

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas

**“EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE
TRES ESPECIES DE MICROALGAS, IQUITOS – 2016”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

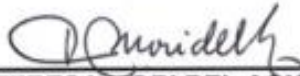
Autor:

Joe Brian Petterman Vilchez

Iquitos – Perú

2017

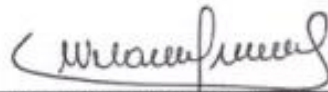
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



**Blga. TERESA MORI DEL AGUILA, Dra.
PRESIDENTE**

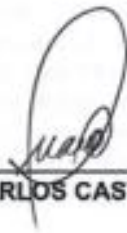


**Mblgo. ALVARO TRESIERRA AYALA, Dr
MIEMBRO**



**Blga. LUZ ESTHER VELA GUERRA, Mgr.
MIEMBRO**

ASESORES



Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ, Dr.



Blga. MARIANELA COBOS RUIZ, Dra.



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 017

Iquitos, 21 de octubre de 2017


En la ciudad de Iquitos, a los veintiún días del mes de octubre del 2017 y, siendo las 11.00 a.m. horas; se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 066-2016-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; **Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra. (Presidente); Mblgo. ÁLVARO BENJAMIN TRESIERRA AYALA, Dr. (Miembro) y Blga. LUZ ESTHER VELA GUERRA, Mgr., (Miembro)**, para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS, IQUITOS-2016”**, por el Br. **JOE BRIAN PETTERMAN VÍLCHEZ** de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Formación Profesional de Ciencias Biológicas, promoción 2015-II, graduado de bachiller con **R.R. N° 0265-2017-UNAP** de fecha 27 de febrero del 2017, reconociendo como asesores a los siguiente profesionales: **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr. y Blga. MARIANELA COBOS RUÍZ, Dra.;**



Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBAR MUY BUENA LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADO COMO **apto** para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12.25 p.m. horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente acta de sustentación por triplicado.


Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra.
PRESIDENTE


Mblgo. ÁLVARO BENJAMIN TRESIERRA AYALA, Dr.
MIEMBRO


y Blga. LUZ ESTHER VELA GUERRA, Mgr.
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Carmen Vílchez, Jorge Petterman, a mi pequeño hermano Xavier Petterman, a mi tío con mucho cariño Prof. Darío Torres Sifuentes.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto “Desarrollo de plataformas biotecnológicas microalgales para la producción eficiente y sustentable de nutraceuticos y proteínas recombinantes de interés biomédico” Convenio 213 – 2015 – FONDECYT financiado por el Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (CONCYTEC) y la Universidad Científica del Perú (UCP).

A mis asesores de tesis, al Dr. Juan Carlos Castro Gómez y a la Dra. Marianela Cobos Ruiz, por haber confiado en mí cuando era un estudiante y haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigadores de la Unidad Especializada de Biotecnología (CIRNA-UNAP) y del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética (UCP).

Al Dr. Jorge Luis Marapara del Águila Coordinador de la Unidad Especializada de Biotecnología (CIRNA-UNAP) y a una excelente persona e investigador Blgo. Jorge Angulo Quintanilla por el apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos Brucee Jiu, Napoleón Rodríguez, Cindy López, Jhoao Fasabi, María Casuso, Sheyla Pérez, Levi Estela, Piere Manzur.

A mi familia en especial a mis Padres, Jorge Petterman y Carmen Vílchez, que gracias a ellos y con su ejemplo he aprendido a superar las adversidades de la vida y saber mirar el lado positivo de las cosas, a mis abuelitos Ricardo y Rosario que insoslayablemente formaron parte sustancial de mi vida y a todas las personas que depositaron esa confianza en mí.

RESUMEN

Las microalgas son microorganismos con un gran potencial biotecnológico debido a su capacidad de producción de diversos compuestos. Sin embargo, para ser empleadas como plataformas biotecnológicas moleculares es necesario conocer su susceptibilidad a los antibióticos. Este conocimiento, es fundamental para seleccionar el gen de resistencia para diseñar los vectores de expresión apropiados. Por tanto, el objetivo fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003. Las microalgas fueron cultivadas en medio CHU-10 en condiciones controladas y axénicas, luego tratadas con diferentes concentraciones (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL) de los antibióticos Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina. Todos los antibióticos afectaron el perfil de crecimiento de las tres especies de microalgas. Las concentraciones de antibióticos que inhibieron en un 50% el crecimiento microalgal (concentración efectiva al 50% = EC₅₀) fluctuaron de 2,11 µg/mL con Higromicina B a 3798,37 µg/mL con Espectinomicina. En conclusión, se ha demostrado que los antibióticos Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina inhiben el crecimiento de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 y su perfil de crecimiento es afectado en función a la concentración del antibiótico empleado.

Palabras clave: marcadores de selección, mejoramiento genético, plataformas biotecnológicas

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	ii
ASESORES	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 017	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	vii
ÍNDICE DEL CONTENIDO	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Antecedentes	4
3.2. Aspectos generales de las microalgas	7
3.2.1. <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001	9
3.2.2. <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002	9
3.2.3. <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003	10
3.3. Curva de crecimiento microalgal	11
3.3.1. Fase de adaptación	11
3.3.2. Fase Exponencial	11
3.3.3. Fase de declinación relativa del crecimiento	11
3.3.4. Fase Estacionaria	12
3.3.5. Fase de Muerte	12
3.4. Conceptos generales de pruebas de susceptibilidad	13
3.4.1. Descripción de los antibióticos	14
3.4.2. Mecanismo de acción de antibióticos	14
3.4.2.1. Cloranfenicol	15
3.4.2.2. Espectinomicina	16
3.4.2.3. Geneticina	17
3.4.2.4. Higromicina B	18

3.4.2.5. Zeocina-----	19
3.5. Preparación del antibiótico. -----	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS-----	21
4.1. ÁREA DE ESTUDIO-----	21
4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA -----	21
4.2.1. Población-----	21
4.2.2. Muestra -----	21
4.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES-----	21
4.3.1. Equipos -----	21
4.3.2. Materiales de laboratorio -----	22
4.3.3. Insumos químicos -----	23
4.3.4. Tipo y diseño de investigación -----	24
4.4. PROCEDIMIENTOS-----	24
4.4.1. Cultivo de microalgas-----	24
4.4.2. Obtención de cultivos axénicos de microalgas-----	25
4.4.3. Prueba de susceptibilidad por dilución -----	25
4.4.3.1. Perfil de Crecimiento de las microalgas -----	26
4.4.3.2. Perfil de crecimiento microalgal en presencia y ausencia de antibióticos	27
4.4.3.3. Determinación de la concentración efectiva 50 (EC ₅₀) -----	27
4.5. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN-----	27
V. RESULTADOS-----	28
5.1. Obtención de cultivos axénicos -----	28
5.1.1. Prueba de axenidad -----	29
5.1.1.1. Tinción de gram y siembra en medio LB (Luria Bertani) Agar -----	29
5.2. Perfil de crecimiento microalgal en presencia y ausencia de antibióticos -----	31
5.2.1. <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	31
5.2.2. <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002 -----	33
5.2.3. <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	35
5.3. Concentración efectiva 50 (EC ₅₀)-----	37
VI. DISCUSIÓN-----	38
VII. CONCLUSIONES-----	42
VIII. RECOMENDACIONES -----	43
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	44
X. ANEXOS-----	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas-----	13
Figura 2. Estructura química de Cloranfenicol-----	15
Figura 3. Estructura química de Espectinomicina-----	16
Figura 4. Estructura química de Geneticina-----	17
Figura 5. Estructura química de Higromicina B-----	18
Figura 6. Estructura química de Zeocina-----	19
Figura 7. Cultivos monoespecíficos unialgales de tres especies de microalgas (A= <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, B= <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002 y C= <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003) -----	28
Figura 8. Tinción de Gram y siembra en medio LB Agar antes y después del tratamiento con lisozima y ampicilina de A = <i>Ankistrodesmus</i> sp. UCP0001, B = <i>Chlorella</i> sp. UCP0002 y C = <i>Scenedesmus</i> sp. UCP0003-----	30
Figura 9. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) diferentes sobre el crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	32
Figura 10. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) diferentes sobre el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	34
Figura 11. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) diferentes sobre el crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	36

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. - Clasificación de los diferentes grupos de microalgas.-----	8
Cuadro 2. Valores de EC ₅₀ para la inhibición del crecimiento microalgal-----	37

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo I. Del mapa georeferencial del área de estudio.

Figura 1. Ubicación del laboratorio de biotecnología y bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP) que contienen los bancos de cepas de <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001, <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002 y <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	53
--	----

Anexo II. Abreviaturas-----54

Anexo III. Curvas de calibración de las tres especies de microalgas.

Figura 1. Curva de calibración de <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	55
Figura 2. Curva de calibración de <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0001-----	55
Figura 3. Curva de calibración de <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	56

Anexo IV. Cuadros de datos estadísticos de los 5 antibióticos (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) de las tres especies de microalgas.

Cuadro 1. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de cloranfenicol en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	57
Cuadro 2. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomicina en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	57
Cuadro 3. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	57
Cuadro 4. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	58
Cuadro 5. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en <i>Ankistrodesmus</i> sp. Cepa UCP0001-----	58
Cuadro 6. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Cloranfenicol en <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	58

Cuadro 7. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomicina en <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	59
Cuadro 8. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	59
Cuadro 9. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	59
Cuadro 10. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en <i>Chlorella</i> sp. Cepa UCP0002-----	60
Cuadro 11. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Cloranfenicol en <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	60
Cuadro 12. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomicina en <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	60
Cuadro 13. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	61
Cuadro 14. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	61
Cuadro 15. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en <i>Scenedesmus</i> sp. Cepa UCP0003-----	61

Anexo V. Flujogramas de procedimientos metodológicos

Foto 1. Flujograma de procedimientos para la obtención de cultivos axénicos de las tres especies de microalgas-----	62
Foto 2. Flujograma de procedimientos para prueba de sensibilidad en las tres especies de microalgas-----	63

I. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de productos naturales para la salud, los alimentos y productos cosméticos ha aumentado el interés en la biotecnología de las microalgas ⁽¹⁾. La biotecnología de microalgas es un campo donde se han descubierto y aislado de microorganismos fotosintéticos ⁽²⁾, varios compuestos de alto valor agregado que se descubren cuando son expuestas bajo ciertas condiciones experimentales, tales como variación de la temperatura, CO₂, ausencia de nitrógeno, entre otros factores ⁽³⁾. También, poseen una excelente capacidad de tratamiento de aguas residuales, captura de CO₂ y otras funciones de importancia ecológica ⁽⁴⁾. Además, pueden ser usadas como biofábricas para la producción biotecnológica de biocombustibles y de proteínas recombinantes ⁽⁵⁾.

La utilización de microalgas como sistemas eucariotas para la expresión de proteínas recombinantes, pueden generar desde hormonas o anticuerpos hasta antígenos para la inmunización de especies animales ⁽⁶⁾. A pesar de las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas, éstas han sido poco estudiadas en comparación con las bacterias y las levaduras respecto a la susceptibilidad a antibióticos a fin de ser usados como marcadores de selección de genes de resistencia ⁽⁷⁾.

El desarrollo de técnicas de antibiograma aplicadas a las microalgas es de vital importancia para establecer la selección de las mismas y trabajar con especies para fines de mejora genética, no solo desde el punto de vista biotecnológico, sino con el objetivo de alcanzar un mayor conocimiento fisiológico y bioquímico de las mismas ⁽⁸⁾. Esto nos permitiría llegar a producir especies de microalgas transformadas genéticamente mediante el establecimiento de un sistema de diseños de vectores de expresión ⁽⁹⁾. Además, de la utilización de los mecanismos biosintéticos de estas cepas para la producción de proteínas recombinantes de interés ⁽¹⁰⁾.

Sin embargo, aún no conocemos la susceptibilidad a diferentes tipos de antibióticos en microalgas aisladas en la Amazonia Peruana. Esta falta de información constituye una barrera para desarrollar estudios relacionados a la combinación apropiada de genes de resistencia y diseños de vectores de expresión.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

2.2. Objetivos Específicos

Obtener cultivos axénicos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

Evaluar el perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 en presencia y ausencia de los antibióticos Cloranfenicol, Espectinomomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina.

Establecer la concentración efectiva 50 (EC₅₀) de los antibióticos Cloranfenicol, Espectinomomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina, solo para las especies de microalgas que presentan susceptibilidad.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Antecedentes

En un estudio utilizaron Lisozima y Ampicilina para la producción de cultivos axénicos de *Anabaena flos-aquae* y *Aphanothece nidulans*. Estas cianobacterias resistieron la digestión por Lisozima en sus concentraciones experimentales, mientras que las bacterias se digirieron selectivamente. Este método de purificación parece ser especialmente útil con las especies de cianobacterias que son sensibles a los antibióticos u otros agentes germicidas ⁽⁵⁰⁾.

En estudios sobre toxicidad algal de los agentes antibacterianos aplicados en la piscicultura. Evaluaron los efectos inhibitorios del crecimiento de Amoxicilina (A), Flumequina (F), Ácido Oxolínico (OA), Clorhidrato de Oxitetraciclina (OT), Sarafloxacino Clorhidrato de (SF), Sulfadiazina (SD), y Trimetoprima (T) en tres especies de algas: la cianobacteria de agua dulce *Microcystis aeruginosa*, el agua dulce verde *Selenastrum capricornutum*, y la marina *Rhodomonas salina*. Demostraron que la toxicidad (valor EC50, mg/L) en orden decreciente fue A (0,0037), SF (0,015), SD (0,135), F (0,159), OA (0,180), OT (0,207) y T (112) para *M. aeruginosa*; OT (1,6), OA (10), T (16), F (18), SF (24), SD (403) y A (3108) para *R. salina*; y OT (4,5), F (5,0), SD (7,8), OA (16), SF (16), T (130) y A (NOEC > 250) para *S. capricornutum*. Aplicando este procedimiento de prueba, la toxicidad de los agentes antibacterianos, que son compuestos mono o polipróticos, puede subestimarse debido a la división entre formas ionizadas y sindicalizadas ⁽⁶⁶⁾.

