



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**Tema:**

---

**“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA MICROALGA  
*Chlorella* EXTRAÍDA DE LAS AGUAS EMPOZADAS DE LAS ACEQUIAS DE  
ATOCHA, TILULUM Y EL SOCAVÓN DEL CANTÓN AMBATO”**

---

Trabajo de Investigación. Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniera Bioquímica.

**AUTOR:** Adriana Carolina Barona Altamirano

**Tutor:** Ing. Mg. Alex Valencia

Ambato – Ecuador

2014

## APROBACION DEL TUTOR

Siendo el tutor de trabajo de investigación realizado bajo el tema: “Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato”, por la egresada Adriana Carolina Barona Altamirano; tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de una tesis de grado de Ingeniería en Bioquímica; y el graduando posee los méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, enero del 2014

Ing. Mg. Alex Valencia

TUTOR

## AUTORIA

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: "Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato", así también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, corresponden exclusivamente a Adriana Carolina Barona Altamirano; e, Ing. Mg. Alex Valencia; Tutor del Proyecto de Investigación.

.....

Adriana Carolina Barona Altamirano

AUTOR

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Enero del 2014

Para constancia firman:

.....  
Presidenta Tribunal  
Ing. Gladys Navas

.....  
Miembro del tribunal  
Ing. Lander Pérez Mg.

.....  
Miembro del tribunal  
Dr. Carlos Rodríguez, PhD.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicarle este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza.  
A mi padre por haberme apoyado y amado mientras estuvo a mi lado, por cuidarme siempre desde el cielo.

A mi madre por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, a mis hermanos Paola, María José y Alex por estar siempre presentes, a mi esposo por su apoyo incondicional y a mi hijo Mateo quien es mi motivación, inspiración y felicidad.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi madre y hermanas quienes me han apoyado todo el tiempo brindándome su mano amiga, dándome a cada instante una palabra de aliento para llegar a culminar mi profesión.

Al Ingeniero Diego Salazar y Alex Valencia por su paciencia prestada y colaboración en la elaboración de este proyecto.

# INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## A. PAGINAS PRELIMINARES

<b>TEMA DE LA INVESTIGACION.....</b>	<b>i</b>
<b>APROBACION DEL TUTOR .....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIA .....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>vi</b>
<b>INDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>ANEXO A. TABLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>ANEXO B. FOTOGRAFIAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xvi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xvii</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>EL PROBLEMA DE INVESTIGACION .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tema de investigación.....	1
1.2.1 Contextualización .....	1
1.2.2 Análisis Crítico.....	4
1.2.3 Prognosis .....	5
1.2.4 Formulación del problema .....	5
1.2.5 Preguntas Directrices .....	5
1.2.6 Delimitación .....	6
1.3 Justificación.....	6
1.4 Objetivos .....	7
1.4.1 Objetivo general:.....	7
1.4.2 Objetivos específicos: .....	7
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>8</b>
<b>MARCO TEORICO .....</b>	<b>8</b>
2.1 Antecedentes investigativos .....	8
2.2 Fundamentación Filosófica .....	9
2.3 Fundamentación Legal .....	10

2.4	Categorías fundamentales.....	10
2.4.1	Microalgas .....	12
2.4.2	Importancia de las microalgas .....	12
2.4.3	Sistemas de cultivos.....	13
2.4.4	Aspectos del crecimiento de microalgas .....	13
2.4.5	Clasificación .....	15
2.4.6	<i>Chlorella</i> .....	16
2.4.7	Caracterización de la microalga <i>Chlorella</i> .....	16
2.4.8	Clasificación biológica .....	17
2.4.9	Condiciones óptimas de crecimiento .....	17
2.4.10	Aislamiento y Purificación .....	18
2.4.11	Biocaracterísticas .....	19
2.4.12	Compuestos bioactivos.....	21
2.4.13	Actividad antimicrobiana.....	21
2.4.14	Bactericida.....	22
2.4.15	Potencial antimicrobiano.....	22
2.5	Hipotesis.....	22
2.5.1	Hipótesis Nula .....	22
2.5.2	Hipótesis Alternativa .....	23
2.6	Señalamiento de variables.....	23
2.6.1	Variable Independiente.....	23
2.6.2	Variable Dependiente .....	23
<b>CAPITULO III</b> .....		24
<b>LA METODOLOGIA</b> .....		24
3.1	Enfoque.....	24
3.2	Modalidad básica de la investigación.....	24
3.3	Nivel o tipo de investigación .....	24
3.3.1	Exploratorio .....	24
3.3.2	Descriptivo.....	25
3.4	Población y muestra .....	25
3.5	Operacionalización de variables .....	25
3.6	Plan de Recolección de la Información.....	28
3.6.1	Recolección de muestras.....	28



3.6.2	Observación en microscopio de las muestras recogidas .....	28
3.6.3	Identificación de la microalga <i>Chlorella</i> .....	28
3.6.4	Asilamiento de la microalga <i>Chlorella</i> .....	29
3.6.5	Crecimiento microalgal .....	29
3.6.6	Velocidad de crecimiento.....	31
3.6.7	Obtención de Chlorellin .....	31
3.6.8	Aislamiento de bacterias mediante el método de difusión en placa .....	32
3.6.9	Identificación la bacteria gram-positiva .....	32
3.6.10	Aplicación de los discos.....	33
3.6.11	Incubación .....	33
3.6.12	Medición de los halos de inhibición.....	34
3.6.13	Control positivo.....	34
3.7	Plan de procesamiento de la información .....	34
3.7.1	Factores o niveles en estudio .....	34
a.	Tratamientos.....	34
b.	Diseño Experimental.....	36
<b>CAPÍTULO IV .....</b>		<b>37</b>
<b>ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS .....</b>		<b>37</b>
4.1	Análisis de los resultados .....	37
4.1.1	Crecimiento Celular .....	37
4.1.2	Velocidad de crecimiento.....	38
4.1.3	Pruebas de identificación bacteriana .....	39
4.1.4	Identificación de la microalga <i>Chlorella</i> .....	40
4.1.5	Conteo Celular.....	41
4.1.6	Chlorellin .....	41
4.1.7	Medición de Halos de inhibición.....	42
4.1.8	Análisis de varianza.....	43
4.1.9	Control positivo.....	46
4.2	Verificación de Hipótesis.....	46
4.2.1	Hipótesis nula (H <sub>0</sub> ) .....	46
4.2.2	Hipótesis Alternativa (H <sub>1</sub> ).....	46
4.3	Discusión general del trabajo de investigación .....	46
<b>CAPITULO V .....</b>		<b>48</b>

<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	48
5.1 Conclusiones .....	48
5.2 Recomendaciones .....	48
<b>CAPITULO VI</b> .....	50
<b>PROPUESTA</b> .....	50
6.1 Datos Informativos .....	50
6.1.1 Título: .....	50
6.1.2 Unidad Ejecutora: .....	50
6.1.3 Beneficiarios: .....	50
6.1.4 Ubicación .....	50
6.1.5 Director del Proyecto: .....	50
6.1.6 Personal Operativo: .....	50
6.2 Antecedentes de la Propuesta .....	50
6.3 Justificación .....	52
6.4 Objetivos .....	52
6.4.1 Objetivo General .....	52
6.4.2 Objetivos Específicos. ....	52
6.5 Análisis de factibilidad .....	52
6.6 Fundamentación .....	53
6.7 Metodología. Modelo Operativo .....	53
6.7.1 Recolección de muestras .....	53
6.7.2 Observación en microscopio de las muestras recogidas .....	53
6.7.3 Identificación de la microalga <i>Chlorella</i> .....	53
6.7.4 Asilamiento de la microalga <i>Chlorella</i> .....	54
6.7.5 Crecimiento microalgal .....	55
6.7.6 Velocidad de crecimiento .....	56
6.7.7 Obtención de Chlorellin .....	56
6.7.8 Aislamiento de bacterias mediante el método de difusión en placa .....	57
6.7.9 Identificación bacteriana .....	57
6.7.10 Aplicación de los discos .....	58
6.7.11 Incubación .....	59
6.7.12 Medición de los halos de inhibición .....	59
6.7.13 Control positivo .....	59

6.8	Administración.....	61
6.8.1	Recursos humanos.....	61
6.8.2	Recursos físicos.....	61
6.8.3	Recursos materiales.....	61
6.9	Previsión de la evaluación.....	62
4.4	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
<b>ANEXO</b>	.....	72

## INDICE DE TABLAS

### ANEXO A. TABLAS

Tabla A1. Medio Basal de Bold

Tabla A2. Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias

Tabla A3. Medio Mueller-Hinton

Tabla A4. Estándares de interpretación de CIM para *Staphylococcus* spp.

Tabla A5. Valores de crecimiento celular de la muestra de Atocha

Tabla A6. Valores de crecimiento celular de la muestra de Tilulum

Tabla A7. Valores de crecimiento celular de la muestra del Socavón

Tabla A8. Valores de Ln de los promedios de concentración celular

Tabla A9. Resultados de inhibición antibacteriana

Tabla A10. Halos de inhibición promedio

## **ANEXO B. FOTOGRAFIAS**

Fotografía 1: Microalga *Chlorella* observada microscópicamente

Fotografía 2. Sector Tilulum

Fotografía 3. Sector Atocha

Fotografía 4. Sector Socavón

Fotografía 5: Aislamiento

Fotografía 6: Resiembra

Fotografía 7: Agar sangre y Mac Conkey

Fotografía 8: Prueba catalasa

Fotografía 9: Prueba coagulasa

Fotografía 10. Prueba gram

Fotografía 11: Crecimiento 0-24 horas

Fotografía 12: Crecimiento celular 48-192 horas

Fotografía 13. Crecimiento celular 216-240 horas

Fotografía 14. Cultivo microalgal

Fotografía 15. Observación *Chlorella* (40x)

Fotografía 16. Chlorellin (Sobrenadante)

Fotografía 17. Chlorellin (Sedimento)

Fotografía 18. Molde para antibiograma

Fotografía 19. Alcohol Isopropílico- sedimento

Fotografía 20. Reverso

Fotografía 21. Etanol- Sedimento

Fotografía 22. Reverso

Fotografía 23. Agua- sobrenadante

Fotografía 24: Reverso

Fotografía 25. Alcohol Isopropílico- Sobrenadante

Fotografía 26. Reverso

Fotografía 27. Etanol- Sobrenadante

Fotografía 28. Reverso

Fotografía 29. Agua- sobrenadante

Fotografía 30: Reverso

Fotografía 31. Alcohol Isopropílico sedimento

Fotografía 32. Reverso

Fotografía 33. Etanol- Sedimento

Fotografía 34. Reverso

Fotografía 35. Agua- Sedimento

Fotografía 36. Reverso

Fotografía 37. Alcohol Isopropílico- Sobrenadante

Fotografía 38. Reverso

Fotografía 39. Etano- sobrenadante

Fotografía 40. Reverso

Fotografía 41. Agua- Sobrenadante

Fotografía 42. Reverso

Fotografía 43. Alcohol Isopropílico- Sedimento

Fotografía 44. Reverso

Fotografía 45. Etanol- Sedimento

Fotografía 46. Reverso

Fotografía 47. Agua- Sedimento

Fotografía 48. Reverso

Fotografía 49. Alcohol Isopropílico-sobrenadante

Fotografía 50. Reverso

Fotografía 51. Etanol- sobrenadante

Fotografía 52. Reverso

Fotografía 53. Agua- Sobrenadante

Fotografía 54. Reverso

Fotografía 55: Antibiograma de bacteria gram-positiva en agar Mueller-Hinton

## RESUMEN

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química; las condiciones óptimas de crecimiento varían de una especie a otra, las investigaciones sobre el cultivo de microalgas son de gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial.

*Chlorella* es una microalga verde unicelular de agua dulce, de forma esférica mide cerca de 2-10 micrones de diámetro, tiene alta concentración de clorofila, se reproduce rápidamente y de forma asexual, necesita carbono agua luz y pequeñas cantidades de minerales.

Se recolecto diferentes muestras de aguas empozadas de Atocha, Tilulum y el Socavón de la ciudad de Ambato, los cultivos de la microalga *Chlorella* se aislaron utilizando el medio Basal de Bold debido a la cantidad de nutrientes que posee, las células tardaron 240 horas en alcanzar la fase exponencial para su posterior análisis.

Se determinó el potencial antimicrobiano de la microalga en base a los resultados positivos en los ensayos en los que se utilizó el precipitado que resulta de la extracción del chlorellin con los solventes etanol y alcohol isopropílico.

El análisis estadístico determinó que el mejor tratamiento fue Tilulum- Alcohol isopropílico al tener mayor el tamaño del halo de inhibición, cuya media fue de 28mm, ante la bacteria coco grampositiva, mientras que el menor tratamiento fue Socavón-etanol con una media de 0,11mm.

En la última etapa de la investigación se realizó las pruebas de control positivo mediante la técnica del antibiograma utilizando la bacteria aislada y antibióticos como penicilina, demostrando que fue sensible con un halo de inhibición de 5mm ante la ampicilina y 1mm ante oxacilina, valores que están dentro del rango de sensibilidad de acuerdo a las tabla CIM (Concentración Mínima Inhibitoria).



## SUMMARY

Microalgae are photosynthetic unicellular eukaryotic organisms capable of transforming luminous energy into chemical energy, the optimal growth conditions change from one species to another, research on the cultivation of microalgae are of great importance because of its extensive biotechnology and commercial application.

*Chlorella* is a green single-cell microalga of sweet water, spherical measuring about 2-10 microns of diameter, has a high concentration of chlorophyll, it reproduces quickly and asexually, carbon water needs light and trace minerals.

Different samples stagnant water of Atocha, Tilulum and Socavón of Ambato city was collected, the cultures of *Chlorella* microalgae were isolated using the Basal Bold medium because of the amount of nutrients, the cells took 240 hours to reach exponential phase for analysis.

The antimicrobial potential of microalgae according to the positive results in the tests in which the precipitate which results from the extraction solvent chlorellin with ethanol and isopropyl alcohol was used was determined.

Statistical analysis determined that the best treatment was Tilulum-isopropyl alcohol have increased the size of the zone of inhibition, which averaged was 28mm, with Gram-positive bacteria, while the lowest was Socavón-ethanol treatment with a mean of 11mm.

In the last stage of the research tests positive control was performed by using the technique of susceptibility bacteria Gram-positive and antibiotics such as penicillin, showing that was sensitive to an inhibition of 5mm to 1mm to ampicillin and oxacillin, values that are within the range of sensitivity according to the MIC table (Minimum Inhibitory Concentration).

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

### 1.1 Tema de investigación

“DETERMINACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA MICROALGA *Chlorella* EXTRAIDA DE LAS AGUAS EMPOZADAS DE LAS ACEQUIAS DE ATOCHA, TILULUM Y EL SOCAVÓN DEL CANTÓN AMBATO”

### 1.2 Planteamiento del problema

#### 1.2.1 Contextualización

##### Macro

El trabajo de investigación se centra en la determinación del potencial biotecnológico de microalgas, ya que constituyen un grupo muy diverso considerado como maquinarias fotosintéticas generadoras de pigmentos con una adaptación ecofisiológica y plasticidad bioquímica única, que les permite la bioconversión directa de la energía solar en compuesto químicos, bajo una variedad de condiciones medioambientales y a una velocidad mayor que cualquier otra fuente vegetal (Paniagua, 1994). Tiene gran importancia económica ya que a diferencia de las plantas superiores, contienen relativamente pequeñas cantidades de material estructural y muchos de los componentes celulares son de reconocido valor económico (Travieso & Benítez, 1998).

Son fáciles de cultivar, su cultivo se lo puede realizar en grandes volúmenes de agua como lagunas, crecen sin fuertes restricciones climáticas o estacionarias,

muestran tener mayor actividad fotosintética y capacidad de fijación de dióxido de carbono (Ferrero, 2011).

Las microalgas tienen varias aplicaciones, destacando actualmente la producción de aceites y combustibles, además de su uso como suplemento alimenticio humano y animal, fuente de ácidos grasos, producción de energía eléctrica, uso como abono y fertilizante agrícola; se han observado también con extractos de microalgas, una gama de actividades farmacológicas sin embargo, los principios activos son todavía desconocidos en la mayoría de los casos (Olmedo, 2008).

Las principales especie de microalgas que se cultiva comercialmente son del género *Chlorella* Beijerinck (*Chlorophyceae*) y *Arthrospira* Stizenberger (*Cyanophyceae*) en adición a los alimentos naturales, *Dunaliella salina* Teodoresco (*Chlorophyceae*) para obtener el beta-caroteno y *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Chlorophyceae*) para la obtención de astaxantina, *Spirulina platensis*, la Cianofícea que es la más utilizada en acuicultura, *Chlorella vulgaris* utilizada para mejorar la función del sistema inmunológico, como también para desintoxicación de metales pesados del cuerpo (Martínez, 2010).

El Centro de Investigación de Cepsa (Compañía Española de Petróleos) y la Cátedra Cepsa trabajan, desde 2010, en un proyecto de investigación destinado a evaluar la viabilidad del uso de microalgas en la obtención de ácidos grasos útiles para la producción de biodiesel (Pérez, 2012). En la Universidad de Córdoba se obtuvo harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* con su correspondiente análisis proteico (Andrade, *et. al.*, 2006).

## **Meso**

En América Latina en países como Argentina, en la región de Chubut, hay un cultivo en campo abierto que produce 10 toneladas diarias de biodiesel. El cultivo consiste en varios estanques con forma de hipódromo, de 30 centímetros de

profundidad, se puede observar microalgas que absorben el CO<sub>2</sub> del ambiente para la producción del aceite (Botero, 2007).

En Brasil se estudió Bioprocesos para la eliminación de dióxido de carbono y óxidos de nitrógeno con microalgas (Vieira & Greque, 2008). En Colombia uno de los estudios de microalgas se realizó en lagos y ríos ubicados en la frontera Colombo-Brasílica en ecosistemas de los ríos Amazonas y Putumayo obteniendo alrededor de 206 taxones de 5 clases taxonómicas (Duque & Núñez, 2000). En Venezuela se investigó el Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.* aislada de la Represa de Tulé (Mora *et. al.*, 2005).

