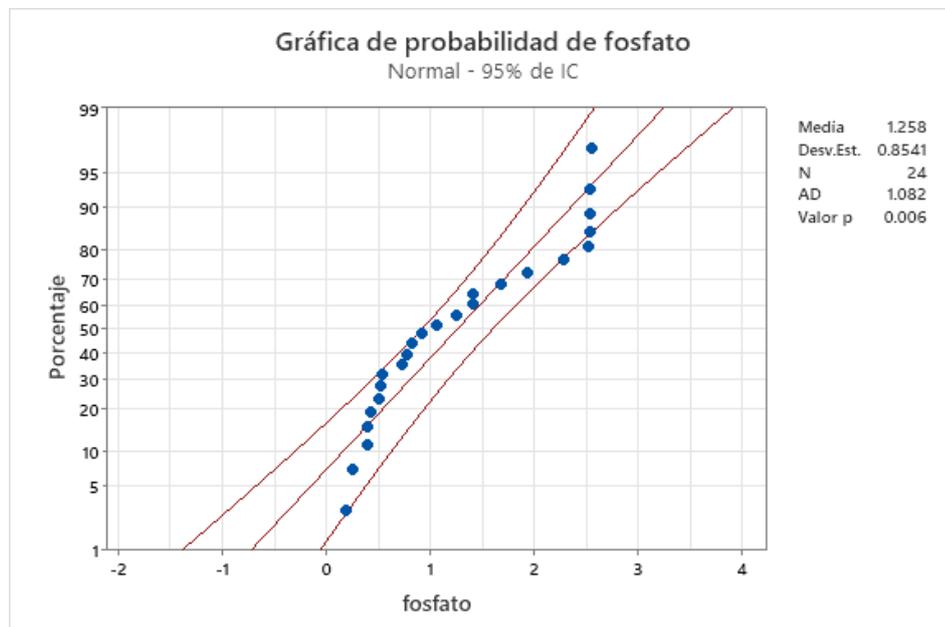


Figura 2. 8

Distribución de datos de fosfato

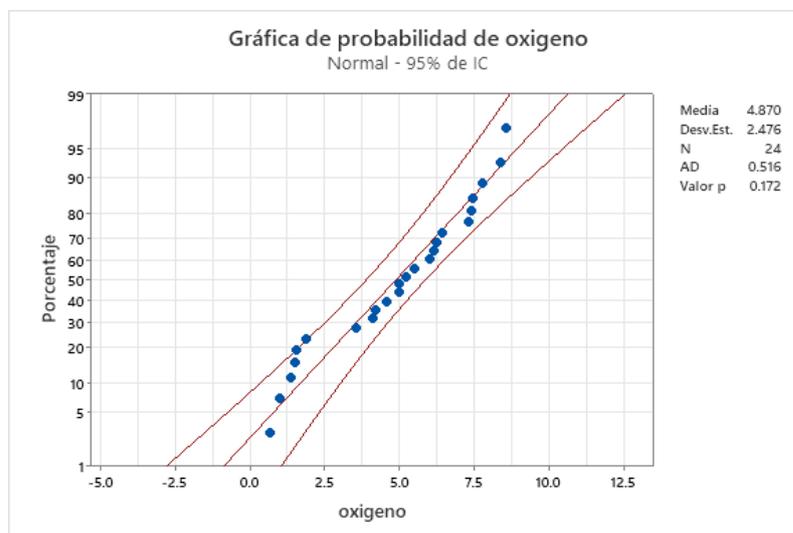


Como se observó, los datos no son normales, esto se comprobó por la prueba de Shapiro-Wilk y por medio de los gráficos ya observados. Al no tener los datos normales, se procede a hacer transformaciones de Johnson, consiguiendo datos normalizados para poder realizar el análisis de varianza (ANOVA). Luego, para tener resultados más claros, se realizó la prueba de Tukey de los tratamientos en el transcurso de los días.

Los datos de oxígeno disuelto, como se observó en la **figura 2.9**, están normalizados, esto se comprobó con el dato de **p. valor**, que es igual a 0.172. Según la norma, si el valor de **p. valor** > 0.05 los valores están normalizados. Por lo cual se realizó el análisis de ANOVA directamente.

Figura 2. 9

Distribución de datos de oxígeno disuelto



2.10 Aislamiento de fagos y condiciones para el medio de cultivo

La cepa de bacteriófago utilizada en el estudio (bme3) fue aislada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la ESPOL a partir de una bacteria de *E. coli* “ATCC 15597”. Estos serían por centrifugación, filtración, cloroformo, entre otros. En este caso se realizó un aislamiento a través del método de filtración con filtros de 0.22 μm para que solo logren pasar los bacteriófagos. Luego de este filtrado se realizará un enriquecimiento de fagos y se determina el título a través de la prueba “spot” y se procede a conservar a 4°C (Punil Luciano, 2017).

2.11 Enriquecimiento de fagos

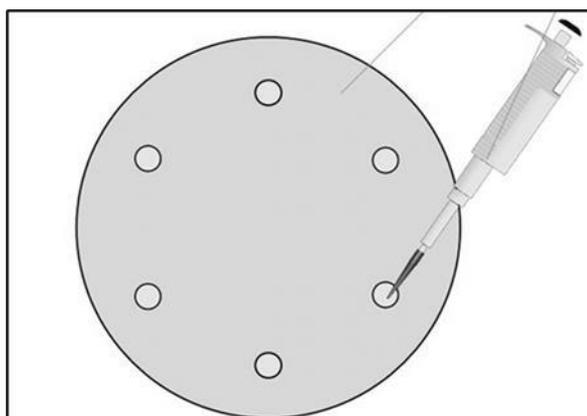
El enriquecimiento se realizó mediante la técnica descrita por Poxleitner et al., 2018 con algunas modificaciones. Se inoculó 100 μL del lisado del bacteriófago en 5 mL de TSB con crecimiento de la cepa de *E. coli* en 0,5 McFarland y se incubó por 24 h a 37°. Luego, se centrifugó a 4500 \times g durante 30 min y el sobrenadante recuperado se pasó por un filtro de jeringa de 0,22 μm . Para determinar el título se realizó la prueba de la gota o “spot” de las diluciones del bacteriófago enriquecido (Poxleitner et al., 2018).

2.12 Método “spot”

Para la prueba Spot se inoculó placas de TSA con la bacteria (McFarland 0,5). Luego se inoculó con 10 μ L de suspensión de fago, se dejó secar e incubó las placas durante la noche a 37°C Mirzaei & Nilsson, 2015 para que se formaran los halos (**figura 2.10**).

Figura 2. 10

Metodo "Spot"



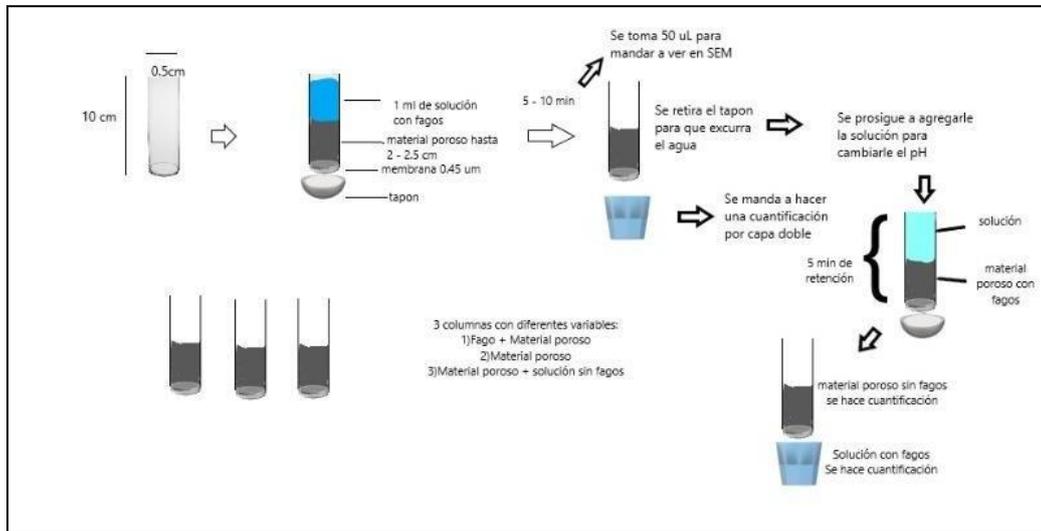
Nota. Representación de los halos creados por los fagos en un medio inoculado por E.coli

2.13 Ensayo de retención y liberación de fagos en material poroso.

Para el ensayo de retención y liberación de fagos se basó en varias referencias (Zhang et al., 2024); (Bradford et al., 2006); (Bales et al., 1997). Como se ve en la **figura 2.11**, se realizaron varias columnas con una longitud de 10 cm y 0.5 cm de diámetro. Se colocó 400 mg de Al-PILC y la concentración de fagos que tenía 10^{-8} UFC por mL, se añadió 1 mL del concentrado. Se dejó retenido por 10 min y 20 min para ver la efectividad de retención del material poroso con los fagos. Una vez pasado el tiempo de retención se retiró el tapón para que el 1 mL del concentrado se conserve en otro tubo para hacerle un análisis por el método de “spot” y poder ver la cantidad que se retuvo (Zhang et al., 2018).