En el año 2000 investigadores probaron los efectos inhibidores del crecimiento de ocho antibióticos en dos especies de microalgas, *Microcystis aeruginosa* (cianobacterias de agua dulce) y *Selenastrum capricornutum* (algas verdes). Se probaron los efectos de los antibióticos Bencilpenicilina (Penicilina G) (BP), Clortetraciclina (CTC), Olaquinox (O), Espiramicina (SP), Estreptomina (ST), Tetraciclina (TC), Tiamulina (TI) y Tilosina (TY). Éstos demostraron que la toxicidad (valor EC50, mg/L) en orden alfabético

fue BP (0,006); CTC (0,05); O (5,1); SP (0,005); ST (0,007); TC (0,09); TI (0,003) y TY (0,034) para *M. aeruginosa*. BP (NOEC = 100); CTC (3,1); O (40); SP (2,3); ST (0,133); TC (2,2); TI (0,165) y TY (1,38) para *S. capricornutum*. Por lo que demostraron que *M. aeruginosa* es aproximadamente dos órdenes de magnitud más sensible que *S. capricornutum* ⁽⁶⁷⁾.

Estudios realizados en *Chlamydomonas reinhardtii* usando el gen de *Streptomyces hygroscopicus* aminoglycoside phosphotransferase (aph7 "). Para transformar *C. reinhardtii* de pared celular deficiente y cepas de tipo salvaje. Estos seleccionaron en placas con 10 µ/mL de Higromicina B exhibieron diversos niveles de resistencia de hasta 200 µ/mL que se mantuvieron de manera estable durante al menos siete meses, contenían entre dos y cinco copias de la construcción integrada en sus genomas. Esto aboga por el plásmido de resistencia a la Higromicina, pHyg3, como una nueva herramienta versátil para la transformación de un amplio rango de cepas de *C. reinhardtii* sin la necesidad sostenida de usar mutantes auxotróficos como receptores ⁽⁶²⁾.

Estudios demuestran en el 2009 que antibióticos fenólicos en las microalgas utilizadas en la acuicultura como Cloranfenicol (CAP), Florfenicol (FF) y Tiamphenicol (TAP) en cultivos de un alga verde de agua dulce, *Chlorella pyrenoidosa* y dos algas marinas, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis chui*. Son tóxicos para las dos algas marinas, la FF muestran niveles más altos de toxicidad (EC50 1,3-8 mg/L) que CAP (4-41 mg/L) y TAP (38-158 mg/L). Además, muestran que CAP fue más tóxica para las algas de agua dulce (EC50, 14 mg/L) que FF (215 mg/L) y TAP (1283 mg/L) con esto demostraron que TAP fue el menos tóxico para las tres algas, pero mantuvo la mayor estabilidad durante el período de prueba. Entre las algas probadas, *T. chui* fue la especie más sensible a los tres antibióticos. Este estudio demuestra que los tres antibióticos phenicol pueden inhibir el crecimiento de las tres microalgas y deben usarse con cuidado en la acuicultura ⁽⁶⁵⁾.

En 2010 se estudió varios métodos físicos y químicos para la eliminación de contaminantes de las microalgas, *Tetraselmis suecica*. Además, utilizaron

dos antibióticos, 5 mg/mL de Vancomicina y 10 mg/mL de Neomicina para la mejora del crecimiento de *T. suecica* y la fácil adaptación de cultivos fotoautótrofos a condiciones heterotróficas. Finalmente, el cultivo se inoculó en el medio que contenía 10 g/L de glucosa, se incubó en total oscuridad para obtener células heterotróficas. Además, demostraron que se producen cambios en la morfología y composición de las células de *T. suecica* durante la adaptación de la condición fotoautotrófica a heterotrófica ⁽⁵⁷⁾.

En estudios realizados en 2011 para identificar los antibióticos adecuados para la selección de células transformadas de forma estable, probaron 6 antibióticos, Ampicilina (Am), Kanamicina (Km), Higromicina (Hm), Geneticina (G418), Cloranfenicol (Cm) y Paromomicina (Pm), que se emplean frecuentemente como agentes de selección en la transformación de plantas terrestres y microalgas. Estos mostraron que Hm, G418, Cm y Pm tuvieron un efecto letal a más de 1.0 mg/mL, lo que sugiere la idoneidad de estos cuatro antibióticos para la selección de células genéticamente transformadas de gametofitos de *Porphyra yezoensis*. Además, mostraron que los gametofitos de *P. yezoensis* fueron altamente resistentes a Am y Km. También lograron reducir las concentraciones de antibióticos al disminuir el valor de pH y la concentración de sal utilizando un medio sintético artificial. El aumento de la sensibilidad de las células gametofíticas a Hm, G418, Cm y Pm en el medio sintético modificado contribuirá a establecer un sistema de transformación genética en *P. yezoensis* ⁽⁶³⁾.

En China el 2015, evaluaron ocho antibióticos, Ampicilina (AMP), Estreptomina (STR), Kanamicina (KAN), Cloranfenicol (CHL), Penicilina (PEN), Griseofulvina (GRI), Sulfato de Gentamicina (GEN), Ceftazidima (CAZ), añadiendo al caldo de cultivo para explorar cultivo axénicos de *Haematococcus pluvialis*, en principio la griseofulvina a una concentración baja (0,05 mg/mL) era beneficioso para el crecimiento celular de microalgas, en un cultivo intermedio la penicilina a esa misma concentración tuvo un efecto Bactericida, además la combinación de estos, tuvo un mejor efecto bactericida. Después de 18 días cultivo las microalgas crecieron con total normalidad ⁽⁷²⁾.

3.2. Aspectos generales de las microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos, se clasifican en procariotas (cianobacterias) como las algas verdes-azules y eucariotas (clorofitas o algas verdes), generalmente crecen en la hidrósfera a profundidades no mayores de 200 m hasta donde haya penetración de luz fotónica ⁽¹¹⁾. Las microalgas poseen estructuras celulares simples y grandes áreas superficiales en relación al volumen de las células. A diferencia de las plantas superiores, no requieren sistemas vasculares para el transporte de nutrientes, ya que carecen de hojas, tallos y raíces, estas características disminuyen el consumo energético y aumentan la eficiencia en la asimilación de nutrientes ⁽¹²⁾. Las microalgas y cianobacterias han sido reconocidas como parte de los microorganismos más antiguos sobre la tierra; estos microorganismos se encuentran en la base de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuáticos, debido a que por medio de la fotosíntesis producen su propio alimento, liberando oxígeno y compuestos orgánicos que son asimilados por depredadores ⁽¹³⁾. Las microalgas han sido estudiadas desde los años 50, cuando Estados Unidos, Japón y Europa se interesaron en los productos generados a partir de la biomasa microalgal, que fueron utilizados como alimento humano y animal, por su alto contenido en proteína ⁽¹³⁾. Las microalgas procariotas o cianobacterias, carecen de las membranas que limitan sus organelas y sus ribosomas son más pequeños. Las microalgas eucariotas se dividen de acuerdo a sus pigmentos fotosintéticos e incluyen diatomeas (*Bacillarioficeas*), doradas (*Crisoficeas*), rojas (*Rodofitas*), pardas (*Feoficias*) y verdes (*Clorofitas*). Las verdes, son consideradas plantas unicelulares que pueden crecer flotando o de manera fija sobre una superficie, en forma de colonias (conjunto de células de diferentes generaciones comunicadas entre sí, filamentos o algunas desarrollan flagelos (estructuras de locomoción), además poseen alta capacidad de adaptación, incluso en ambientes extremos ⁽¹⁴⁾.

Cuadro 1. - Clasificación de los diferentes grupos de microalgas.

Reino	División	Clase
Procariota Eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eucariota	Glaucophyta	Glaucophyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Heterokontophyta	Crhysophyceae
		Xanthophyceae
		Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
		Haptophyta
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
		Cladophorophyceae
		Bryopsidophyceae
Zygnematophyceae		
Trentepohliophyceae		
Klebsormidiophyceae		
Charophyceae		
Dasycladophyceae		

Fuente: Barsanti L. & Gualtieri P., ⁽¹⁵⁾

3.2.1. *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

Reino : Plantae
Filo : Chlorophyta
Clase : Chlorophyceae
Orden : Chlorococcales
Familia : Oocystaceae
Genero : *Ankistrodesmus*
Corda, 1838 ⁽¹⁶⁾

Forman colonias de 4 – 32, células del cuerpo largo o cabezal en forma cónica en ambos extremos células pegadas unas con otras en el centro del cuerpo, en paralelo o dispuestas radialmente, sin envoltura gelatinosa, un cloroplasto y no presenta pirenoide. El alga *Ankistrodesmus* suele formar gavillas, aunque, a veces, crece sola, pero no es lo habitual. Sin embargo, con más frecuencia, esta pequeña alga se curva ligeramente como un arco y forma pequeñas y finas lunas, que agrupadas forman estrellas. Al agruparse en colonias, formando estos densos haces, *Ankistrodesmus* puede flotar con más facilidad y formar parte, como muchas otras algas estrelladas, del universo de las aguas ⁽¹⁷⁾. Este género, tan característico y relativamente común forma parte del plancton en lagunas y cursos lentos de agua.

3.2.2. *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

Reino : Plantae
Filo : Chlorophyta
Clase : Chlorophyceae
Orden : Chlorellales
Familia : Chlorellaceae
Genero : *Chlorella*
Beijerinck, 1890 ⁽¹⁸⁾

Es un género de algas verdes unicelulares del filo Chlorophyta. Tiene forma esférica, midiendo de 2 a 10 μm de diámetro, y no posee flagelo. *Chlorella* sp. Contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores clorofila a y b en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo sólo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales por esto se creía que la *chlorella* sp. podría servir como fuente de alimento y de energía debido a su eficiencia fotosintética, que puede alcanzar teóricamente el 8% ⁽¹⁹⁾.

3.2.3. *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

Reino : Plantae
Filo : Chlorophyta
Clase : Chlorophyceae
Orden : Chlorococcales
Familia : Scenedesmaceae
Genero : Scenedesmus
Meyen, 1829 ⁽²⁰⁾

Es un género de algas verdes. Son cenobiales y no móviles. Es uno de los géneros de agua dulce más común; Sin embargo, las diversas morfologías que se encuentran dentro de las especies hacen difícil la identificación. Aunque la mayoría de las especies se encuentran en todo el mundo, existen ciertas especies sólo en las poblaciones locales, tales como *S. intermedius* y *S. serrato* que se encuentran en Nueva Zelanda. *Scenedesmus* sp. es conocido por tener una alta productividad de biomasa entre las algas verdes, y se ha investigado activamente su uso para la producción de biodiesel. Su producción heterótrofa de la biomasa y de los lípidos en condiciones optimizadas se informa que tiene una mayor eficacia que su producción autótrofa ⁽²¹⁾.

3.3. Curva de crecimiento microalgal

Existen de 3 a 5 fases generalmente reconocidas del crecimiento de población de microalgas, las cuales corresponden al estado nutricional de las células. La duración de cada fase puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse dependiendo de diversos factores como: temperatura, luz, composición del medio de cultivo, tamaño del inoculo y estado fisiológico del alga ⁽²²⁾.

3.3.1. Fase de adaptación

En donde no ocurre incremento en el número de células pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inoculo inicial exponencial debido a que las células viables no se encuentran en las condiciones adecuadas para dividirse inmediatamente debido a la necesidad de un ajuste bioquímico ⁽²³⁾.

3.3.2. Fase Exponencial

Al adaptarse las células al medio, la velocidad de multiplicación se caracteriza por tener una forma geométrica. Esta fase es la más importante, porque indica que el cultivo debe cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento máximo en la densidad celular. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días. Si se controla la tasa de dilución del cultivo, esta etapa puede prolongarse por varias semanas ⁽²³⁾.

3.3.3. Fase de declinación relativa del crecimiento

En esta fase, que puede durar de uno a dos días, empieza a manifestarse la muerte de las células debido a condiciones desfavorables en el cultivo generadas en la fase anterior (agotamiento de nutrientes, aumento de metabolitos de desecho, cambios de pH) y consecuentemente empieza a disminuir la densidad celular ⁽²³⁾.

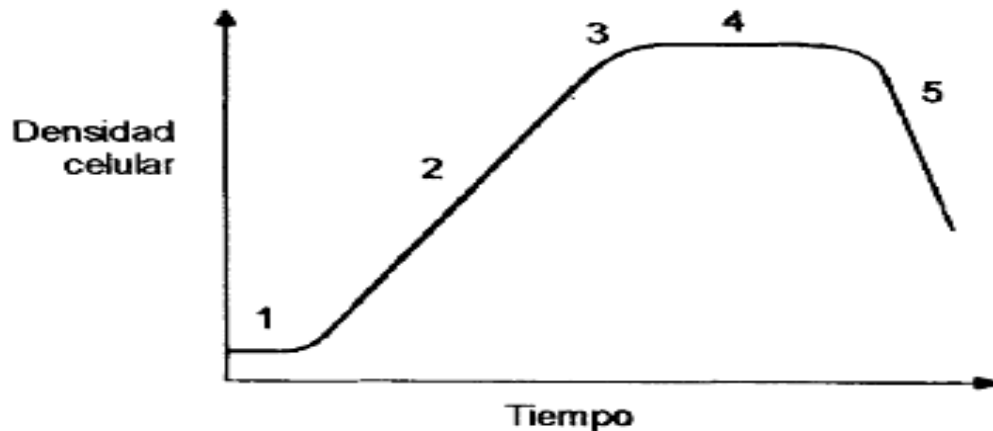
3.3.4. Fase Estacionaria

En este periodo, el número de microalgas permanece constante. En ocasiones el fenómeno apenas se detecta y puede presentarse en su lugar la fase de muerte ⁽²³⁾.