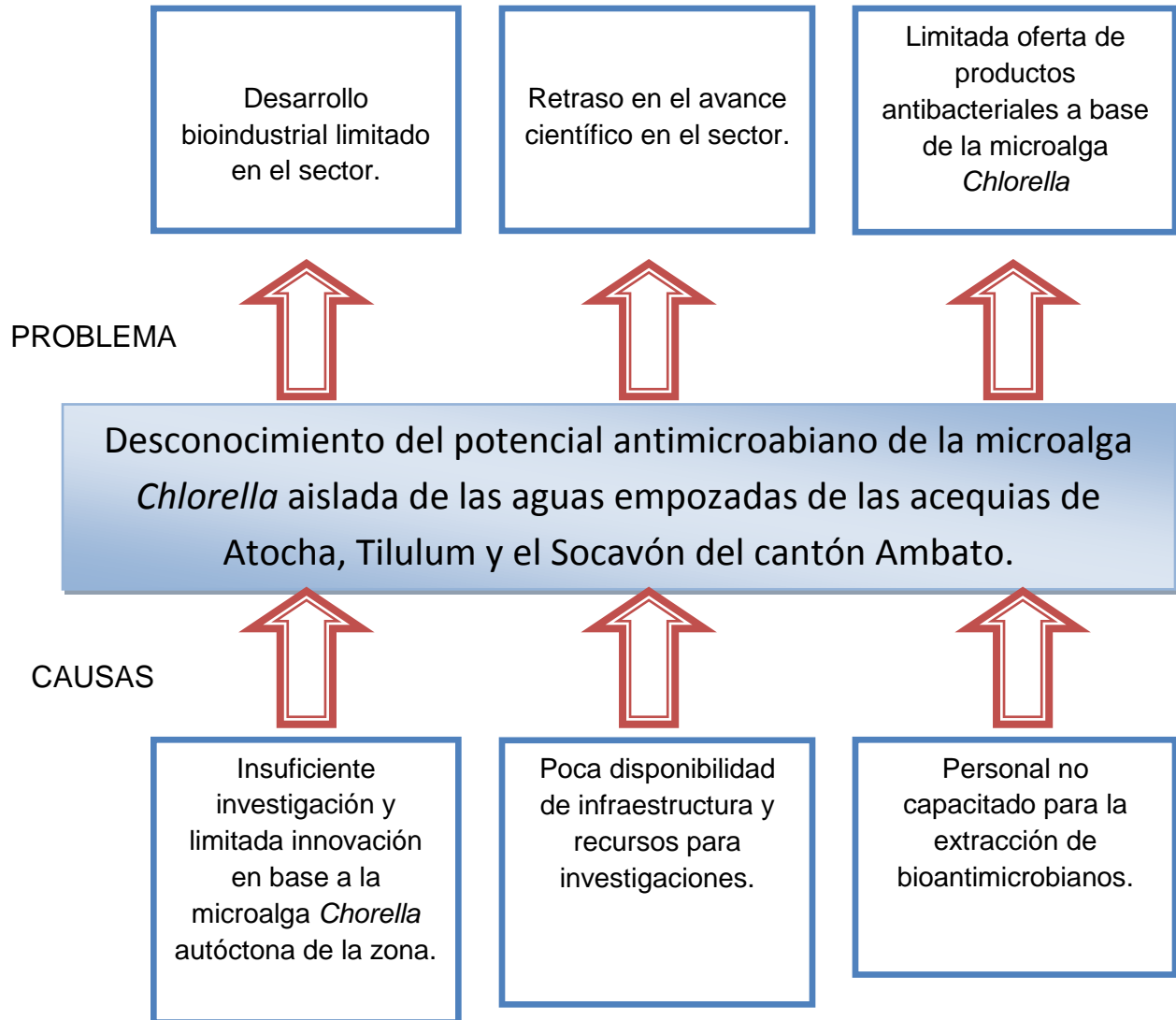
### **Micro**

Existe documentación que demuestra investigaciones realizadas en el Ecuador como la Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro microalgas nativas de las Provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha (Koch & Portilla, 2010), la obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de *Spirulina platensis*, mediante degradación anaerobia en fase hidrolítica (Albuja *et. al.*, 2011), compuestos con actividad antibacteriana producidos por las microalgas *Nannochloropsis oculata* y *Porphyridium cruentum* (Álvarez, 2007).

## 1.2.2 Análisis Crítico

### Diagrama Causa-Efecto

#### EFFECTOS



Elaborado por: Adriana Barona, 2013

Se han realizado varias investigaciones con microalgas, sin embargo muy poco se sabe de las propiedades de *Chlorella*, sobre todo de su potencial antimicrobiano debido a la escasa información acerca de su metabolismo y de sus compuestos bioactivos.

Insuficiente investigación y limitada innovación en base a la microalga *Chlorella* autóctona de la zona limitando el desarrollo bioindustrial en el sector. Por la poca disponibilidad de infraestructura y recursos para investigaciones con microalgas hay retraso en el avance científico en el sector. Debido al escaso personal capacitado para la extracción de bioantimicrobianos, existe limitada oferta de productos antibacteriales a base de la microalga *Chlorella*.

En la investigación se trató de determinar el potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato, para lo cual se ensayó la actividad antimicrobiana mediante el método del disco en solución de *Chlorella*, y se comparó su actividad con alcoholes comunes.

### **1.2.3 Prognosis**

Al no profundizar estudios en organismos marinos, se está limitando la búsqueda de compuestos bioactivos como en las microalgas, la poca investigación de los beneficios de *Chlorella* no permite avanzar en el conocimiento de su aplicabilidad. Al desconocer sus beneficios antibacteriales no se podrá elaborar productos con actividad antibacteriana.

### **1.2.4 Formulación del problema**

¿La microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato posee potencial antibacteriano?

### **1.2.5 Preguntas Directrices**

¿Cuál es el medio adecuado de crecimiento de *Chlorella* en el cantón Ambato?

¿Cómo se da el crecimiento *Chlorella* extraída de ambientes naturales en el laboratorio?

¿La microalga *Chlorella* posee potencial antimicrobiano?

¿*Chlorella* tiene actividad antimicrobiana similar a los alcoholes empleados como antibacteriales?

### **1.2.6 Delimitación**

#### **Delimitación Científica**

Campo: Biotecnología.

Área: Microbiología

Sub- área: Evaluación del potencial antimicrobiano de *Chlorella*

#### **Delimitación temporal**

La investigación se efectuó entre los meses de mayo 2013– enero 2014

#### **Delimitación Espacial- Geográfica**

El proyecto de investigación se realizó en los laboratorios de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica en la Universidad Técnica de Ambato, las muestras de la microalga en estudio se recogió de tres diferentes sectores de la ciudad de Ambato: El Socavón, Tilulum, y Atocha.

### **1.3 Justificación**

*Chlorella* es considerada una fuente potencial de compuestos con actividades biológicas importantes que no han sido explotados ampliamente, los cuales tienen un gran campo de aplicación en lo alimenticio, energético, agrícola y ambiental.

A pesar de ser capaces de crecer en un amplio rango de condiciones por la que se les encuentra en cualquier lugar, se conoce muy poco de los beneficios de las

propiedades de las microalgas, destacando el desconocimiento de la actividad antimicrobiana de *Chlorella*, en la investigación se pretendió evaluar su potencial antibacterial a partir de la extracción, aislamiento, purificación e identificación de *Chlorella*.

La investigación es factible ya que las muestras se tomó de lugares públicos donde existió agua estancada que presentaron coloración verde lo que confirmó la presencia de microalgas, el aislamiento y análisis correspondiente se realizó en los laboratorios de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, lo que facilitó la adquisición de materiales, equipos y reactivos necesarios para la realización del proyecto.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general:**

- Determinar el potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato.

### **1.4.2 Objetivos específicos:**

- Establecer lugares de crecimiento de la microalga *Chlorella* en el sector Ambato para su posterior extracción y aislamiento.
- Construir la curva de crecimiento de *Chlorella* extraída del sector.
- Determinar el potencial antimicrobiano de las moléculas extraídas de *Chlorella*.
- Determinar el potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* ante bacterias grampositivas.



## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

Revisado los archivos de trabajo que existen en la Universidad Técnica de Ambato, principalmente en la facultad de Ingeniería en Alimentos no se encontraron información concerniente al tema del trabajo de investigación, por lo que la investigación tomará en condición artículos técnicos.

A lo largo de la historia se han realizado varios estudios con microalgas, las primeras fueron realizadas en 1830 por el científico francés Dunal quien constató la existencia de las microalgas; en 1890 el microbiólogo Beijerinck obtuvo por primera vez cultivos puros con *Chlorella vulgaris*; Warburg trabajó en la obtención de cultivos con alta densidad celular, seguido por Teodoresco que describió a lo que actualmente se conoce como *Dunaliella salina* (Gómez L., 1997), a partir de entonces, se han realizado un sinnúmero de investigaciones descubriendo nuevos campos de aplicabilidad como en la industria farmacéutica, cosmética, acuicultura, en el tratamiento de aguas residuales (Albarracín, 2007).

Dentro del campo de la investigación en microalgas es importante el aporte de Pratt y Colaboradores (1945) al obtener una sustancia antibiótica contra bacterias grampositivas y gramnegativas extraídas a partir de cultivos de *Chlorella* en soluciones de nutrientes inorgánicos llamada Chlorellin.

Ghasemi y colaboradores (2007) estudiaron sesenta cepas de microalgas de las cuales 21 demostraron actividad antibacteriana contra al menos una bacteria grampositiva o gramnegativa, 9 cepas fueron especies de *Chlorella*; el principio activo de las microalgas fue extraído con metanol y hexano: las especies de *Chlorella* en extractos metanólicos presentaron mayores halos de inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa* al igual en el estudio de Kellam & Walker (2007), utilizaron 132 especies de microalgas evaluando su actividad antibacteriana in vitro.

El solvente hexano produjo las zonas más grandes de inhibición tanto para la bacteria *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, *Chlorella stigmatophora* presento halos de inhibición para las dos bacterias mientras que *Chlorella* sp. solo presentó inhibición para *Staphylococcus aureus*, este estudio demostró que las distintas especies de *Chlorella* en extractos metanólicos presentaron mayores halos de inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus* en comparación con la microalga *Nostocmuscorum*, que no presentó inhibición contra dicha bacteria, para la bacteria *Staphylococcus epidermidis* las cepas de *Chroococcus dispersus* tuvieron mayores halos de inhibición seguido por una de las cepas de *Chlorella vulgaris*; mientras que para la bacteria *Escherichia coli* las especies de *Chlorella* tuvieron menores zonas de inhibición, para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* *Chlorella vulgaris* no inhibió su crecimiento mientras que *Chroococcus dispersus* tuvo mayores halos, y para *Salmonella typhi* las especies de *Chlorella* tuvieron menos zonas de inhibición comparados con las otras microalgas destacando *Chlorella* sp. quien tuvo mayor halo entre ellas (Kellam & Walker, 2007).

## **2.2 Fundamentación Filosófica**

El paradigma positivista también denominado paradigma cuantitativo, empírico-analítico, o racionalista, tiene como fundamento filosófico el positivismo; es utilizado para estudiar los fenómenos en el campo de las ciencias naturales, regido por leyes, las cuales permiten explicar, predecir y controlar los fenómenos del mundo natural.

El paradigma positivista conduce a la formulación de hipótesis desde la lógica formal en las cuales se interrelacionan variables, cuya medición cuantitativa, permite aceptarlas o rechazarlas en el proceso de investigación; este paradigma tiene como escenario de investigación el laboratorio a través de un diseño preestructurado y esquematizado.

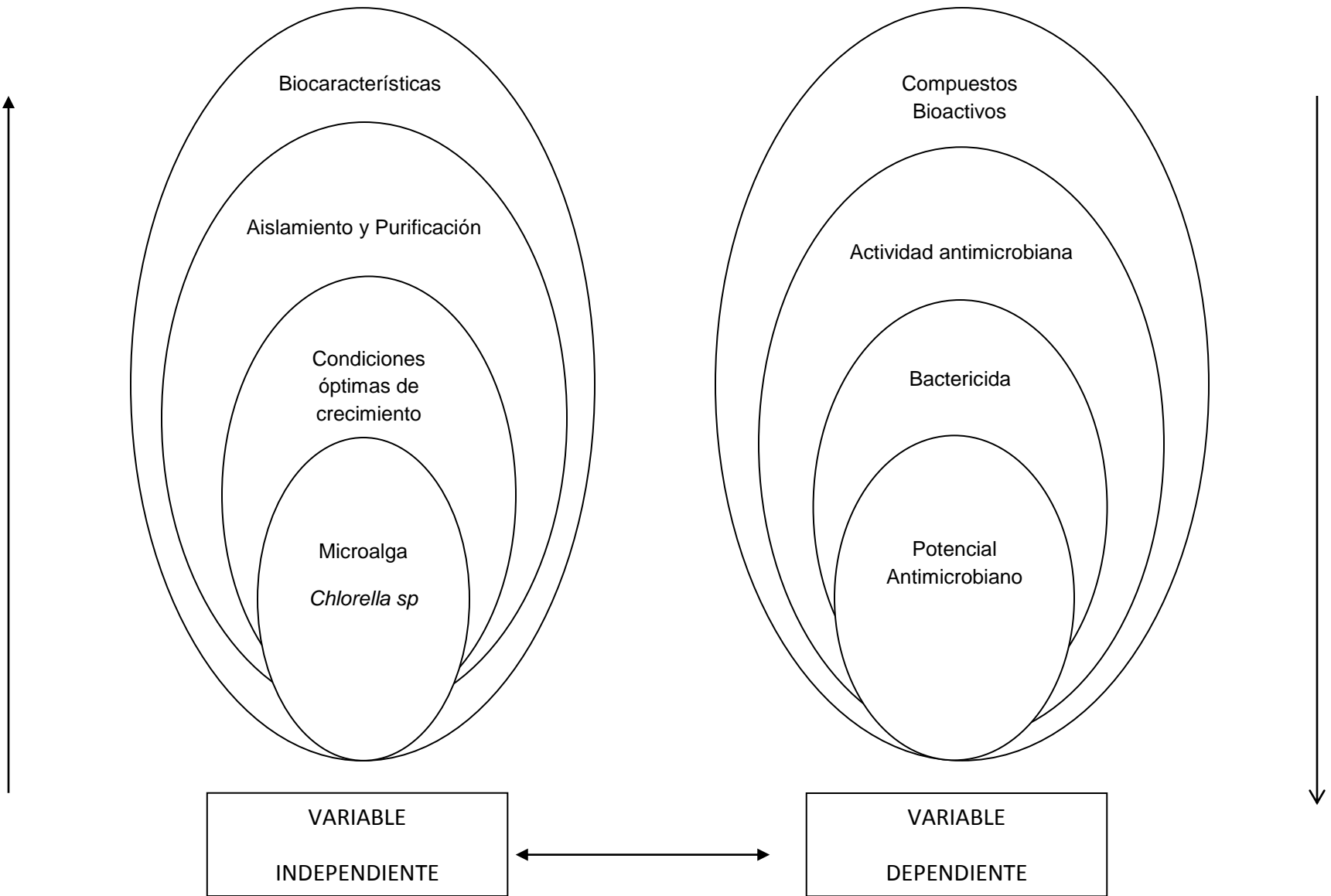
La presente investigación se basará en este paradigma porque se plantean hipótesis acerca del potencial antimicrobiano que tiene la microalga *Chlorella* para luego ser comprobado; todo fundamentado en el conocimiento cuantitativo.

### **2.3 Fundamentación Legal**

Esta investigación se basa en el artículo 400 del capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales, sección segunda: Biodiversidad, del Régimen del Buen Vivir de la Constitución del Ecuador, el cual se refiere a la soberanía que ejerce el estado sobre la biodiversidad.

Declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

### **2.4 Categorías fundamentales**



### **2.4.1 Microalgas**

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares procariotas (cianobacterias) y eucariotas que utilizan la luz como fuente de energía para fijar el dióxido de carbono; contienen clorofila y pigmentos carotenoides siendo una parte importante en la producción primaria de la cadena alimenticia acuática (Silva *et. al.*, 2006).

Su tamaño varía del micrón a la centena de micrones, se encuentran en abundancia en los medios acuáticos (océanos, ríos, lagos), crecen también en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes (Monthieu, 2010).

La biodiversidad de las microalgas es sumamente amplia, se han identificado alrededor de 40,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000 de las cuales se desconoce su composición bioquímica y metabolismo (Hernández, *et. al.*, 2009).

### **2.4.2 Importancia de las microalgas**

Son organismos que contienen pequeñas cantidades de material estructural y muchos de sus componentes celulares actualmente son de reconocido valor económico (Quintero, 1981).

Según Travieso & Benítez (1998) las microalgas poseen un gran potencial como fuente de productos químicos como vitaminas, minerales, carbohidratos, lípidos y proteínas, por lo que son utilizadas en las industrias cosmética, textil, como fuente directa de alimentos, medicamentos, forraje, fertilizantes y combustibles.

Las microalgas pueden ser cultivadas todo el año, y cosechadas continuamente, siendo importantes también en la acuicultura como alimento para larvas, en la biotecnología y biomedicina como complemento alimenticio para humanos (Silva, *et. al.*, 2006), en biorremediación, biocombustibles y biofertilizantes empleando

microalgas como abonos y acondicionadores de suelos controlando la erosión (Bejarano, 2010).

### 2.4.3 Sistemas de cultivos

Para el cultivo de microalgas se han diseñado y empleado distintos sistemas de cultivos como:

- **Sistema continuo:** Su funcionamiento consiste en la entrada y salida de un flujo de materia de forma continua durante todo el periodo de operación.
- **Cultivo discontinuo (feed-batch):** consiste en adicionar los reactivos de una vez en el interior del reactor, esperar el tiempo necesario para que se dé la reacción y vaciar el contenido, durante el tiempo de operación no entra ni sale ningún flujo de materia del reactor.
- **Sistema semicontinuo:** consiste en introducir un reactivo de forma discontinua (todo de una vez), y añadir el segundo reactivo de forma continua durante el periodo de reacción, la masa total de la mezcla de reacción no se mantiene constante (Grau, 1999).

Los fotobioreactores son idóneos para producir una gran cantidad de biomasa algal, permiten el cultivo de una única especie de microalga durante un tiempo prolongado (Gómez F., 2009)

### 2.4.4 Aspectos del crecimiento de microalgas

En el medio natural, así como en cultivos, el crecimiento de una población de microalgas es el resultado de la interacción entre factores biológicos, físicos y químicos (Martínez, 2010).

## - Requerimientos Físicos

De manera general las microalgas requieren de ciertos factores específicos, como los que se detallan en la tabla 1 y 2.

**Tabla 1.** Requerimientos físicos de los Cultivos de Microalgas

Parámetros	Requerimientos	Valores
Físicos	LUZ	2,000 – 4,000 lux
	TEMPERATURA	15 – 22°C
	SALINIDAD	0.37‰

**Fuente:** Acuña, 2011

Para el cultivo de microalgas se prefiere una fuente de luz artificial en lugar de la exposición directa a la luz solar, porque la radiación ultra violeta puede ser nociva para las células, además se debe tomar en cuenta la temperatura ya que la mayoría de las especies de microalgas crece entre 10 y 35°C con un óptimo entre 16 y 24 °C, al inyectar aire a los cultivos se logra una difusión efectiva de los nutrientes y un aporte parcial de CO<sub>2</sub> además que ayuda a estabilizar el pH (Acuña, 2011).

## - Requerimientos Químicos

**Tabla 2.** Requerimientos químicos de los Cultivos de Microalgas

Parámetro	Requerimientos	Compuestos Químicos
Químicos	C	CO <sub>2</sub> , CO <sub>3</sub>
	O, H	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
	N	N <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	P	PO <sub>4</sub>
	S	SO <sub>4</sub>
	Na, K, Ca, Mg	Sales
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al	Sales

**Fuente:** Acuña, 2011

### 2.4.5 Clasificación

Se han estudiado los detalles morfológicos de microalgas con el uso del microscopio electrónico, lo que ha permitido observar la fina estructura de la célula a escala y sus constituyentes (Viramontes, 1991).

**Tabla 3.** Clasificación de microalgas

División	Características	Clase	Características
Chlorophyta	Reserva de carbono almidón.	<i>Chlorophyceae</i>	Tiene clorofila a y b
Cyanophyta	Tienen clorofila a, pigmentos accesorios.	<i>Cyanophyceae</i>	Sus pigmentos tienen clorofila a.
Rhodophyta	Tienen clorofila a y d, beta carotenos.	<i>Rhodophyceae</i>	Contienen clorofila a y d.
Charophyta	Tienen clorofila a y b, xantofilas y caroteno.	<i>Charophyceae</i>	Tienen clorofila a y b
Chromophyta	Posee clorofila a y c y beta caroteno, xantofilas, peridina.	<i>Euglenophyceae</i> (euglenoides)	Tiene clorofila a y b
		<i>Dinophyceae</i> (dinoflagelados)	Tiene clorofila a, y c.
		<i>Cryptophyceae</i> (Criptofitas)	Tienen clorofila a, y c.
		<i>Crysophyceae</i> (alga dorada)	Tiene clorofila a, c <sub>1</sub> y c <sub>2</sub>
		<i>Prymnesiophyceae</i>	Tiene clorofila a, c <sub>1</sub> y c <sub>2</sub> ,
		<i>Rhaphidophyceae</i> (cloromonadas)	Los cloroplastos contienen clorofila a.
		<i>Xantophyceae</i>	Sus cloroplastos tienen clorofila a y β-carotenos
		<i>Eustigmatophyceae</i>	Posee carotenoides fucoxantina
		<i>Phaeophyceae</i>	Tienen clorofila a c <sub>1</sub> y c <sub>2</sub>

**Fuente:** Viramontes, 1991

A pesar de las diferencias estructurales y morfológicas entre los representantes de cada división, son similares fisiológicamente y tienen un metabolismo análogo al de las plantas (Viramontes, 1991).