Figura 2. 11

Esquema del ensayo de retención y liberación de fagos en material poroso



2.14 Análisis de fagos después de los ensayos

Para el análisis de fagos se procedió a hacer el método “spot”, se hizo hasta la dilución 10^{-8} , colocando SM buffer en 5 tubos Eppendorf (colocando 900 µL en los tres primeros y 990 µL en los dos últimos) y luego se añadió 100 µL en el primer tubo y se hizo vortex por 10 segundos, posterior se pasó 100 µL del primer tubo al siguiente y se repitió con el tercer tubo, a partir del cuarto tubo se pasó 10 µL y luego se traspasó 10 µL al quinto tubo. Posteriormente se inocula una placa de TSA con *E. coli* y se inocula 10 µL del fago que se encuentra en cada tubo para comprobar la titulación de los fagos.

Capítulo 3

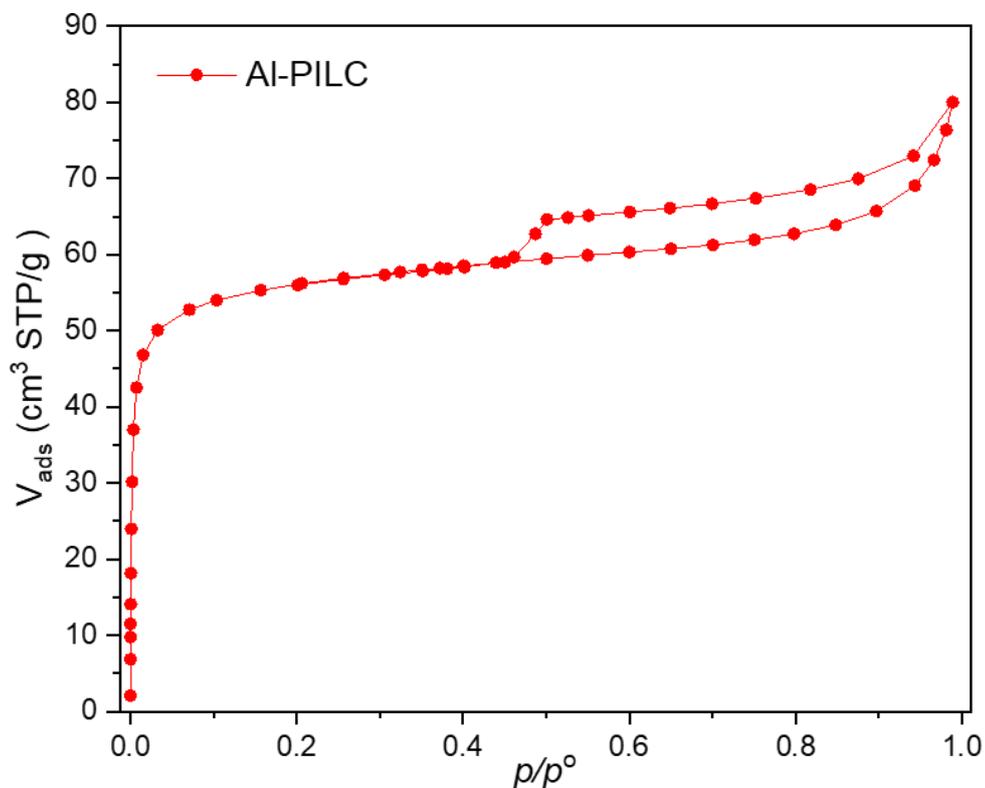
3 Resultados y análisis

3.1 Caracterización del material poroso e Isoterma

La isoterma de la **figura 3.1** tienen una combinación entre isoterma tipo I y IIb, siendo el tipo I un incremento abrupto de volumen adsorbido durante las bajas presiones relativas que confirma la presencia de microporos en la estructura de la arcilla. El tipo IIb muestra la adsorción en las regiones que tiene multicapas tiene presente poros interpartícula y que la arcilla natural no fue afectada durante el proceso de pilarización. Además, presenta ciclos de histéresis que son provocados por mesoporos en la estructura, estos dan indicios de como la estructura más externa quedo ordenada (Rao et al., 2015).

Figura 3. 1

Isoterma del material poroso



El aumento del volumen adsorbido a bajas presiones relativas varía respecto a la cantidad de aluminio que tiene incorporado la Al-PILC, al igual que el tamaño y la cantidad de microporos.

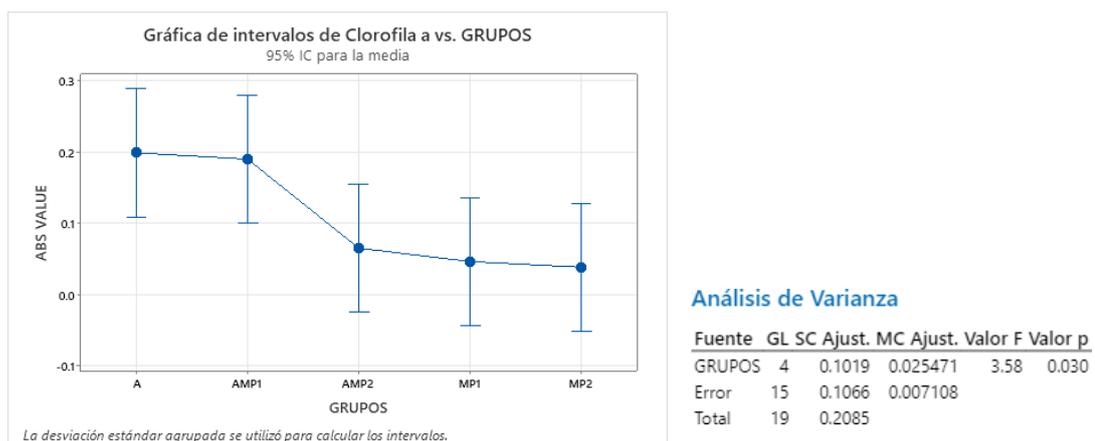
Se puede observar una relación directa concerniente al aumento de aluminio y el aumento de la densidad de los microporos en los pilares de la interlámina (M. E. Roca Jalil et al., 2014).

3.2 Análisis estadístico por la prueba de ANOVA

Los resultados de la prueba de ANOVA en clorofila mostro que posee un $p=0.030$, lo cual significa que se puede haber una diferencia significativa entre los tratamientos. Por cual se confirmó con el grafico de análisis de Tukey de la **figura 3.2**, el cual mostro que no hay demasiada diferencia significativa entre los tratamientos, aunque si se puede afirmar que las muestras de A y A/MP1 tuvieron mejores resultados.