3.3.5. Fase de Muerte

Al incrementarse el número de células muertas y las condiciones desfavorables, tales como el aumento del número de bacterias, hongos, metabolitos de desecho y espuma, producto de la destrucción celular, generan el colapso final del cultivo ⁽²³⁾.

En la práctica, la fase de adaptación no es tan marcada en los cultivos microalgales, sino más bien parece ocurrir una fase de multiplicación de las células. Esto se debe a que los medios frescos casi siempre se inoculan con cultivos microalgales en fase cercanamente estacionaria, por lo que hay crecimiento de células jóvenes “viables” y por consiguiente una multiplicación de células desde el inicio de los cultivos microalgales. Con la finalidad de observar adecuadamente la fase log, se tendría que determinar la “edad” más apropiada del inóculo y/o también realizar cultivos sincrónicos, donde todas células mantienen el mismo patrón de desarrollo del ciclo celular ⁽²³⁾.



Fuente: Fogg y Thake ⁽²³⁾

Figura 1. Curva representativa de crecimiento de un cultivo estático de microalgas.

3.4. Conceptos generales de pruebas de susceptibilidad

Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos. Métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida, alguicida o fungicida mínima (CBM) dependiendo del caso ⁽²⁴⁾. Estas técnicas son muy importantes ya que la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución, sin embargo, muchos de los ensayos demuestran ser efectivos en bacterias y hongos ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Por otro lado, también es importante mencionar que para calcular la sensibilidad en otros microorganismos tales como las microalgas se dan mediante el uso de la concentración efectiva o de inhibición media (EC_{50}). Concentración que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La EC_{50} y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico también pueden llamarse Dosis letal media o Concentración letal media ⁽²⁸⁾. Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo. En general la muerte es el criterio más utilizado en la prueba de

CL50. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones excepto cuando existe falta de disponibilidad del tóxico. Los bioensayos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- Afectación del término de vida
- Alteración de la tasa de crecimiento
- Cambios de los parámetros reproductivos

Cuando se produce algún efecto se anota el efecto y la concentración del compuesto químico. Si el organismo de prueba muere se anota la concentración letal. Esta es la manera por la cual se determina en un laboratorio la toxicidad de un compuesto químico. Puede ocurrir que a bajas concentraciones de un compuesto químico muchos de los animales de prueba mueran, esto significa que el compuesto en cuestión es muy tóxico ⁽²⁸⁾.

3.4.1. Descripción de los antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo ⁽²⁹⁾.

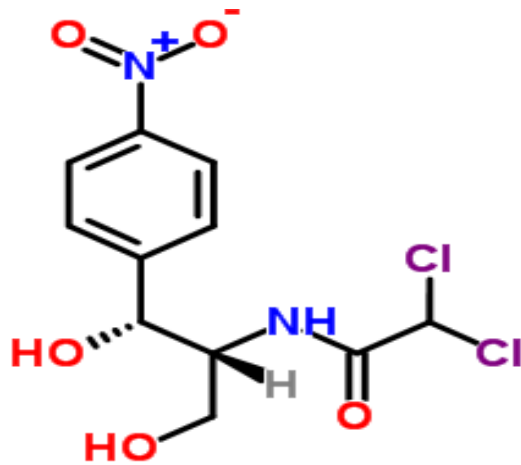
3.4.2. Mecanismo de acción de antibióticos

Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato

presente en las células eucariotas humanas o suficientemente distintas a estas.

Varios antibióticos inhiben la síntesis proteica, aunque también pueden inhibir la síntesis de polisacáridos hasta ácidos nucleicos depende del tipo de antibiótico, la mayoría lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico (ARNr) que forman parte del centro de decodificación, del centro de formación de enlaces peptídicos (peptidiltransferasa) o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado, mientras que otros bloquean la acción directa de los complejos enzimáticos involucradas en la síntesis de Ácidos nucleicos ⁽³⁰⁾.

3.4.2.1. Cloranfenicol



Fuente: Wolfe AD & Hahn FE ⁽³²⁾

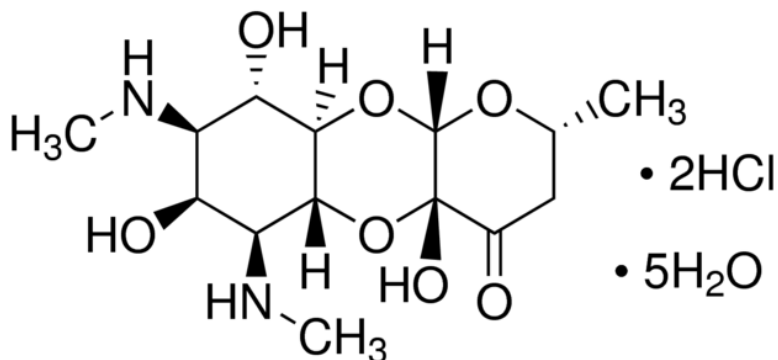
Figura 2. Estructura química de Cloranfenicol

Es un antibiótico principalmente bacteriostático, aunque en ciertas especies puede ser bactericida; posee un amplio espectro de actividad es un antibiótico que se obtuvo por primera vez de *Streptomyces venezuelae*, una bacteria saprofita, aunque más tarde se obtuvo a partir de otras especies de *Streptomyces* ⁽³¹⁾.

El Cloranfenicol previene la elongación de la cadena proteica al inhibir la actividad de la peptidil transferasa del ribosoma bacteriano, se une específicamente a los residuos A2451 y A2452 en el ARNr 23S de la subunidad ribosomal 50S, evitando la formación de enlaces peptídicos. La clase macrólidos de los antibióticos interactúan con los ribosomas, el cloranfenicol no es un macrólido e interfiere directamente con la unión del sustrato, mientras que los macrólidos bloquean estéricamente la progresión del péptido en crecimiento ⁽³²⁾. El principal mecanismo que otorga resistencia a cloranfenicol es la inactivación del antibiótico por acetilación dependiente de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) ^(33,34).

Se ha comprobado su actividad *in vitro* en contra de *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *H. influenzae*, *Pasteurella*, *P. mallei* y *pseudomallei*, *Bacteroides*, *Salmonella typhi*, y otras especies de *Salmonella*, *Proteus* (ciertas cepas), *Neisseria*, *Shigella*, *Brucella*, *V. cholerae*, algunos estreptococos y estafilococos; y a dosis mayores puede actuar en contra de *Actinomyces*, *Bacillus anthracis*, *C. diphtheriae*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bartonella*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* ⁽³⁵⁾.

3.4.2.2. Espectinomicina

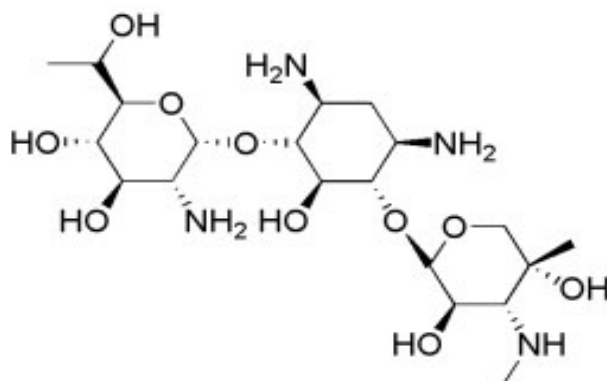


Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s4014> ⁽³⁷⁾

Figura 3. Estructura química de Espectinomicina.

Espectinomina es un antibiótico bacteriostático derivado de la familia de los aminoglicósidos descubierto en 1962 a partir de una cepa de *Streptomyces spectabilis*. Su estructura molecular se basa en un anillo de aminociclitol. No es nefrotóxico ni ototóxico. Espectinomina actúa inhibiendo la síntesis y elongación de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S bacteriana y la interferencia con la translocación de peptidyl tRNA. Una mutación en *rpsE*, el gen de la proteína ribosomal S5, impide la unión de la espectinomina. La resistencia también es conferida por el gen aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (*aadA*)^(36,37).

3.4.2.3. Geneticina



Fuente: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11811031>⁽³⁹⁾

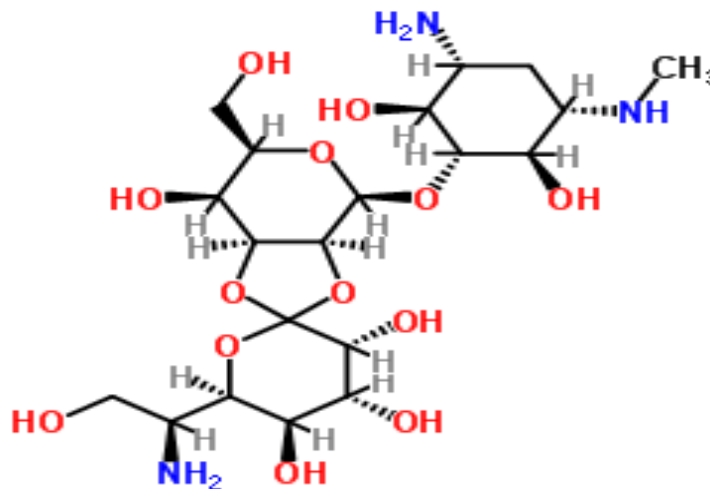
Figura 4. Estructura química de Geneticina.

También conocido como (G418 Sulfate) es un aminoglucósido antibiótico similar en estructura a la Gentamicina B1. Es producido por *Micromonospora rhodorangea*. Este antibiótico bloquea la síntesis de polipéptidos y la elongación de proteínas en células eucariotas mediante la unión de ribosomas 70S y 80S. La resistencia a G418 es conferida por el gen *neo* de Tn5 que codifica un aminoglucósido 3'-fosfotransferasa, APT 3' II.^(38,39)

G418 se utiliza comúnmente en la investigación de laboratorio para seleccionar las células de ingeniería genética, en general para las bacterias y las concentraciones de algas de 5 g / L o menos se utilizan, para células

de mamífero concentraciones de aproximadamente 400 g / L se utilizan para la selección y 200 g / L para el mantenimiento. Sin embargo, la concentración óptima para la selección de clones resistentes en células de mamífero depende de la línea celular utilizada, así como en el plásmido que lleva el gen de resistencia, por lo tanto, la valoración de antibióticos se debe hacer para encontrar la mejor condición para cada sistema experimental. La titulación se debe hacer uso en concentraciones de antibiótico que van desde 100 mg / L hasta 1400 mg / L. la selección de clones resistentes podría requerir de 1 a un máximo de 3 semanas ⁽⁴⁰⁾.

3.4.2.4. Higromicina B



Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h7772R25001> ⁽⁴⁴⁾

Figura 5. Estructura química de Higromicina B

Es un antibiótico aminoglicósido producido por *Streptomyces hygroscopicus*, originalmente desarrollada para un uso veterinario. Hoy en día, es un antibiótico usado universalmente para la selección y mantenimiento de células tanto eucariotas como procariotas que portan el gen hph (sintetiza una quinasa que fosforila el propio antibiótico). Higromicina B es un antibiótico aminoglicósido que Inhibe la síntesis de proteínas interrumpiendo

Fleomicina) alcanzándose una selección óptima tanto en células de mamífero como en procariotas por presencia de ese gen de resistencia en el vector usado en la transfección o transformación ⁽⁴⁵⁾.

3.5. Preparación del antibiótico.

Los antimicrobianos para usar en las técnicas de dilución pueden obtenerse de los correspondientes fabricantes, o comprarse directamente a ciertas compañías comerciales. Para los estudios in vitro no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de caducidad y el lote de preparación ⁽⁴⁶⁾. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor, por lo general en un desecador que se mantiene en frigorífico o en congelador. En el caso de usar desecadores para la conservación, hay que evitar la formación de agua de condensación por lo que, tras sacarlos del frigorífico/congelador, se deben abrir sólo cuando hayan alcanzado la temperatura ambiente ⁽⁴⁷⁾. La sustancia valorada debe pesarse en una balanza de precisión. Para conseguir una determinada concentración, lo más sencillo es pesar con un ligero exceso, una cantidad de sustancia valorada y, posteriormente, añadir el volumen de diluyente necesario. Como resulta obvio, para calcular una determinada concentración de antimicrobiano hemos de considerar la pureza de la sustancia que se esté empleando (que en la mayoría de casos no es del 100%). Las concentraciones de antimicrobianos deben prepararse al menos 10 veces más concentradas que la concentración más alta que se vaya a evaluar, y en todo caso superior a 1000 mg/l. No es necesario esterilizar las soluciones de antimicrobianos porque la contaminación de estas soluciones es muy infrecuente ⁽⁴⁶⁾.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicado en la Av. Abelardo Quiñones Km 2,5 cuyas coordenadas son 3°46'10" S 70°16'56" O, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.2.1. Población

La población estuvo constituida por todas las microalgas de los géneros *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 del Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú.

4.2.2. Muestra

Estuvo conformada por los cultivos de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0003 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003. El número de muestras por ensayo estuvo conformado por 30 muestras biológicas de cada especie con sus respectivos controles (C+), este ensayo se realizó por triplicado.

