

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cianobacterias y
microalgas aisladas de páramos ecuatorianos frente a cepas de
Staphylococcus aureus y *Escherichia coli*.**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

DIEGO ANDRÉS MENA AGUIRRE

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Microbiólogo del Sr. Diego Andrés Mena Aguirre ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Carolina Elizabeth Portero Pico

Directora de la Disertación

Quito, 06 de enero del 2020

DEDICATORIA

A mi padre, madre y hermana.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiar mi vida y darme apoyo en todo momento.

A mi padre y madre por darme una educación que me ha llevado lejos y a mi hermana por apoyarme y guiarme en todo momento.

Agradezco al CISEAL, a todas las personas que lo conforman, en especial a la MSc. Alexandra Narváez, directora del laboratorio de Biotecnología Vegetal que me permitió usar su laboratorio para llevar a cabo este trabajo de disertación y particularmente a la Mtr. Carolina Portero que me permitió realizar esta investigación. Gracias por su ayuda, guía y ser mi directora de disertación.

Muchas gracias, Fernando Marín y Carolina Castro por haberme guiado en este proceso hasta el final.

A la PhD. Iliana Alcocer, por facilitarme las cepas empleadas en el estudio realizado.

A Carolina Proaño de la Universidad Regional Amazónica IKIAM, que nos ayudó con la lectura e interpretación de las muestras.

A Bolívar Salas, encargado del Cuarto de Preparación de la Facultad, que me facilitó las pruebas bioquímicas para realizar la identificación de las bacterias empleadas en el presente estudio.

A la PhD. Katti Christina y MSc. Eliana Veloz, por las revisiones en el documento.

A mis compañeros, Jacqueline González, Thomas Landázuri, Shirley Arreaga y Emilia García, por darme su apoyo y consejos incondicionalmente durante toda la carrera, además de demostrarme lo que es la verdadera amistad, gracias por todos los momentos vividos en nuestra carrera universitaria.

A mis profesores Jennifer Yáñez, Elena Granda, Diana Astorga, Fernando Santacruz, Verónica Luna, por enseñarme lo que se y hacerme amar la carrera. Pero sobre todo quiero agradecer a Diana Ontaneda, por enseñarme el maravilloso mundo de las microalgas y cianobacterias, y en especial a Magaly Estrella, por ser un apoyo y pilar fundamental en mi carrera universitaria, enseñándome que la humildad y confianza en uno mismo son la clave para llegar lejos.

A mis compañeros de curso y amigos que me acompañaron no solo en la carrera sino también en mi vida universitaria.

A todas las personas que conocí en prácticas preprofesionales, en particular a Gabriel Renato Castro y Diana Guillén, por ampliar mis conocimientos en ficología, además de ser excelentes personas. ¡Muchas Gracias!

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AM	Ampicilina
AMC	Amoxicilina con ácido clavulánico
AZM	Azitromicina
BG11	Blue green 11
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración mínima bactericida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Eritromicina
FOX	Cefoxitin
GM	Gentamicina
IC ₅₀	Concentración que inhibe el 50%
ITS	Internal transcribed spacer
LIA	Lisina iron agar
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
mg	Miligramo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
ml	Mililitro
NA	Ácido nalidíxico
NET	Netilmicina
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OMS	Organización mundial de la salud
OX	Oxacilina
P	Penicilina
p/v	Peso sobre volumen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RM	Rojo de metilo
SR	Sin resistencia
SXT	Sulfametoxazol trimetoprima

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)

Abreviatura	Significado
TE	Tetraciclina
TSI	Triple sugar iron
µl	Microlitro
VA	Vancomicina
VP	Vogues Proskauer

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. ANTIBIÓTICOS: CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA.....	3
3.2. RESISTENCIA BACTERIANA EN EL ECUADOR	3
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
3.4. <i>Escherichia coli</i>	5
3.5. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS Y BIOPROSPECCIÓN	7
3.6. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS	7
3.7. BIOPROSPECCIÓN CON MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS EN EL ECUADOR.....	8
3.8.OBJETIVO GENERAL.....	10
3.9.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1. MUESTREO/OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	11
4.1.1. Obtención de bacterias y caracterización fenotípica	11
4.1.2. Obtención de cianobacterias y microalgas	11
4.2. AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS	12
4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	12
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROALGAS	13
4.5. ESCALAMIENTO DE <i>Chlorococcum</i> sp.....	13
4.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS APLICANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF	14

4.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO.....	16
4.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS	17
4.8.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	17
5. RESULTADOS	18
5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS.....	18
5.2. AISLAMIENTO DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE-COCA	18
5.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS	19
5.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA RECC-DM/Chl2.1	20
5.5. CONDICIONES DE ESCALAMIENTO DE <i>Chlorococcum</i> sp.	21
5.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EMPLEANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF.....	21
5.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE <i>Chlorococcum</i> sp. EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO.....	22
5.7.1. Cuantificación de números de compuestos mediante MALDI-TOF ...	22
5.7.2. Pruebas de microdilución con los extractos obtenidos.....	23
5.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS	23
6. DISCUSIÓN.....	24
6.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS.....	24
6.2. AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS	24
6.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	26
6.4. IDENTIFICACIÓN MOLÉCULAR DE MICROALGAS	27
6.5. ESCALAMIENTO DE MICROALGAS	28