Figura 3. 2

Gráfico de caja de bigotes de los niveles de clorofila a

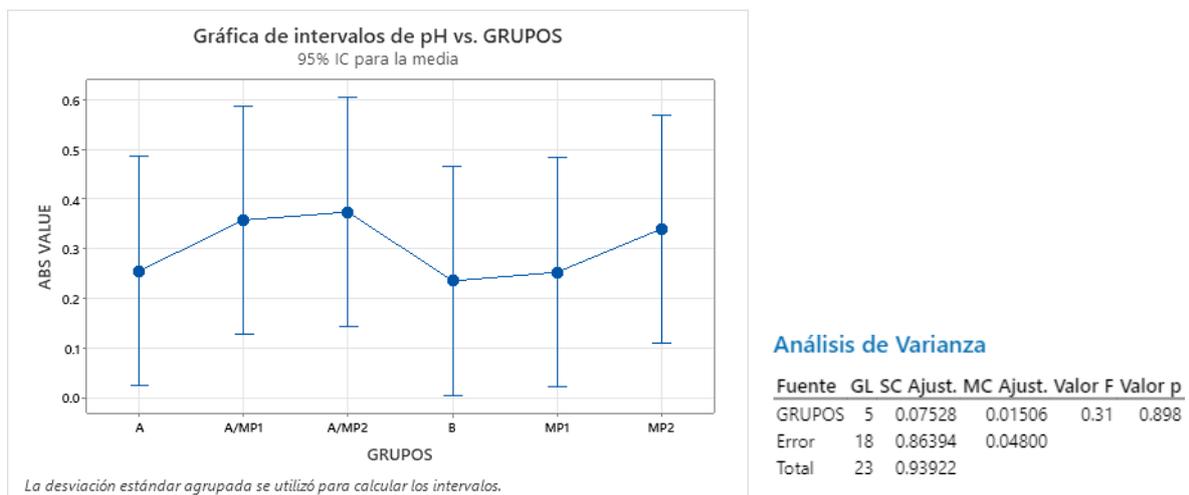


Los resultados que se observa en la **figura 3.3** es que el valor de **p.valor** es mayor a 0.05, por lo cual no se tiene una diferencia significativa entre los tratamientos. Aunque, se

puede observar por el grafico del análisis de Tukey que hay mejores resultados en los tratamientos de A/MP1, A/MP2 y MP2.

Figura 3. 3

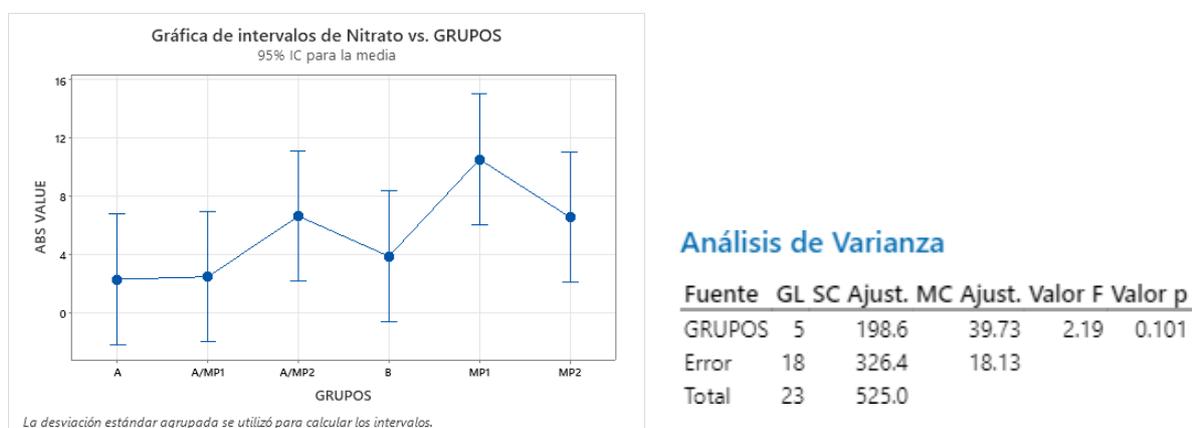
Gráfico de intervalos de pH



En la **figura 3.4** se observan los resultados de ANOVA de los datos de nitrato, el cual nos indica que no hay diferencia significativa entre los grupos. Pero en el grafico de Tukey, se puede apreciar que el tratamiento con solo MP1, tuvieron peores resultados, debido que el objetivo de esta prueba era la reducción del nitrato en el agua.

Figura 3. 4

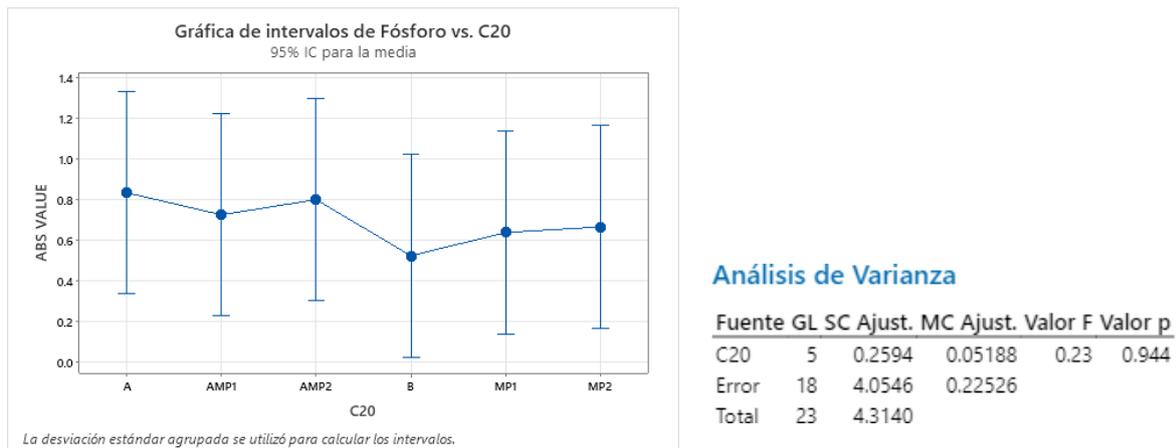
Gráfico de intervalos de nitrato



En el ANOVA de la **figura 3.5** nos muestra que el p. valor es mayor a 0.05 por lo cual no hay mucha diferencia significativa, lo cual nos confirma el analisis de Tukey que la mayoría de los grupos no tiene una diferencia considerable.

Figura 3. 5

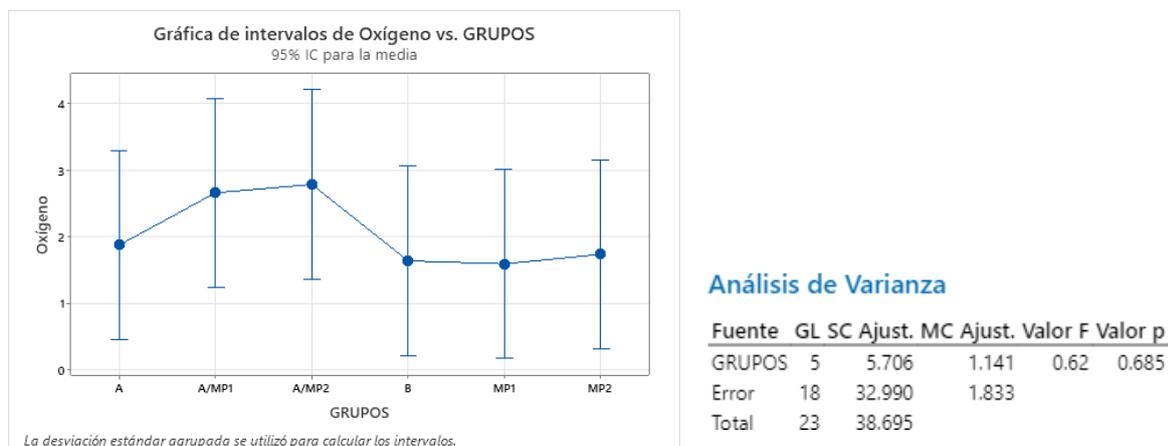
Gráfico de intervalos de fósforo



En la **figura 3.6** en los valores del ANOVA se tiene que el p.valor es mayor a 0.05, por lo cual no hay diferencia significativa, pero en los valores de la grafica del analisis Tukey, se encuentra que los valores de A/MP1 y A/MP2 son más alto que el resto de tratamientos, esto es bueno debido a que lo que se quiso obtener en este analisis, es que el oxigeno disuelto de los ensayos aumenten, debido a que esto beneficia a los algas que se encuentran.