4.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES

4.3.1. Equipos

- Agitador magnético digital (Thermo Scientific,)
- Autoclave (Yamato SM 510)
- Balanza Analítica (Kern, Abj – Nm/Abj - N)

- Camara de flujo laminar (Telstar, Bio II Advance)
- Centrífuga (Universal 320R Hettich)
- Congeladora (Coldex Autofrost)
- Destilador de agua (GFL, 2004)
- Espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Cientific EE. UU)
- Estufa (Ecocell 111)
- Microscopio de epifluorescencia (ZEISS AXIO LAB – A1)
- Microscopio de luz invertida (LEICA DMi1)
- Potenciómetro (HANNA INSTRUMENTS, HI2210 - 01)
- Vortex (ISO LAB)

4.3.2. Materiales de laboratorio

- Algodón
- Capilares de vidrio
- Cuaderno de laboratorio
- Gasa intrahospitalaria
- Gradillas
- Guantes descartables
- Laminas porta objetos
- Lápiz, lapicero y rotulador
- Matraces de 20 mL, 50mL, 100mL, 200mL, 500mL y 1000mL
- Micropipetas con rangos de 0,5-10 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L
- Microtubos de 1,5 mL, y 2 mL
- Parafilm
- Pastilla magnética
- Pissetas de 500 mL
- Probeta graduada de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, y 1000 mL
- Puntas de plástico de 5-10 μ L, 1-20 μ L, 1-200 μ L, y 100-1000 μ L
- Tubo de Borocilicato tapa rosca 10 mL
- Vasos precipitados de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 500 mL, y 1000 μ L

4.3.3. Insumos químicos

- EDTA (Sigma Aldrich)
- Agar Bacteriologico (Sigma Aldrich)
- Alcohol de 96°
- Extracto de levadura (Sigma Aldrich)
- Etanol Absoluto (Merck)
- HCl (Merck)
- Hidróxido de sodio (NaOH)(Merck)
- Isopropanol (Merck)
- KOH (Sigma Aldrich)
- K₂HPO₄ (Merck)
- Lisozima (Sigma Aldrich)
- NaCl (Merck)
- PIPES (Merck)
- Triptona (Sigma Aldrich)

4.3.4. Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación fue correlacional, debido a que se analizó la relación de dependencia que tienen ambas variables. Además, fue Experimental - transversal: Debido a que se manipuló las variables para determinar la susceptibilidad en las tres especies de microalgas en un tiempo determinado.

4.4. PROCEDIMIENTOS

4.4.1. Cultivo de microalgas

Las cepas de microalgas de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 fueron proporcionadas por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la UCP. Estas microalgas fueron cultivadas inicialmente en matraces de 250 mL y posteriormente cuando alcanzaron un crecimiento exponencial se retiraron alícuotas para los estudios pertinentes. Estos matraces fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos ⁽⁴⁸⁾.

Se empleó el medio de cultivo CHU – 10 el cual está constituido por 0,032 mM de KH_2PO_4 , 0,101 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,250 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,188 mM de NaHCO_3 , 0,009 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,010 mM de Na-EDTA, 11,5 μM de H_3BO_3 , 0,2 μM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 μM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y 0,04 μM de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ⁽⁴⁹⁾. Las condiciones de cultivo fueron con agitación a 110 rpm, 25°C y 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad), aireación constante durante 05 semanas hasta observar suficiente biomasa microalgal para realizar los bioensayos.

4.4.2. Obtención de cultivos axénicos de microalgas

1. En tubos de borosilicato se prepararon tres soluciones stocks, lisozima (10.000 µg/mL), Ampicilina (1000 µg/mL) y 10 mL de buffer (PIPES/NaOH 100 Mm, EDTA 10 Mm a pH: 6,8), todos fueron esterilizadas por filtración (filtros de nitrocelulosa de 0,25 µm)
2. Se agregó 1 mL de cada solución a 7 mL de cultivo de cada especie de microalga con densidad óptica de 0,2 completando a un volumen de 10 mL.
3. Se homogenizó durante 30 segundos aproximadamente en un vortex.
4. Se incubaron de 60 a 90 min. a 37°C
5. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min.
6. Al pellet obtenido se resuspendió en agua estéril autoclavada y se lavó con agua estéril cuatro veces ⁽⁵⁰⁾.
7. Para confirmar la axenidad de los cultivos se realizó un análisis microbiológico o tinción de Gram para observar la presencia o ausencia de bacterias Gram + o Gram -.
8. Se sembró en placas Petri con medio LB (Luria Bertani) sólido (0,7% Triptona, 0,5%, extracto de levadura y 0,7% NaCl),
9. Se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por cinco días para observar el crecimiento de cualquier otro contaminante.

4.4.3. Prueba de susceptibilidad por dilución

La evaluación de la susceptibilidad se realizó mediante el método cuantitativo (diluciones en caldo), de las tres especies de microalgas (*Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003) cultivados en condiciones axénicas. Se les sometió a 5 antibióticos (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) en un rango de concentraciones de 0 – 1000 µg/mL según Guo ⁽⁵¹⁾. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

1. Se prepararon soluciones stocks de los antibióticos (20,000 µg/mL) para luego diluirlas a las concentraciones finales requeridas para el estudio.
2. Todos los antibióticos fueron esterilizados por filtración (filtros de 0,25 µm). Para conocer la concentración final de los antibióticos se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

Donde:

C₁: concentración uno. V₁: volumen uno. Y C₂: concentración dos. V₂: volumen dos.

3. Se retiró un volumen de 100 µL de cada solución de antibiótico para llegar a una concentración final de 62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/mL en un volumen de 2000 µL total, Se realizaron tres repeticiones.
4. Se utilizaron para estos ensayos tubos de borosilicato tapa roscas. Los cultivos se establecieron a partir de una fase de crecimiento exponencial con una densidad inicial no menor de 2 x 10⁴ células/mL según ^(52,53).
5. El monitoreo fue continuo con sus respectivos controles, (C+) que contenía la muestra microalgal y el respectivo solvente de cada antibiótico. Se mantuvo en las mismas condiciones de luz y temperatura descrita anteriormente para los cultivos, sólo que en este caso se sometió a procesos de agitación.

4.4.3.1. Perfil de Crecimiento de las microalgas

Durante el periodo de evaluación se extrajo una alícuota no mayor a 10 µL del cultivo en experimentación para el análisis continuo, de las cuales 3 µL de la muestra se analizó en el Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 para obtener la absorbancia a 680 nm y establecer una curva de crecimiento en el tiempo.

4.4.3.2. Perfil de crecimiento microalgal en presencia y ausencia de antibióticos

Se contrastó el perfil de crecimiento de las tres cepas de microalgas, siguiendo los patrones antes mencionados, se utilizó los datos del perfil de crecimiento de cada cepa ya analizada con y sin antibióticos.

4.4.3.3. Determinación de la concentración efectiva 50 (EC₅₀)

Se calculó primero el porcentaje de inhibición del crecimiento Microalgal:

$$\text{Ecuación: } \% \text{ inhibición} = (C-T) / C * 100$$

Dónde (C) y (T) son el número de células mL⁻¹ del control y de cada tratamiento ⁽⁵⁴⁾

La EC₅₀ se determinó mediante el logaritmo en base 10 (Log₁₀) de las concentraciones ensayadas y el porcentaje de Inhibición (%I) transformadas a unidades Probit mediante las tablas de PROBIT (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a 1 y sumándole a continuación cinco unidades) de acuerdo a la Organización para la cooperación económica y el desarrollo (OECD por sus siglas en inglés) ⁽⁵⁵⁾

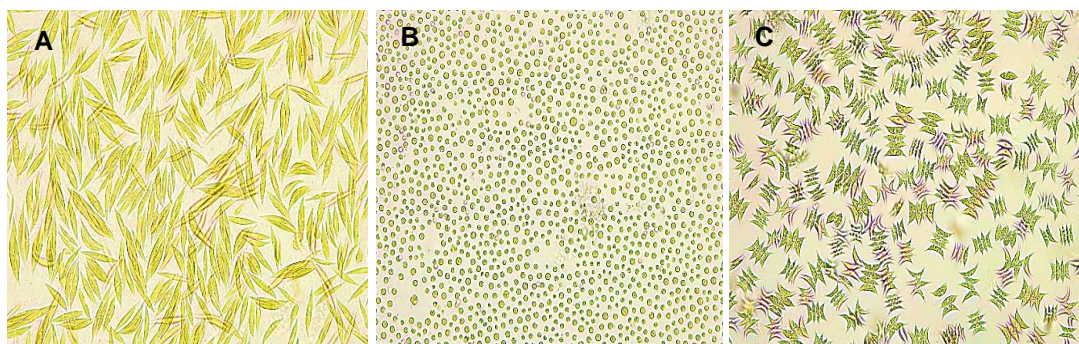
4.5. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Todos los parámetros analizados como la media, desviación estándar de cada tratamiento y de los controles fueron calculados en el programa Excel para Windows 7 starter, del mismo modo para el cálculo de la EC₅₀ se utilizó el mismo programa ya que se manejó un sistema bivariado mediante la función de regresión Lineal. Así mismo se utilizó el programa (SPSS Versión 21), para el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para un valor de significancia de ($\alpha = 0,05$) a un nivel de confianza del 95,0%.

V. RESULTADOS

5.1. Obtención de cultivos axénicos

Los tratamientos empleados para obtener cultivos axénicos fueron efectivos, tal como se muestra en la Figura 7. Se logró eliminar gran parte de las bacterias asociadas a los cultivos facilitando el desarrollo de cultivos monoespecíficos y unialgales. Además, los resultados muestran que la efectividad de los tratamientos está en función de la densidad de los cultivos y las concentraciones finales de Lisozima y Ampicilina, así mismo es preciso mencionar que Lisozima y Ampicilina son más efectivas cuando están combinados.



Fuente: Imagen elaborada por el Autor

Figura 7. Cultivos monoespecíficos unialgales de tres especies de microalgas (A= *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, B=*Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y C=*Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003)

En tal sentido, la eliminación de bacterias es más rápida, ya que no solamente se digiere la pared celular, sino que además impide la formación de las mismas. En experimentos iniciales se probó cultivos de estas microalgas con Lisozima y Ampicilina con las mismas concentraciones por más de 24 horas y los resultados muestran que son sensibles a estas, por lo que se interpreta que no solamente las bacterias son afectadas, sino que también las propias microalgas ensayadas. En tal sentido, *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa

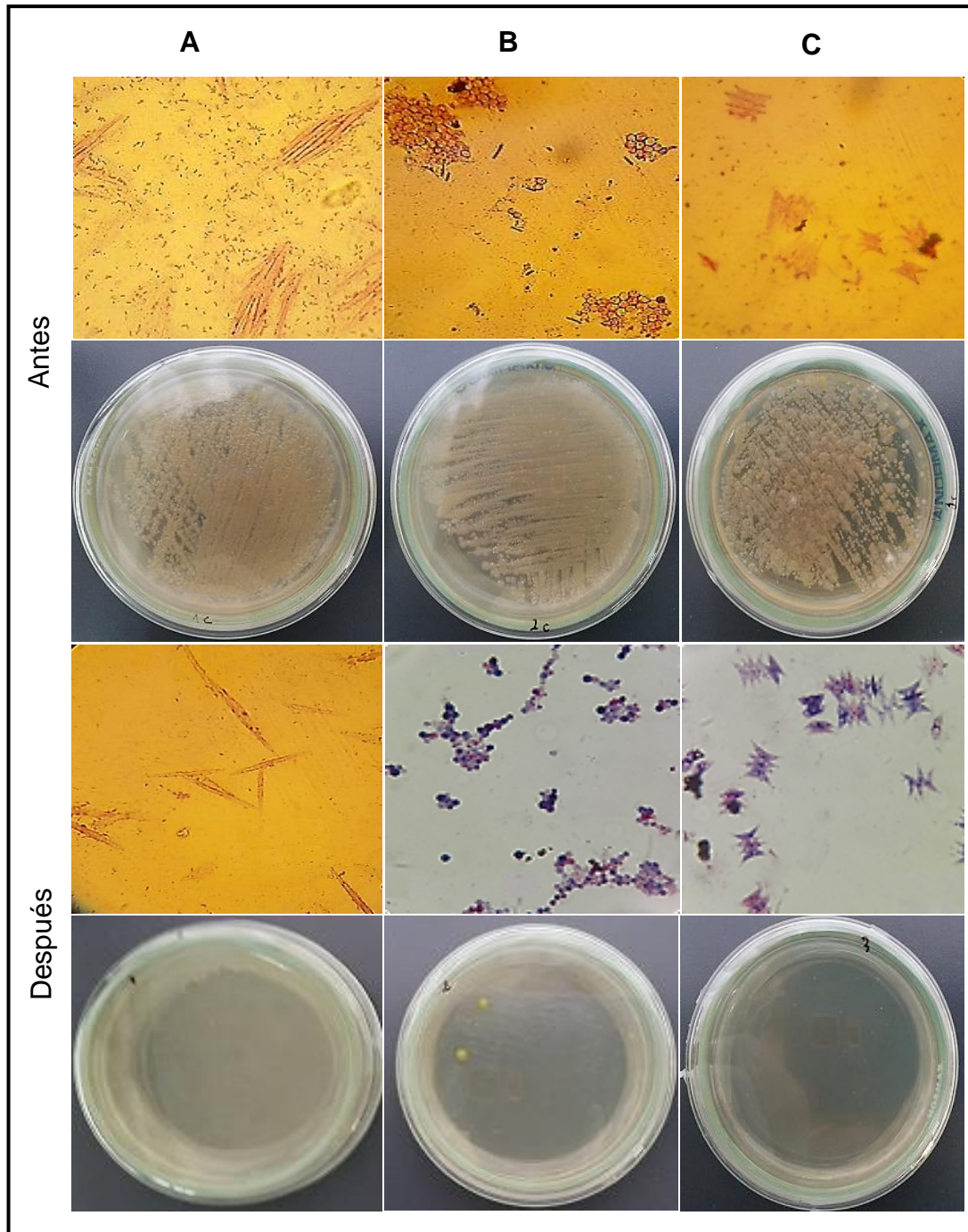
UCP0003 sólo toleran la actividad de la lisozima y ampicilina por cortos periodos de tiempo.

5.1.1. Prueba de axenidad

5.1.1.1. Tinción de gram y siembra en medio LB (Luria Bertani) Agar

Para comprobar la axenidad de los cultivos se sometió a estas dos pruebas lo cual muestra que el tratamiento con Lisozima y Ampicilina fueron efectivos en la reducción de poblaciones Bacterianas asociadas a los cultivos de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 (Figura 8), la prueba de Gram evidencia que *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 antes del tratamiento se muestra altamente contaminado por bacterias, sin embargo esto no nos dice que las otras dos especies estén más puras, ya que las placas con medio LB mostraron que las tres especies implicaron un alto grado de contaminación.