#### **2.4.6 *Chlorella***

El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña; fue descubierta y nombrada por el holandés Martinus Willem Beijerincken 1890 (Ríos, 2010).

*Chlorella* es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las *Chlorophyceae*. Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos, es una de las primeras formas de vida; ha estado en la tierra desde el periodo pre-Cámbrico por más de 2,5 millones de años. Su característico color verde esmeralda y el olor de hierba agradable se deben a su alto contenido de clorofila. *Chlorella* tiene un tamaño de 2 - 8  $\mu\text{m}$  que hace posible que se observe sólo bajo un microscopio; una sola célula es 6/1000 mm de ancho (Infante *et. al.*, 2011).

La reproducción asexual se representa por medio de autosporas y forman grupos irregulares o colonias, esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluidos en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos (Jiménez & Jiménez, 2012)

#### **2.4.7 Caracterización de la microalga *Chlorella*.**

Los primeros parámetros para distinguir a las microalgas se basan en la pigmentación, morfología, ausencia o presencia de flagelos, características de flagelos (numero, longitud), presencia o ausencia de pelos, composición de la pared celular y tipo de producto fotosintético (Albarracín, 2007).

Existen diferentes tipos de microalgas entre ellas las *Cyanophyceae* (cianoficias) cuya característica principal es su ausencia de núcleo definido, no presenta membrana nuclear discreta o nucléolos, carece de flagelos pero muchas de ellas tiene movimiento suave por la producción de mucilago, tienen color azul-verde por la presencia de ficocianina, las *Chlorophyceae* (Cloroficeas) no tiene flagelos, no móviles, tienen color verde por la presencia de clorofila a y b, de forma redonda,

unicelular; las *Chrysophyceae* (crisofíceas) son células móviles, biflageladas uno de los flagelos es parecido a un cabello y el otro es terso y visualmente más corto, de color pardo dorado tienen uno o dos cloroplastos; las *Haptophyceae* (haptofíceas), son similares a las crisofíceas tanto en pigmento como flagelos y modo de nutrición; las *Bacillariophyceae* (bacilariofíceas), aquí están las diatomeas, son de color pardo dorado, de forma alargada, tiene generalmente dos cloroplastos o bien un solo cloroplasto grande y vacuolas pequeñas en los extremos de la célula; las *Phyrrrophyceae* (pirrofíceas) conocidas como dinoflagelados, unicelulares móviles por la presencia de dos flagelos, tienen núcleo, citoplasma del endosimbionte contiene cloroplastos mitocondrias y ribosomas; las *Cryptophyceae* (criptofíceas) son células móviles por la presencia de dos flagelos, tienen clorofila a y c, y finalmente las *Euglenophyceae* (euglenofíceas) son células unicelulares móviles, generalmente de forma cilíndrica o fusiforme, tienen flagelos (Cañavate, 2008).

#### **2.4.8 Clasificación biológica**

**REINO:** Protoctista

**DIVISIÓN:** Chlorophyta

**CLASE:** *Chlorophyceae*

**ORDEN:** Chlorococcales

**FAMILIA:** Oocystaceae

**GÉNERO:** *Chlorella*

**ESPECIES:** *C. fusca*, *C. fusca* var. *Rubencens*, *C. homosphaera*, *C. kessleri*, *C. luteorividis*, *C. minutissima*, *C. prototheicoides*, *C. saccharophila*, *C. vulgaris*, *C. vulgarisfortertia*, *C. zofngiensis* (Becerra & Monzoy, 1992).

#### **2.4.9 Condiciones óptimas de crecimiento**

El crecimiento de la microalga *Chlorella* requiere luz, dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas. Con respecto a la temperatura, su valor está dentro del intervalo que toleran un gran número de especies, entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo. Temperaturas por debajo

de 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por encima de los 35°C son letales, debe permanecer generalmente dentro de 18 a 30 °C.

El medio del crecimiento debe proporcionar los elementos inorgánicos que constituyen la célula algácea. Los elementos esenciales incluyen el nitrógeno, el fósforo, y el hierro (Alvear *et. al.*, 2011).

#### 2.4.10 Aislamiento y Purificación

##### Medio de cultivo

Un cultivo puede ser definido como un ambiente artificial en el que las microalgas crecen, para lo cual es necesario que las condiciones del cultivo deben semejarse al ambiente natural de la microalga (Cervera, 2011)

Para la microalga *Chlorella* se recomienda el “Medio Basal de Bold (BBM)” cuya fórmula se describe a continuación:

**Tabla 4.** Medio Basal de Bold

REACTIVO	CONCENTRACION (mg/L)
Nitrato de sodio	250
Cloruro de Calcio dihidratado	25
Sulfato de Magnesio heptahidratado	75
Fosfato de potasio	75
Cloruro de sodio	25
Ácido sulfúrico	0.001(ml/L)
Ácido Bórico	11.42
EDTA	50
Sulfato de zinc Heptahidratado	8.82
Cloruro de manganeso dihidratado	14.4
Oxido de Molibdeno	0.71
Sulfato de cobre pentahidratado	1.57
Nitrato de cobre hexahidratado	0.49

**Fuente:** Ramírez *et. al.*, 2008

#### **2.4.11 Biocaracterísticas**

*Chlorella* es una especie con una alta concentración de nutrientes, lo que le permite mantener vida independiente, contiene alrededor de 18 aminoácidos, incluidos todos los aminoácidos esenciales, lo que la convierte en una fuente de proteína completa y de alta calidad, tiene una amplia gama de vitaminas (incluyendo vitamina A, C, E) que favorecen el valor nutricional de su biomasa (Quintana *et. al.*, 1999) beta carotenos (B1, B2, B6, B12) poderoso antioxidante, minerales (calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, yodo), los nutrientes (tales como, proteínas, hidratos de carbono); es rica en ácidos grasos no saturados (Healey, 2010).

También contiene la mayor concentración de clorofila (5 a 10 veces mayor que cualquier otra microalga) y ácidos nucleicos (RNA y DNA), ácidos nucleicos esenciales para la producción de energía, estructura y función celular (Quintana *et. al.*, 1999).

Las microalgas representan una fuente natural importante de principios activos de gran valor en el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones; además, pueden ser usadas para la producción de componentes de alto valor añadido y como biomasa propia para el inicio de procesos de bioproducción (Carvajal *et. al.*, 2010).

#### **Lípidos**

Según Pérez y Fernández (2011), los lípidos son biomoléculas de gran interés científico y biotecnológico por sus amplias aplicaciones; las microalgas constituyen la materia prima para la síntesis de lípidos, particularmente *Chlorella sp.*, que es una de las microalgas más representativas por su elevado contenido de lípidos, además, destacan que la producción de lípidos se encuentra influenciada por varios factores físicos y químicos, esta modificación provoca una respuesta de estrés que se manifiesta por variaciones en la composición de lípidos sintetizados, que varía de una especie a otra.

Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol formados por ácidos grasos con cadenas constituidas de 14-20 átomos de carbono, pueden ser

saturados o insaturados como: ácido eicosapentaenoico, y ácido linoléico (Albarracín, 2007).

### **Vitaminas**

Los cultivos de *Chlorella* son utilizados como suplemento alimenticio sustituyendo fuentes alimenticias comunes; su contenido vitamínico depende del genotipo, estado del ciclo de crecimiento, estado nutricional, intensidad de la luz y otros factores que pueden afectar el desarrollo y metabolismo de la microalga.

*Chlorella* tiene cantidades significativas de vitamina C, Vitamina B1( tiamina), B2 (Riboflavina), B3 (Niacina), B5 (Acidopantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (Ácido fólico) y B12 (Cianocobalamina), Vitaminas E, H (Biotina) (Quintana *et. al.*, 1999).

### **Clorofila**

Camacho y Colaboradores (1999) mencionan que *Chlorella* tiene la mayor cantidad de clorofila en comparación con todas las algas verde y otras plantas, su contenido de clorofila puede llegar tan alto como el 7% del total de sus de peso, 10 veces más que la *Spirulina*, y 10 veces más que la alfalfa.

### **Aminoácidos**

*Chlorella* tiene una buena composición de aminoácidos, tiene 8 aminoácidos esenciales, además contiene una gran cantidad de aminoácidos no esenciales, por lo que puede compensar deficiencias en el cuerpo, siendo una proteína completa (Quintana *et. al.*, 1999).

### **Sales minerales**

Los componentes minerales como el potasio, el calcio, el magnesio o aquellos elementos como el hierro, el zinc y el selenio son indispensables para las reacciones del metabolismo celular. Estos están presentes a su vez para reforzar la formación de sustancias como los huesos, los dientes y uñas para favorecer una formación de mejor calidad, resistentes. *Chlorella* además de contener dichos

minerales, es también una fuente de ácido lipoico, un factor de crecimiento microbiano importante (Bertoldi *et. al.*, 2006).

## **Fibra**

*Chlorella* tiene un contenido alto en fibra, debido a su triple capa de celulosa en la pared celular externa, también ayuda al sistema de defensa natural reforzando el sistema inmunológico (Healey, 2010).

## **Ácidos nucleicos**

La microalga *Chlorella* tiene el más alto contenido de ADN y ARN, los cuales asisten al cuerpo humano en la reparación del material genético dañado de las células haciendo más lento el proceso de envejecimiento, ayuda también a la reparación de tejidos heridos como úlceras y heridas, y así promueve una rápida recuperación de lesiones y enfermedades y la regeneración de la piel (Barajas *et. al.*, 2011).

### **2.4.12 Compuestos bioactivos**

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos, numerosas revisiones señalan a las microalgas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos, en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes, entre otros (Ríos, *et. al.* 2009)

### **2.4.13 Actividad antimicrobiana**

La actividad antibacterial puede ser considerada como un indicador de la capacidad de las microalgas para sintetizar compuestos bioactivos de interés terapéutico, aunque esta actividad puede depender tanto de la especie como de la extracción eficiente de los compuestos bioactivos.

Particularmente sobre la actividad antibacteriana y antifúngica se han desarrollado en años recientes una importante cantidad de investigaciones con resultados que

reportan que los extractos crudos de algunas algas inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Ríos, *et. al.* 2009).

#### **2.4.14 Bactericida**

La mayoría de las investigaciones realizadas con extractos crudos de microalgas mencionan gran actividad contra bacterias Gram positivas. Entre ellas, el *S. aureus* es considerada como una de las especies más susceptibles a los exudados y extractos algales (Ríos, *et. al.* 2009).

#### **2.4.15 Potencial antimicrobiano**

Cada vez son más los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano que se obtienen de fuentes naturales como plantas, algas y hongos. Estos compuestos inactivan las cepas bacterianas por mecanismos diferentes a los antibióticos actuales lo que favorece su empleo como tratamiento alternativo o complementario.

El estudio de la antibiosis microalgal suele enmarcarse en cuatro perfiles estrechamente relacionados: la búsqueda de especies con actividad antimicrobiana, la separación, purificación y elucidación de la estructura química de los compuestos responsables de la misma (Lara, *et. al.* 1999).

### **2.5 HIPOTESIS**

La determinación del potencial antimicrobiano de *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón permite conocer los efectos antibacterianos en diferentes medios de elución.

#### **2.5.1 Hipótesis Nula**

La determinación del potencial antimicrobiano no se ve influenciada significativamente del medio de elución y lugar de extracción.

### **2.5.2 Hipótesis Alternativa**

La determinación del potencial antimicrobiano se ve influenciada significativamente del medio de elución y lugar de extracción.

## **2.6 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES**

### **2.6.1 Variable Independiente**

Microalga *Chlorella*

### **2.6.2 Variable Dependiente**

Potencial antimicrobiano



## CAPITULO III

### LA METODOLOGIA

#### 3.1 Enfoque

La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, ya que para la comprobación de las hipótesis establecidas previamente, se recogieron y analizarán datos, en base al potencial antimicrobiano de *Chlorella*, utilizando un método estadístico que permitió establecer el mejor tratamiento de estudio.

#### 3.2 Modalidad básica de la investigación.

Se empleó la investigación de tipo documental-bibliográfica, ya que se estudió conceptos y características de lo que son las microalgas, principalmente de *Chlorella*, sus propiedades, aislamiento y beneficios, basándose en documentos científicos, libros, revistas relacionados con este tema.

Investigación tipo experimental, ya que permitió manipular una o más variables experimentales no comprobadas, en este caso los diferentes medios de elución y los lugares de donde se recogieron las muestras a utilizar con el fin de determinar si posee o no potencial antimicrobiano la microalga *Chlorella*.

#### 3.3 Nivel o tipo de investigación

##### 3.3.1 Exploratorio

La investigación empleada en el proyecto fue de tipo exploratorio porque se inició el estudio de un fenómeno del cual se tiene mucha información, que debe ser organizada para llegar a una debida comprensión del tema y del problema, en este caso el estudio de *Chlorella*, sus beneficios y potenciales que pueden ser aprovechados para la obtención de antibacteriales para bacterias comunes.

### **3.3.2 Descriptivo**

El nivel de investigación fue descriptivo porque detalla las características más importantes del tema de investigación, que permitió obtener datos confiables para determinar las mejores condiciones de aislamiento de *Chlorella* para la obtención de productos antibacterianos.

### **3.4 Población y muestra**

Se tomaron muestras individuales de agua empozadas de distintos puntos en tres lugares diferentes Atocha, Tilulum y el Socavón, con la ayuda de recipientes estériles se recolectaron 100ml de agua, los cuales fueron almacenados a temperatura ambiente en el laboratorio a trabajar.

### **3.5 Operacionalización de variables**

**TABLA 5: Variable dependiente: Potencial Antimicrobiano**

CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICA E INSTRUMENTOS
La determinación del potencial antimicrobiano de la microalga <i>Chlorella</i> extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón permite conocer los efectos antibacterianos en diferentes medios de elución.	Potencial antimicrobiano	Halos de inhibición	Se determina el potencial antimicrobiano mediante la presencia de halos de inhibición que limitan el crecimiento de la bacteria	Observación Directa Discos de Inhibición
	Agua empozada	Canal de agua Agua estancada	La microalga en estudio crece en canales de agua, agua estancada asegurando su existencia por la coloración verde que presenta el agua	Observación directa
	Medios de elución	Etanol Alc. Isopropílico Agua	Los diferentes medios de elución como el etanol el alcohol isopropílico y el agua sirven para la extracción de las moléculas bioactivas de <i>Chlorella</i> .	Observación Directa

**ELABORADO POR:** Adriana Barona, 2013

**TABLA 6: Variable Independiente: Microalga *Chlorella***

CONCEPTUALIZACION	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEM BASICO	TECNICA E INSTRUMENTOS
<p><i>Chlorella</i> es una microalga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples, pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las <i>Chlorophyceae</i>.</p>	Concentración de <i>Chlorella</i>	Morfología  Población celular	La microalga <i>Chlorella</i> se la reconoce por su morfología redonda y color verde mediante el uso del hemocitómetro	Hemocitómetro
	Chlorophyta	Clorofila a, b Formas unicelulares	La división Chlorophyta se las distingue principalmente por ser unicelulares o formar colonias simples, todos los grupos de esta división tienen clorofila a y b	Microscopio
	<i>Chlorophyceae</i>	morfología ultraestructural	La clase <i>Chlorophyceae</i> son algas verdes que se distinguen básicamente por su morfología ultraestructural	Microscopio

**ELABORADO POR:** Adriana Barona, 2013

### **3.6 Plan de Recolección de la Información**

#### **3.6.1 Recolección de muestras**

Para la obtención de células de *Chlorella* se recogieron muestras de aguas estancadas de distintos puntos en 3 lugares diferentes del cantón Ambato: Atocha, Tilulum y El Socavón; 4 muestras en Atocha, 5 muestras en Tilulum y 4 muestras en el Socavón, (13 muestras) teniendo en cuenta su coloración verde lo que indicó presencia de algas.

Se recogió 100 ml de agua estancada de cada uno de los puntos en recipientes de plástico estériles, rotulando la fecha, y el lugar específico de donde fueron recolectadas (Anexo B1).

Se conservó las muestras en las mismas botellas, para su posterior observación, expuestas al ambiente sin taparlas.

#### **3.6.2 Observación en microscopio de las muestras recogidas**

Se colocó una gota de cada muestra en un portaobjetos y se observó en el microscopio, identificando la presencia de numerosos microorganismos por lo que se trató de reconocer células microalgas con el fin de seleccionar las muestras útiles y descartar las muestras que no tuvieron la microalga.

#### **3.6.3 Identificación de la microalga *Chlorella*.**

Para la identificación de *Chlorella* se basó en su morfología esférica, cerca de 2-10 micrones de diámetro, por su ausencia de flagelos por lo que es inmóvil, por su ausencia de pelos, por ser unicelular, y en su pigmentación, ya que al contener altos niveles de clorofila a y b el medio en el que creció fue de color verde; finalmente se comparó las células obtenidas con bibliografía con el fin de corroborar que en las muestras analizadas crecía posiblemente la microalga de interés.

En Atocha se identificó que 3 de las 4 muestras recolectadas tuvo células microalgas, de Tilulum 3 de las 5 muestras y Socavón 2 de las 4 muestras, al reconocer lo que posiblemente era *Chlorella* se las aisló varias veces con el fin

de obtener cultivos puros, en un medio nutriente para microalgas, en este caso en medio Basal de Bold, proporcionando nutrientes necesarios para su multiplicación (Armendáriz, 2011).

Las muestras se observaron diariamente eliminando aquellas que tenían presencia de otros microorganismos, otras en las que no hubo crecimiento de las células microalgas, otras en las que a más de crecimiento de lo que posiblemente era *Chlorella* creció otro tipo de microalga de forma ovoide, o que por su exposición a la luz solar había disminuido su volumen, al final se eligió un cultivo puro por sector.

#### **3.6.4 Asilamiento de la microalga *Chlorella***

##### **Medio de cultivo líquido**

Para la elaboración del medio se basó en la fórmula que se encuentra en la tabla A1 reemplazando el micronutriente  $MnCl_2$  por  $NH_4Cl$ , como adaptación propia previo a pruebas realizadas demostrando ser útil en la masificación microalgal.

Para su aislamiento se preparó 250ml de medio Basal de Bold con 30ml de las muestras seleccionadas, se tomó este volumen de muestra para su pronta identificación, se colocó en botellas previamente lavadas, con aireación cada una de ellas y expuestas a la luz solar para ayudar a que las células se adapten al medio, este procedimiento se repitió hasta obtener cultivos puros de posiblemente *Chlorella*, basándose particularmente en su morfología redonda.

Cada botella contó con aireación continua debido a que las microalgas son aeróbicas, evitando su sedimentación y permitiendo la homogenización de los nutrientes mejorando significativamente la asimilación debido a que el movimiento del agua disminuye la capa laminar alrededor de la microalga, aumentando de esta forma la difusión de nutrientes (Gonzales, 2010).

##### **3.6.5 Crecimiento microalgal**

Se eligió un cultivo puro por sector los cuales se aislaron nuevamente en recipientes plásticos de agua de 6 litros, los cuales fueron llenados con 2 litro

de medio de cultivo Basal de Bold y 240 ml de las muestras de los cultivos puros, (se tomó como referencia el volumen utilizado en los anteriores aislamientos, 30ml de muestra en 250ml de medio) se dejó reposar las muestras por 7 días para su masificación microalgal.

Para el conteo celular se preparó 3 réplicas del cultivo puro de Atocha, 3 réplicas del cultivo de Tilulum y 3 réplicas del cultivo del Socavón, obteniendo 9 ensayos, utilizando recipientes plásticos de agua de 2 litros, los cuales fueron llenados con 1 litro de medio de cultivo basal de bold y 10% de los cultivos puros iniciales por litro.

Para el cálculo de concentración de la microalga se calculó por el método del hemocitómetro, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (ml)}}$$

Se colocó una gota de cada muestra a observar en el hemocitómetro, se tapó con un cubreobjetos evitando formar burbujas de aire que dificulten la visualización.

Se utilizó esta fórmula porque se contó los cuatro cuadrado externos, el volumen se calculó multiplicando la altura, ancho y longitud del hemocitómetro (0,1cm\*0,1cm\*0,01cm).