Figura 3. 6

Gráfico de intervalos de oxígeno



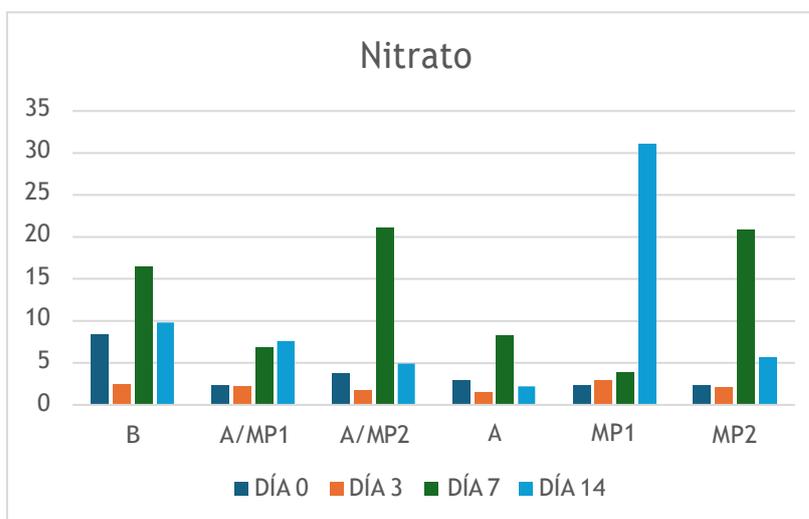
3.3 Influencia del material poroso en los niveles de Nitratos

Los niveles de nitratos fueron anormales debido a un proceso que ocurrió durante el ensayo, que se trata de la actividad de las algas como se observa en la **figura 3.7**. Los resultados salieron en aumento en vez de disminuir al paso de los días en algunos casos. En el caso de los ensayos que contienen algas, hubo un aumento al paso de los días, esto debido a una actividad que tiene las algas que se le denomina nitrato reductasa y nitrito reductasa. Esto es porque las algas necesitan nitrato y nitrito para su desarrollo, entonces en un ecosistema donde no haya altos niveles de nitratos, las algas se encargarán de producirlas. Esto es normal debido al ciclo de nutrientes, el cual nos referimos al flujo y reciclaje de nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de organismos vivos en el ecosistema.

En cuestión a nuestro producto AL-PILC, se puede ver que aportó levemente en algunos casos a la disminución de los niveles de nitratos, mostrando que su capacidad de adsorción a contaminantes si son efectivas, pero debido a lo mencionado anteriormente, se debería agregar mayor cantidad de Al-PILC al ensayo o crear un Al-PILC de mayor densidad de porosidad para tener mejores resultados.

Figura 3. 7

Niveles de nitrato en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días



Nota. Datos obtenidos de los niveles de nitrato del día 0, 3, 7 y 14

3.4 Influencia del material poroso en los niveles de fosfatos

Por otro lado, los resultados de la **figura 3.8** que se obtuvo de los niveles de fósforo fueron muy eficaces, habiendo una disminución considerable del día 0 al día 14. Según los datos, el ensayo que tuvo mejor eficacia fue el que contenía las algas + material poroso 2 (Al-PILC), seguido por el ensayo solo con algas y de las algas + material poroso 1 (Arcilla bentonita natural).

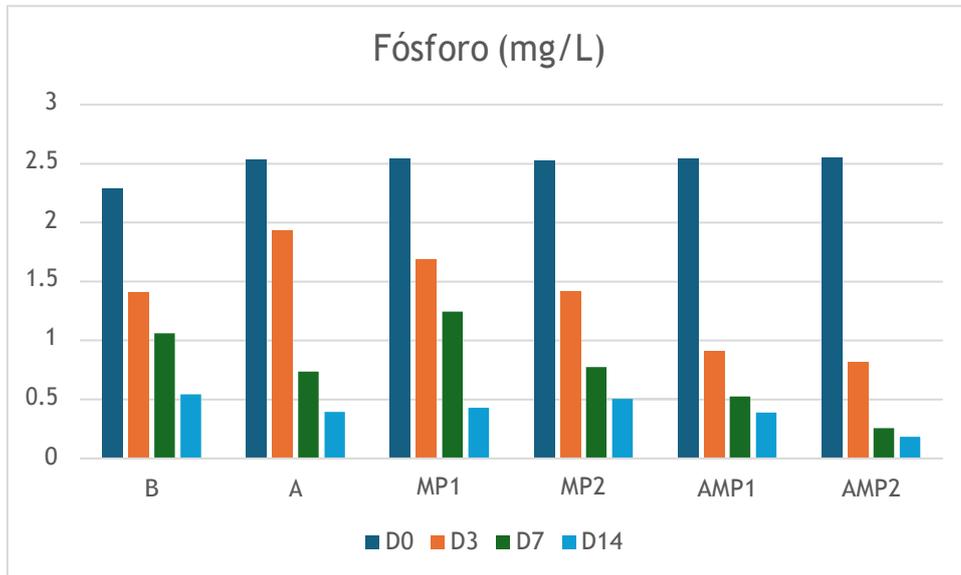
Basándonos en fuentes bibliográfica, la arcilla bentonita tiene una capacidad de adsorción del fosfato de 14 mg/g de la arcilla bentonita (Pandey, 2017).

El ensayo pudo tener mejores resultados si en el ensayo solo se hiciera pruebas con fosfato y no con diferentes tipos de contaminantes, debido a que el producto adsorbe todos los contaminantes que haya en el ecosistema.

En el ensayo del “Blanco” se dio la hipótesis que la combinación de agua del Río de San Luis y el efluente pudo tener pequeños restos de algas o algún otro organismo que pudo reducir levemente los niveles de fosforo

Figura 3. 8

Niveles de fósforo en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días



3.5 Influencia del material poroso en los niveles de oxígeno disuelto

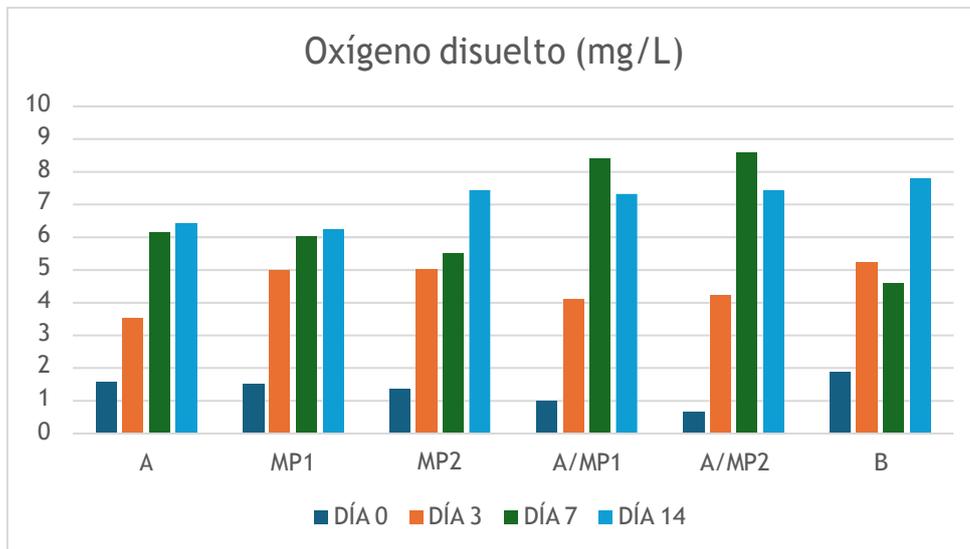
El aumento de oxígeno disuelto que se observa la **figura 3.9** es buena señal de aumento de algas en un ecosistema, debido a que estas tienen un proceso llamado fotosíntesis el cual aumenta los niveles de oxígeno en el ecosistema acuático. Los niveles estándares según varias organizaciones como OMS y EPA, están entre el 5 y 9 mg/L de oxígeno disuelto. De acuerdo con los estándares de las organizaciones, el día 7 mostró buenos resultados los ensayos con los materiales porosos y algas, seguido del ensayo con solo algas.