En cuanto a los resultados obtenidos después del tratamiento es evidente el grado de efectividad de la enzima y el antibiótico sobre las bacterias, solo *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 mostró líneas mínimas de contaminación en las placas con medio LB en contraste con lo obtenido en la tinción de Gram ya que aparentemente no se observa contaminantes, en términos cuantitativos se logró eliminar más de un 90% de contaminantes de los cultivos microalgales. De esta forma se establece cultivos más puros de las tres especies ensayadas para sus respectivos cultivos. Cabe mencionar que tanto Lisozima como Ampicilina fueron dirigidos exclusivamente a la eliminación de poblaciones bacterianas, dejando la posibilidad de que existan otros microorganismos resistentes a estos compuestos.



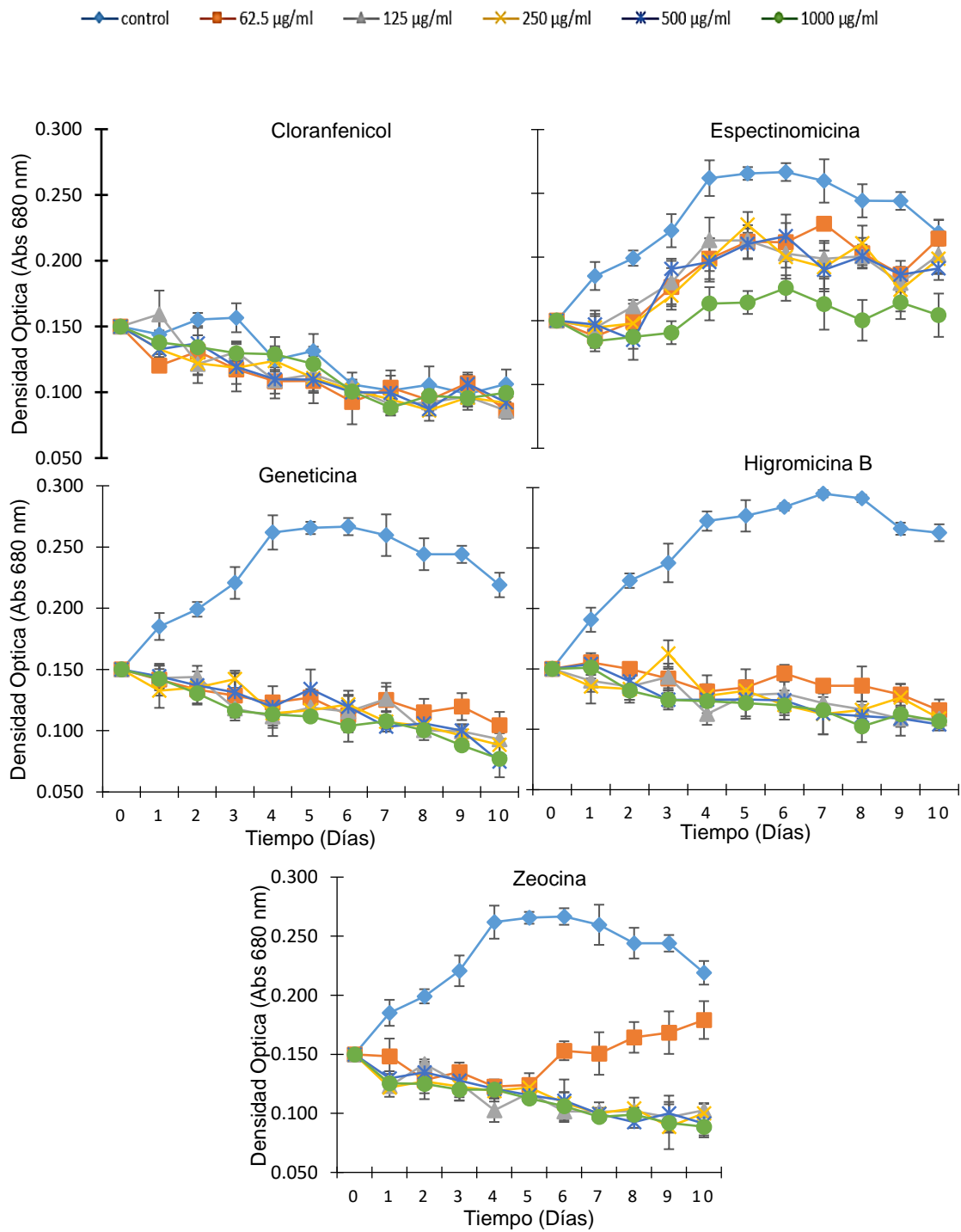
Fuente: Imagen elaborada por el Autor

Figura 8. Tinción de Gram y siembra en medio LB Agar antes y después del tratamiento con lisozima y ampicilina de A = *Ankistrodesmus* sp. UCP0001, B = *Chlorella* sp. UCP0002 y C = *Scenedesmus* sp. UCP0003.

5.2. Perfil de crecimiento microalgal en presencia y ausencia de antibióticos

5.2.1. *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

Se partió de una densidad óptica inicial de 0,150 de absorbancia que representa un valor promedio de $3,7 \times 10^6$ cel/mL de acuerdo a la curva de calibración (Ver Anexo III, Figura 1). Los resultados reflejan un buen perfil de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001. De los cinco antibióticos ensayados para esta especie Geneticina e Higromicina B fueron los más efectivos, mostrando diferencias estadísticas altamente significativas ($F=46,493$; $F=14,117$; $p=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 3 y 4), se muestra que *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 fue sensible a partir de $62.5 \mu\text{g/mL}$ lo cual evidencia que existen diferencias con respecto al grupo Control (C+) mas no entre las concentraciones (Figura 9). Del mismo modo Zeocina mostró un gran efecto evidenciando también diferencias estadísticas significativas ($F=54,951$; $P=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, cuadro 5), pero a diferencia de los anteriores éste antibiótico fue eficaz a partir de $125 \mu\text{g/mL}$, además existen diferencias con respecto al grupo control (C+) y en las concentraciones entre sí. Por otro lado Cloranfenicol y Espectinomicina tuvieron menores efectos sobre *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 pese a mostrar diferencias significativas ($F=3,955$; $p=0,024$) ($p<0,05$) y ($F=4,897$ $p=0,011$) ($p<0,05$) (Anexo IV, cuadro 1 y 2) respectivamente, así cloranfenicol experimentó el crecimiento del grupo control (C+) más bajo, por lo que se interpreta que el solvente (Etanol absoluto) tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microalga mas no el antibiótico ensayado, acá la concentración más efectiva fue $125 \mu\text{g/mL}$ ya que muestran diferencias con respecto al grupo control (C+) $p=0,033$ ($p<0,05$) no encontrándose diferencias entre concentraciones. En cambio espectinomicina si bien es cierto no mostró un gran efecto sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 pero se puede considerar a $1000 \mu\text{g/mL}$ como la concentración más efectiva ya que se evidencia diferencias con respecto al grupo Control (C+) $p=0,009$ ($p<0,05$), además se muestra diferencias en las concentraciones entre sí.



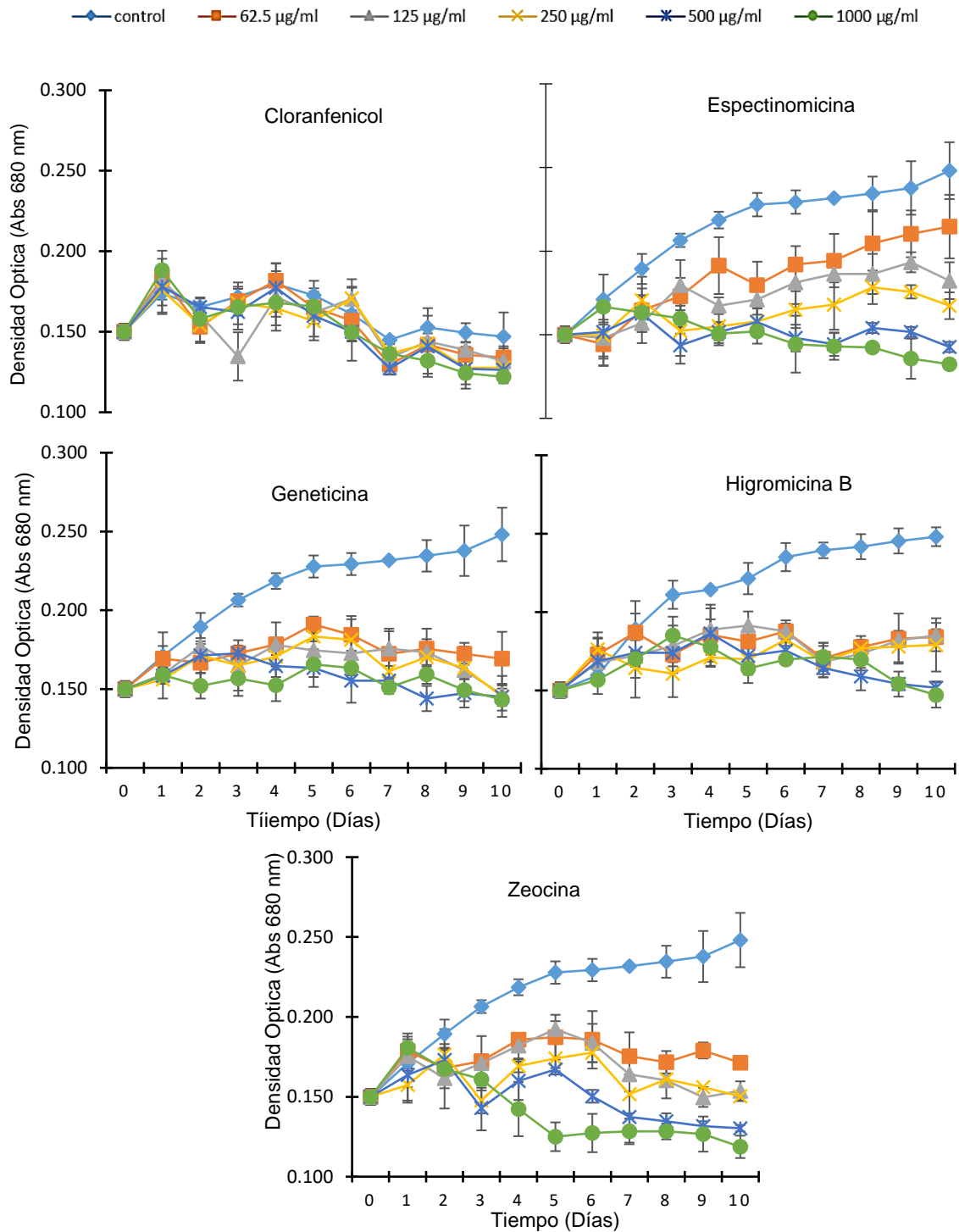
Fuente: Imagen elaborada por el Autor

Figura 9. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos diferentes (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp. Ceba UCP0001

5.2.2. *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

Se inició a una densidad óptica de 0,150 de absorbancia que representa un valor promedio de $4,3 \times 10^7$ cel/mL de acuerdo a la curva de calibración (Anexo III, Figura 2). Los resultados del presente estudio reflejan un buen perfil de crecimiento de *Chlorella* sp. Cepa UCP0002. La presencia de antibióticos ensayados en el cultivo tuvo efectos significativos, con algunas diferencias particulares dependiendo del tipo de antibiótico.

Cuatro de los cinco antibióticos ensayados resultaron tener un alto grado de efectividad (Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) ya que mostraron diferencias estadísticas altamente significativas ($F=18,830$; $F=35,916$; $F=49,188$ y $F=94,026$; $p=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 7 - 10). En este caso *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 mostró que fue sensible a partir de la concentración $62.5 \mu\text{g/mL}$ de los tres últimos antibióticos mencionados y a partir de $125 \mu\text{g/mL}$ para Espectinomicina, así mismo todos mostraron tener diferencias significativas con respecto al grupo control (C+), Geneticina uno de los antibiótico más efectivos ensayados no mostró diferencias significativas en las concentraciones entre sí en contraste con los otros tres antibióticos que si mostraron diferencias significativas entre sus concentraciones (Figura 10). Para el caso de cloranfenicol el resultado fue muy parecido a lo obtenido en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, el crecimiento del control (C+) se vio afectado por el solvente del antibiótico (Etanol absoluto) pese a esto mostró diferencias significativas ($F=3,438$; $p=0,037$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 6), además mostró que la concentración más efectiva fue $1000 \mu\text{g/mL}$ estableciendo diferencias significativas con respecto al control (C+) $p= 0,025$ ($p<0,05$) (Figura 10).