Se realizó conteos diarios para la obtención de la curva de crecimiento con el número de células de *Chlorella* que se determinaron en cada uno de los 9 ensayos (X) en el transcurso de los días (Y), se elaboró una gráfica de In Densidad celular vs. Tiempo, que correspondió a la curva de crecimiento en escala logarítmica de la microalga.

Los datos obtenidos del conteo por 10 días de cada una de las réplicas se reportan en las tablas 5, 6, y 7.

Al determinar que las réplicas de Tilulum tuvieron una población inicial mayor se colocaron en un lugar con poca iluminación y sin aireación continua, mientras que las réplicas de Atocha y el Socavón al tener una población inicial y crecimiento parecido mantuvieron durante las 240 horas condiciones óptimas

de crecimiento, controlando de esta manera que la población final de cada ensayo no tuvieran diferencias significativas.

### 3.6.6 Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento se calculó en base a la fórmula:

$$\mu = \frac{[\ln(Nt) - \ln(N0)]}{\ln 2(t - t0)}$$

Dónde:

t: tiempo transcurrido entre el inicio y fin de la prueba,

t0: tiempo inicial,

N0: densidad celular inicial,

Nt: densidad celular final.

El tiempo de generación se calculó con la fórmula:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

### 3.6.7 Obtención de Chlorellin

Cuando las células de los 9 ensayos se encontraron en estado exponencial, tomando en cuenta que el crecimiento celular no vario significativamente por 3 días, se recogieron 10 ml de cada muestra en tubos de ensayo, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos.

Se utilizó los cultivos en fase exponencial ya que después de este período no es aconsejable desde el punto de vista tecnológico ni económico (Barajas *et. al.*, 2011).

Para saber en qué parte existió potencial antimicrobiano se trabajó con el sobrenadante acuoso y el sedimento de la microalga resultante, luego de la centrifugación, colocándolos en tubos de ensayo con tapa rosca.

Este procedimiento se repitió 3 veces para obtener por cada ensayo 3 tubos de sedimento y tres tubos de sobrenadante, posteriormente se colocó en cada uno solventes distintos; 5 ml de etanol, 5 ml de Alcohol isopropílico y 5ml de agua,



se agitaron durante 20 minutos, resultando al final 54 tratamientos; se utilizó los dos alcoholes por ser de mayor uso como desinfectantes, el etanol desnaturaliza las proteínas y disuelve los lípidos destruyendo eficazmente muchos tipos de células bacterianas y virales, y alcohol isopropílico por ser en función y estructura similar al etanol, destruye las células bacterianas y virales por el mismo mecanismo por lo que puede ser utilizado como sustituto para el etanol (Arévalo *et. al.*, 2010).

Los tubos previamente tapados se colocaron en refrigeración para su almacenamiento, evitando contaminación.

### **3.6.8 Aislamiento de bacterias mediante el método de difusión en placa**

Para comprobar el potencial antimicrobiano de *Chlorella* se aisló bacterias que se encuentran en la palma de la mano, para lo cual se limpió y esterilizó el área de trabajo, se prendió el mechero para evitar la rápida contaminación del lugar donde se preparó las muestras, se sumergió el hisopo en agua salina estéril, y se pasó por la mano, se hizo estrías simples con la cabeza del hisopo en el medio ya preparado, detallado en la tabla A2, sin retirar completamente la tapa del medio de cultivo para evitar que se contaminen. Se incubó a 37°C por alrededor de 24-48 horas, se obtuvo dos tipos de bacterias con coloración amarilla y naranja.

### **3.6.9 Identificación la bacteria gram-positiva**

Para identificar el tipo de bacteria se realizó pruebas primarias y secundarias; una vez obtenida una cepa pura de cada una de ellas se resembró en agar sangre (Gram positivas) y en agar Mac Conkey (gram negativas), a las 24 horas se realizó la prueba de catalasa para lo cual se tomó una muestra de la cepa en un palillo estéril se colocó en un porta objetos con una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; seguido se hizo la prueba de tinción gram colocando una muestra de la bacteria en un portaobjetos haciendo el extendido de la muestra, se dejó secar a temperatura ambiente, fijándola con metanol durante 1 minuto, se agregó unas gotas de cristal violeta por 1 minuto, se enjuago con agua, luego se colocó acetona y se esperó 30 segundos, y se enjuago con agua, finalmente se agregó gotas de safranina por 1 minuto, una vez lista la muestra se observó en

el microscopio óptico en el lente de 40x; al observar crecimiento en agar sangre (medio común para *Staphylococcus* sp.) se hizo una prueba secundaria, la prueba de la coagulasa que permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa, se colocó unas gotas de plasma en la muestra (Gonzales, *et al.*, 2009).

Las bacterias fueron almacenadas en refrigeración para posteriormente ser aisladas nuevamente.

### **3.6.10 Aplicación de los discos**

Una vez identificado la bacteria gram-positiva con la que se trabajó, se aisló en 54 cajas Petri mediante estrías compuestas, las estrías se realizaron en la cámara de flujo laminar, desinfectando previamente para evitar contaminación en las cajas.

Se colocaron 5 discos de papel filtro estéril, 4 en los extremos y uno en el centro, con 300µl de cada una de las 54 soluciones de ensayos, ya que por pruebas previas se demostró que con cantidades menores la inhibición bacteriana es mínima dificultando su identificación, secándolos bajo un flujo de aire laminar, no por más de 15 segundos, los discos se tomaron con pinza estéril y se colocaron en el medio en un tiempo menor a 15 minutos después de haber inoculado la placa, los discos se presionaron ligeramente para asegurar un contacto con la superficie evitando ser removidos una vez que tomaron contacto con la superficie del agar, para prevenir una sobreposición de las zonas de inhibición; se distribuyó adecuadamente los discos con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa y una distancia de alrededor de 30 mm entre discos, para lo cual se diseñó un molde con dichas medidas para evitar errores en la colocación de los discos (Anexo B5).

### **3.6.11 Incubación**

Luego de 15 minutos de haber colocado los discos se invirtieron las cajas Petri incubándolas a 37 ° C durante un período de 24 horas.

### **3.6.12 Medición de los halos de inhibición.**

Para la medición de los halos de inhibición se midió con una regla por el fondo de la caja iluminándola con luz sobre un fondo negro para facilitar la medición.

Se calculó el halo promedio por caja, ya que se colocó 5 discos.

### **3.6.13 Control positivo**

Los antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas de los parámetros establecidos de concentración mínima inhibitoria (CMI) (Faría *et. al.*, 1999)

A las colonias aisladas de la bacteria gram-positiva se les realizó antibiograma en cajas Petri con agar Mueller-Hinton (específico para bacterias) (Tabla A3), para determinar la sensibilidad o resistencia se ajustó el inóculo al patrón de turbidez MacFarlan N°0.5 para luego sembrar en las cajas con un hisopo estéril, se utilizó sensidiscos de antibióticos como ampicilina 10 µg, oxacilina 10 µg por tener un espectro predominando grampositivo incluyendo *Staphylococcus* spp. productor de penicilinasas, los halos de inhibición se mido a las 24 horas de incubación.

## **3.7 Plan de procesamiento de la información**

### **3.7.1 Factores o niveles en estudio**

#### **a. Tratamientos**

Se estudiaron 9 tratamientos (tabla 7) producto de la combinación de los dos factores en estudio, los lugares de recolección de las muestras y medios de elución (Tabla 8).

**Tabla 7.** Factores de estudio

FACTORES		NIVELES
		a0: Atocha
<b>A</b>	SECTORES DE RECOLECCION DE MUESTRA DE <i>Chlorella</i>	a1: Tilulum a2: Socavón
		b0: Etanol
<b>B</b>	MEDIO DE ELUCION	b1: Alcohol Isopropílico b2: Agua

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

**Tabla 8.** Tratamientos de estudio

TRATAMIENTOS		FACTORES DE ESTUDIO	
N°	CODIFICACIÓN	Factor A	Factor B
		SECTORES DE RECOLECCION	MEDIO DE ELUCIÓN
1	a0b0	Atocha	Etanol
2	a1b0	Tilulum	Etanol
3	a2b0	Socavón	Etanol
4	a0b1	Atocha	A. Isopropílico
5	a1b1	Tilulum	A. Isopropílico
6	a2b1	Socavón	A. Isopropílico
7	a0b2	Atocha	Agua
8	a1b2	Tilulum	Agua
9	a2b2	Socavón	Agua

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

## b. Diseño Experimental

Se aplicó el diseño experimental AxB, es decir dos factores con tres niveles cada uno con dos replicas, además se realizó un análisis de varianza para los halos de inhibición medidos en los ensayos. El esquema de varianza se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Esquema de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	(a-1)
Factor B	(b-1)
AB	(a-1) (b-1)
Error	ab x (r-1)
Total	(r x t) -1

**Elaborado por:** Adriana Barona

Las respuestas experimentales que se evaluaron en la parte operativa de la investigación fueron la caracterización por su forma de la microalga *Chlorella*, la concentración microalgal, curva de crecimiento de cada uno de los ensayos mediante conteo celular, obtención de molécula bioactiva, identificación del potencial antimicrobiano de *Chlorella* ante determinada bacteria aerobia, medición de los halos de inhibición y comparación con testigos positivos como la ampicilina.

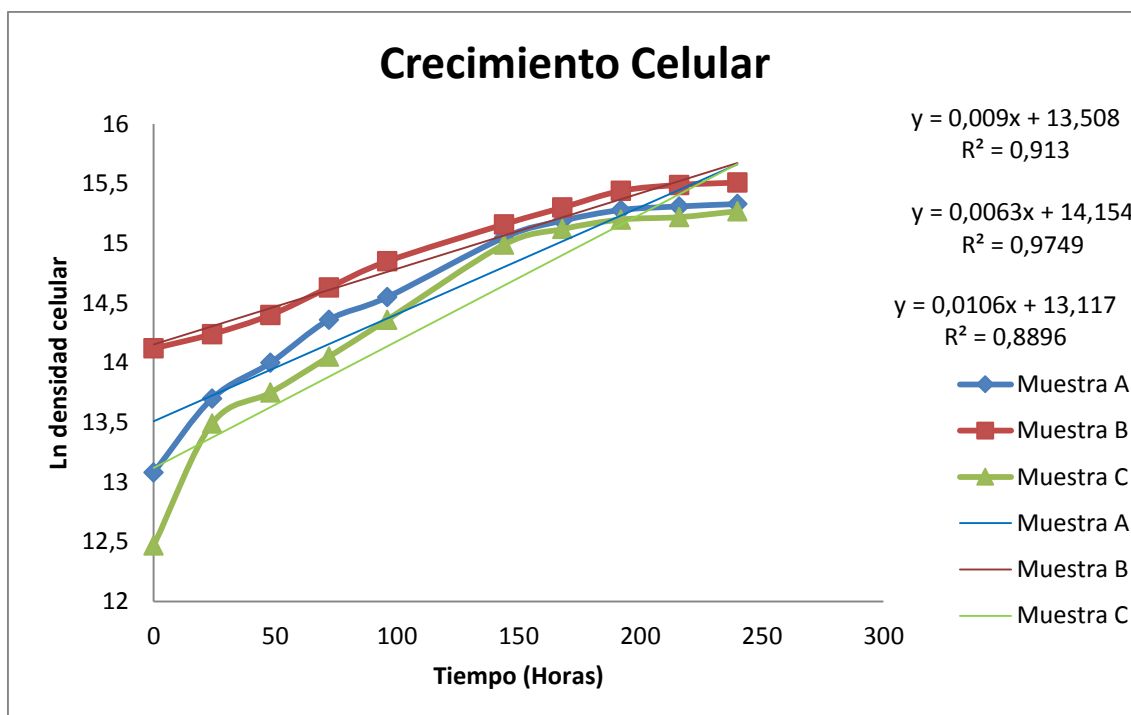
## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

#### 4.1 Análisis de los resultados

##### 4.1.1 Crecimiento Celular

Gráfico 1: Curva de crecimiento



Elaborado por: Adriana Barona, 2013

Se realizó el conteo celular diario por 240 horas (Tablas A5, A6, A7) con una cámara de Neubauer en las tres muestras se observó una proporción directa, mostrando una curva típica de crecimiento. El conteo se realizó hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial, los datos permitieron graficar la curva de crecimiento poblacional correspondiente para cada uno de los tratamientos tomando en cuenta el estudio realizado por Gonzales, (2010) donde determinó las curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para identificar el momento en el cual las células se encontraban en fase exponencial y de esta forma se estableció la duración de los experimentos en diez días, las dos especies alcanzaron la fase estacionaria después de este

tiempo, igual los resultados obtenidos por Wang *et. al.* (2010), quienes cultivaron esta microalga en aguas residuales durante un periodo de nueve días.

#### 4.1.2 Velocidad de crecimiento

En la tabla 10 se muestran los valores de  $\mu$  y Td de cada muestra para lo cual se utilizó los promedios tanto de densidad celular inicial, como de densidad final, calculando el logaritmo natural de cada uno.

**Tabla 10.** Velocidad de crecimiento y tiempo de generación

<b>Muestras</b>	<b>Velocidad de crecimiento (<math>d^{-1}</math>)</b>	<b>Tiempo de generación (días)</b>
Atocha	0,349	1.986
Tilulum	0,24	2,88
Socavón	0,42	1,65

**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

El cultivo de la muestra del Socavón presento una mejor cinética de crecimiento comparando con las otras muestras, mostrando una velocidad de crecimiento de  $0,42 d^{-1}$  y tiempo de duplicación de 1.65 días, seguido por la muestra recolectada de Atocha con velocidad de crecimiento de  $0,349 d^{-1}$  y tiempo de 1.986 días y finalmente la de Tilulum con  $\mu=0,24 d^{-1}$  y  $t=2.88$  días; con respecto a otros trabajos relaciones con el cultivo de *Chlorella sp.* se observa que tanto la velocidad de crecimiento como el tiempo de duplicación estuvieron dentro del rango de los valores obtenidos por Cervera (2011), cuyos resultados fueron velocidad de crecimiento de  $0,296d^{-1}$  y tiempo de generación de 2,34 días, y el de Greque y Viera (2007), con  $\mu = 0,31d^{-1}$  y  $T_g=2.27$  días al cultivar *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de 4 litros de capacidad.

Con estos datos se observó que la muestra de Tilulum tuvo mayor tiempo de duplicación, y por ende, menor velocidad de crecimiento debido a las condiciones de crecimiento a las que se expuso los ensayos, los cuales fueron diferentes a los que se expuso las réplicas de Atocha y del Socavón con el fin

de alcanzar una población final similar en cada una de las réplicas de las 3 muestras.

Se observa la correlación inversa entre el valor de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de generación ( $t_g$ ), el incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad  $\mu$ .

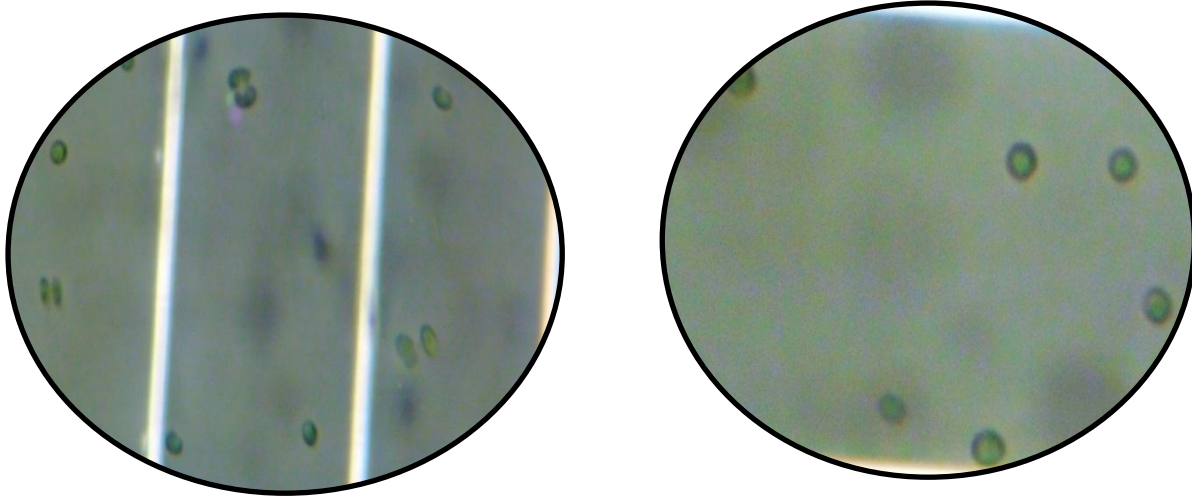
#### **4.1.3 Pruebas de identificación bacteriana**

Al realizar las pruebas para la identificación bacteriana a las 24 horas del resembrado en agar sangre se observó crecimiento de colonias blanquecinas de forma circular y superficie lisa y por su capacidad de producir pigmento carotenoide tuvo color amarillo y otra naranja (Anexo B2); se realizó la prueba de catalasa dando positivo al desdoblarse el peróxido en agua y oxígeno gaseoso que se liberó en forma de burbujas en la muestra (Anexo B2) descartando que posiblemente fue *Enterococcus*; la prueba de tinción de gram dio positivo, identificación que eran bacterias gram positivos siendo posiblemente *Staphylococcus* (Anexo B2) por ser bacterias comunes en las superficies cutáneas y mucosas además que se obtuvo crecimiento bacteriano en agar sangre que es un medio común donde crecen *Staphylococcus* sp. en la prueba de la coagulasa dio positivo (Anexo B2) indicando que posiblemente era la bacteria *Staphylococcus aureus* ya que es la única especie que produce la enzima coagulasa y pigmentación amarilla (Gonzales, *et. al.*, 2009), sin embargo para saber exactamente el tipo de bacteria utilizada es necesario realizar una identificación molecular.



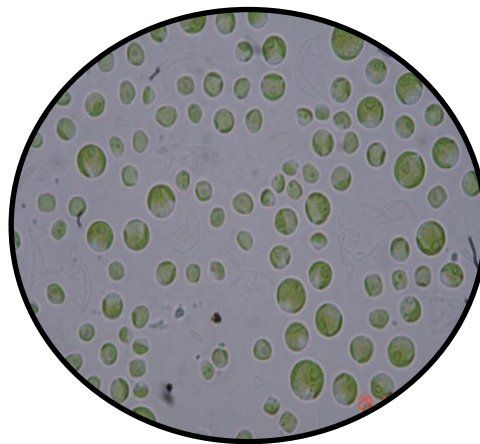
#### 4.1.4 Identificación de la microalga *Chlorella*

Fotografía 1: Microalga *Chlorella* observada microscópicamente



Elaborado por: Adriana Barona, 2013

Figura 1. Vista al microscopio de cepa de *Chlorella*



Fuente: Jiménez & Jiménez, 2012

Al observar al microscopio las muestras recogidas se observó la presencia de la microalga que posiblemente fue *Chlorella* (Fotografía 1), identificándola por ser células pequeñas, de alrededor de 2 a 10 micrones de diámetro, de color verde por la presencia de clorofila, aisladas y otras formando colonias con forma irregular conservando su forma esférica, se reproducen muy rápidamente y de forma asexual, y principalmente no tiene flagelo, como fue reportado y comparado por Gonzales, 2010 y Cervera, 2011.

#### **4.1.5 Conteo Celular**

El crecimiento de la microalga a las 0, y 24 horas las células se adaptaron al nuevo entorno por lo que no existió replicación celular, el color del cultivo fue casi transparente (Anexo B3), a partir de las 48 horas se observó crecimiento exponencial en cada uno de los tratamientos hasta las 192 horas, el color de los cultivos cambio a verde claro (Anexo B3), a partir de aquí la densidad celular no cambio significativamente hasta las 240 horas, el color de los cultivos fue verde oscuro (Anexo B3) observando que iniciaba la fase estacionaria al no existir producción de células nuevas por lo que se extrajo la biomolécula de cada una de las muestras.