Por otro lado, el día 14, se obtuvo una decadencia del oxígeno disuelto en los dos primeros ensayos, mientras que el ensayo con solo algas siguió en aumento. Esto pudo ser por la proliferación de las algas en los dos ensayos primeros que provoco una disminución del oxígeno, debido a la muerte de algas que al momento de descomponerse se consume oxígeno, lo que provoco esa disminución leve. Mientras que, en el ensayo con solo algas, al no haber

una proliferación de algas no ocurrió este fenómeno (*California State Water Resources Control Board*, s. f.).

Figura 3. 9

Niveles de oxígeno disuelto en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días



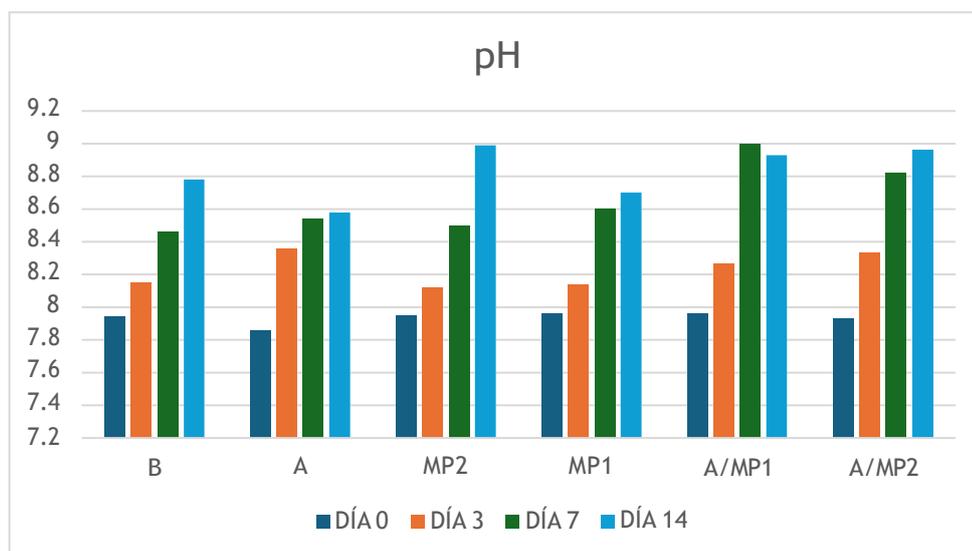
3.6 Influencia del material poroso en los niveles de pH

Las algas desempeñan un papel crucial en el aumento del pH de la **figura 3.10**, manifestando varias actividades que incluyen la fotosíntesis, la producción de alcalinidad, el consumo de ácido orgánico y la descomposición. Según (Wilde et al., 2006), las algas prosperan óptimamente en un rango de pH que oscila entre 8.2 y 8.7. De acuerdo con los estándares para la supervivencia de las algas, los niveles de pH más favorables se observaron en los ensayos de "Algas", "A/MP1" y "A/MP2".

Desde la perspectiva de la supervivencia de las algas, estos resultados son altamente significativos. El aumento del pH en el día 14 se correlacionó con la muerte de las algas, liberando nutrientes y sustancias orgánicas en el medio ambiente.

Figura 3. 10

Niveles de pH en los diferentes ensayos en un periodo de 14 días



3.7 Influencia del material poroso en los niveles de clorofila

Los niveles de clorofila de los diferentes tratamientos de materiales porosos de la **figura 3.11** confirmaron de la baja presencia de algas, mientras que los ensayos donde se había colocado los 180 mL los niveles de clorofila A fueron altos, siendo el más alto el de la muestra con solo algas, seguido del ensayo de Algas + material poroso (arcilla natural) y en tercer lugar se encuentra el ensayo de algas + material poroso (arcilla pilareada AI-PILC).

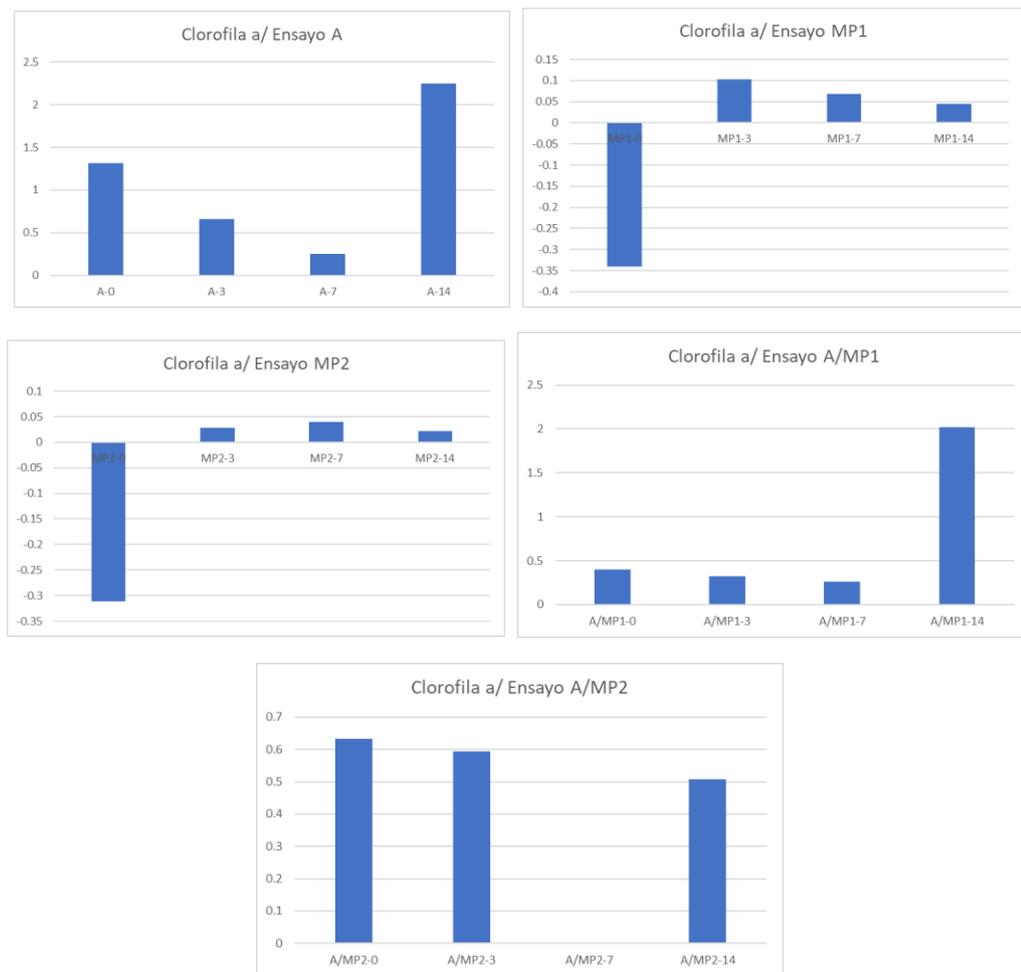
Los ensayos que solo contenía materiales porosos muestran bajos niveles de clorofila A, pero en los días siguientes llegaron a aumentar levemente, esto pudo ser por presencia de algas en el agua del río de San Luis y por el ecosistema del ensayo lograron aumentar la cantidad de algo en los ensayos llegando a 0.1 mg/m³ en el ensayo que contenía la arcilla bentonita.

Entre los ensayos que involucran algas y materiales porosos, el ensayo con arcilla natural ha arrojado los mejores resultados en cuanto al aumento de clorofila. Esto se debe a la interacción entre las algas y la bentonita, que facilita la absorción de luz por parte de las algas.

Como resultado, se promueve una fotosíntesis más eficiente, lo cual se traduce en niveles más altos de clorofila A.