6.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS APLICANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF	29
6.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO.....	31
6.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS	32
7. CONCLUSIONES.....	34
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9. FIGURAS	55
10. TABLAS.....	66
11. ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. Análisis Método de Taguchi	55
2. Figura 2. Antibiograma 1	56
3. Figura 3. Antibiograma 2	56
4. Figura 4. Antibiograma 3	56
5. Figura 5. Antibiograma 4.	57
6. Figura 6. Antibiograma 5	57
7. Figura 7. Mapa del lugar de muestreo.....	58
8. Figura 8. Cultivo de <i>Chlorococcum</i> sp.....	59
9. Figura 9. Cultivo de <i>Scenedesmus</i> spp.	59
10. Figura 10. Cultivo de <i>Nostoc</i> spp.	59
11. Figura 11. Cultivo de <i>Sellaphora</i> spp.....	60
12. Figura 12. Cultivo de <i>Pseudoanabaena</i> spp.....	60
13. Figura 13. Cultivo de <i>Klebsormidium</i> spp.....	60
14. Figura 14. PCR con gradiente de hibridación para la región ITS de <i>Chlorococcum</i> sp	61
15. Figura 15. Distribución cuartilar de compuestos obtenidos en la optimización de extractos mediante el Método Taguchi.....	62
16. Figura 16. Variación de porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> 104C ORSA a diferentes concentraciones el extracto Chl. E3.....	63
17. Figura 17. Concentración mínima bactericida (CMB) de <i>S. aureus</i> 104C ORSA...	64
18. Figura 18. Placa de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de <i>S. aureus</i> 104C ORSA.	65

LISTA DE TABLAS

1. Tabla 1. Lista de antibióticos empleados en el antibiograma de <i>S. aureus</i>	66
2. Tabla 2. Lista de antibióticos empleados en el antibiograma de <i>E. coli</i>	67
3. Tabla 3. Lista de lugares muestreados en el Páramo de la Virgen	68
4. Tabla 4. Niveles y factores de los tratamientos empleados de acuerdo al Método de Taguchi L8 (2 ⁷)	69
5. Tabla 5. Porcentaje de inhibición del extracto crudo frente a seis cepas resistentes de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
6. Tabla 6. Identificación bioquímica de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
7. Tabla 7. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> (SR).....	72
8. Tabla 8. Perfil de resistencia antibiótica de la cepa de <i>S. aureus</i> sin resistencia.....	73
9. Tabla 9. Perfiles de resistencia antibiótica de las cepas resistentes representantes de <i>S. aureus</i>	74
10. Tabla 10. Perfil de resistencia antibiótica de la cepa de <i>E. coli</i> sin resistencia	75
11. Tabla 11. Identificación morfológica de los aislados	76
12. Tabla 12. Parámetros de calidad del ADN obtenidos mediante NanoDrop	77
13. Tabla 13. Información molecular de <i>Chlorococcum</i> sp. (RECC-DM/Chl 2.1).....	78
14. Tabla 14. Número de picos obtenidos mediante MALDI-TOF para cada tratamiento.	79
15. Tabla 15. Promedios de número de picos por nivel de cada factor	80
16. Tabla 16. Número de picos obtenidos a partir del diseño unifactorial (Segunda extracción).....	81
17. Tabla 17. Pruebas estadísticas realizadas con los extractos obtenidos con metanol y etilacetato de la segunda ronda.....	82
18. Tabla 18. Resultado de la microdilución con los extractos crudos obtenidos (0,80 mg/ml) con etilacetato y metanol frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	83
19. Tabla 19. Porcentaje de inhibición del extracto crudo obtenido frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	84

LISTA DE ANEXOS

1. Anexo 1. Protocolo de amplificación sugerido por Sarwa y Verma (2017)	85
2. Anexo 2. Tratamientos de extracción empleados con el Método de Taguchi.....	85
3. Anexo 3. Protocolo empleado en la segunda extracción.....	90
4. Anexo 4. Protocolo empleado en la tercera extracción	90
5. Anexo 5. Secuencia limpia de <i>Chlorococcum</i> sp	90
6. Anexo 6. Pruebas inter-sujetos tras el ANOVA multifactorial	91
7. Anexo 7. Explicación de los niveles empleados en el Método de Taguchi	92
8. Anexo 8. Prueba estadística de t de student	93
9. Anexo 9. Prueba estadística de Kruskal-Wallis	93
10. Anexo 10. Montaje fresco de muestras obtenidas de cuerpos de agua provenientes del Páramo de la Virgen en el Parque Nacional Cayambe-Coca	94
11. Anexo 11. Lectura de MALDI-TOF (Rango 1000-3000 Da)	95
12. Anexo 12. Tabla de equipos empleados para los diferentes procedimientos realizados	96

1. RESUMEN

La resistencia bacteriana es un problema creciente que afecta a la población mundial, siendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, bacterias que presentan frecuentemente resistencias a antibióticos. En el Ecuador estos microorganismos han presentado perfiles inusuales de resistencia, incrementando la mortalidad causada por estos patógenos. Debido a esto, es fundamental la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos, siendo las microalgas provenientes de páramos muy prometedoras, pues se ha visto que climas extremos favorecen la producción de moléculas bioactivas. En el presente estudio se obtuvieron extractos crudos a partir de la microalga *Chlorococcum* sp. para analizar sus actividades antimicrobianas. Se determinó el efecto de siete factores en la metodología de extracción para optimizar el protocolo y obtener un mayor número de moléculas potencialmente antimicrobianas. De los siete factores examinados solo el procesamiento inicial (masa seca vs. masa húmeda con inactivación) produjo diferencias significativas en el número de moléculas obtenidas. Los extractos no inhibieron el crecimiento de *E. coli*, mientras que para *S. aureus* si hubo efecto inhibitorio de 26, 19%. Se evaluaron seis cepas resistentes de *S. aureus*, de las cuales una, que presenta resistencia intermedia a la clindamicina, fue inhibida por el extracto. Esta investigación es una base para posteriores estudios de las propiedades antimicrobianas de microalgas.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, biomoléculas, microalgas, resistencia bacteriana.