Se calculó la población inicial promedio de cada muestra, para lo cual se realizó el conteo celular de cada una de las réplicas de las muestras sacando el promedio de las mismas; la muestra de Atocha tuvo una población inicial promedio de  $4,8 \times 10^5$  cel/ml menor que la muestra de Tilulum, cuya población inicial promedio fue de  $13,60 \times 10^5$  cel/ml y mayor que la muestra de Socavón, con población inicial promedio de  $2,60 \times 10^5$  cel/ml, durante las 72 horas posteriores no hubo mayor crecimiento en la muestra de Atocha y el Socavón por lo que fue factible el conteo celular mientras que en la muestra de Tilulum su crecimiento fue mayor; la fase exponencial se alcanzó a las 192 horas hasta las 240 horas que fue donde se extrajo el chlorellin, obteniendo una población final promedio de  $54,23 \times 10^5$  cel/ml en la muestra de Tilulum seguida por la muestra de Atocha con población final promedio  $45,76 \times 10^5$  cel/ml y finalmente la muestra de Socavón con  $42,86 \times 10^5$  cel/ml (Tablas A5, A6, A7)

#### **4.1.6 Chlorellin**

Se observó que los tubos con sedimento-solvente fueron de color verde oscuro mientras que los tubos con sobrenadante-solvente fueron casi transparentes lo que indico predominancia de microalgas en los tubos con sedimento (Anexo B4).

Al realizar el antibiograma de los 54 ensayos, resultaron positivos los tratamientos sedimento-etanol y sedimento-alcohol Isopropílico es decir 18 tratamientos positivos, mientras que los 36 restantes fueron negativos; no hubo

inhibición con el solvente agua-sedimento, tampoco en las cajas en las que se colocó los discos con el sobrenadante, con los tres solventes, lo que indicó que existe potencial antibacteriano en el sedimento que se obtiene al extraer el chlorellin (Tabla A9).

#### **4.1.7 Medición de Halos de inhibición**

El antibiótico se difundió radialmente desde el disco a través del agar, la concentración fue disminuyendo a medida que se alejó del disco hasta que en un punto determinado la concentración del antibiótico en el medio fue incapaz de inhibir el crecimiento bacterial.

En la tabla A10 se observa que en la muestra de Atocha en la réplica 1 el nivel a0b1 (Atocha-alcohol isopropílico) tuvo un halo de inhibición promedio de 0.23 mm mayor a0b0 (Atocha- etanol) de 0.15mm, en la réplica 2 a0b1 (Atocha-alcohol isopropílico) su halo promedio fue de 0.217 mm a0b0 (Atocha-etanol) fue de 0.18 mm, en la réplica 3 a0b1 (Atocha- alcohol isopropílico) fue 0.205 mm y a0b0 (Atocha- etanol) fue 0.193mm.

En la muestra de Tilulum, en la réplica 1 el nivel a1b1 (Tilulum-alcohol isopropílico) la inhibición promedio fue de 0.282mm y a1b0 (Tilulum- etanol) de 0.209mm, en la réplica 2 a1b1 (Tilulum- alcohol isopropílico) fue de 0.26mm y a1b0 (Tilulum-etanol) 0.18mm, y en la réplica 3 a1b1 (Tilulum-alcohol isopropílico) su halo promedio fue de 0.29mm y a1b0 (Tilulum-etanol) 0.192mm.

En la muestra del Socavón, el nivel a2b1de la réplica 1 (Socavón-Alcohol isopropílico) tuvo un halo de inhibición promedio de 0.203mm, a2b0 (Socavón-etanol) fue 0.117mm, en la réplica 2 a2b1 (Socavón- alcohol isopropílico) 0.188 en a2b0 (Socavón- etanol) fue 0.122mm y finalmente en la réplica 3 a2b1 (Socavón- alcohol isopropílico) fue de 0.207mm y a2b0 (Socavón- etano) fue 0.113mm.

En los tres tratamientos se observó que entre replicas los halos de inhibición promedio no tuvieron diferencia significativa.

Las muestras de Atocha, Tilulum y el Socavón con alcohol isopropílico tuvieron mayores valores de inhibición comparado con los tratamientos con etanol sin embargo la diferencia no fue significativa lo que indicó que los dos solventes con el extracto de *Chlorella* pueden inhibir el crecimiento bacteriano con la misma eficacia; las réplicas de la muestra de Tilulum tuvieron mayor inhibición promedio seguido por la muestra de Atocha y finalmente las réplicas de la muestra del Socavón.

Comparando con los resultados obtenidos por la investigación de Kellam y Walker (2007), quienes obtuvieron zonas grandes de inhibición tanto para la bacteria *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* se demuestra que las distintas especies de *Chlorella* en solventes-alcohol presentan inhibición bacteriana al igual que Ghasemi y colaboradores (2007) quienes también identificaron actividad antibacteriana contra la bacteria *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando el principio activo de *Chlorella*, se comprueba de esta manera, que el extracto de la microalga *Chlorella* tiene actividad contra bacterias gram positivas.

#### 4.1.8 Análisis de varianza

La única variable evaluada fue el diámetro de la zona de inhibición, en milímetros, la separación de medias fue realizada al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, usando la prueba de Tukey al 5% de significancia utilizando el programa Infostat.

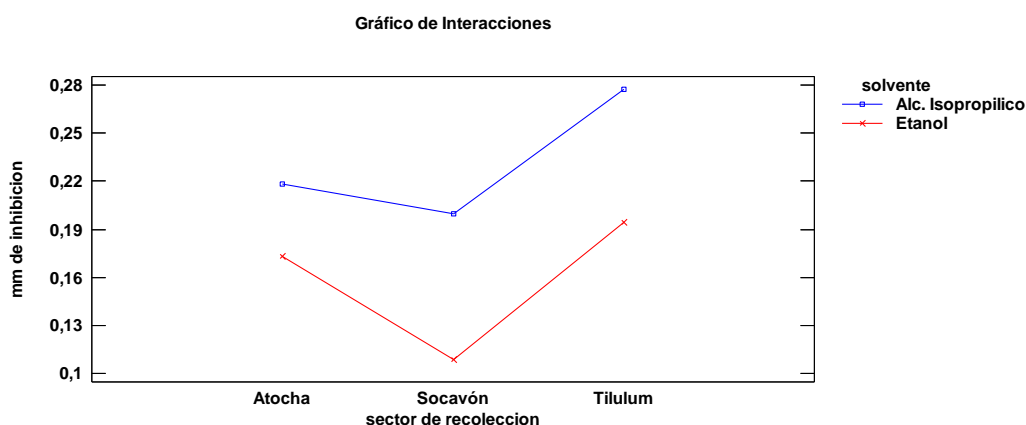
**Tabla 11:** Análisis de Varianza para mm de inhibición.

<b>FUENTE</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GL</b>	<b>CUADRADO MEDIO</b>	<b>RAZÓN-F</b>	<b>VALOR-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:sector de recolección	0,0199301	2	0,00996506	49,58	0,0000
B:solvente	0,0239076	1	0,0239076	118,95	0,0000
C:replica	0,000536778	2	0,000268389	1,34	0,3062
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,00178678	2	0,000893389	4,44	0,0416
RESIDUOS	0,00200989	10	0,000200989		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,0481711</b>	<b>17</b>			

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

En el análisis de varianza para los halos de inhibición los valores  $-P$  muestran diferencias altamente significativas tanto en los efectos principales como en las interacciones, es decir para el factor A (sitios de recolección), factor B (solventes) e interacción AB (Sitio de recolección-solvente) ya que fueron menores que 0,05 a un 95% nivel de confianza, lo que indica que el potencial antimicrobiano de *Chlorella* se ve influenciada por el sector de recolección de las muestras y el solvente utilizado.

**Gráfico 2:** Gráfico de Interacciones



**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

En el gráfico de interacciones se observa que para el factor A el mejor sector de recolección fue Tilulum, seguido por Atocha y finalmente el Socavón, mientras que para el factor B el mejor solvente fue el Alcohol isopropílico seguido por el etanol, el gráfico muestra que el Factor A no depende del factor B para el potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* debido a que en todos los tratamientos se produjo halos de inhibición.

**Tabla 12:** Prueba de Tukey para el solvente

SOLVENTE	MEDIAS	N	E.E	
Alc. Isopropilico	0,231667	9	0,004856	A
Etanol	0,158778	9	0,004856	B

Elaborado por Adriana Barona, 2014

De acuerdo a la prueba de Tukey para el solvente se obtuvo que el mejor fue el alcohol isopropílico al tener una media mayor a la del etanol, lo que se confirma en la medición de los halos de inhibición los cuales fueron mayores en los ensayos en los que se utilizó el alcohol isopropílico.

**Tabla 13:** Prueba de Tukey para el lugar de recolección.

SECTOR DE RECOLECCION	MEDIAS	N	E.E	
Tilulum	0,235667	6	0,005947	A
Atocha	0,195833	6	0,005947	B
Socavón	0,154167	6	0,005947	C

**Elaborado por:** Adriana Barona

El mejor sector de recolección fue Tilulum con una media de 0,235667, seguida por el sector de Atocha con una media de 0,1958 y finalmente el Socavón con media 0,154167.

**Tabla 14:** Prueba de Tukey

SECTOR DE RECOLECCIÓN	SOLVENTE	MEDIAS	N	E.E.	
Tilulum	Alc. Isopropílico	0,28	3	0,01	A
Atocha	Alc. Isopropílico	0,22	3	0,01	B
Socavón	Alc. Isopropílico	0,20	3	0,01	B C
Tilulum	Etanol	0,19	3	0,01	B C
Atocha	Etanol	0,17	3	0,01	C
Socavón	Etanol	0,11	3	0,01	D

**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

De acuerdo a la tabla de Tukey obtenida en el programa Infostat el mejor tratamiento con  $\alpha$  0,05 fue a1b1 (Tilulum- Alcohol Isopropílico) ya que su media fue mayor, lo que indicó que inhibe la bacteria gram-positiva con la que se trabajó al producir mayor inhibición comparado con los demás tratamientos su media fue de 0,28mm, seguido por el tratamiento a0b1 (Atocha-Alcohol Isopropílico) con una media de 0,22mm, el tratamiento a2b1 (Socavón- Alcohol Isopropílico) con media de 0,20mm, finalmente los tratamiento a1b0 (Tilulum-

etanol) media de 0,19mm, a0b0 (Atocha- Etanol) 0,17mm y a2b0 (Socavón-etanol) con 0,11mm.

Se excluyó los datos obtenidos con agua ya que se obtuvo valores de cero, al no presentar inhibición en el sedimento y en el sobrenadante.

#### **4.1.9 Control positivo**

En el control positivo se observó que la bacteria gram positiva fue sensible a la ampicilina con un halo de inhibición de 5 mm y a la oxacilina con un halo de 1mm ya que los valores están dentro del rango de sensibilidad según la tabla de Concentración Mínima Inhibitoria, (Tabla A4).

### **4.2 Verificación de Hipótesis**

#### **4.2.1 Hipótesis nula (H<sub>0</sub>)**

La determinación del potencial antimicrobiano no se ve influenciada significativamente del medio de elución y lugar de extracción.

#### **4.2.2 Hipótesis Alternativa (H<sub>1</sub>)**

La determinación del potencial antimicrobiano se ve influenciada significativamente del medio de elución y lugar de extracción.

Después de realizar el análisis de inhibición de la microalga *Chlorella*, “se acepta la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) afirmando que el potencial antimicrobiano se ve influenciado significativamente del medio de elución y lugar de extracción.”

### **4.3 Discusión general del trabajo de investigación**

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticas, pueden crecer bajo una variedad de condiciones medioambientales, lo que facilita su accesibilidad; entre las microalgas de mayor importancia se encuentra *Chlorella* por su valor económico y nutricional.

La presente investigación se desarrolló con el propósito de determinar si la microalga aislada, posiblemente *Chlorella*, tiene poder antibacterial. De esta

manera, se aprovechará su potencial en varios ámbitos de la industria, bioquímica y biotecnología.

Se aisló la microalga, hasta obtener un cultivo puro de cada uno de los sectores a analizar; Atocha, Tilulum, y el Socavón; se determinó la cinética de crecimiento lo que permitió identificar cuando las células se encontraron en fase exponencial donde se tomó una muestra de cada uno de los cultivos preparados para centrifugarlos con el fin de separar el sedimento del sobrenadante, al desconocer en qué parte existió potencial antibacterial, se utilizó los dos, los cuales fueron mezclados con tres solventes, etanol, alcohol isopropílico y agua, para la extracción del chlorellin.

La bacteria una vez identificada se aisló mediante estrías compuestas; se aplicó el método del antibiograma, obteniendo al final que el mejor tratamiento fue el de las muestras de Tilulum con alcohol isopropílico sin embargo con etanol los halos de inhibición no tuvieron diferencias significativas, mientras que con el solvente agua no presento inhibición tanto con el sedimento como con el sobrenadante.

Las cajas en las que se colocó los discos con las muestras tratadas con el sobrenadante ninguna presento inhibición, sin embargo esto no afirma que el sobrenadante no tiene efecto inhibitorio pero que si lo tuviera su concentración microalgal es menor que la que tiene el sedimento lo que impide que tenga el mismo efecto de inhibición, de esta manera para posteriores análisis se debe trabajar con el sedimento para tener óptimos resultados de inhibición.

Para comprobar que la bacteria utilizada era sensible a antibióticos comunes como la penicilina y oxacilina se hizo controles positivos demostrando que la menor concentración de antibiótico fue capaz de inhibir in vitro el crecimiento visible de la bacteria

Los resultados de la actividad antibacteriana de la microalga aislada, muestran posibilidades prometedoras para la obtención de metabolitos secundarios, por la notable capacidad de inhibición es necesario ampliar el estudio de este tipo de organismos unicelulares que son parte de la composición de aguas empozadas, siendo de interés significativo en el avance de la biotecnología.



## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Se construyó la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* extraída de cada uno de los sectores establecidos, obteniendo que la muestra del Socavón tuvo mayor velocidad de crecimiento, mientras que la muestra de Tilulum tuvo la menor velocidad de crecimiento.
- Se indicó que el potencial antibacteriano de la microalga se encuentra en el precipitado, el cual se utilizó para la extracción de chlorellin.
- Se determinó el potencial antibacteriano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de diferentes sectores de la ciudad, mediante pruebas realizadas en el laboratorio se obtuvo que la microalga encontrada en la muestra de Tilulum presentó inhibición ante la bacteria gram-positiva aislada, con el solvente Alcohol isopropílico al tener mayor promedio de halo de inhibición cuya media fue de 0,28mm, mientras que *Chlorella* de la muestra del Socavón con etanol tuvo la menor media, 0,11mm.

#### 5.2 Recomendaciones

- Realizar cultivos de la microalga recolectada las veces que sean necesarias para eliminar cualquier otro tipo de microorganismo que pudiera estar presente y que pueda influir en su crecimiento.
- Llevar un registro de crecimiento de la microalga a estudiar, ya que la duración de cada fase puede acortarse, alargarse dependiendo de diversos factores y características propias de las microalgas.

- El presente trabajo ha aportado con resultados precisos en desarrollo de una metodología adecuada para la recolección, aislamiento y determinación del potencial antibacteriano de la microalga *Chlorella* ante la bacteria grampositiva con diferentes solventes, por esta razón es necesario profundizar el estudio acerca de las microalgas y sus propiedades con el fin de ampliar su campo de aplicación para su aporte en el avance biotecnológico.

## CAPITULO VI

### PROPUESTA

#### 6.1 Datos Informativos

##### 6.1.1 Título:

“Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* en bacterias grampositivas”

##### 6.1.2 Unidad Ejecutora:

Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

##### 6.1.3 Beneficiarios:

Población de Ambato

##### 6.1.4 Ubicación

**Provincia:** Tungurahua

**Cantón:** Ambato

##### 6.1.5 Director del Proyecto:

Ing. Alex Valencia

##### 6.1.6 Personal Operativo:

Adriana Barona

#### 6.2 Antecedentes de la Propuesta

El término de “ALGA” comprende un grupo muy heterogéneo de organismos vegetales marinos (50.000 aproximadamente) que se caracterizan por realizar la fotosíntesis oxigénica (fotosíntesis que produce oxígeno). Aunque la mayoría de las algas son unicelulares y microscópicas, algunas de 1 o 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Jaramillo, 2011).

Tiene gran importancia económica ya que a diferencia de las plantas superiores, contienen relativamente pequeñas cantidades de material estructural y muchos de los componentes celulares son de reconocido valor económico (Travieso & Benítez, 1998), en los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos según numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos (Ríos *et. al.*, 2009).

*Chlorella* es una microalga que tiene la capacidad de reproducirse rápidamente, una sola célula puede dividirse y subdividirse en cuatro células cada 16 a 20 horas (Healey, 2010), pueden crecer en medios artificiales para lo cual es necesario que las condiciones del cultivo se asemejen al ambiente natural de la microalga, para lo que se recomienda el “Medio Basal de Bold” (Cervera, 2011).

La actividad antibacteriana puede ser considerada como un indicador de la capacidad de las microalgas para sintetizar compuestos bioactivos de interés terapéutico, aunque esta actividad puede depender tanto de la especie como de la extracción eficiente de los compuestos bioactivos, sobre la actividad antibacteriana y antifúngica se han desarrollado en años recientes importantes investigaciones con resultados que reportan que los extractos crudos de algunas algas inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Ríos, *et. al.*, 2009)

Cada vez son más los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano que se obtienen de fuentes naturales como plantas, algas y hongos. Estos compuestos inactivan las cepas bacterianas por mecanismos diferentes a los antibióticos actuales lo que favorece su empleo como tratamiento alternativo o complementario.

El estudio de la antibiosis microalgal suele enmarcarse en cuatro perfiles estrechamente relacionados: la búsqueda de especies con actividad antimicrobiana, la separación, purificación y elucidación de la estructura química de los compuestos responsables de la misma (Lara, *et. al.* 1999).

### **6.3 Justificación**

Las microalgas son de interés industrial debido a la gran diversidad metabólica de este grupo de organismos unicelulares que han colonizado una amplia variedad de ecosistemas acuáticos, siendo de gran interés para muchas aplicaciones medicinales, terapéuticas, entre otras,

La finalidad de esta investigación es determinar la capacidad de inhibición de la microalga *Chlorella* ante la bacteria gram-positiva aislada de muestras tomadas de las manos; lo que es de gran interés al ser una nueva metodología de obtención de sustancia que inhiban el crecimiento de bacterias comunes, y por ende un paso para la producción de geles antibacteriales al reducir costos de materia prima

### **6.4 Objetivos**

#### **6.4.1 Objetivo General.**

- Proponer una metodología básica para determinar el potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella*.

#### **6.4.2 Objetivos Específicos.**

- Caracterizar fenotípicamente la microalga *Chlorella*
- Establecer un estudio económico para la tecnología de obtención de chlorellin como sustancia inhibitoria de crecimiento bacterial.

### **6.5 Análisis de factibilidad**

Es factible determinar el potencial antibacterial de *Chlorella*, utilizando un medio específico para su aislamiento y posterior búsqueda de compuestos bioactivos, ya que de acuerdo a los análisis realizados se determinó que efectivamente la microalga inhibe el crecimiento de la bacteria gram-positiva aislada de muestras tomadas de las manos.

## **6.6 Fundamentación.**

La investigación "DETERMINACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA MICROALGA *Chlorella* EXTRAIDA DE LAS AGUAS EMPOZADAS DE LAS ACEQUIAS DE ATOCHA, TILULUM Y EL SOCAVON DEL CANTON AMBATO" es la base científica que permite la formulación de la propuesta.

## **6.7 Metodología. Modelo Operativo**

### **6.7.1 Recolección de muestras**

Para la obtención de células de *Chlorella* se recogieron muestras de aguas estancadas de distintos puntos en 3 lugares diferentes del cantón Ambato: Atocha, Tilulum y El Socavón; 4 muestras en Atocha, 5 muestras en Tilulum y 4 muestras en el Socavón, (13 muestras) teniendo en cuenta su coloración verde lo que indicó presencia de algas.

Se recogió 100 ml de agua estancada de cada uno de los puntos en recipientes de plástico estériles, rotulando la fecha, y el lugar específico de donde fueron recolectadas (Anexo B1).