Figura 3. 11

Niveles de clorofila a en los diferentes ensayos en un período de 14 días



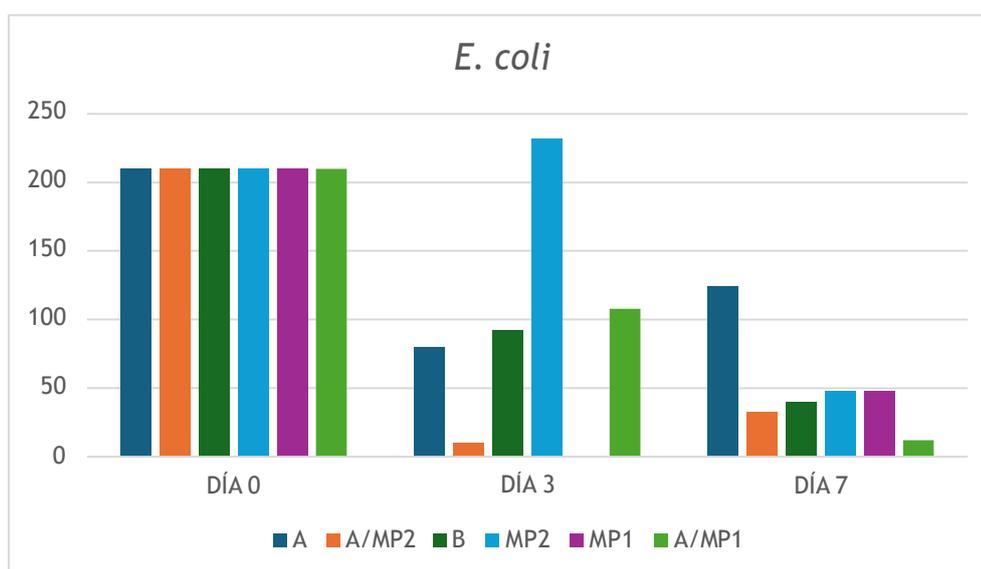
Entre los ensayos que involucran algas y materiales porosos, el ensayo con arcilla natural ha arrojado los mejores resultados en cuanto al aumento de clorofila. Esto se debe a la interacción entre las algas y la bentonita, que facilita la absorción de luz por parte de las algas. Como resultado, se promueve una fotosíntesis más eficiente, lo cual se traduce en niveles más altos de clorofila A."

3.8 Influencia del material poroso en la cuantificación de diatomeas y *Escherichia coli*

Los resultados de la **figura 3.12** en la cuantificación de *E.coli*, fueron variando día tras día. Las capacidades de los materiales porosos han demostrado que pueden adsorber diferentes tipos de microorganismos, como contaminantes. Lo que se puede hacer una deducción, que en el día 7 el material poroso Al-PILC adsorbiera una gran parte de *E.coli* que se encontraba en el ensayo, al igual que la arcilla natural.

Figura 3. 12

Crecimiento de E.coli en los diferentes ensayos en un período de 7 días



En los ensayos del material poroso y algas, se vio una disminución mejor que en los ensayos anteriores. La interacción entre las algas y materiales porosos puede causar un efecto que no permita el crecimiento bacteriano en los ensayos.

El aumento de la cantidad de diatomeas como se observa en la **figura 3.13** fue considerablemente bueno, en especial la longitud y tamaño de los diferentes tipos de diatomeas como se ve en la **figura 3.14**. Como se puede ver en la imagen de la derecha, la longitud de las *Melosiras* empezó a ser largas, al igual que la cantidad de *Naviculas*.

De los tres tipos de diatomeas que fueron estudiados, las *Cocconeis* fueron las que menos cantidad se encontraron.

Figura 3. 13

Cuantificación de diatomeas en un período de 14 días

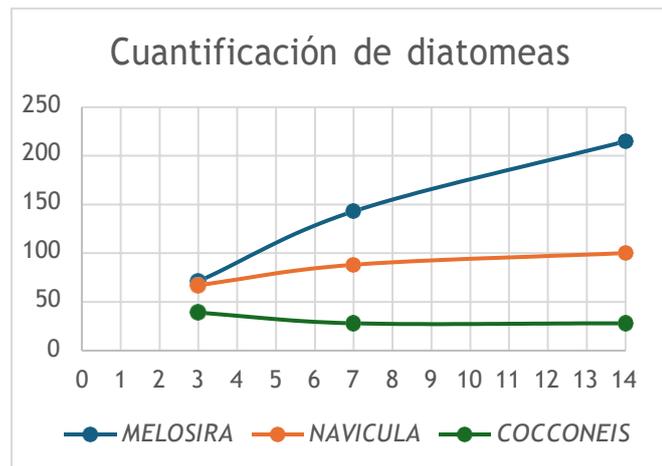


Figura 3. 14

Observación de la longitud de una Melosira



Por otro lado, el día 14 se empezó a encontrar otros tipos de diatomeas como la *Cyclotella* y *Synedra*. Lo cual pudo ser porque el ecosistema estaba mejor adaptado para el crecimiento de estos tipos de diatomeas

3.9 Enriquecimiento de bacteriófagos y comprobación de titulación de fagos

Para analizar los resultados del enriquecimiento de los bacteriófagos se dejó incubando por 24 horas a 37°C. El enriquecimiento nos permitió llegar a una titulación de 10^6 , dándonos un nivel adecuado de titulación como se observa en la **figura 3.15** y **figura 3.16** para realizar los experimentos siguientes.

Figura 3. 15

Comprobación del método doble capa a través del método “spot”

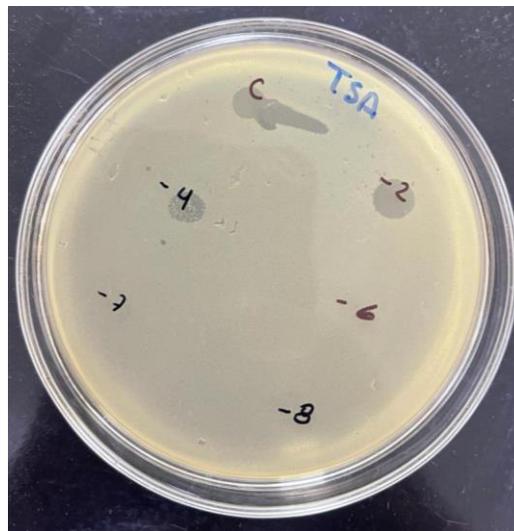
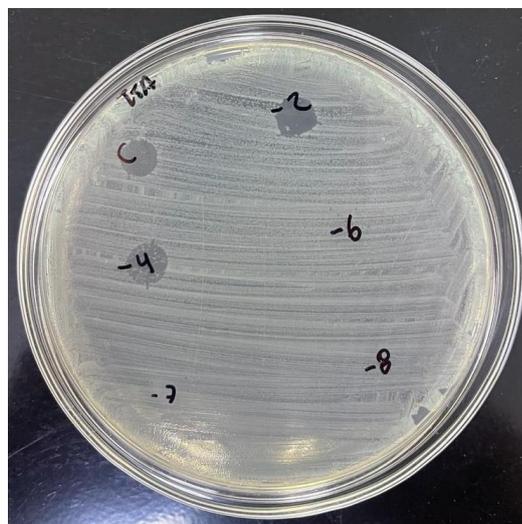


Figura 3. 16

Comprobación del método de barrido a través del método “spot”



El nivel de titulación si se hubiera querido tener más alto, se tuviera que aumentar el tiempo de espera del lisado con los 5 mL de TSB aproximadamente 6 horas más si se hubiera querido tener una titulación de 10^8 .