2. ABSTRACT

Bacterial resistance is a growing worldwide problem. Common bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, frequently present resistance to antibiotics. Specifically, in Ecuador, these microorganisms present unusual resistance profiles and individuals infected with these pathogens die with higher frequency. Therefore, exploring new sources of antibiotics is crucial and microalgae native to the Andean highlands are very promising because they experience extreme weather conditions which favor the production of bioactive molecules. In the present study, we obtained crude extracts from the microalgae *Chlorococcum* sp. and analyzed their antimicrobial activities. We examined the effect of seven factors on the extraction methodology to optimize the protocol and obtain a greater number of potentially antimicrobial molecules. Of the seven factors examined, only the initial processing (dry mass vs. wet mass with inactivation) produced significant differences in the number of molecules obtained. The extracts did not inhibit *E. coli* growth, while *S. aureus* activity was inhibited by 26,19%. Additionally, we evaluated six resistant strains of *S. aureus*, one of which (with intermediate resistance to clindamycin), was inhibited by the extract. This research is a foundation for further studies of the microalgae antimicrobial properties

Key words: antimicrobial activity, biomolecules, bacterial resistance, microalgae.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTIBIÓTICOS: CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA.

Los antibióticos son medicamentos de origen natural, artificial o semisintético, que se emplean en la medicina tradicional para combatir bacterias debido a que interrumpen o alteran procesos metabólicos, permitiendo combatir un sinnúmero de enfermedades producidas por infecciones bacterianas (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Durante las últimas décadas la efectividad de los antibióticos ha disminuido notablemente debido a la resistencia bacteriana, la cual es un problema evolutivo que ocurre naturalmente en bacterias, que se ha acelerado por el uso indebido de los antibióticos en humanos y en animales de crianza (OMS, 2018; OMS, 2017; Seija y Vignoli, 2015), provocando un incremento en la tasa de mortalidad de algunas enfermedades bacterianas (Ignacio-Alós, 2014). La ausencia de medicamentos efectivos para combatir bacterias que han adquirido resistencias a los antimicrobianos tiene consecuencias directas como: el incremento de costos en el tratamiento de patologías, disminución de la efectividad del tratamiento terapéutico con antibióticos y el riesgo de contraer infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), por que puede prolongar la estadía en hospitales (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2016).

La OPS (2016) reporta que bacterias como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacterias como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus* representan una amenaza para la salud de las personas. Se han registrado cepas multirresistentes de estos géneros bacterianos a carbapenémicos y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, siendo esto un problema porque este grupo de antibióticos incluye medicamentos que son recetados como última opción terapéutica contra bacterias resistentes, debido a su amplio espectro de acción (Rivas, Rivas, Dávila y Rodríguez, 2002; OPS, 2016).

3.2. RESISTENCIA BACTERIANA EN EL ECUADOR.

De acuerdo al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en el Ecuador se han detectado bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con perfiles de

resistencias inusuales a antibióticos, que comprometen la supervivencia de los pacientes afectados por patologías causadas por estos microorganismos (Villacís, Reyes, Vásquez y Villavicencio, 2014).

S. aureus y *E. coli*, son dos patógenos (Gran positivo y Gram negativo respectivamente) de gran interés clínico por los mecanismos de resistencia antibiótica que poseen, lo que los convierte en microorganismos ideales para la búsqueda de nuevos medicamentos antimicrobianos (Ministerio de Salud Pública, 2017; Villacís et al., 2014). Adicionalmente, ambas bacterias son de especial interés debido sus características fenotípicas, su ubicuidad en el humano, la diversidad de patologías que causan, sus factores de virulencia y sus mecanismos de resistencia antibiótica.

3.3. *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus (Eubacteria (Firmicutes (Bacilli (Bacillares (Staphylococcaceae (*Staphylococcus* (*S. aureus*)))))), es microorganismo Gram positivo esférico (cocos), dispuesto individualmente, en pares, tétradas, cadenas cortas o principalmente en forma de racimos (Gnanamani, Hariharan y Paul- Satyaseela, 2017). Este género se caracteriza por la producción de enzima catalasa, la ausencia de la enzima oxidasa y cápsula ni motilidad. *S. aureus* se diferencia de otras especies de este género por la producción de la enzima coagulasa, DNAsa y termonucleasa, además, de la tolerancia a concentraciones de sal de 7,5 % aproximadamente (Gnanamani, Hariharan y Paul- Satyaseela, 2017; Lizcano y Vergara, 2008).

Esta bacteria se encuentra principalmente en la piel como parte de su microbiota normal y causa una gran variedad de patologías como piodermitis, bacteriemia, endocarditis, sepsis, intoxicaciones alimentarias e infecciones asociadas con la atención en salud (Garza-Velasco, Zuñiga-Rangel y Perea-Mejía, 2013; Paganini et al., 2009).

La gran variedad de enfermedades que puede ocasionar se debe a sus factores de virulencia, que le permiten la unión e invasión en los tejidos, evitar la inmunidad del huésped y la producción de toxinas (Gnanamani, Hariharan y Paul- Satyaseela, 2017). Dentro de las más importantes se encuentran: proteína A, resistencia a fagocitosis; coagulasa, evita formación de redes de fibrina; hemolisina, lisis de eritrocitos; leucocidina, afecta el sistema inmune y enterotoxinas, causante de intoxicaciones alimentarias (Rivadeneira, 2014).

Adicionalmente a lo mencionado, *Staphylococcus aureus* presenta varios mecanismos de resistencia antibiótica, siendo la modificación enzimática la más común. La resistencia a meticilina y β -lactámicos se da por la expresión del gen *mecA*, que altera las proteínas PBP (proteínas de unión a las penicilinas) (González, Maribel, Mena y Armindo, 2010; Lacueva, 2017; Vaca, 2016).