Se conservó las muestras en las mismas botellas, para su posterior observación expuestas al ambiente sin taparlas.

### **6.7.2 Observación en microscopio de las muestras recogidas**

Se colocó una gota de cada muestra en un portaobjetos y se observó en el microscopio, identificando la presencia de numerosos microorganismos por lo que se trató de reconocer células microalgas con el fin de seleccionar las muestras útiles y descartar las muestras que no tuvieron la microalga.

### **6.7.3 Identificación de la microalga *Chlorella*.**

Para la identificación de *Chlorella* se basó en su morfología esférica, cerca de 2-10 micrones de diámetro, por su ausencia de flagelos por lo que es inmóvil, por su ausencia de pelos, por ser unicelular, y en su pigmentación, ya que al contener altos niveles de clorofila a y b el medio en el que creció fue de color verde; finalmente se comparó las células obtenidas con bibliografía con el fin

de corroborar que en las muestras analizadas crecía posiblemente la microalga de interés.

En Atocha se identificó que 3 de las 4 muestras recolectadas tuvo células microalgas, de Tilulum 3 de las 5 muestras y Socavón 2 de las 4 muestras, al reconocer lo que posiblemente era *Chlorella* se las aisló varias veces con el fin de obtener cultivos puros, en un medio nutriente para microalgas, en este caso en medio Basal de Bold, proporcionando nutrientes necesarios para su multiplicación (Armendáriz, 2011).

Las muestras se observaron diariamente eliminando aquellas que tenían presencia de otros microorganismos, otras en las que no hubo crecimiento de las células microalgas, otras en las que a más de crecimiento de lo que posiblemente era *Chlorella* creció otro tipo de microalga de forma ovoide, o que por su exposición a la luz solar había disminuido su volumen, al final se eligió un cultivo puro por sector.

#### **6.7.4 Asilamiento de la microalga *Chlorella***

##### **Medio de cultivo líquido**

Para la elaboración del medio se basó en la fórmula que se encuentra en la tabla A1 reemplazando el micronutriente  $MnCl_2$  por  $NH_4Cl$ , como adaptación propia previo a pruebas realizadas demostrando ser útil en la masificación microalgal.

Para su aislamiento se preparó 250ml de medio Basal de Bold con 30ml de las muestras seleccionadas, se tomó este volumen de muestra para su pronta identificación, se colocó en botellas previamente lavadas, con aireación cada una de ellas y expuestas a la luz solar para ayudar a que las células se adapten al medio, este procedimiento se repitió hasta obtener cultivos puros de posiblemente *Chlorella*, basándose particularmente en su morfología redonda.

Cada botella contó con aireación continua debido a que las microalgas son aeróbicas, evitando su sedimentación y permitiendo la homogenización de los nutrientes mejorando significativamente la asimilación debido a que el

movimiento del agua disminuye la capa laminar alrededor de la microalga, aumentando de esta forma la difusión de nutrientes (Gonzales, 2010).

### 6.7.5 Crecimiento microalgal

Se eligió un cultivo puro por sector los cuales se aislaron nuevamente en recipientes plásticos de agua de 6 litros, los cuales fueron llenados con 2 litro de medio de cultivo Basal de Bold y 240 ml de las muestras de los cultivos puros, (se tomó como referencia el volumen utilizado en los anteriores aislamientos, 30ml de muestra en 250ml de medio) se dejó reposar las muestras por 7 días para su masificación microalgal.

Para el conteo celular se preparó 3 réplicas del cultivo puro de Atocha, 3 réplicas del cultivo de Tilulum y 3 réplicas del cultivo del Socavón, obteniendo 9 ensayos, utilizando recipientes plásticos de agua de 2 litros, los cuales fueron llenados con 1 litro de medio de cultivo basal de bold y 10% de los cultivos puros iniciales por litro.

Para el cálculo de concentración de la microalga se calculó por el método del hemocitómetro, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (ml)}}$$

Se colocó una gota de cada muestra a observar en el hemocitómetro, se tapó con un cubreobjetos evitando formar burbujas de aire que dificulten la visualización.

Se utilizó esta fórmula porque se contó los cuatro cuadrado externos, el volumen se calculó multiplicando la altura, ancho y longitud del hemocitómetro (0,1cm\*0,1cm\*0,01cm).

Se realizó conteos diarios para la obtención de la curva de crecimiento con el número de células de *Chlorella* que se determinaron en cada uno de los 9 ensayos (X) en el transcurso de los días (Y), se elaboró una gráfica de Densidad celular vs. Tiempo, que correspondió a la curva de crecimiento en escala logarítmica de la microalga.



Los datos obtenidos del conteo por 10 días de cada una de las réplicas se reportan en las tablas A5, A6, A7.

Al determinar que las réplicas de Tilulum tuvieron una población inicial mayor se colocaron en un lugar con poca iluminación y sin aireación continua, mientras que las réplicas de Atocha y el Socavón al tener una población inicial y crecimiento parecido mantuvieron durante las 240 horas condiciones óptimas de crecimiento, controlando de esta manera que la población final de cada ensayo no tuvieran diferencias significativas.

#### **6.7.6 Velocidad de crecimiento**

La velocidad de crecimiento se calculó en base a la fórmula:

$$\mu = \frac{[\ln(Nt) - \ln(N0)]}{\ln 2(t - t0)}$$

Dónde:

t: tiempo transcurrido entre el inicio y fin de la prueba,

t0: tiempo inicial,

N0: densidad celular inicial,

Nt: densidad celular final.

El tiempo de generación se calculó con la fórmula:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

#### **6.7.7 Obtención de Chlorellin**

Cuando las células de las 9 ensayos se encontraron en estado exponencial, tomando en cuenta que el crecimiento celular no vario significativamente por 3 días, se recogieron 10 ml de cada muestra en tubos de ensayo, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos.

Se utilizó los cultivos en fase exponencial ya que después de este período no es aconsejable desde el punto de vista tecnológico ni económico (Barajas *et al.*, 2011).

Para saber en qué parte existió potencial antimicrobiano se trabajó con el sobrenadante acuoso y el sedimento de la microalga resultante, luego de la centrifugación, colocándolos en tubos de ensayo con tapa rosca.

Este procedimiento se repitió 3 veces para obtener por cada ensayo 3 tubos de sedimento y tres tubos de sobrenadante, posteriormente se colocó en cada uno solventes distintos; 5 ml de etanol, 5 ml de Alcohol isopropílico y 5ml de agua, se agitaron durante 20 minutos, resultando al final 54 tratamientos; se utilizó los dos alcoholes por ser de mayor uso como desinfectantes, el etanol desnaturaliza las proteínas y disuelve los lípidos destruyendo eficazmente muchos tipos de células bacterianas y virales, y alcohol isopropílico por ser en función y estructura similar al etanol, destruye las células bacterianas y virales por el mismo mecanismo por lo que puede ser utilizado como sustituto para el etanol (Arévalo *et. al.*, 2010).

Los tubos previamente tapados se colocaron en refrigeración para su almacenamiento, evitando contaminación.

#### **6.7.8 Aislamiento de bacterias mediante el método de difusión en placa**

Para comprobar el potencial antimicrobiano de *Chlorella* se aisló bacterias que se encuentran en la palma de la mano, para lo cual se limpió y esterilizó el área de trabajo, se prendió el mechero para evitar la rápida contaminación del lugar donde se preparó las muestras, se sumergió el hisopo en agua salina estéril, y se pasó por la mano, se hizo estrías simples con la cabeza del hisopo en el medio ya preparado, detallado en la tabla A2, sin retirar completamente la tapa del medio de cultivo para evitar que se contaminen. Se incubó a 37°C por alrededor de 24-48 horas, se obtuvo dos tipos de bacterias con coloración amarilla y naranja.

#### **6.7.9 Identificación bacteriana**

Para identificar el tipo de bacteria se realizó pruebas primarias y secundarias; una vez obtenida una cepa pura de cada una de ellas se resembró en agar sangre (Gram positivas) y en agar Mac Conkey (gram negativas), a las 24 horas se realizó la prueba de catalasa para lo cual se tomó una muestra de la

cepa en un palillo estéril se colocó en un porta objetos con una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; seguido se hizo la prueba de tinción gram colocando una muestra de la bacteria en un portaobjetos haciendo el extendido de la muestra, se dejó secar a temperatura ambiente, fijándola con metanol durante 1 minuto, se agregó unas gotas de cristal violeta por 1 minuto, se enjuago con agua, luego se colocó acetona y se esperó 30 segundos, y se enjuago con agua, finalmente se agregó gotas de safranina por 1 minuto, una vez lista la muestra se observó en el microscopio óptico en el lente de 40x; al observar crecimiento en agar sangre (medio común para *Staphylococcus* sp.) se hizo una prueba secundaria, la prueba de la coagulasa que permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa, se colocó unas gotas de plasma en la muestra (Gonzales, *et al.*, 2009).

Las bacterias fueron almacenadas en refrigeración para posteriormente ser aisladas nuevamente.

#### **6.7.10 Aplicación de los discos**

Una vez identificado la bacteria coco gram-positiva con la que se trabajó, se aisló en 54 cajas Petri mediante estrías compuestas, las estrías se realizaron en la cámara de flujo laminar, desinfectando previamente para evitar contaminación en las cajas.

Se colocaron 5 discos de papel filtro estéril, 4 en los extremos y uno en el centro, con 300µl de cada una de las 54 soluciones de ensayos, ya que por pruebas previas se demostró que con cantidades menores la inhibición bacteriana es mínima dificultando su identificación, secándolos bajo un flujo de aire laminar, no por más de 15 segundos, los discos se tomaron con pinza estéril y se colocaron en el medio en un tiempo menor a 15 minutos después de haber inoculado la placa, los discos se presionaron ligeramente para asegurar un contacto con la superficie evitando ser removidos una vez que tomaron contacto con la superficie del agar, para prevenir una sobreposición de las zonas de inhibición; se distribuyó adecuadamente los discos con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa y una distancia de alrededor de 30 mm entre discos, para lo cual se diseñó un molde con dichas medidas para evitar errores en la colocación de los discos (Anexo B5).

### **6.7.11 Incubación**

Luego de 15 minutos de haber colocado los discos se invirtieron las cajas Petri incubándolas a 37 ° C durante un período de 24 horas.

### **6.7.12 Medición de los halos de inhibición.**

Para la medición de los halos de inhibición se midió con una regla por el fondo de la caja iluminándola con luz sobre un fondo negro para facilitar la medición.

Se calculó el halo promedio por caja, ya que se colocó 5 discos.

### **6.7.13 Control positivo**

Los antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas de los parámetros establecidos de concentración mínima inhibitoria (CMI) (Faría *et. al.*, 1999)

A las colonias aisladas de la bacteria gram-positiva se les realizó antibiograma en cajas Petri con agar Mueller-Hinton (específico para bacterias) (Tabla A3), para determinar la sensibilidad o resistencia se ajustó el inóculo al patrón de turbidez MacFarlan N°0.5 para luego sembrar en las cajas con un hisopo estéril, se utilizó sensidiscos de antibióticos como ampicilina 10 µg, oxacilina 10 µg por tener un espectro predominando grampositivo incluyendo *Staphylococcus* spp. productor de penicilinasas, los halos de inhibición se mido a las 24 horas de incubación.

**Tabla 15.-** Modelo operativo (plan de acción).

<b>Fases</b>	<b>Metas</b>	<b>Actividades</b>	<b>Responsable</b>	<b>Recursos</b>	<b>Presupuesto</b>	<b>Tiempo</b>
1. Formular la propuesta	Determinación del potencial antibacteriano de <i>Chlorella</i>	Revisión bibliográfica	Investigador	Humano Técnico Económico	\$25	20 días
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Elaborar metodología para extracción de chlorellin.	Extraer la biomolécula de la microalga.	Investigador	Humano Técnico Económico	\$150	14 días
3. Implementación de la propuesta	Ejecutar procedimientos y fichas técnicas para la determinación del potencial antimicrobiano de <i>Chlorella</i>	Elaboración fichas técnicas y redacción de metodología.	Investigador	Humano Técnico Económico	\$50	60 días
4. Evaluación de la propuesta	Proponer talleres de socialización de resultados y beneficios a los interesados de la propuesta.	Análisis con investigadores de algas.	Investigador	Humano Técnico Económico	\$100	30 días

**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

## 6.8 Administración.

Para la ejecución de la propuesta se requerirá de los siguientes recursos:

### 6.8.1 Recursos humanos

Está conformando por él y los investigadores de organismos acuáticos.

### 6.8.2 Recursos físicos

Las actividades se desarrollaran en un ambiente adecuado con todas las comodidades para el avance satisfactorio de las actividades planificadas.

### 6.8.3 Recursos materiales

- Computador y Proyector.
- Cuadernos y esferos.
- Impresiones.
- Fotocopias
- Resma de Papel Bond.

**Tabla 16.-** Administración.

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Aprovechamiento del potencial antibacteriano de la microalga <i>Chlorella</i> .	Falta de conocimiento acerca de las propiedades de las microalgas.	Determinación del potencial antibacteriano de <i>Chlorella</i> en bacterias gram-positivas.	Obtención de la molécula bioactiva de <i>Chlorella</i> .	Investigadora: Adriana Barona

**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

## 6.9 Previsión de la evaluación

A fin de garantizar y asegurar la ejecución de la propuesta de conformidad con lo programado, para el cumplimiento de los objetivos planteados, se deberá realizar el monitoreo del plan de acción, como un proceso de monitoreo y evaluación permanente que nos permita anticipar contingencias que se pueden presentar en el camino con la finalidad de implementar correctivos a través de acciones que nos aseguren la consecución de las metas.

<b>PREGUNTAS BÁSICAS</b>	<b>EXPLICACIÓN</b>
<b>Quiénes solicitan evaluar?</b>	Docentes  Investigador
<b>Por qué evaluar?</b>	Porque proporciona información sobre nuevos compuestos bioactivos a partir de la microalga <i>Chlorella</i> .
<b>Para qué evaluar?</b>	Para determinar si la propuesta contribuye en logro los objetivos propuestos.
<b>Qué evaluar?</b>	El impacto que genera la determinación del potencial antimicrobiano de <i>Chlorella</i>
<b>Quién evalúa?</b>	El investigador
<b>Cuando evaluar?</b>	Durante el proceso e inmediatamente luego de concluida la aplicación de la propuesta.
<b>Cómo evaluar?</b>	A través de ensayos en bacterias de amplio espectro.
<b>Con qué evaluar?</b>	Utilizando los instrumentos adecuados según las técnicas aplicadas.

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

#### 4.4 BIBLIOGRAFÍA

**ACUÑA, R., 2011,** *Diseño de foto-bioreactores para el cultivo microalgas oleaginosas. Parte 1. Teoría y generalidades.*

Recuperado de: <http://bioreactorcrc.wordpress.com/2011/05/06/diseo-de-foto-bioreactores-para-el-cultivo-micro-algas-oleaginosas-parte-1-teora-y-generalidades/>

**ALBARRACIN, I., 2007,** *La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad.* XV Simposio electrónico Internacional.

Recuperado de:

[http://www.ceid.edu.ar/biblioteca/biocombustibles/isabel\\_albarracin\\_microalgas\\_potenciales\\_productoras.pdf](http://www.ceid.edu.ar/biblioteca/biocombustibles/isabel_albarracin_microalgas_potenciales_productoras.pdf)

**ALBUJA, R.; ARAUJO, P. & LÓPEZ, A., 2011,** *Obtención de un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de Spirulina platensis, mediante degradación anaerobia.* Departamento de Ciencias de la vida. Ingeniería en Biotecnología. Ecuador: Sangolquí.

**ALVAREZ, M., 2007.** Tesis de maestría. Instituto CICESE. “*Compuestos con actividad antibacterial producidos por las microalgas Nannochloropsis oculata Y Porphyridium cruentum*”.

**ALVEAR, M.; CASTILLO, C. & HENAO, D., 2011,** *Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel.* Universidad de Cartagena.

**ANDRADE, R.; TORRES, R.; MONTES, E. & FERNANDEZ, A., 2006,** *Obtención de harina a partir del cultivo de Chlorella vulgaris y su análisis proteico.* Revista de divulgación científica. Facultad de ciencias agrícolas 12(1) pp: 50-57.



**AREVALO, J.; ARRIBAS, J.; HERNANDEZ, M. & LIZAN, M., 2010,** *Guía de utilización de antisépticos.* Universidad de España.

**ARMENDÁRIZ, J., 2011,** Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, México  
“*Producción de biodiesel por microalgas, como una estrategia de fuentes alternas de energía*”.

**BARAJAS, A.; GARZÓN, L.; GONZÁLEZ, A., GUZMÁN, A., KAFAROV, V.; MORENO, N.; NUÑEZ, M.; PLATA, V. & VELASQUEZ, G. 2011,** *Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel.* Universidad Industrial de Santander.

**BECERRA, M. & MONZOY, L., 1992,** *I Parte: Monografía del género Chlorella. II Parte: Diferentes medios de cultivo para Chlorella vulgaris.* Universidad Autónoma Metropolitana.

**BEJARANO, C., 2010,** Tesis doctoral. Universidad de Huelva. España  
“*Caracterización de la radiación ultravioleta en la provincia de Huelva e incidencia en la productividad y el valor biotecnológico de cultivos de interés comercial*”.

**BERTOLDI, F.; SANT, E. & BARCELOS, J., 2006,** *Lipids, fatty acids composition and carotenoids of Chlorella vulgaris cultivated in hydroponic wastewater.* Grasas y Aceites 57(3) pp: 270-274.

**BOTERO, L., 2007.** *Microalgas, una maravilla para biodiesel.* Nextfuel, Medellín (2007, 31 de agosto)

Recuperado de: <http://biodiesel.com.ar/444/microalgas-una-maravilla-para-biodiesel>

**CAMACHO, R.; MARTÍNEZ, S. & SÁNCHEZ V., 1999**, *Contenido de clorofila en Chlorella pyrenoidosa durante el crecimiento heterotrófico sobre monosacáridos*. Universidad de Granada pp: 151-153

**CAÑAVATE, J. 2008**, *Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles*. IFAPA Centro El Toruño. Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la producción Ecológica. Junta de Andalucía. España.

**CARVAJAL, M.; SOLBAS, A. & GARCÍA, J., 2010**, *Nuevos alimentos funcionales a partir de microalgas*.

Recuperado de:

[https://www.ainia.es/html/sites/10/portaldelasociado/Art\\_Nuevos%20alimentos%20funcionales%20a%20partir%20de%20microalgasIPR\\_Aliment\\_equipos\\_tecnolo\\_a bril.pdf](https://www.ainia.es/html/sites/10/portaldelasociado/Art_Nuevos%20alimentos%20funcionales%20a%20partir%20de%20microalgasIPR_Aliment_equipos_tecnolo_a bril.pdf)

**CERVERA, O., 2011**, Tesis de maestría en biotecnología. Facultad de ciencias experimentales, “*Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal*”.

**DORADO, G., 2005**, *Preparación de medios de laboratorio, cultivo de bacterias y gel de agarosa*. Universidad de Córdoba. Departamento de bioquímica y biología molecular.

**DUQUE, S. & NUÑEZ, M., 2000**, *Microalgas acuáticas de la Amazonia Colombiana*. Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal. Biota Colombiana, Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Colombia 1(002) pp: 208-216.

**FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGO, B. & ALLARA, M., 1999.** “Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNNFG aislados de leche cruda (II)”. Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. IX, N°1, 11-16.

**FERRERO, I., 2011.** Monografía de grado. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Argentina, “producción de biodiesel a partir de microalgas como alternativa a los cultivos clásicos”.

**GHASEMI, Y.; MORADIAN, A.; MOHAGHEGHZADEH, A.; SHOKRAVI, S. & HOSSEINMOROWVAT, M., 2007,** *Antifungal and Antibacterial Activity of the Microalgae Collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of Antimicrobial Activity of Chroococcus dispersus.* Journal of Biological Sciences. 7 pp. 904-910.