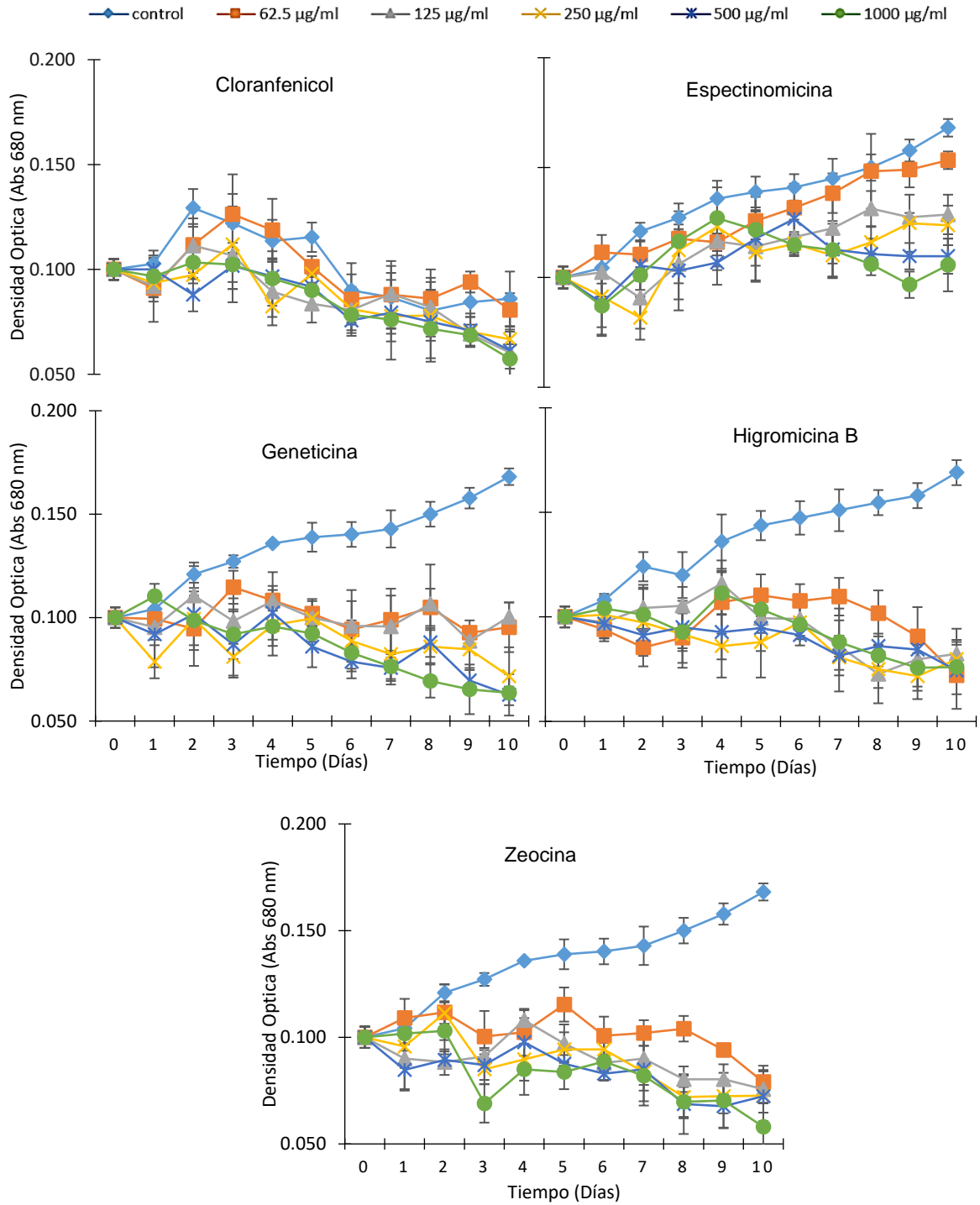
Fuente: Imagen elaborada por el Autor

Figura 10. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos diferentes (Cloranfenicol, Espectinomocina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) sobre el crecimiento de *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

5.2.3. *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

La densidad óptica de 0,100 de absorbancia representa un valor promedio de $1,6 \times 10^7$ cel/mL de acuerdo a la curva de calibración (Anexo III, Figura 3). La presencia de antibióticos ensayados en el cultivo tuvo efectos significativos, con diferencias particulares dependiendo del tipo de antibiótico (ver Figura 11).

Los resultados muestran que de todos los antibióticos ensayados para esta especie Higromicina B y Zeocina fueron los más efectivos, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($F=37,980$; $F=71,291$; $p=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 14 y 15), se muestra que *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 fue sensible a partir de $62.5 \mu\text{g/mL}$ lo cual evidencia que existen diferencias con respecto al grupo Control (C+) mas no entre las concentraciones. Del mismo modo geneticina mostró un gran efecto sobre el crecimiento de *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 evidenciando también diferencias estadísticamente significativas ($F=57,136$ $P=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 13) siendo también eficaz a partir de $62.5 \mu\text{g/mL}$, en contraste de que éste antibiótico mostró diferencias en las concentraciones entre sí, además de las diferencias con respecto al control (C+) (Figura 11). Por otro lado, Cloranfenicol y Espectinomicina tuvieron menores efectos sobre el crecimiento de *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 pese a mostrar diferencias significativas ($F=3,459$; $p=0,036$) ($p<0,05$) y ($F=28,342$ $p=0,000$) ($p<0,05$) (Anexo IV, Cuadro 11 y 12) respectivamente, de esta forma Espectinomicina fue capaz de causar efecto sobre *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 a partir de $125 \mu\text{g/mL}$ observando también diferencias con respecto al control (C+) y en las concentraciones entre sí. Por último, cloranfenicol experimentó los mismos resultados que en los dos últimos el crecimiento del grupo control (C+) fue bajo, por lo que se deduce que el solvente (Etanol absoluto) del mismo tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microalga mas no el antibiótico ensayado, acá no se determinó ninguna concentración efectiva ni diferencias con respecto al grupo control(C+) (Figura 11)



Fuente: Imagen elaborada por el Autor

Figura 11. Efecto de las concentraciones de 5 antibióticos diferentes (Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina) sobre el crecimiento de *Scenedesmus* sp. UCP0003

5.3. Concentración efectiva 50 (EC₅₀)

Los antibióticos mostraron efectos inhibitorios en las tres especies de microalgas, con excepción de Cloranfenicol debido a que el control (C+) y los tratamientos mostraron el mismo perfil de crecimiento, esto se atribuye al efecto inhibitorio del solvente empleado (Etanol al 5%) para preparar las soluciones de Cloranfenicol. Los niveles de sensibilidad de las tres microalgas fueron evaluados y se muestra en la (Cuadro 2). *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 muestra valores de EC₅₀ de 2,11 a 3798,37 µg/mL para Higromicina B y Espectinomicina respectivamente, la EC₅₀ para esta especie se incrementa de acuerdo al orden que sigue: Higromicina B < Geneticina < Zeocina < Espectinomicina, por tanto, Higromicina B fue el antibiótico más efectivo para *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001.

Cuadro 2. Valores de EC₅₀ para la inhibición del crecimiento microalgal.

Antibióticos	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.
	Cepa UCP0001 EC ₅₀ (µg/mL)	Cepa UCP0002 EC ₅₀ (µg/mL)	Cepa UCP0003 EC ₅₀ (µg/mL)
Espectinomicina	3798,37	988,07	1831,36
Geneticina	35,08	1781,21	150,52
Higromicina B	2,11	2872,73	79,05
Zeocina	291,59	762,72	39,11

Note: EC, concentración efectiva.

Fuente: Elaborado por el Autor

Por otro lado, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 muestra valores de EC₅₀ entre rangos de 762,72 a 2872,73 µg/mL para Zeocina y Higromicina B respectivamente, por lo que los valores de EC₅₀ para esta especie se incrementa de acuerdo al orden que sigue: Zeocina < Espectinomicina < Geneticina < Higromicina B, por tanto, el antibiótico Zeocina fue más efectivo para *Chlorella* sp. Cepa UCP0002. Así mismo *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 muestra valores de EC₅₀ entre rangos de 39,11 y 1831,36 µg/mL, para Zeocina y Espectinomicina respectivamente y el valor de EC₅₀ se incrementa de acuerdo al orden que sigue Zeocina < Higromicina B < Geneticina < Espectinomicina, por lo que el antibiótico Zeocina fue al más efectivo al igual que en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 (Cuadro 2).

VI. DISCUSIÓN

6.1. Obtención de cultivos axénicos

La literatura manifiesta que es de vital importancia obtener cultivos puros para el desarrollo de estudios relacionados a la susceptibilidad a antibióticos, de esta forma se obtiene resultados más exactos y minimizar en lo posible el margen de error durante la evaluación, se han empleado métodos como la adición de antibióticos a los cultivos como una alternativa eficiente tal como lo muestra Droop ⁽⁵⁶⁾, por otro lado Mojtaba Azma *et al.* ⁽⁵⁷⁾ expresan que la radiación UV también es un buen método para la obtención de cultivos puros en algas verdes - azules. Hyun y Choul ^(58,72) reportan haber obtenido cultivos axénicos de *Haematococcus pluvialis* mediante la adición de 12 antibióticos diferentes. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo cultivos axénicos utilizando el método de Jung *et al.* ⁽⁵⁰⁾ con una leve modificación en la concentración de Lisozima y Ampicilina, obteniéndose resultados satisfactorios y concordando con el autor en cuanto a la efectividad de la lisozima y ampicilina, pese a que el autor utilizó microalgas procariotas (Cianobacterias) se coincide para ambos tipos un alto grado de efectividad en la reducción de poblaciones bacterianas.

6.2. Efecto de antibióticos en el crecimiento de las microalgas

El crecimiento fue un parámetro fundamental para determinar la susceptibilidad de los antibióticos sobre *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003, Aunque en los últimos años se han venido desarrollando ensayos basados en nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para el estudio de su toxicidad de acuerdo a Geoffroy *et al.* ⁽⁵⁹⁾, pero el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas Van Wezel y Van Vlaardingen ⁽⁶⁰⁾. Por otro lado, en cuanto a la susceptibilidad a antibióticos se ha encontrado poca información acerca de éstos como agente

de selección para estas tres especies de microalgas, con excepción del antibiótico Cloranfenicol sobre *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis chui*. De manera que bajo estas consideraciones interpretamos que el crecimiento de las tres especies de microalgas fueron afectadas por los antibióticos ensayados, de las cuales Geneticina, Higromicina B y Zeocina tuvieron un patrón similar en la inhibición, todos mostraron diferencias estadísticas altamente significativas, ya que a concentraciones bajas tuvieron un gran efecto inhibidor del crecimiento microalgal, Zeocina en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001 experimentó un valor similar a lo reportado por De la vega ⁽⁵²⁾ el cual menciona que Zeocina tuvo un efecto inhibitorio a partir de 60 y 100 µg/mL sobre el crecimiento de las microalgas *Picochlorum* sp y *Dunaliella salina* dos microalgas marinas respectivamente. Asimismo, Barbosa y Chaparro ⁽⁶¹⁾ demuestran que la Higromicina B se comporta como un excelente antibiótico de selección a partir de 50 µg/mL en callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.), a diferencia de los resultados mostrados por Berthold *et al.* ⁽⁶²⁾ que señalan una concentración muy baja de 10 µg/mL en medio sólido y de 2 µg/mL en medio líquido sobre *Chlamydomonas reinhardtii*. Del mismo modo Takahashi *et al* ⁽⁶³⁾ establecen que la concentración más efectiva de Geneticina fue a partir de 1000 µg/mL en *Porphyra yezoensis* una alga roja marina (Rhodophyta), una concentración 16 veces más a lo obtenido en el presente estudio, esto prueba que las macroalgas tienen mayor resistencia a los antibióticos ya que muestran diferencias en cuanto a sus estructuras celulares, su composición y/o mecanismo bioquímico Takahashi *et al.* ⁽⁶³⁾

En cuanto al comportamiento de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 frente a Espectinomomicina a diferentes concentraciones se logra evidenciar un mayor grado de tolerancia, ya que se vieron afectados a partir de una concentración de 125 µg/m, el cual es similar a lo reportado por Lopez ⁽⁶⁴⁾ en *Chlamydomonas reinhardtii*. Por otro lado, el antibiótico cloranfenicol no presentó un efecto toxico sobre las microalgas ensayadas, ya que se evidenció un descenso del crecimiento de sus controles (+) un caso

totalmente diferente con lo reportado por Takahashi *et al.* ⁽⁶³⁾ en cual menciona que cloranfenicol es efectivo a una concentración de 2000 µg/mL en *Porphyra yezoensis*, resultados que no concuerdan con Lai *et al.* ⁽⁶⁵⁾ ya que demuestran que cloranfenicol es efectiva a partir de 20 µg/mL para *Chlorella pyrenoidosa* e *Isochrysis galbana*, mientras que para *Tetraselmis chui* fue de 2.5 µg/mL resultados que nos permite interpretar que cloranfenicol no mostró efectos ya que el solvente etanol al 5% afectó el crecimiento microalgal y por tanto el resultado final.