Varias cepas de este género bacteriano también presentan resistencia frente a glicopéptidos, principalmente a vancomicina (por alteración del sitio diana y producción de residuos que se unen a los antibióticos), quinolonas (mutaciones en el sitio de unión), aminoglucósidos (fosforilación o metilación del antibiótico), oxazolidinonas (alteraciones del sitio blanco y mutaciones), quinupristina-dalfopristina (modificación enzimática) y macrólidos (por modificación del sitio diana, gen *erm*; bombas de flujo, genes *mrsA*, *erpA* y *vgaA*; y síntesis de enzimas, genes *inuA*, *inuB*, *vatA* y *mphC*) (Lacueva, 2017; Lowry, 2003; Pantosti, Sanchini y Monaco, 2007).

3.4. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa, mesófila que crece a temperatura de 37 °C y fermenta varios tipos de azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa. Morfológicamente son bacilos con bordes redondeados, Gram negativos, móviles con flagelos peritricos, no esporulados, que fácilmente pueden ser identificados mediante pruebas bioquímicas como catalasa (+), oxidasa (-), TSI, SIM, LIA, citrato, malonato, urea, MR y VP (Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011). Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera: Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, *Escherichia*, *Escherichia coli* (ATCC, 2020).

Esta bacteria entérica causa enfermedades relacionadas con el sistema digestivo, principalmente diarreas (Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011). Además, puede ocasionar infecciones en las vías urinarias, principalmente de mujeres (por su disposición anatómica), además de prostatitis en hombres, colecistitis, infecciones de la vesícula biliar, infecciones post-operacionales de apendicitis, diverticulitis y heridas. También puede causar, con menor frecuencia, neumonía y meningitis en recién nacidos, entre otras (Bush, 2015; Doyle y Dolores, 1996; Sussman, M, 1997).

Escherichia coli presenta tres antígenos (Ag) característicos. El primero conocido como “O” o somático, el segundo “H” o flagelar y el tercero “K” por la cápsula. Estos

son importantes factores de virulencia, además que hay una relación entre el antígeno K y el O, puesto que este último es envuelto por el Ag capsular, evitando el reconocimiento por el sistema inmunológico y por lo tanto la fagocitosis (Sangwan, 2017).

Basados en los diferentes síntomas que causan, *E. coli* ha sido clasificada en diferentes patotipos (Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cárdenas y Vargas-Remolina, 2016), siendo los más importantes: *E. coli* enteropatogénica (ECEP), afecta principalmente a niños; *E. coli* shigatóxica (ECST), que produce toxinas que causan diarrea con sangre y dolor abdominal; *E. coli* enterotoxigénica (ECET), produce diarrea aguda leve y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), que se diferencia de las demás por una diarrea con mucosidad. Adicionalmente, los patotipos enteroagregativo (ECEA) y difusamente adherente (ECDA) son menos comunes y presentan síntomas más leves (Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cárdenas y Vargas-Remolina, 2016).

Además de sus factores de virulencia y patotipos, la severidad de las enfermedades que causa *E. coli* se debe a que posee diversos mecanismos de resistencia a antibióticos como la modificación enzimática (β -lactámicos, siendo las enzimas más importantes las BLEE, betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas) (García, 2013; Muro de Zaro, 2017), bombas de eflujo (tetraciclinas), modificaciones del sitio blanco, alteración en la permeabilidad, empleo de rutas metabólicas alternas o exportadores de antibióticos (quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y cloranfenicol) (Ibarra, 2017, Leoro-Garzón, Ortega-Paredes y Fernández-Moreira, 2017; Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011).

Esta variedad de mecanismos de resistencia a una gran variedad de medicamentos, incluso frente antibióticos de última línea como la colistina, la convierten en un microorganismo difícil de tratar (Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011; Oluwasola, Oriade y Lamakanra, 2013; Angles, 2018; Organización Panamericana de la Salud, 2016).

Este incremento acelerado de la resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* a diversos antibióticos se debe principalmente a la resistencia adquirida, en la que se transfieren genes de resistencia mediante plásmidos, entre diferentes especies. Este mecanismo les permite incrementar su supervivencia a los diferentes tratamientos terapéuticos actuales contra este microorganismo, dificultando el control y tratamiento de las patologías causadas por esta bacteria (Sánchez, Muñoz y Gutierrez, 2012).

3.5. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS Y BIOPROSPECCIÓN.

Debido al incremento de mortalidad por enfermedades bacterianas y las resistencias adquiridas a antibióticos en los últimos años, la búsqueda de nuevos antibióticos se ha convertido en una prioridad mundial (OMS, 2017). Sin embargo, la producción de nuevos medicamentos en los últimos años ha disminuido. Encontrar nuevas fuentes de fármacos es una necesidad urgente, especialmente para bacterias Gram negativas que son extensamente resistentes a fármacos (XDR) y solo pueden ser tratadas con colistina y tigeciclina, siendo estos medicamentos la última opción terapéutica por sus efectos adversos en la salud (Aguayo, Mella, Riedel, Bello, Domínguez y González-Rocha, 2016).

A causa de esta escasez de antibióticos eficaces, la bioprospección ha tomado fuerza investigativa en la última década, siendo las microalgas y cianobacterias microorganismos prometedores debido a las propiedades antibacteriales que han mostrado sus metabolitos (Abed, Dobretsov y Sudesh, 2009; Thanh-Sang, Dai-Hung y Se-Kwon, 2015; Sigh, Tiwari, Rai y Mohapatra, 2011; Mi, Zhang, He y Yan, 2017).

3.6. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS.

Dentro de la búsqueda de compuestos antimicrobianos obtenidos a partir de microalgas y cianobacterias varios compuestos han sido identificados como clorenina, noscomina, diterpenoides, pahayokolido, entre otros (Ramírez-Mérida, Ragagnin de Menezes, Queiroz Zepka y Jacob-Lopes, 2015). Desde el 2006 hasta finales del 2016, se han descubierto aproximadamente 126 nuevos péptidos a partir de cianobacterias marinas pertenecientes a los géneros: *Lyngbya* spp., *Oscillatoria* spp., *Moorea* spp. y *Symplocos* spp. (Mi et al. 2017), los cuales inhiben parásitos como: *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp. y *Leishmania* spp. (Mi, Zhang, He y Yan, 2017). Mientras que microalgas como *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella stigmatophora*, *Schizotrix* spp. poseen un gran rango de actividades frente a diferentes bacterias como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* (Victory, 2009; Senhorinho, Ross y Scott, 2015; Sigh, Tiwari, Rai y Mohapatra, 2011).