**GOMEZ, F.,** (2009, 3 de noviembre). *Microalgas, estado del arte (3. Sistemas de cultivo).* Madrid.

Recuperado de:

[http://www.madrimasd.org/blogs/renovables\\_medioambiente/2009/11/03/128012](http://www.madrimasd.org/blogs/renovables_medioambiente/2009/11/03/128012)

**GOMEZ, L., 1997.,** Tesis doctoral. Universidad de Coruña, España, “Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba”.

**GONZALES, E.; ANTIPARRA, R. & VILLARREAL, F. 2009.** *Aislamiento e identificación de una cepa de Staphylococcus aureus meticilino resistente y catalasa negativo.* Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. An Fac Med; 70(1): 45-6

**GONZÁLEZ, L., 2010,** Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, “Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fosforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*”.

**GRAU, D., 1999**, Estudio del comportamiento de reactores discontinuos y semicontínuos: modelización y comprobación experimental. Universidad Politécnica de Cataluña pp: 17-39

**GREQUE, M. & VIEIRA, J., 2007**, *Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp., and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor*. Journal Biotechnology; 129: 439–445.

**HEALEY, J., 2010**, Detoxification with Chlorella.

Recuperado de:

[http://www.nutrition4all.co.uk/recommends/Chlorella\\_for\\_Detoxification.pdf](http://www.nutrition4all.co.uk/recommends/Chlorella_for_Detoxification.pdf)

**HERNANDEZ, A.; VÁZQUEZ, R.; SANCHEZ, M.; SERRANO, L. & MARTINEZ, A., 2009**, *Biodiesel a partir de microalgas*. Universidad Nacional Autónoma de México. Artículo Biotecnología 13(3) pp.38-61.

**INFANTE, C.; ANGULO, E.; ZÁRATE, A.; FLOREZ, J. & BARRIOS, F., 2011**, *Propagación de la microalga Chlorella sp. En cultivo por lote: cinética del crecimiento celular*. Avances en ciencias e Ingeniería. 3(2) pp: 159-164

**JARAMILLO, J., 2011**, Tesis de maestría en ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería y arquitectura. “*Evaluación tecnológica de la producción de biocombustibles a partir de microalgas*”.

**JIMENEZ, J. & JIMENEZ, M., 2012**, *Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de AND de Chlorella vulgaris Beyerinck (Beijerinck)*. Universidad Pedagógica Nacional.

**KELLAM, S. & WALKER, J., 2007**, *Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture*. British Phycological Journal 24 (2) pp: 191-194.

**KOCH, K. & PORTILLA, G., 2010**, Tesis para Ingeniería en Biotecnología. ESPE, Facultad de Ingeniería en Biotecnología, Sede Sangolquí “*Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro Microalgas nativas de las Provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio*”.

**LARA, I.; ALVAREZ, S.; LOZANO, C. & HERNÁNDEZ, N., 1999**, *Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas*. Hidrobiología 9(2) pp: 159-169.

**LEDEZMA, J., 2013**, *Formulación de agares*. Instituto tecnológico Superior de San Martín Texmelucan. México.

Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/144040404/Formulacion-de-Agares>

**MARIN, A., 2013**, Tesis para optar el título de doctor en ciencias marinas. Instituto Politécnico Nacional. La paz. “*Potencial bioactivo de algas del genero Codium, recolectadas en baja california sur, México*”.

**MARTÍNEZ, A., 2010**, Tesis para optar el título de Doctora en Tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. “*Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga Haematococcus pluvialis (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) cultivada en diferentes medios*”.

**MONTHIEU, C., 2010**, Tesis doctoral. Universidad Pontificia Comillas España: Madrid “*Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel*”.

**MORA, R.; MORONTA, R.; ORTEGA, J. & MORALES, E., 2005**, *Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa Chlorella sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela*. Laboratorio de

Bioquímica y Microorganismos Fotosintéticos. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Venezuela: Maracaibo.

**OLMEDO, F.**, *Biocombustibles a partir de algas, futuro cercano y prometedor*. Biodisol, España (2008,05 de noviembre).

Recuperado de: <http://www.biodisol.com/biocombustibles/biocombustibles-a-partir-de-algas-futuro-cercano-y-prometedor-energias-renovables-cultivos-energeticos-algas/>

**PANIAGUA, M., 1994**, *Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos y alimenticios*. Serie científica, U.A.B.C.S. N° Especial 2(1) pp: 109-117.

**PÉREZ, J. & FERNÁNDEZ P., 2011**, *Synthesis of neutral lipids in Chlorella sp. under different light and carbonate conditions*. CT&F- Ciencia, Tecnología y Futuro 4 (4) pp: 47-58.

**PEREZ, E., 2012**, *Cepsa cultiva microalgas útiles para producir biodiesel*. Huelva24, España (2012, 19 de enero)

Recuperado de:

[http://huelva24.com/not/14584/cepsa\\_desarrolla\\_un\\_proyecto\\_para\\_producir\\_biodiesel\\_a\\_partir\\_de\\_microalgas/](http://huelva24.com/not/14584/cepsa_desarrolla_un_proyecto_para_producir_biodiesel_a_partir_de_microalgas/)

**PRATT, R.; ONETO, F. & PRATT, J., 1945**, *Studies on Chlorella vulgaris.X. Influence the age of the culture on the accumulation of chlorellin*. *American Journal Botánica*. 32(7) pp: 405.

**QUINTANA, M.; HERNANDEZ, L.; MORRIS, H. & FERNÁNDEZ, M., 1999**, *Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalgas Chlorella sp*. *Revista Cubana Aliment. Nutr.* 13 (1) pp: 9-13

**QUINTERO, R., 1981,** *Ingeniería Bioquímica. Concepto y Aplicaciones*. Primera Edición. Editorial Siluetas S. A. México. Págs. 27 – 38.

**RAMIREZ, P. & MENDOZA, A., 2008,** “*Ensayo toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia en México*”. Instituto Nacional de Ecología.

**RÍOS, N.; MEDINA, G.; JIMÉNEZ, J.; YÁNEZ, C.; GARCÍA, M.; DI BERNARDO, M. & GUALTIERI, M., 2009,** *Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas*. Revista Perú. Biol. 16(1) pp: 97-100.

**RIOS, S., 2010,** *Potencial productivo como base para cosméticos de dos especies de microalgas en el Municipio de Sincelejo*. Universidad de Sucre.

**SACSAQUISPE, R. & VELÁSQUEZ, J., 2002,** “*Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*”. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

**SILVA, A., SILI, C. & TORZILLO, G., 2006,** *Cyanoprocaryota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) betónicas dominantes en ríos de Costa Rica*. Rev. Biol. Trop. 56(4) pp: 221-235.

**TRAVIESO, L.; BENÍTEZ E., 1998,** “*Cultivo de Arthrospira sp: del laboratorio a Planta Piloto. Curso: Tecnología y aprovechamiento del cultivo heterotrófico de microalgas*”. Centro de Investigaciones Pesqueras. La Habana. Cuba.

**VIRAMONTES, F., 1991,** *Estudio del efecto de diferentes ciclos luz-oscuridad sobre el crecimiento y contenido de lípidos en tres especies de microalgas marinas*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. 46 pp.

**WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LIU, Y.; WANG, Y. & RUAN, R.**  
**2010**, "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. In different wastewaters from  
Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl. Biochem Biotechnol.* 162:1174-1186.



# **ANEXO A**

# **TABLAS**

## ANEXO A1

El medio Basal de Bold tiene soluciones stock de macronutrientes y Micronutrientes las cuales se citan a continuación:

**Tabla A1.** Medio Basal de Bold

<b>MACRONUTRIENTES</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MEDIO (g/l)</b>
NaNO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.036
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.027
Ácido Cítrico	0.006
EDTA	0.001
NaCO <sub>3</sub>	0.02
Agua Destilada	1 L
<b>MICRONUTRIENTES</b>	
<b>COMPONENTE FINAL</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MEDIO (g/ml)</b>
Agua Destilada	100ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.286
NH <sub>4</sub> Cl*4H <sub>2</sub> O	0.425
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.012
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.005
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.003

Fuente: Armendáriz, 2011

## ANEXO A2

Las bacterias, para poder desarrollarse, requieren de un medio con el alimento adecuado. Existen muchas recetas para conseguir buenos medios de cultivo; uno de los mejores es el medio Luria-Bertani (LB) (Dorado, 2005).

**Tabla A2.** Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias

	<b>MEDIO SOLIDO (g)</b>
NaCl	10
Extracto de levadura	5
Peptona de caseína	10
Agar	15
Agua destilada	1 litro

**Fuente:** Dorado, 2005.

### ANEXO A3

**Tabla A3.** Medio Mueller-Hinton

<b>FORMULA( gramo por litro)</b>	
<b>Infusión de carne</b>	<b>3</b>
<b>Peptona de caseína</b>	<b>17.5</b>
<b>Almidón</b>	<b>1.5</b>
<b>Agar</b>	<b>15.0</b>

Fuente: (Ledezma, 2013)

Suspender 38 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles (Ledezma, 2013).

## ANEXO A4

**Tabla A4.** Estándares de interpretación de Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus* spp.

ANTIBIOTICOS	SENSIBILIDAD	INTERMEDIO ( $\mu\text{g/ml}$ )	RESISTENTE
Penicilina	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$
Oxacilina	$\leq 2$	-	$\geq 4$
Eritromicina	$\leq 0,5$	4-8	$\geq 16$
Vancomicina	$\leq 2$	1-4	$\geq 8$

**Fuente:** Leal et al., 2010

## ANEXO A5

**Tabla A5:** Valores de crecimiento celular muestra Atocha

		Tiempo (horas)									
		0	24	48	72	96	144	168	192	216	240
Densidad celular(*10 <sup>5</sup> )	A1	7,4	11,2	13,8	19,93	24,31	38,94	43,79	46,7	48,94	49,39
	A2	5,5	9,43	12,7	17,79	20,81	33,94	39,12	43,7	44,12	46,68
	A3	1,5	6,32	9,7	14,18	17,64	29,92	36,3	40,53	40,92	41,23
	Total	1,5	8,98	12,066	17,3	20,92	34,266	39,73	43,64	44,66	45,766

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

**Tabla A6:** Valores de crecimiento celular muestra Tilulum

		Tiempo (horas)									
		0	24	48	72	96	144	168	192	216	240
Densidad celular(*10 <sup>5</sup> )	B1	13,89	16,42	19,28	24,9	29,37	39,17	43,95	50,17	53,8	54,31
	B2	11,96	12,91	16,38	19,81	26,22	35,81	41,11	48,94	50,81	52,23
	B3	14,85	16,61	18,34	23,41	29,18	40,19	47,91	53,21	54,49	56,14
	Total	13,6	15,31	18	22,71	28,26	38,39	44,32	50,77	53,03	54,23

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

**Tabla A7:** Valores de crecimiento celular muestra del Socavón

		Tiempo (horas)									
		0	24	48	72	96	144	168	192	216	240
Densidad celular(*10 <sup>5</sup> )	C1	1,65	5,8	7,79	10,4	14,6	29,02	34	38,24	39,15	41,5
	C2	2,5	7,22	9,7	13,24	17,93	33,7	37,5	40,2	41,23	42,21
	C3	3,65	8,78	10,8	14,24	19,6	34,6	39,5	41,4	42,7	44,87
	Total	2,6	7,27	9,43	12,63	17,38	32,44	37	39,95	41,027	42,87

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

## ANEXO A6

**Tabla A8.** Ln de los promedios de la concentración celular de las muestras

Días	Ln		
	Muestra A	Muestra B	Muestra C
0	13,08	14,12	12,47
24	13,7	14,24	13,49
48	14	14,4	13,75
72	14,36	14,63	14,05
96	14,55	14,85	14,36
144	15,050	15,16	14,99
168	15,190	15,3	15,12
192	15,28	15,44	15,2
216	15,31	15,49	15,22
240	15,33	15,51	15,27

Elaborado por: Adriana Barona



## ANEXO A7

**Tabla A9.** Tabla de inhibición antibacteriana

		<b>Etanol</b>	<b>Alcohol Isopropílico</b>	<b>Agua</b>
<b>A1</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>A2</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>A3</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>B1</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>B2</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>B3</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C1</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C2</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C3</b>	Sobrenadante	Negativo	Negativo	Negativo
	Sedimento	Positivo	Positivo	Negativo

**Elaborado por:** Adriana Barona, 2013

## ANEXO A8

**Tabla A10.** Halos de inhibición promedio

Tratamientos		Promedio
Atocha	Etanol	0,150
Atocha	Alcohol Isopropílico	0,233
Tilulum	Etanol	0,209
Tilulum	Alcohol Isopropílico	0,282
Socavón	Etanol	0,117
Socavón	Alcohol Isopropílico	0,203
Atocha	Etanol	0,180
Atocha	Alcohol Isopropílico	0,217
Tilulum	Etanol	0,180
Tilulum	Alcohol Isopropílico	0,260
Socavón	Etanol	0,122
Socavón	Alcohol Isopropílico	0,188
Atocha	Etanol	0,193
Atocha	Alcohol Isopropílico	0,205
Tilulum	Etanol	0,192
Tilulum	Alcohol Isopropílico	0,290
Socavón	Etanol	0,113
Socavón	Alcohol Isopropílico	0,207

Elaborado por: Adriana Barona, 2013

# **ANEXO B**

# **FOTOGRAFÍAS**

**ANEXO B1. Lugares de recolección de muestras**



**Fotografía 2. Tilulum**

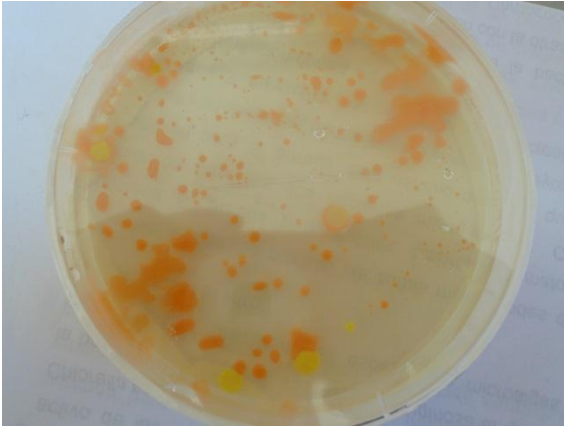


**Fotografía 3. Atocha**



**Fotografía 4. Socavón**

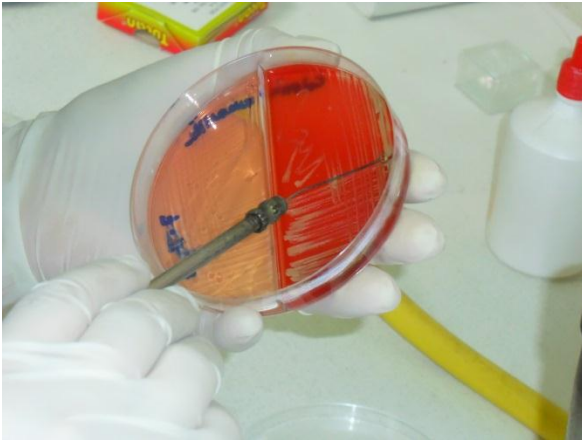
## ANEXO B2. Identificación bacteriana



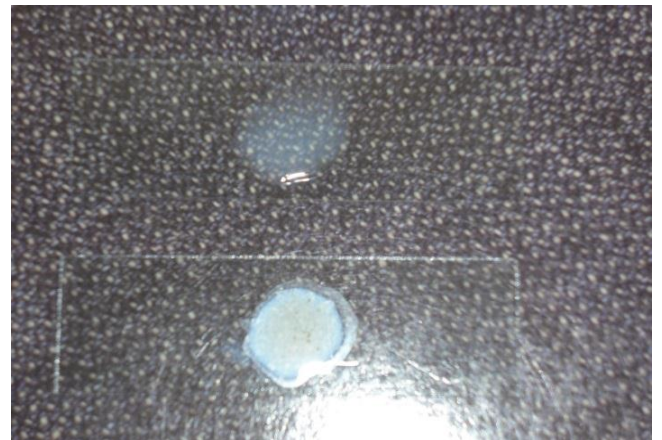
Fotografía 5. Aislamiento



Fotografía 6. Resiembra



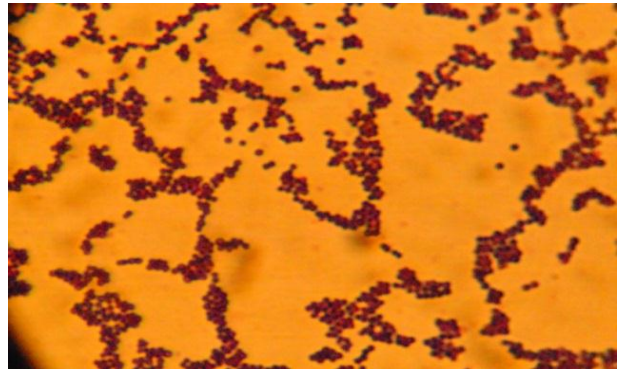
Fotografía 7. Agar sangre y mac Conkey



Fotografía 8. Prueba catalasa



Fotografía 9. Prueba coagulasa



Fotografía 10. Prueba gram

### ANEXO B3. Cultivos *Chlorella*



Fotografía 11. Crecimiento 0-24 horas



Fotografía 12. Crecimiento celular 48-192 horas

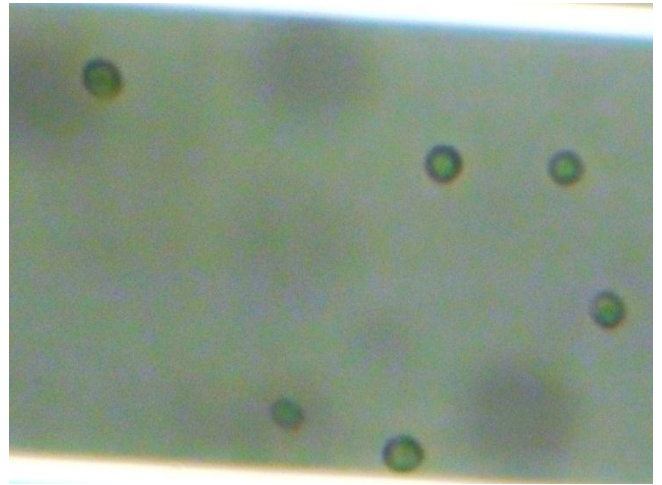


Fotografía 13. Crecimiento celular 216-240 horas

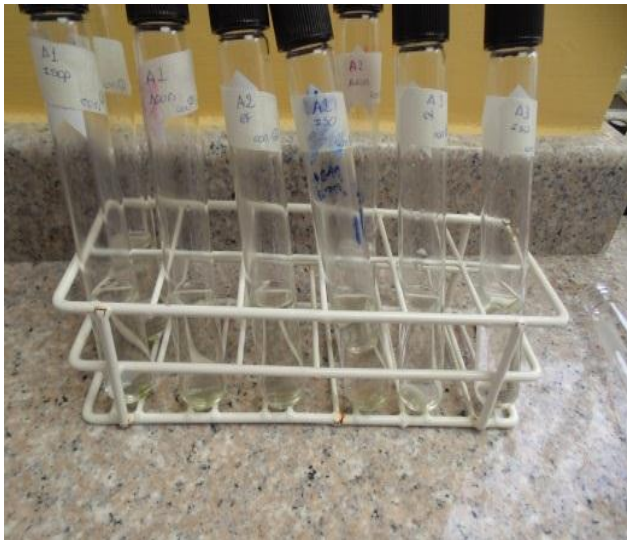
## ANEXO B4. Extracción Chlorellin



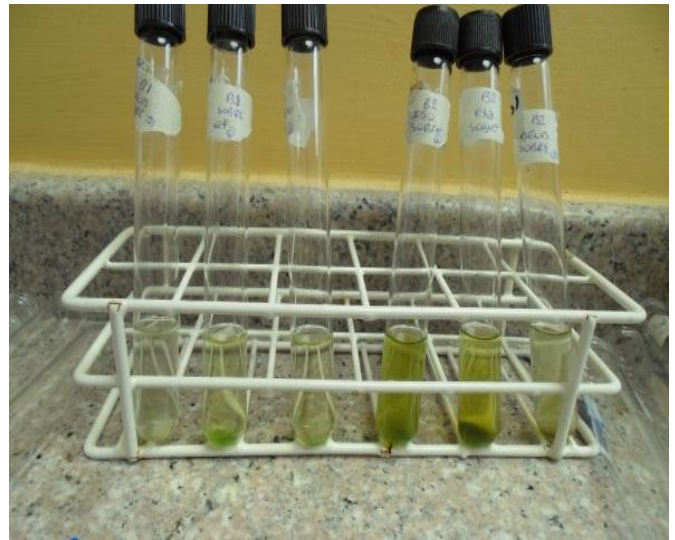
Fotografía 14. Cultivo microalgal



Fotografía 15. Observación (40x)