6.3. Concentración efectiva 50 (EC₅₀)

El efecto de la inhibición de varios antibióticos contra las algas se ha informado a concentraciones sorprendentemente bajas de 5 -100 µg/mL de acuerdo a Lützhøft *et al.* ⁽⁶⁶⁾. Aunque también Halling ⁽⁶⁷⁾ relata que varios antibióticos utilizados en piscicultura intensiva tienen efectos inhibitorios del crecimiento (EC₅₀, 0,0037-3108 µg/mL) dependiendo del tipo de antibiótico y algas. Estos rangos no están muy distantes a lo obtenido para los antibióticos Higromicina B y Espectinomicina respectivamente en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001. Por otro lado, de acuerdo a la ficha de seguridad de productos químicos (FISPQ) ⁽⁶⁸⁾ Espectinomicina muestra un valor de EC₅₀ de 1,18 µg/mL sobre *Selenastrum capricornutum* en 72 horas, resultados que no se ve apoyado por lo obtenido en ninguna de las tres especies. Así mismo, Gürel y Gözükmizi ⁽⁶⁹⁾ revelan que las EC₅₀ para Geneticina fueron de 80-100 µg/mL en *Hordeum vulgare* L. una planta monocotiledónea, concentraciones que coinciden con lo obtenido en *Scenedesmus* sp cepa UCP0003, del mismo modo Zambre *et al.* ⁽⁷⁰⁾ reportan que el valor de EC₅₀ para geneticina es de 20 µg/mL en *Phaseolus acutifolius* una planta, resultado semejante obtenido en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001. Por otra parte, Men *et al.* ⁽⁷¹⁾ establecen un valor de EC₅₀ para higromicina B de 30 µg/mL en dos especies de orquídeas, datos que no se aproximan a ninguno de los obtenidos en las tres especies de microalgas estudiadas. Finalmente, para Zeocina no se encontraron reportes similares, pero es

preciso mencionar que éste antibiótico no pasó de un rango de concentración de 1000 µg/mL por lo que fue el antibiótico más efectivo en el estudio.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró obtener cultivos axénicos de las tres especies de microalgas en condiciones de laboratorio, el cual fue demostrado por la ausencia de bacterias contaminantes en los cultivos de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003.
- El perfil de crecimiento de las microalgas *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003 se ve afectado de acuerdo al tipo y concentración del antibiótico empleado (Cloranfenicol, Espectinomina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina).
- La EC_{50} de los antibióticos fluctuó ampliamente de acuerdo a la especie microalgal evaluada, siendo los antibióticos Geneticina, Higromicina B y Zeocina los más efectivos, ya que a bajas concentraciones inhibieron el crecimiento microalgal.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios de susceptibilidad con otros antibióticos de selección
- Se sugiere corroborar el efecto inhibitorio del etanol en el crecimiento de las microalgas estudiadas y en otras especies similares
- Se recomienda identificar a las poblaciones bacterianas asociadas a los cultivos microalgales.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee .Y. K. J. Appl. Phycol. Vol. Vol. 9. 1997. 403 p.
2. Lorenz R. T. and Cysewski .G. R. Tibtech. Vol. Vol. 18. 2000. 160 p.
3. Cid A., Abalde J. & Herrero C. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). Journal of Applied Phycology. 1992;4:31-7.
4. Cheng Y-L, Juang Y-C, Liao G-Y, Ho S-H, Yeh K-L, Chen C-Y, et al. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol. diciembre de 2010;101(23):9092-6.
5. Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Applied Energy. 2011;(88.a ed.):3402–3410. p.
6. Gimpel J.A, Henríquez V, Mayfield S.P. In Metabolic Engineering of Eukaryotic Microalgae: Potential and Challenges Come with Great Diversity. Front Microbiol. 2015;
7. Pawlowski J., Audic S., Adl S, et al. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. PLoS biology. 2012;10.
8. Jiao Y, Ouyang H-L, Jiang Y-J, Kong X-Z, He W, Liu W-X, et al. Toxic Effects of Ethyl Cinnamate on the Photosynthesis and Physiological Characteristics of *Chlorella vulgaris* Based on Chlorophyll Fluorescence and Flow Cytometry Analysis. Sci World J. 2015
9. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. junio de 2007;25(3):294-306.

10. Reitan K.I, Rainuzzo J.R, Olsen Y. Effect of Nutrient Limitation on Fatty Acid and Lipid Content of Marine Microalgae¹. *J Phycol.* 1 de diciembre de 1994;30(6):972-9.
11. Parra, O. & Bicudo, C.E.M. *Introducción a la biología y sistemática de las algas de aguas continentales.* Ediciones Universidad de Concepción. 1996.
12. Costa, J. A. V., & de Morais, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresour Technol.* 2011;102(1):2–9.
13. Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renew Sustain Energy Rev.* 2012;16(5):3043– 3053.
14. Oncel, S. S. Microalgae for a macroenergy world. *Renew Sustain Energy Rev.* 2013;26,:241–264.
15. Barsanti L. & Gualtieri P.,. *Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.* Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group; 2006.
16. Corda. WoRMS - World Register of Marine Species - *Ankistrodesmus convolutus* , [Internet]. 1838 [citado 11 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=575734>
17. Guiry MD, Guiry GM, Morrison L, Rindi F, Miranda SV, Mathieson AC, et al. *AlgaeBase: An On-line Resource for Algae.* *Cryptogam Algol.* 1 de mayo de 2014;35(2):105-15.
18. Beyerinck [Beijerinck], M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung.* 1890;47:725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
19. Zelitch, I. «Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity». Academic Press; 1971. 275 p.

20. Meyen, F.J.F. Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae*. 1829;14:768-778, XLIII [43].
21. Mandal S, Mallick N. Biodiesel Production by the Green Microalga *Scenedesmus obliquus* in a Recirculatory Aquaculture System. *Appl Environ Microbiol*. agosto de 2012;78(16):5929-34.
22. Abalde, J. A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. En Universidad de la Coruña. España. .; 1995. p. 210 p.
23. Fogg G. E. & Thake B. *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*. 3rd edn. London The University of Wisconsin Press, Ltd; 1987. pg. 269.
24. Taroco R., Seija V. & Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Colombia Rev. Bacteriol.*; 2008. 663-670 pp. p.
25. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Path Microb Scand*. 1971;(Suppl. 217):90 pp.
26. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott. *Diagnóstico microbiológico*. En: 12ª Edición. Buenos Aires, Argentina.: Ed. Médica Panamericana.; 2009.
27. Jorgensen J.H. & Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 1998;26:973-80.
28. Díaz M.C., Bustos M.C. y Espinosa A.J. *Pruebas de Toxicidad Acuática: Fundamentos y Métodos, conceptos generales.*. Colombia: Unibiblos; 2004.
29. Yao J, Moellering R. Antibacterial Agents,. In Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*. En: 10th Edition. Washington, DC: ASM Press; 2011.
30. Martínez J.A. y Sánchez F. Mecanismo de acción de los antibióticos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínic. Barcelona. España.; 2007.

31. Peter P. Regna, Ph.D.1. Chemistry of antibiotics of clinical importance. *Ann J Med.* 1955.
32. Wolfe AD & Hahn FE. Mode of action of chloramphenicol. IX. Effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. *Biochim Biophys Acta.* 11 de enero de 1965;95:146-55.
33. Jardetzky O. Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. I. The conformation of chloramphenicol in solution. *J Biol Chem.* julio de 1963;238:2498-508.
34. Farfán U M, Flores G O, Navarro G N, Prado J V, Mora L G, Toro U C. Caracterización molecular de mecanismos de resistencia a cloranfenicol en cepas de *Shigella flexneri* aisladas en niños chilenos con diarrea aguda. *Rev Médica Chile.* marzo de 2002;130(3):275-80.
35. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Farmacología y Terapéutica. Tetraciclinas, cloranfenicol Y antibióticos polipeptídicos, Guión nº: 65.
36. Unemo M, Golparian D, Skogen V, Olsen AO, Moi H, Syversen G, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Strain with High-Level Resistance to Spectinomycin Due to a Novel Resistance Mechanism (Mutated Ribosomal Protein S5) Verified in Norway. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2013;57(2):1057-61.
37. Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate S4014 [Internet]. Sigma-Aldrich. [citado 4 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s4014>
38. Wagman GH, Testa RT, Marquez JA, Weinstein MJ. Antibiotic G-418, a New Micromonospora-Produced Aminoglycoside with Activity Against Protozoa and Helminths: Fermentation, Isolation, and Preliminary Characterization. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 1974;6(2):144-9.

39. Geneticin Selective Antibiotic (G418 Sulfate), Powder - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [citado 4 de abril de 2017]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11811031>
40. Waitz JA, Sabatelli F, Menzel F, Moss EL. Biological activity of antibiotic G-418, a new micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 1974;6(5):579-81.
41. Borovinskaya MA, Shoji S, Fredrick K, Cate JHD. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA N Y N.* agosto de 2008;14(8):1590-9.
42. McGaha SM, Champney WS. Hygromycin B inhibition of protein synthesis and ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* febrero de 2007;51(2):591-6.
43. Szafraniec M, Stokowa-Sołtys K, Nagaj J, Kasprowicz A, Wrzesiński J, Jeżowska-Bojczuk M, et al. Capreomycin and hygromycin B modulate the catalytic activity of the delta ribozyme in a manner that depends on the protonation and complexation with Cu²⁺ ions of these antibiotics. *Dalton Trans Camb Engl* 2003. 28 de agosto de 2012;41(32):9728-36.
44. Hygromycin B from *Streptomyces hygroscopicus* H7772 [Internet]. Sigma-Aldrich. [citado 4 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h7772>
45. Zeocin Selection Reagent - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [citado 4 de abril de 2017]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R25001>
46. Ministerio De Sanidad, Servicios Sociales E Igualdad. Guía de buenas prácticas de preparación de medicamentos en servicios de farmacia hospitalaria. 2014.

47. Surprenant AM, Preston DA. Effect of refrigerated storage on cefaclor in Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol.* enero de 1985;21(1):133-4.
48. Cobos M., Castro JC., Gutierrez AL. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del Río Itaya, Loreto. *Ecol Apl.* julio de 2014;13(2):169-75.
49. Barclay W., Jhonsen J., Chelf P., Nagle N. & Roessler R. Microalgae culture collection. *Sol Energy Res Inst. Golden, Colorado.*; 1986. 232–3079. 147p. p.
50. Jung-S.K, Yong H.P, Byung D.Y and Hee M.O. Establishment of Axenic Cultures of *Anabaena Flos-Aquae* and *Aphanothece Nidulans* (Cyanobacteria) by Lysozyme Treatment. *J Phycol.* 1999;35:865-9.
51. Guo S-L, Zhao X-Q, Tang Y, Wan C, Alam MA, Ho S-H, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *J Biotechnol.* 10 de enero de 2013;163(1):61-8.
52. De la Vega N.M. Aislamiento, caracterización y manipulación genética de microalgas marinas para la producción de compuestos de alto valor añadido. [España]: Universidad de Huelva; 2014.
53. Becker, E. W. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology.* Cambridge University Press. USA; 1994. 293 pp.
54. Casais E. Efecto tóxico de un herbicida frecuente en Galicia sobre una microalga dulceacuícola. [España]: Universidad de a Coruña; 2014.
55. OECD. uidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems test N°201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2011.

56. Droop MR. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br Phycol Bull.* 1 de diciembre de 1967;3(2):295-7.
57. Mojtaba A., Rosfarizan M., & Raha A.R. Improved Protocol for the Preparation of *Tetraselmis suecica* Axenic Culture and Adaptation to Heterotrophic Cultivation. *The Open Biotechnology Journal.* 2010;4:36-46.
58. Hyun-Na Joo and Choul-Gyun Lee. Antibiotics Addition as an Alternative Sterilization Method for Axenic Cultures in *Haematococcus pluvialis*. *J Ind Eng Chem.*, 2007;Vol. 13:110-5.
59. Geoffroy L, Gilbin R, Simon O, Floriani M, Adam C, Pradines C, et al. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol Amst Neth.* 15 de junio de 2007;83(2):149-58.
60. Van Wezel AP, Van Vlaardingen P. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat Toxicol Amst Neth.* 10 de marzo de 2004;66(4):427-44.
61. Barboza I.D. & Chaparro A. Concentración mínima inhibitoria de higromicina B en callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Colomb Biotecnol.*2011; 13(2):193-8.
62. Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist.* diciembre de 2002;153(4):401-12.
63. Takahashi M., Mikami K., Mizuta H. and Saga N. Identification and Efficient Utilization of Antibiotics for the Development of a Stable Transformation System in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta. *Aquac Res Development.* 2011;2:118.
64. López A.R. Producción de lactostatina en cloroplastos de *Chlamydomonas Reinhardtii*. 13 de agosto de 2014 [citado 7 de julio de 2017]; Disponible en: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmLui/handle/123456789/257>

65. Lai HT , Hou JH , Su CI , Chen CL. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009;72(2):329-34.
66. Lützhøft HH, Halling B, Jørgensen SE. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch Environ Contam Toxicol.* enero de 1999;36(1):1-6.
67. Halling B., 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* 40, 731–739.
68. FISPQ. Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos em acordo com a NBR :14725-4. 2009.
69. Gürel F., Gözükmizi N. Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 2000;19:787–791.
70. Zambre M., Goossens A., Cardona C., Van Montagu M., et al. A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theor Appl Genet.* 2005;110:914–924.
71. Men S, Ming X, Wang Y, Liu R, Wei C, Li Y. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep.* febrero de 2003;21(6):592-8.
72. Sun W., Huang H., Lin H., Peng C. & Su H. Effects of antibiotics on axenic culture from *Haematococcus pluvialis*. *Chin J Bioprocess Eng.* 2015;Vol 13(N 04):11-6.

X. ANEXOS

Anexo I. Del mapa georeferencial del área de estudio



Figura 1. Ubicación del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP) que contienen los bancos de cepas de *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001, *Chlorella* sp. Cepa UCP0002 y *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

Anexo II. Abreviaturas

aadA	aminoglucósido-3'-adeniltransferasa
APT	aminoglucósido 3'-fosfotransferasa
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
CAM	Concentracion Alguicida Minima
CAT	Cloranfenicol Acetil-Transferasa
CIM	Concentracion Inhibitoria Minima
EC ₅₀	Concentracion efectiva 50
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
hph	Hygromycin phosphotransferase
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
rpsE	gen de la proteína ribosomal S5
sh ble	Gen de resistencia a Zeocina