Otra ventaja del trabajo con estos microorganismos en el área de la bioprospección es que su cultivo a grandes escalas resulta rentable (Bloor y England, 1989; Ahmed, 1999; Yasser y Adli, 2015), pues los requerimientos nutricionales de estos microorganismos

son simples y emplean la luz natural para la fotosíntesis (Diana, Reginald y Parthipan, 2014; Vijayakumar y Menakha, 2015; Yasser y Adli, 2015).

3.7. BIOPROSPECCIÓN CON MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS EN EL ECUADOR.

La bioprospección en cianobacterias y microalgas es un campo que no ha sido explorado en Ecuador, a pesar de que es un país altamente biodiverso. En un estudio de diversidad, realizado por Guamán y González (2016), al analizar treinta y dos cuerpos de agua distribuidos en páramos ecuatorianos, se identificaron más de 30 géneros solo del Fílum Bacillaryophyta, lo cual demuestra la gran diversidad de la microflora.

En otro estudio, Morales, Luna, Navarro, Santana, Gordillo y Arévalo (2013), analizaron cuerpos de agua en diferentes provincias de Ecuador, demostrando que tan solo en el Balneario de Aguas Hediondas en Carchi, existen más de once diferentes géneros entre cianobacterias y microalgas, siendo las más abundantes las Chlorophytas.

Senhorinho, Ross y Scott (2015), han relacionado las condiciones ambientales extremas o que generan estrés con la producción de metabolitos con actividad antibacteriana. Así mismo, hábitats altamente competitivos favorecen la síntesis de compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano más eficientemente. Los páramos ecuatorianos son ecosistemas que se caracterizan por tener condiciones extremas como temperaturas bajas que oscilan entre 2 a 10 °C y alta radiación ultravioleta (Hofstede, Segarra y Mena, 2003; Mena y Hofstede, 2006; Camacho, 2013). Además, debido a la poca actividad antropogénica y niveles altos de precipitación, son apropiados para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos (Diana, Reginald y Parthipan, 2014). Debido a esto, los páramos constituyen un lugar apropiado para la colección y estudio de microorganismos resistentes a estas condiciones ambientales extremas y por lo tanto posibles productores de metabolitos de interés. Dado el enorme potencial de este grupo, el objetivo de este estudio es analizar la capacidad antimicrobiana de algunas cianobacterias y microalgas provenientes de páramos ecuatorianos. Adicionalmente, uno de los desafíos en este campo, es que no se tiene establecido un protocolo estandarizado para realizar la extracción de los compuestos orgánicos de cianobacterias o microalgas, y se desconoce si dependiendo del género o características de las cianobacterias o microalgas, el solvente afecta la extracción de compuestos (Diana et al., 2014;

Vijayakumar y Menakha, 2015; Yasser y Adli, 2015). Por lo que, un segundo objetivo de este estudio es optimizar un protocolo de extracción de biomoléculas para los microorganismos seleccionados.

Esta investigación permitirá la generación de nuevos conocimientos sobre los metabolitos de microorganismos fotosintéticos y si estos poseen actividad inhibitoria de crecimiento de cepas patogénicas de bacterias.

Debido a la problemática planteada, se propone resolver las siguientes preguntas de investigación: a) ¿Qué condiciones *in vitro* favorecen la obtención de una mayor cantidad de metabolitos de los extractos orgánicos a partir de microalgas y cianobacterias aisladas? b) ¿Los compuestos extraídos a partir de cianobacterias y microalgas obtenidas de páramos ecuatorianos poseen efecto inhibitorio frente a las bacterias *S. aureus* y *E. coli* sin resistencia antibiótica? y c) ¿Los extractos que inhiben a las cepas no resistentes puede inhibir a cepas resistentes?

3.8. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos crudos obtenidos a partir de cianobacterias y microalgas del páramo de la Virgen frente las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

3.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar cepas de microalgas y cianobacterias provenientes del Parque Nacional Cayambe-Coca mediante la recolección de muestras de aguas.
- Identificar taxonómicamente las microalgas y cianobacterias aisladas mediante técnicas moleculares y microscopía óptica.
- Determinar qué factores favorecen la obtención de un mayor número de biomoléculas obtenidas de microalgas provenientes de los páramos ecuatorianos mediante un diseño factorial incompleto y unifactorial.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las biomoléculas extraídas frente a *S. aureus* y *E. coli* mediante las pruebas antimicrobianas de microdilución.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREO/ OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

4.1.1. Obtención de bacterias y caracterización fenotípica.

Bacterias sin resistencia y con resistencia a antibióticos de *E. coli* y *S. aureus* fueron provistas por la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA). Para corroborar la identificación de las bacterias se realizaron pruebas bioquímicas y tinción Gram, mientras que el perfil fenotípico de resistencia se llevó a cabo mediante la prueba de Kirby Bauer (Difusión por disco).

Para *E. coli* se realizó la identificación mediante las siguientes pruebas: tinción Gram, catalasa, oxidasa, TSI (Triple Sugar Iron Agar), LIA (Lysine Iron Agar), SIM (Sulfur Indole Motility Media), citrato, malonato, urea, Vogues Prokauer (VP) y rojo de metilo (RM) (MacFaddin, 2003). Las pruebas en las que se emplearon medios con sustratos específicos se incubaron aeróbicamente durante 18-24 horas a 37 °C (Fernández, García, Sáenz y Valdezate, 2010; MacFaddin, 2003).