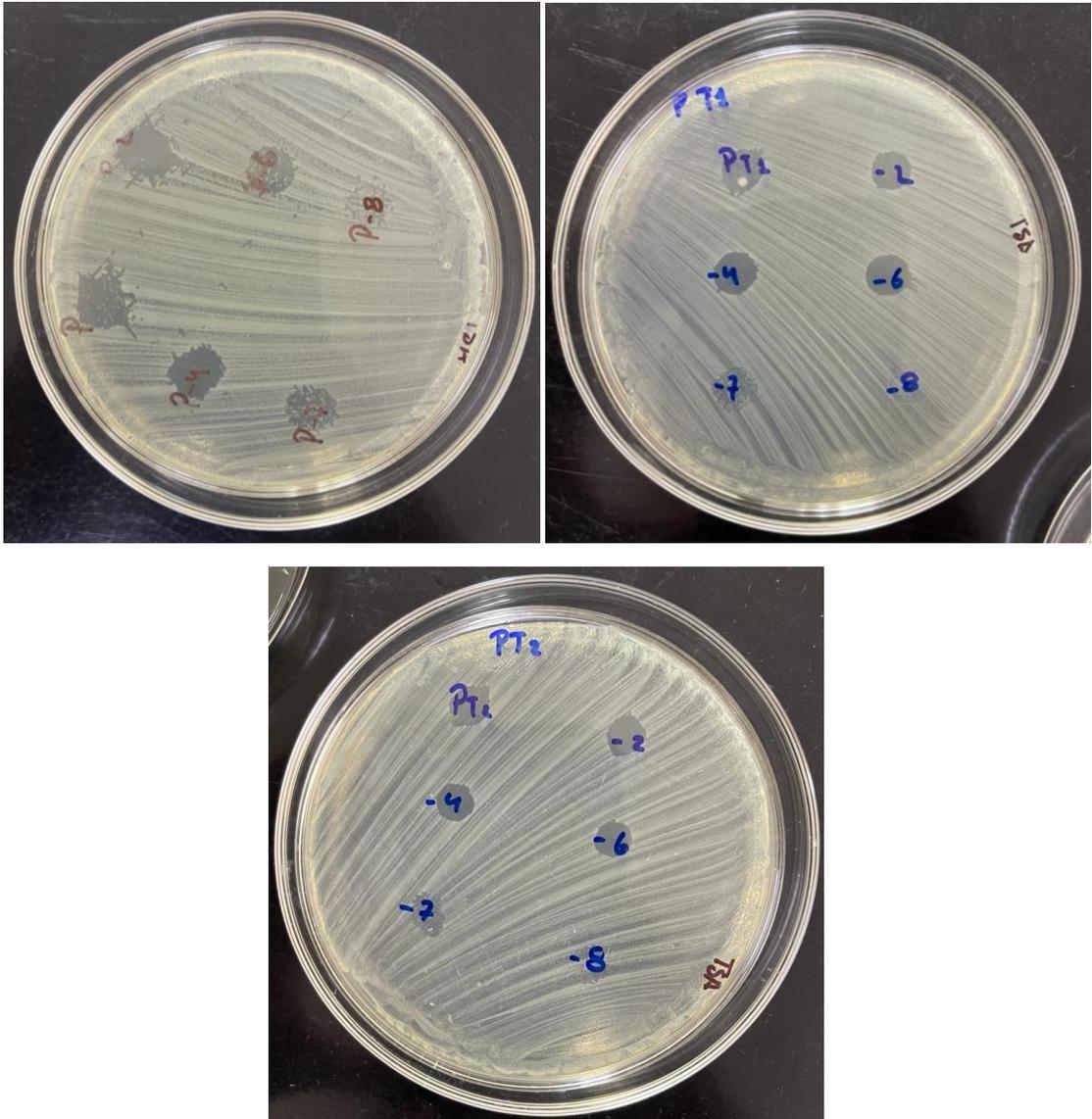
3.10 Análisis de titulación de bacteriófagos post-ensayo

Los resultados de la **figura 3.17** que son del post-ensayo no fueron los esperados debido a que la concentración de fagos siguió dando una concentración de 10^8 , lo cual nos indica que la concentración de entrada fue la misma concentración de salida. El ensayo se repitió de dos maneras diferentes, siendo la primera por tubos con un método de retención, el cual provocaba que por el tiempo que tomaba en pasar el tapón para hacer el análisis, provocaba que la concentración aumentara. Es por esto por lo que se optó por el segundo método en donde se realizó por matraces Erlenmeyer para una homogenización y retención más eficaz y no ocurra un aumento de concentración de fagos. En ambos ensayos se probó a una temperatura ambiental de 20°C y un pH entre 3.5 a 4.5, que es el pH de la arcilla sintetizada.

Pruebas adicionales utilizando diferentes niveles de pH y temperatura permitirán determinar las condiciones óptimas requeridas para que la capacidad de adsorción del material poroso sea la más óptima y de esta manera lograr obtener fagos adsorbidos que pueden ser liberados en el ambiente y lograr el control de microorganismos, particularmente, *E. coli*.

Figura 3. 17

Comprobación de titulación de bacteriófagos post-ensayo en diferentes tiempos de retención



Capítulo 4

4 Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se ha logrado sintetizar un material poroso sintetizado a partir de una arcilla bentonita y de aluminio para la creación de los pilares en la capa interlaminar de su estructura. El material posee dos diferentes tipos de poros, los cuales son microporos y mesoporos, que permitirá que pueda adsorber microorganismos de menos de 2 nm hasta 50 nm y con un área superficial de 200 m².
- Este material aparte de cumplir con el objetivo de adsorber microorganismos proporciona beneficios adicionales en la remediación de diversos contaminantes en ecosistemas acuáticos. Estos beneficios incluyen la reducción de contaminantes, aumento de oxígeno disuelto, el aumento del pH y el fomento del crecimiento de microorganismos que contribuyen a la restauración del ecosistema.
- Hasta el momento el material poroso a unas condiciones normales que son de temperatura ambiental (20°C) y a un pH natural de la arcilla bentonita, no ha logrado adsorber el bacteriófago “bme3”, por lo cual se espera a que en pruebas futuras con diferentes temperatura y pH se logre adsorber el bacteriófago.
- Con la síntesis de este material y su capacidad de adsorber microorganismo y contaminantes, estaremos cumpliendo dos objetivos de la ODS que son el objetivo 3 de Salud y Bienestar y el objetivo 6 de Agua Limpia y Saneamiento. Además de ser un material barato en comparación a los tratamientos de remediación y tratamientos con antibióticos contra bacterias resistentes.

4.2 Recomendaciones

- Se debe hacer diferentes tipos pruebas variando la temperatura y pH del ensayo para ver los efectos que tienen en el ensayo.
- Sintetizar diferentes tipos de materiales porosos como, arena de silicio, arenas de cuarzo y perlas de vidrio y así poder ver que material poroso beneficia más a la retención de los bacteriófagos.
- Comparar el material con el bacteriófago ya adsorbido con otros productos comerciales para ver las diferencias significativas entre los productos comerciales y nuestro material poroso.
- Usar diferentes bacteriófagos para ver si hay diferencia al retenerse en el material poroso, se podría usar el fago “*Myoviridae*”, el cual es un fago T4, que es especialista de *E. coli*.

Bibliografía

- Bales, R. C., Hinkle, S. R., Kroeger, T. W., Stocking, K., & Gerba, C. P. (1991). Bacteriophage adsorption during transport through porous media: Chemical perturbations and reversibility. *Environmental Science & Technology*, 25(12), 2088-2095. <https://doi.org/10.1021/es00024a016>
- Bales, R. C., Li, S., Yeh, T.-C. J., Lenczewski, M. E., & Gerba, C. P. (1997). Bacteriophage and microsphere transport in saturated porous media: Forced-gradient experiment at Borden, Ontario. *Water Resources Research*, 33(4), 639-648. <https://doi.org/10.1029/97WR00025>
- Bradford, S. A., Simunek, J., & Walker, S. L. (2006). Transport and straining of *E. coli* O157:H7 in saturated porous media. *Water Resources Research*, 42(12). <https://doi.org/10.1029/2005WR004805>
- California State Water Resources Control Board. (s. f.). Recuperado 21 de enero de 2024, de https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3110sp.pdf
- Chhibber, S., Kaur, S., & Kumari, S. (2008). Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 12), 1508-1513. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002873-0>
- Ciência E Tecnologia De Argilas, Pésio De Souza Santos (1) [3no7vz32rgld]. (s. f.). Recuperado 30 de enero de 2024, de <https://idoc.pub/documents/ciencia-e-tecnologia-de-argilas-persio-de-souza-santos-1-3no7vz32rgld>
- DR 2800 Spectrophotometer Procedures Manual.pdf. (s. f.).
- Espinal, L. (2012). Porosity and Its Measurement. En *Characterization of Materials* (pp. 1-10). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471266965.com129>