Anexo III. Curvas de calibración de las tres especies de microalgas

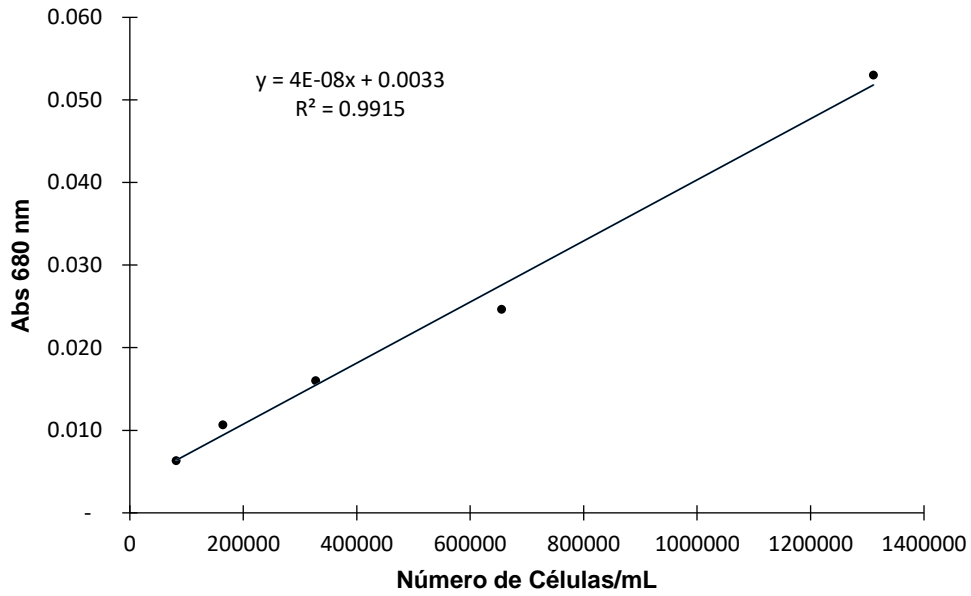


Figura 1. Curva de calibración de *Ankistrodesmus sp.* Ceba UCP0001

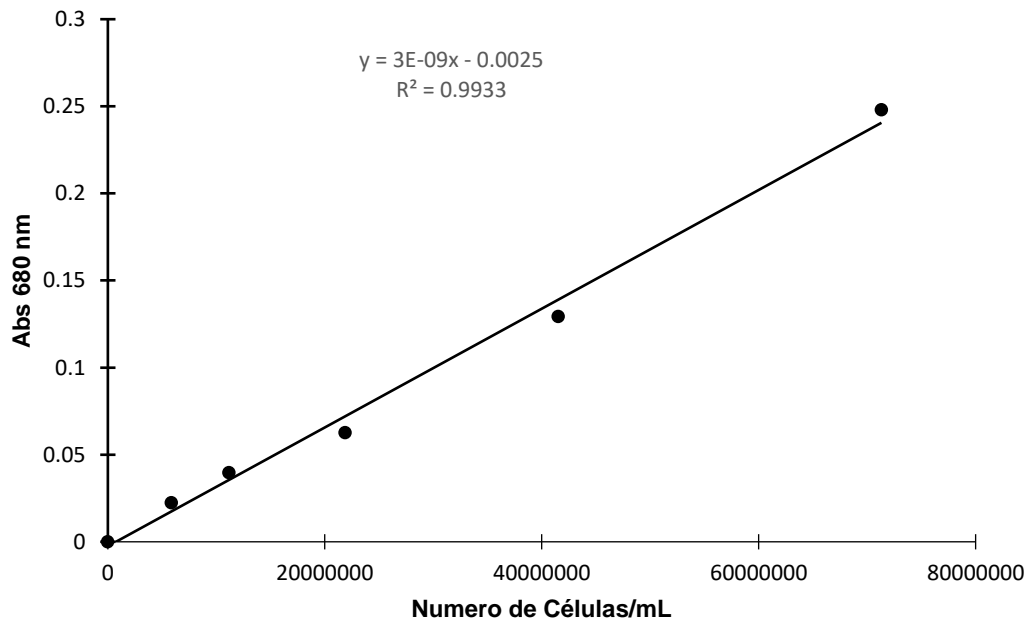


Figura 2. Curva de calibración de *Chlorella sp.* Ceba UCP0002

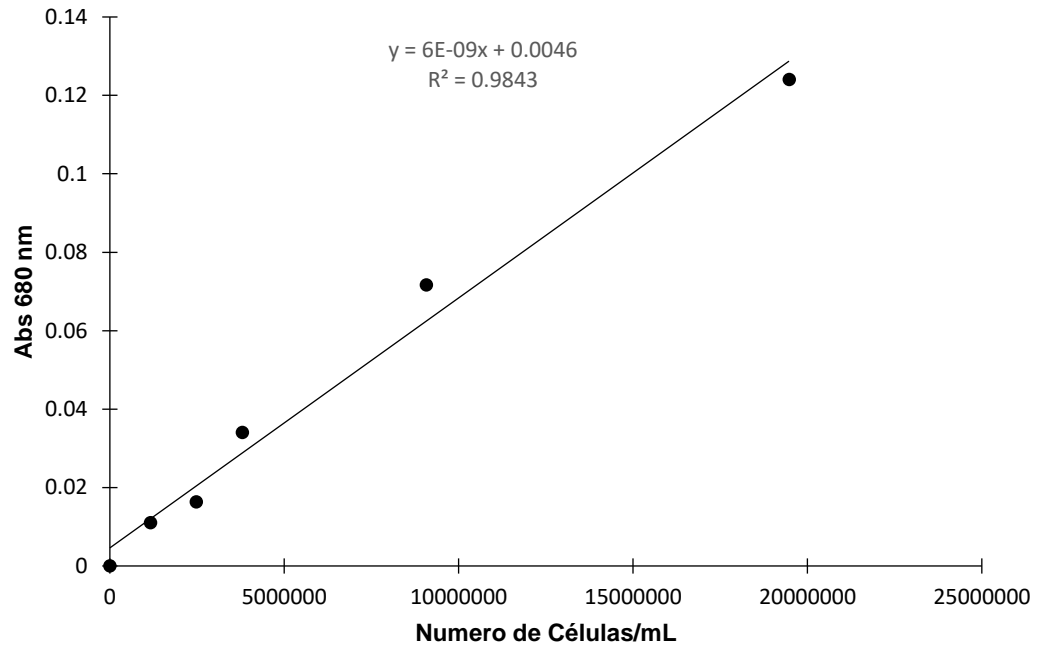


Figura 3. Curva de calibración de *Scenedesmus* sp. Ceba UCP0003

**Anexo IV. Cuadros de datos estadísticos de los 5 antibióticos
(Cloranfenicol, Espectinomicina, Geneticina, Higromicina B y Zeocina)
de las tres especies de microalgas.**

Cuadro 1. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de cloranfenicol en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	5	,000	3,955	,024
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,002	17			

Cuadro 2. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomicina en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,008	5	,002	4,897	,011
Intra-grupos	,004	12	,000		
Total	,012	17			

Cuadro 3. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,045	5	,009	46,493	,000
Intra-grupos	,002	12	,000		
Total	,047	17			

Cuadro 4. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,059	5	,012	14,117	,000
Intra-grupos	,010	12	,001		
Total	,070	17			

Cuadro 5. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en *Ankistrodesmus* sp. Cepa UCP0001

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,046	5	,009	54,951	,000
Intra-grupos	,002	12	,000		
Total	,048	17			

Cuadro 6. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Cloranfenicol en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	5	,000	3,438	,037
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,002	17			

Cuadro 7. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomicina en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,029	5	,006	18,830	,000
Intra-grupos	,004	12	,000		
Total	,033	17			

Cuadro 8. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,026	5	,005	35,916	,000
Intra-grupos	,002	12	,000		
Total	,027	17			

Cuadro 9. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,020	5	,004	49,188	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,021	17			

Cuadro 10. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en *Chlorella* sp. Cepa UCP0002

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,032	5	,006	94,026	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,033	17			

Cuadro 11. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Cloranfenicol en *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,002	5	,000	3,459	,036
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,004	17			

Cuadro 12. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Espectinomomicina en *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,009	5	,002	28,342	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,010	17			

Cuadro 13. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Geneticina en *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,024	5	,005	57,136	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,025	17			

Cuadro 14. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Higromicina B en *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,021	5	,004	37,980	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,023	17			

Cuadro 15. Análisis de la Varianza de un factor (ANOVA) de Zeocina en *Scenedesmus* sp. Cepa UCP0003

ANOVA de un factor					
unidad de absorbancia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,024	5	,005	71,291	,000
Intra-grupos	,001	12	,000		
Total	,025	17			

Anexo V. Flujoograma de procedimientos metodológicos

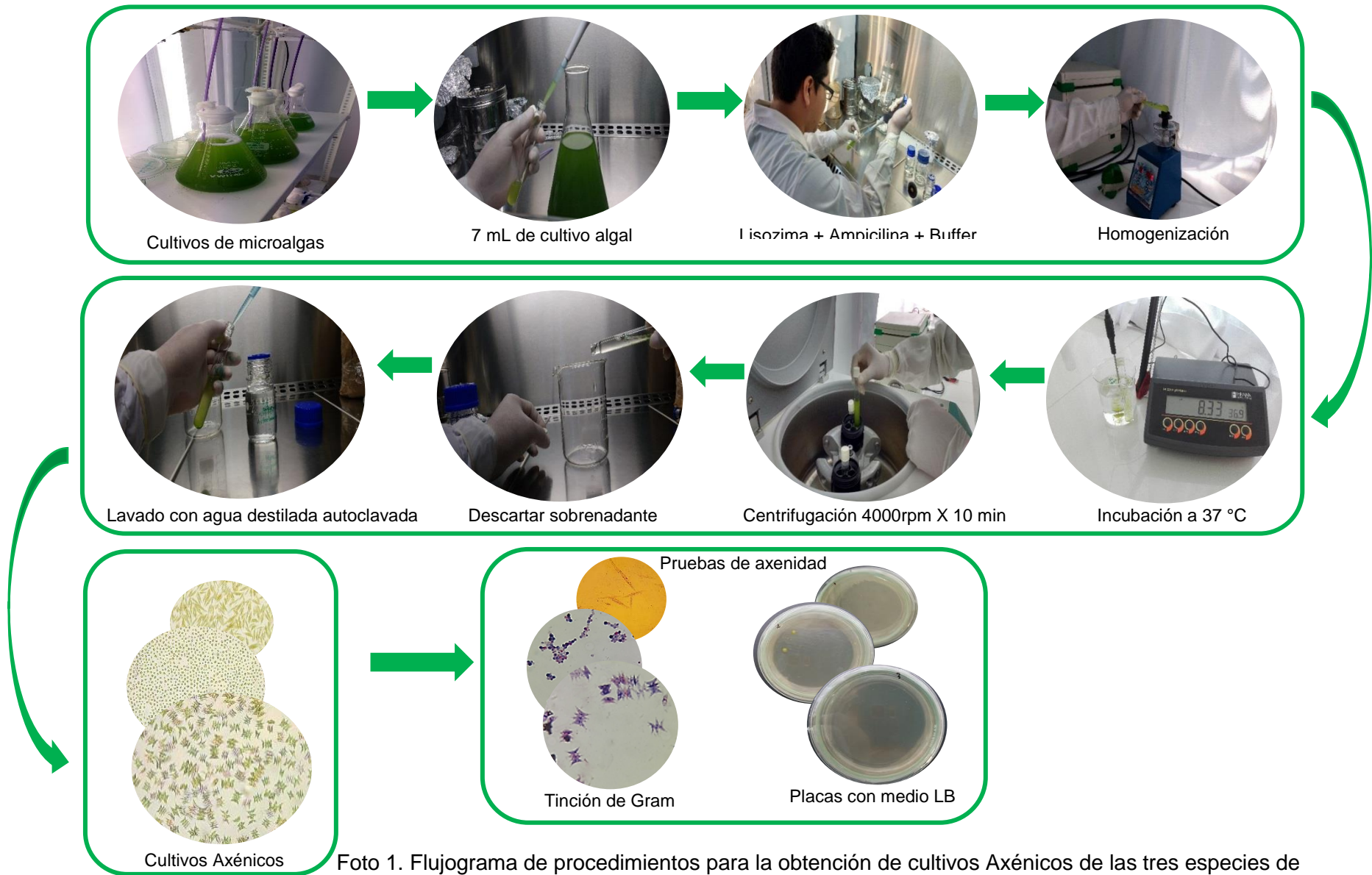


Foto 1. Flujoograma de procedimientos para la obtención de cultivos Axénicos de las tres especies de microalgas.

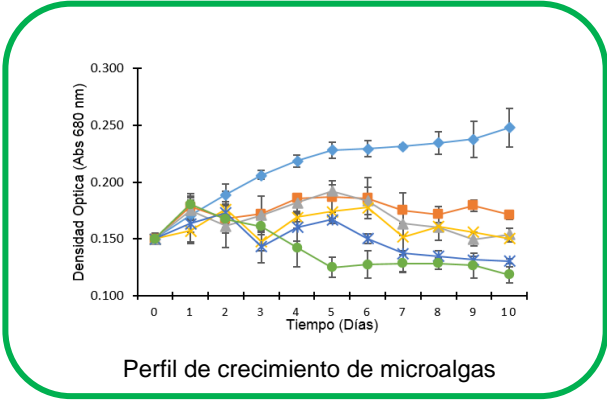
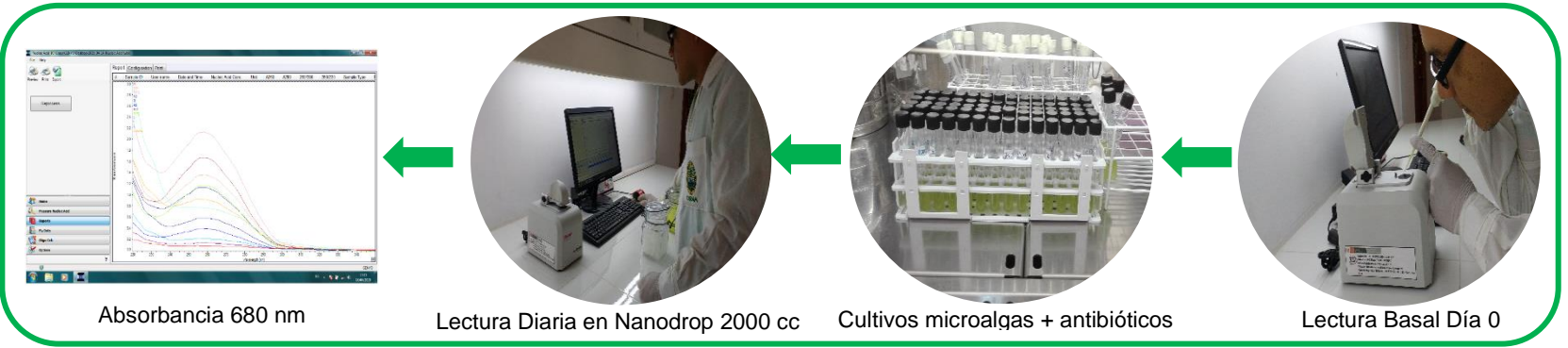


Foto 2. Flujograma de procedimientos para la prueba de sensibilidad en las tres especies de microalgas.