Se realizó la identificación de todas las cepas *S. aureus* mediante la tinción Gram y las siguientes pruebas metabólicas: catalasa, oxidasa, coagulasa en tubo y manitol salado. Solo esta última se incubó durante 18-24 horas a 37 °C (Fernández, García, Sáenz y Valdezate, 2010; MacFaddin, 2003).

Para confirmar el perfil de resistencia a antibióticos reportado anteriormente por la Colección Bacteriana Quito Católica CB-QCA (Guerrero, 2007) de las cepas resistentes y no resistentes de *S. aureus* y *E. coli*, se realizó un antibiograma, empleando los discos citados en la Tabla 1 y 2.

Los discos fueron colocados en agar Mueller Hinton, previamente inoculados con la bacteria de interés (con una DO₆₃₀ entre 0,08 y 0,10) mediante siembra en césped (Becton Dickinson, 2005; Rosales, 2018). Los resultados de la susceptibilidad a los antibióticos fueron referenciados en el CLSI del 2018 para su interpretación. Tras su caracterización, estas bacterias fueron empleadas en los análisis posteriores

4.1.2. Obtención de cianobacterias y microalgas.

Se empleó un muestreo aleatorio simple en trece sitios de estudio del Páramo de la Virgen, dentro del Parque Nacional Cayambe-Coca (Tabla 3).

En los bordes de riachuelos y lagunas se colectaron aproximadamente 100 ml de agua en envases plásticos o de vidrio estériles. Adicionalmente, se tomaron

muestras a partir de rocas que visiblemente presentaban una capa verdosa adherida a la superficie, para este fin se rasparon los sustratos con un cepillo y se almacenaron en 100 ml de agua destilada (Valer, 2014).

Las muestras, se transportaron en oscuridad con pilas de hielo a los laboratorios del Centro de Investigación de Salud en Latinoamérica (CISeAL) y se procesaron hasta un máximo de 24 horas tras la colecta.

4.2. AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS.

Las muestras obtenidas fueron procesadas con la técnica de cultivo de agotamiento por estrías e incubadas a 20-24 °C con un fotoperiodo de 24 horas (Arredondo-Vega y Voltonia, 2007). Se utilizaron los medios solidos BG11 y Nitrofoska sin antibiótico para cianobacterias y microalgas respectivamente. Estos medios proporcionan cantidades adecuadas de nitrógeno, fósforo y oligoelementos, necesarias para el crecimiento de estos microorganismos (Aquiahuatl et al., 2012).

Una vez obtenido el crecimiento de biomasa se realizaron pases consecutivos para la obtención de colonias individuales con la misma técnica antes descrita.

Tras su aislamiento, se mantuvieron en medios sólidos sin antibióticos BG11 y Nitrofoska a temperatura ambiente (20-24 °C) con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad hasta obtener suficiente biomasa para las siguientes fases del estudio.

4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.

Se realizó la identificación de las colonias aisladas mediante microscopía óptica utilizando montajes frescos (Malajovich, 2015). Se empleó la clave taxonómica de Núñez, Marciales y Beltrán (2008), Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador (Guamán y González, 2016), Freshwater Algae of North America Ecology and Classification (Wehr, Sheath y Kociolek, 2015) y Microalgas acuáticas: la otra cara de la biodiversidad en la Amazonía colombiana (Núñez, Marciales y Beltrán, 2008) para describir las características e identificar los microorganismos aislados.

4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROALGAS.

Este procedimiento se realizó con cultivos axénicos. Se usó el protocolo sugerido por Magana-Archchi y Wanigatunge (2011), para la extracción de ADN a partir de colonias de microalgas en crecimiento usando el kit DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN®. Se verificó la calidad y cantidad de ADN mediante espectrofotometría utilizando NanoDrop.

La identificación se realizó usando el espaciador transcrito interno (ITS) empleando cebadores sugeridos por Nubel, Garcia-Pichel y Muyzer (1997): forward primer ITS1: 5'–AGGAGAAGTCGTAACAAGGT– 3' y reverse primer ITS4: 5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC– 3' (Hadi, Santana, Brunale, Gomes, Oliviera, Matthiensen, Oliviera, Silva, y Brasil, 2016). En el protocolo de amplificación sugerido por Sarwa. y Verma (2017) (Anexo 1), se modificó la temperatura de hibridación en base a una gradiente (57, 58, 59, 60, 61, 62 y 63 °C) con el fin de obtener una amplificación más específica.

Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis horizontal en agarosa al 2%, teñidas con SYBR GOLD al 5%, se purificaron fragmentos de 650 pb empleando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System y se secuenció por el método de Sanger en ambas direcciones utilizando los mismos primers de la PCR en el servicio de secuenciamiento de la Universidad de las Américas (UDLA), Quito.

Posteriormente, tras obtener las secuencias en base al cromatograma se eliminaron las regiones con picos sobrelapados y se alineó la secuencia forward y reverse utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). La secuencia consenso obtenida en el paso anterior se comparó con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener la identificación del microorganismo secuenciado.

4.5. ESCALAMIENTO DE *Chlorococcum* sp.

Para seleccionar los microorganismos que se emplearon en esta fase se utilizaron dos criterios: axenidad del cultivo y capacidad de crecimiento. En base a estos parámetros se escogió la cepa *Chlorococcum* sp.

La axenidad del cultivo se confirmó mediante tinción Gram y sembrando el medio líquido con la microalga en agar nutritivo para observar la presencia de

bacterias (incubadas a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis) y Papa Dextrosa Agar (PDA) para hongos (incubadas durante 72 horas a temperatura ambiente, 20-24 °C).

El escalamiento es un procedimiento mediante el cual se obtienen cultivos de mayor volumen. Inicialmente se emplearon los medios líquidos Nitrofoska y BG11 (Aquiahuatl et al., 2012), sin embargo, se obtuvieron mejores resultados con Nitrofoska.