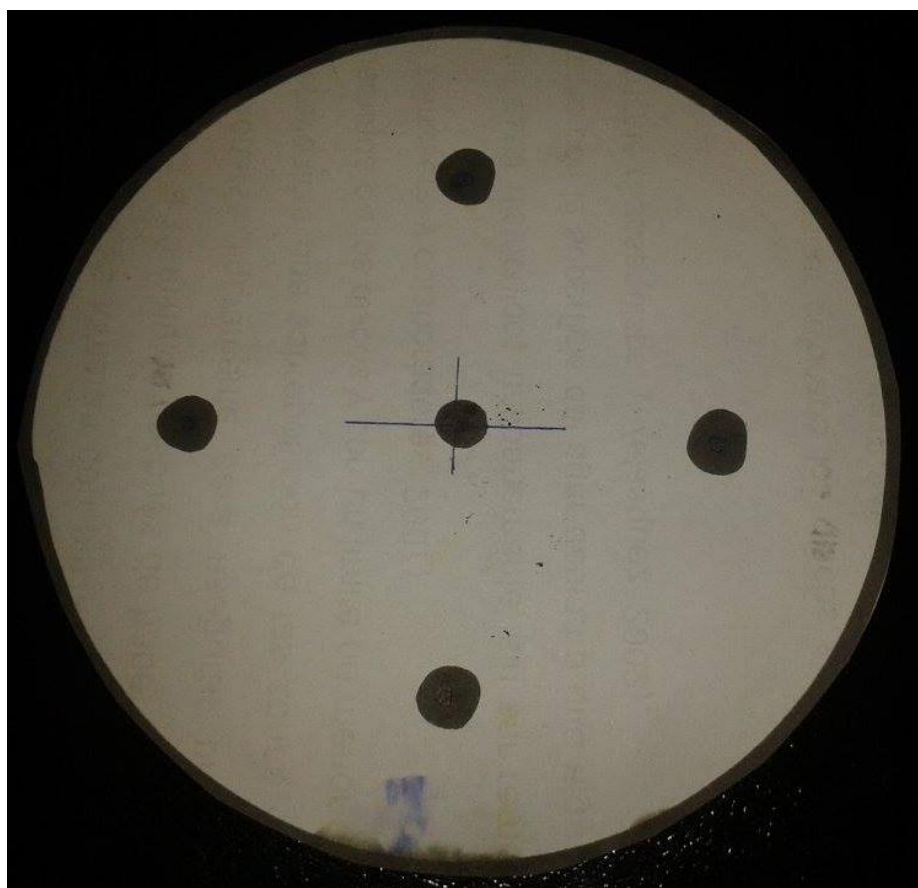
Fotografía 16. Chlorellin (Sobrenadante)



Fotografía 17. Chlorellin (Sedimento)

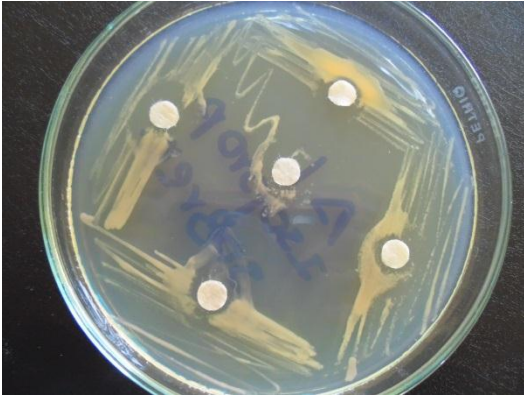
## ANEXO B5

Fotografía 18. Molde para antibiograma





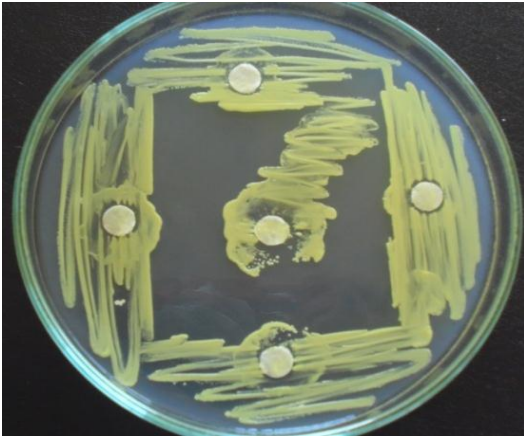
**ANEXO B6. POTENCIAL ANTIBACTERIAL (Atocha)**



**Fotografía 19. Alcohol Isopropílico- sedimento**



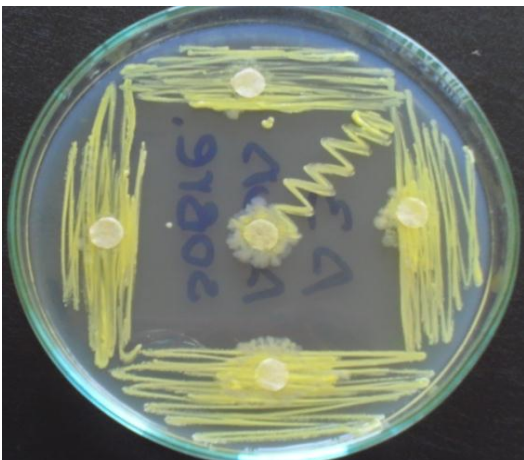
**Fotografía 20. Reverso**



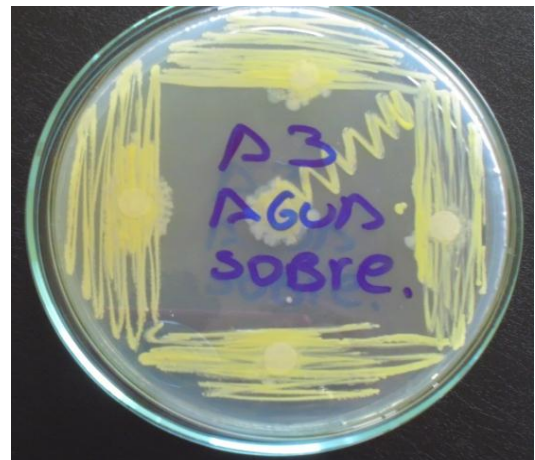
**Fotografía 21. Etanol- Sedimento**



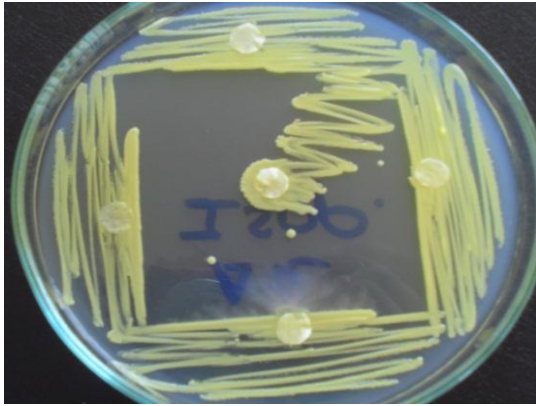
**Fotografía 22. Reverso**



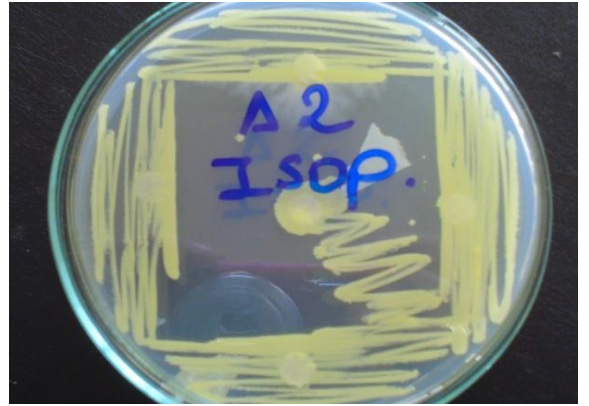
**Fotografía 23. Agua- sobrenadante**



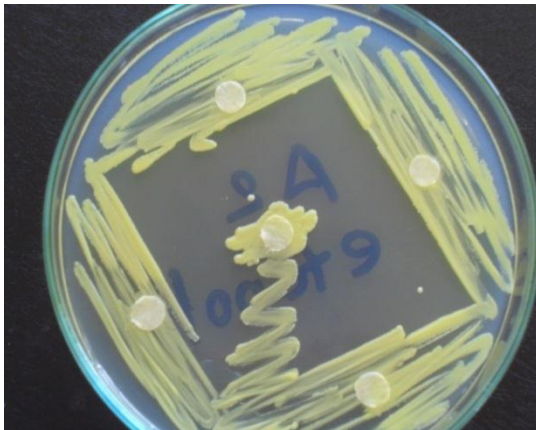
**Fotografía 24: Reverso**



Fotografía 25. Alcohol Isopropílico- Sobrenadante



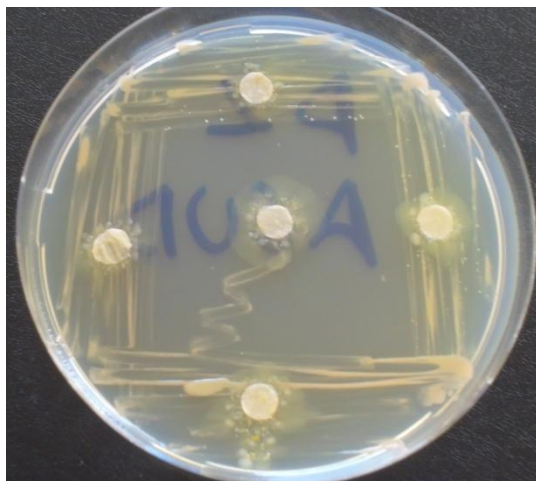
Fotografía 26. Reverso



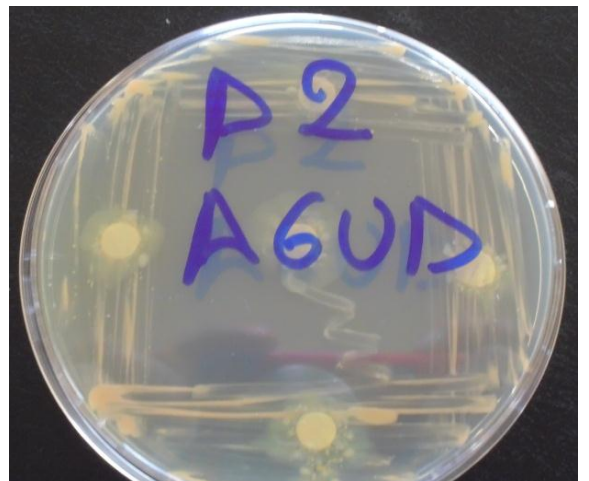
Fotografía 27. Etanol- Sobrenadante



Fotografía 28. Reverso



Fotografía 29. Agua- sobrenadante



Fotografía 30: Reverso

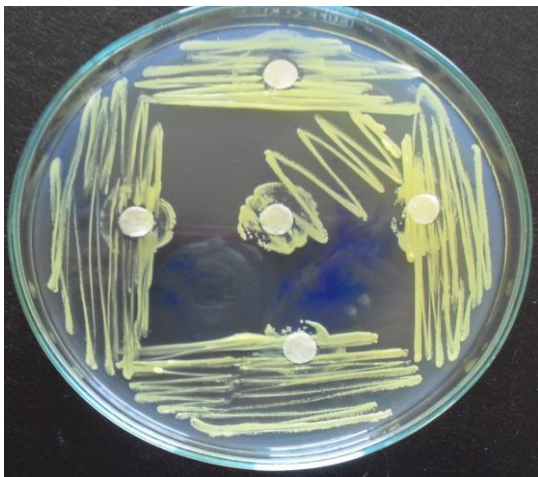
**ANEXO B7. POTENCIAL ANTIBACTERIAL (Tilulum)**



**Fotografía 31. Alcohol Isopropílico sedimento**



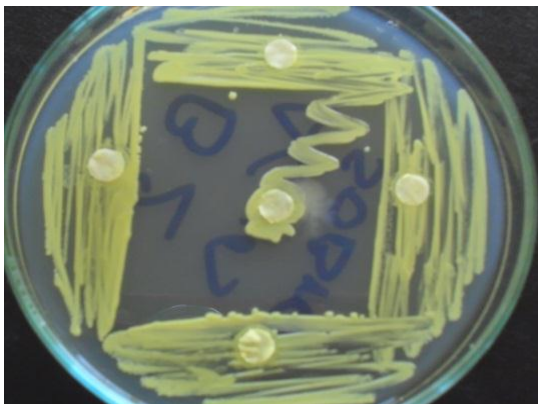
**Fotografía 32. Reverso**



**Fotografía 33. Etanol- Sedimento**



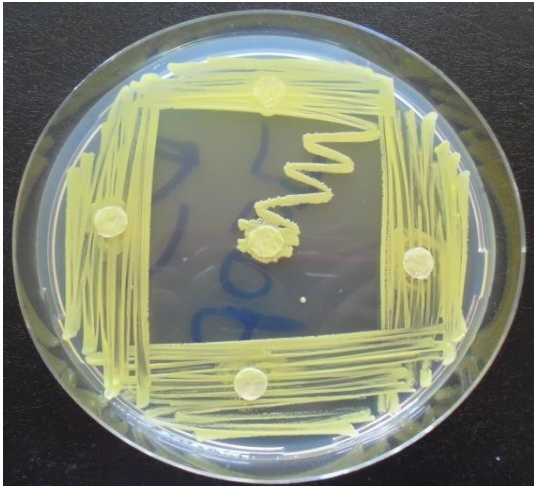
**Fotografía 34. Reverso**



**Fotografía 35. Agua- Sedimento**



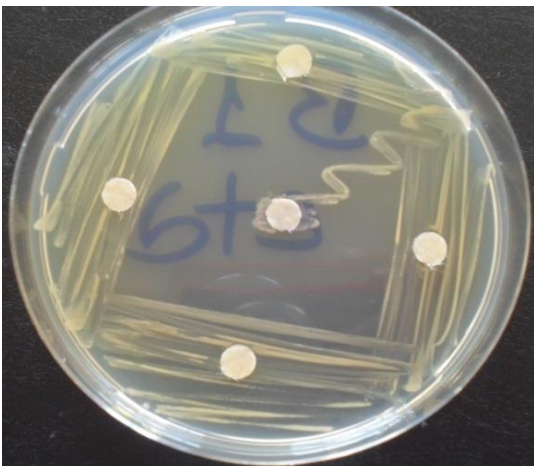
**Fotografía 36. Reverso**



Fotografía 37. Alcohol Isopropílico- Sobrenadante



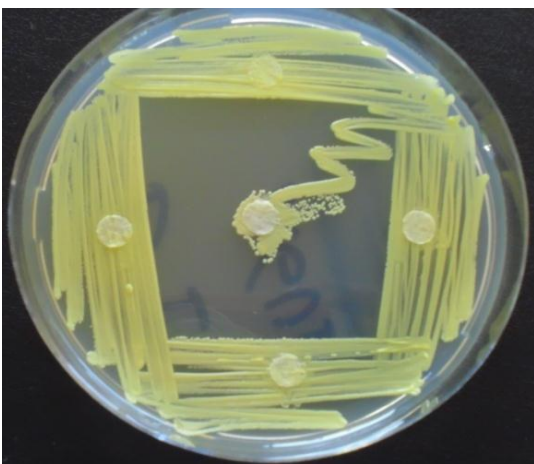
Fotografía 38. Reverso



Fotografía 39. Etano- sobrenadante



Fotografía 40. Reverso



Fotografía 41. Agua- Sobrenadante



Fotografía 42. Reverso

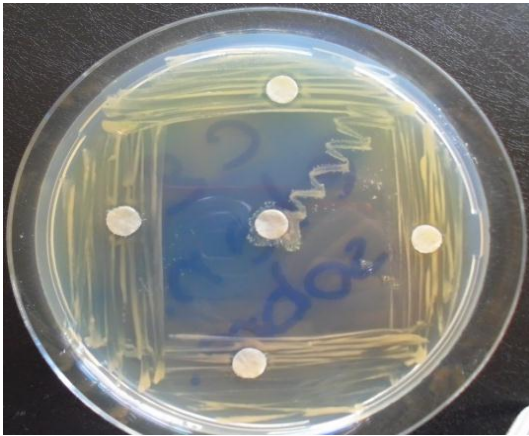
**ANEXO B8. POTENCIAL ANTIBACTERIAL (Socavón)**



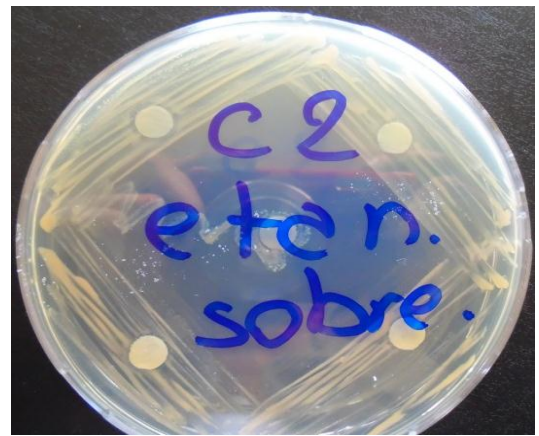
**Fotografía 43. Alcohol Isopropílico- Sedimento**



**Fotografía 44. Reverso**



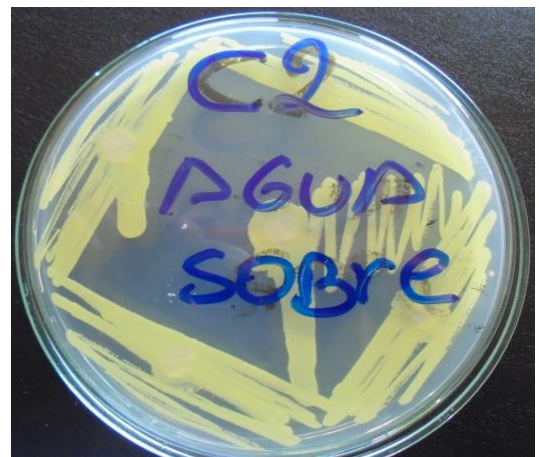
**Fotografía 45. Etanol- Sedimento**



**Fotografía 46. Reverso**



**Fotografía 47. Agua- Sedimento**



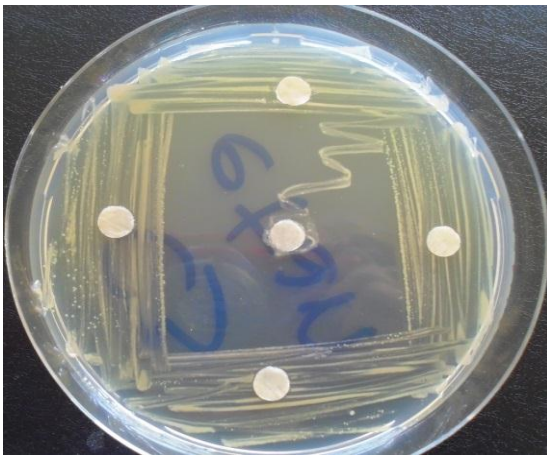
**Fotografía 48. Reverso**



Fotografía 49. Alcohol Isopropílico-sobrenadante



Fotografía 50. Reverso



Fotografía 51. Etanol- sobrenadante



Fotografía 52. Reverso



Fotografía 53. Agua- Sobrenadante



Fotografía 54. Reverso

## ANEXO B9

Fotografía 55: Antibiograma de bacteria gram-positiva en agar Mueller-Hinton