- Franson, M. (1980). *Metodos Normalizados Para el Analisis de Aguas Potables y Residuales*—APHA, AWWA, WPCF (15th edition). E. Greenberg. J. J. Connors and D.Jenkins. https://drive.google.com/file/d/1I9D-OinsCmZe_qvCCDKv90ScBtwjddN/view?pli=1
- Gaceta ram2018—Apuntes—REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014*—*Studocu*. (s. f.). Recuperado 14 de enero de 2024, de <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-ute/semiologia-medica/gaceta-ram2018-apuntes/44836164>
- Gamez, M. J. (s. f.). Objetivos y metas de desarrollo sostenible. *Desarrollo Sostenible*. Recuperado 14 de diciembre de 2023, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Gil, A., Massinon, A., & Grange, P. (1995). Analysis and comparison of the microporosity in Al-, Zr- and Ti-pillared clays. *Microporous Materials*, 4(5), 369-378. [https://doi.org/10.1016/0927-6513\(95\)00021-Z](https://doi.org/10.1016/0927-6513(95)00021-Z)
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 129-136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Green, A. (2017). Preparation of standard nitrate solutions for spectrophotometric analysis. *Journal of Environmental Chemistry*, 112-120.
- Hernández-López, P., Pérez-Rosales, P., Ramírez-Cruz, K., Rangel-Rivera, J., Salazar-Barrientos, I., & Guerra-Contreras, A. (2022). Obtención de esponjas de polidimetilsiloxano y su evaluación en remediación de agua. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1-10.
- Hidalgo Villón, Alba Patricia. (2019). *Contaminación por Coliformes Totales y Escherichia Coli en Concha (Anadara Tuberculosa y Anadara Similis) en Jambelí, El Oro*,

Ecuador.

[https://www.bing.com/ck/a?!&&p=dec9c46d6557731eJmltdHM9MTcwNjQwMDAwMCZpZ3VpZD0yZTQ4YjkYS0xMzg3LTZjMTUtMmI5Ni1hMTFjMTIyMDZkOTcmaW5zaWQ9NTIzNw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=2e48b2da-1387-6c15-2b96-a11c12206d97&psq=Contaminaci%
c3%b3n+por+Coliformes+Totales+y+Escherichia+Coli+en+Concha+\(Anadara+Tuberculosa+y+Anadara+Similis\)+en+Jambel%c3%ad%
2c+El+Oro%2c+Ecuador&u=a1aHR0cDovL3JlcG9zaXRvcmlvLnVnLnVkdS5lYy9oYW5kbGUvcvMzk2MTY&ntb=1](https://www.bing.com/ck/a?!&&p=dec9c46d6557731eJmltdHM9MTcwNjQwMDAwMCZpZ3VpZD0yZTQ4YjkYS0xMzg3LTZjMTUtMmI5Ni1hMTFjMTIyMDZkOTcmaW5zaWQ9NTIzNw&ptn=3&ver=2&hsh=3&fclid=2e48b2da-1387-6c15-2b96-a11c12206d97&psq=Contaminaci%c3%b3n+por+Coliformes+Totales+y+Escherichia+Coli+en+Concha+(Anadara+Tuberculosa+y+Anadara+Similis)+en+Jambel%c3%ad%2c+El+Oro%2c+Ecuador&u=a1aHR0cDovL3JlcG9zaXRvcmlvLnVnLnVkdS5lYy9oYW5kbGUvcvMzk2MTY&ntb=1)

Hornberger, G. M., Mills, A. L., & Herman, J. S. (1992). Bacterial transport in porous media: Evaluation of a model using laboratory observations. *Water Resources Research*, 28(3), 915-923. <https://doi.org/10.1029/91WR02980>

Jenkins, S. H. (1982). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Water Research*, 16(10), 1495-1496. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90249-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90249-4)

Karim Sapag, M. (1997). *Nuevos catalizadores basados en arcillas pilareadas para la síntesis de Fischer-Tropsch* [doctoralThesis]. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/670931>

Mantoura, R. F. C., & Llewellyn, C. A. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 151, 297-314. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80092-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80092-6)

Mirzaei, M. K., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*, 10(3), e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>

- Objetivos de Desarrollo Sostenible*. (s. f.). UNDP. Recuperado 14 de diciembre de 2023, de <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>
- Pandey, S. (2017). A comprehensive review on recent developments in bentonite-based materials used as adsorbents for wastewater treatment. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 1091-1113. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.115>
- Pardo, I., Garcia, L., Delgado, C., & Costas, N. (2019, julio 27). *Protocolos de Muestreo de Comunidades Biológicas Acuáticas Fluviales en el Ámbito de las Confederaciones Hidrográficas del Miño-Sil y Cantábrico; Invertebrados Bentónicos, Diatomeas*, .pdfslide.net. <https://pdfslide.net/documents/protocolos-de-muestreo-de-comunidades-biologicas-acuaticas-fluviales-en-el.html>
- Poxleitner, M., Pope, W., Jacobs-Sera, D., Sivanathan, V., & Hatfull, G. (2018). Phage discovery guide. *Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD*.
- Punil Luciano, R. J. (2017). *Caracterización de un bacteriófago específico de Escherichia coli aislado de aguas residuales de "La Taboada"*. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Rao, F., Song, S., & Lopez-Valdivieso, A. (2015). Synthesis and Characterization of Ag-PILC Through the Formation of Ag@Montmorillonite Nanocomposite. *Nano*, 10(02), 1550031. <https://doi.org/10.1142/S1793292015500319>
- Roca Jalil, E., Baschini, M., & Sapag, K. (2015). *Estudios de adsorción de fármacos en soluciones acuosas sobre arcillas naturales y pilareadas*. UNSL.
- Roca Jalil, M. E., Baschini, M., Rodríguez-Castellón, E., Infantes-Molina, A., & Sapag, K. (2014). Effect of the Al/clay ratio on the thiabendazol removal by aluminum pillared clays. *Applied Clay Science*, 87, 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.014>

- Sapag, K., & Mendioroz, S. (2001). Synthesis and characterization of micro-mesoporous solids: Pillared clays. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 187-188, 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00617-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00617-3)
- Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A.-C., Sultana, S., Krause, L., Huq, S., Bibiloni, R., Bruttin, A., Reuteler, G., & Brüssow, H. (2012). Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology*, 434(2), 222-232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.002>
- SX716-EN-1.pdf*. (s. f.). Recuperado 12 de diciembre de 2023, de <https://aperainst.de/wp-content/uploads/2022/09/SX716-EN-1.pdf>
- Tomul, F., & Balci, S. (2010). Synthesis and Characterization of Al-Pillared Interlayered Bentonites. *gazi university journal of science*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Synthesis-and-Characterization-of-Al-Pillared-Tomul-Balci/f706369bb7b0207af51cbc6b72085eedfe561c7d>
- UV-1800 UV/VIS Spectrophotometer,Rayleigh_specification/price/image_Bio-Equip in China*. (s. f.). Recuperado 12 de diciembre de 2023, de <https://www.bio-equip.cn/enshow1equip.asp?equipid=22031&division=901>
- Wilde, K. L., Stauber, J. L., Markich, S. J., Franklin, N. M., & Brown, P. L. (2006). The Effect of pH on the Uptake and Toxicity of Copper and Zinc in a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(2), 174-185. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0256-0>
- Younes, A., Fahs, M., & Ackerer, P. (2021). Modeling of Flow and Transport in Saturated and Unsaturated Porous Media. *Water*, 13(8), Article 8.
<https://doi.org/10.3390/w13081088>
- Zhang, W., Li, S., Wang, S., Lei, L., Yu, X., & Ma, T. (2018). Transport of *Escherichia coli* phage through saturated porous media considering managed aquifer recharge.

Environmental Science and Pollution Research, 25(7), 6497-6513.

<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0876-3>

Zhang, W., Li, S., Zhao, K., Chai, J., Wan, B., Qin, Y., Huan, H., Sun, S., Yang, Y., & Jat Baloch, M. Y. (2024). E. coli phage transport in porous media: Response to colloid types and water saturation. *Science of The Total Environment*, 906, 167635.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167635>

Zhao, M., Zeng, W., Wang, Y., Kai, G., & Qian, J. (2023). Application of porous composites in antibacterial field. *Materials Today Communications*, 37, 107410.

<https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107410>