Se comenzó el escalamiento con 80 ml del medio, colocando la biomasa que haya crecido en una o dos cajas de Petri. De acuerdo con la velocidad de crecimiento, se escaló posteriormente a matraces de 250 ml y 500 ml (Salazar-González, 2005).

Para obtener la mayor cantidad de biomasa, se colocó los matraces cerrados a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, que fue provista por luz natural indirecta (Aquiahuatl et al., 2012; Arrieta, 2008).

4.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS APLICANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF.

Se empleó el método de Taguchi L8 (2^7) para evaluar el efecto de siete diferentes factores con sus niveles en un arreglo ortogonal en la extracción de compuestos (Lupatini, de Oliveira Bispo, Colla, Costa, Canan y Colla, 2017). Este arreglo consta de ocho diferentes tratamientos que combina de diferente forma los factores con sus respectivos niveles. Este método es un diseño factorial incompleto que permite probar varias características simultáneamente sin que el número de combinaciones aumente exponencialmente, utilizando un número reducido de ensayos.

Los factores a probar fueron: procesamiento inicial (A), disrupción por microondas (B), solvente (C), volumen de solvente (D), tiempo de exposición al solvente (E), agitación (F) y sonicación (G) (Anexo 2) (Barbano, Díaz, Zhang, Sandrin, Gerken y Dempester, 2015; De Sousa e Silva, Moreira, de Magalhães, Farias, Rocha y Bastos, 2017; Mashhadinejad, Zamani y Sarmad, 2017). Cada factor fue evaluado para dos niveles (Tabla 4), los cuales se pueden observar a detalle en el Anexo 2. El arreglo ortogonal y los tratamientos propuestos por el método de Taguchi donde se combinan los diferentes factores se pueden observar en la Tabla 4. Los

ensayos se realizaron en triplicado (Morillas, 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2017).

Se realizaron controles negativos por triplicado donde se empleó el medio de cultivo sin la microalga para cada uno de los tratamientos, que se unificaron de acuerdo al número de repetición y solvente empleado.

Al final de cada tratamiento, todos los extractos y controles negativos fueron concentrados mediante rotavapor y disueltos en 40 μ l de metanol absoluto grado HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia).

La variable que se midió para evaluar el efecto de los tratamientos fue el número de posibles compuestos obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo), donde se asume que cada pico representa a un compuesto.

Esta es una técnica que emplea un láser UV para ionizar muestras, que son aceleradas mediante un campo magnético y enviadas a un tubo al vacío en el que se separaran en función de la velocidad de vuelo, gracias a su peso y carga (Maldonado, Robledo y Robledo, 2017), MALDI-TOF permitió cuantificar y comparar el número de posibles compuestos obtenidos (picos) para cada tratamiento.

Los extractos crudos y controles negativos se transportaron a la Universidad Amazónica (IKIAM), a cuatro grados centígrados en oscuridad. Para el análisis de las muestras se colocó 1 μ l de cada extracto en la placa del MADI-TOF, 1 μ l de la solución de la matriz: ácido α cyano 4 hidroxicinamico (CHCA) (Barbano et al., 2015) y se realizó la medición en un rango de 0 a 20 000 Daltons (Mello, Meccheri, Bagatini, Rodrigues-Filho y Vieira, 2017). Se utilizó el programa informático AXIMA Shimadzu Biotech MALDI-MS para obtener el número de picos por cada tratamiento, factor, nivel y control evaluado, analizando cada muestra en cuatro rangos: flavonoides (1000-3000 Da), lípidos (1500-6000 Da), alcaloides (1000-2000 Da) y proteínas (2000-20 000 Da) (Barbano, Diaz, Zhang, Sandrin, Gerken y Dempster, 2015; Gurumoorthy y Saravanan, 2016; Pasch, Pizzi, y Rode, 2001; Pasco y Pugh, 2010; Wu, Liang, Zhao y Cai, 2007).

Se unificó el número de picos de los controles negativos y se los eliminó de cada uno de los perfiles obtenidos, para obtener información sobre solo los compuestos provenientes de la microalga, de manera que el medio de cultivo, el solvente y la matriz no intervengan en los resultados.

Siguiendo con el análisis del Método de Taguchi, una vez obtenido el número de picos para cada tratamiento, que equivale al número de compuestos, se calculó el número de picos para cada nivel dentro de cada factor, como se ejemplifica en la Figura 1. Donde se agrupa los resultados de cada nivel sin importar el tratamiento del método de Taguchi.

Finalmente, se realizó un diagrama de caja (Box Plot) que muestra los patrones cualitativos de cada nivel y se utilizó una prueba de ANOVA multifactorial mediante el software estadístico IBM SPSS® Statistics (versión 24), con el fin de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles empleados y el número de picos obtenidos mediante MALDI-TOF (Maldonado, Robledo y Robledo, 2017).

4.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO.

En base a los resultados del método Taguchi, se realizó un diseño unifactorial en triplicado (Morillas, 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017) para evaluar el tipo de solvente (etilacetato y metanol absolutos). Se usó un volumen de inóculo inicial mayor (100 ml de *Chlorococcum* sp.), como se detalla en el protocolo incluido en el Anexo 3, y se analizaron dos variables:

1. Número de compuestos, expresados en número de picos, analizados mediante MALDI-TOF con las mismas especificaciones utilizadas en el ensayo anterior. La concentración a la cual se analizaron las muestras fue 16 mg/ml. Esta variable se evaluó estadísticamente mediante la prueba de t de student (Avanza, Mazza, Martínez y Giménez, 2004) para determinar si hay diferencias entre los solventes en base al número de picos obtenidos.
2. Actividad antimicrobiana (porcentaje de inhibición) frente a *E. coli* y *S. aureus*, para lo cual se realizó el método de determinación de la sensibilidad antimicrobiana por microdilución basado en el protocolo del Clinical Standard and Laboratory Institute (CLSI) (2012), con modificaciones para productos naturales (Bascom-Slack, Arnold y Strobel, 2012), en el que se emplean 10 µl del extracto crudo de concentración final de 0,8 mg/ml disuelto en metanol absoluto y 100 µl de la bacteria a evaluar en una concentración de 0,5 de MacFarland.

Las placas se leyeron a dos diferentes tiempos de incubación (0 y 18 horas) en un lector de microplacas a 630 nm (Microplate Manager 6). Se empleó bacteria con metanol como control negativo y medio con metanol como control positivo de inhibición. Los resultados fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

4.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS.

En base a los resultados del ensayo unifactorial se realizó una extracción utilizando solamente etilacetato al 100%. Se emplearon 500 ml de biomasa y se siguió el protocolo del Anexo 4. Este extracto (ChIE.3) se evaluó en primera instancia frente cepas de *E. coli* y *S. aureus* sin resistencia antibiótica, si el extracto mostraba bioactividad sobre alguna de estas cepas se procedía a evaluar la capacidad antibacteriana en cepas resistentes; en este caso para seis cepas resistentes de *S. aureus*, clasificadas de acuerdo a CB-QCA.

Para los ensayos, el extracto se evaluó mediante microdilución a una concentración final de 3,2 mg/ml (Bascom-Slack, Arnold y Strobel, 2012). La viabilidad de las bacterias se confirmó sembrando 4 µl de cada pocillo ensayado en medio Mueller Hinton Agar (MHA).

4.8.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre la cepa de *S. aureus* resistente (104C ORSA) que presentó el mayor porcentaje de inhibición (Tabla 5) y se emplearon ocho diluciones seriadas del extracto crudo (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128).

Se complementó los resultados del MIC con la Concentración Bactericida Mínima (CMB), que permite determinar la mínima concentración de un compuesto que impide el crecimiento de una bacteria inoculada (Universidad de Salamanca, 2011), para lo que se sembró 4 µl de cada pocillo de cada dilución ensayada en Mueller Hinton Agar, se dejó secar y se incubó durante 18-24 horas a 37 °C en aerobiosis.

Adicionalmente, se calculó el IC₅₀ (concentración del extracto que muestra la mitad de su efecto máximo inhibitorio) mediante la herramienta virtual IC₅₀ Calculator de AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS.

Las pruebas fenotípicas en conjunto con la tinción Gram corroboraron la identidad de los microorganismos evaluados como *S. aureus* y *E. coli* (Tabla 6 y 7).

Por otro lado, tras realizar método de determinación de la sensibilidad antimicrobiana por difusión con disco para todas las cepas de *S. aureus* (Figura 2-5), se obtuvieron los perfiles de resistencia a antibióticos que se indican en las Tablas 8 y 9.

Adicionalmente se reporta el perfil de resistencia de una cepa de *E. coli* en la Tabla 10 y Figura 6).

Al comparar los perfiles de resistencia obtenidos de *S. aureus* con los previamente reportados por la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA) (Guerrero, 2007), se determinó que únicamente la cepa 104C ORSA perdió la resistencia a STX (Sulfa-Trimetoprima), mientras que los perfiles de resistencia a antibióticos de las demás cepas se han mantenido (Tabla 5).

5.2. AISLAMIENTO DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS DEL PARQUE NACIONAL CAYAMBE-COCA.

Se obtuvieron 21 muestras provenientes de 13 cuerpos de agua (Tabla 3) de la Reserva Ecológica Cayambe-Coca (Figura 7) y se aislaron seis microorganismos fotosintéticos: cuatro microalgas y dos cianobacterias.

Bajo las condiciones de cultivo: fotoperiodo 12 h de luz y 12 h de oscuridad; incubación a temperatura ambiente (20-24 °C); cultivados en medios Nitrofoska o Blue Green 11 (BG11), se aisló y purificó una cepa de microalga: *Chlorococcum* sp. (Chlorococcaceae), a partir de muestra de agua (RECC 2,1) y con la cual se trabajó en los ensayos posteriores.

La purificación de esta cepa se realizó mediante pases consecutivos en placa de Petri con agar Nitrofoska (3 ml/L) sin emplear diluciones, antibióticos o antifúngicos.

5.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS.

Para los seis aislados se realizó la descripción de sus características morfológicas microscópicas de la biomasa obtenida, en base a las cuales se obtuvo su identificación (Tabla 11).

- a) RECC-DM/Chl 2.1 presentó células redondas individuales o agrupadas de color verdoso, con un cloroplasto grande característico en forma de copa, fácilmente visible, dispuestos en un extremo de las células. Internamente presentó abundantes granulaciones y un delgado mucílago (Figura 8), características pertenecientes al género *Chlorococcum* sp.
- b) La microalga RECC-DM/Scn 7.1, identificada como *Scenedesmus* spp. presentó células ovoides verdosas levemente alargadas dispuestas en pares o individualmente, pero principalmente en grupos de cuatro, seis u ocho células unidas paralelamente denominados cenobios. El cloroplasto se encuentra ubicado ligeramente hacia el extremo y los cenobios carecen de espinas o dientes (Figura 9).
- c) El aislado RECC-DM/Ntc 9.1 corresponde a un microorganismo filamentosos largo conformado por células granulares esféricas de color verdoso azulado que se disponían una tras de otra, formando tricomas. También se observó la presencia de heterocistos intercalados entre algunas de las células, estas estructuras fijadoras de nitrógeno son más grandes y hialinas que las células vegetativas (Figura 10), por lo que se identificó a esta cianobacteria como *Nostoc* spp.
- d) RECC-DM/Slp 9.1, se observó células de un color café claro verdoso, que tenían las valvas lanceoladas o elípticas, achatadas antes de llegar a los polos y estos últimos redondeados. El rafe ni el nódulo central no se logra distinguir. Los cloroplastos se encuentran dispuestos en los extremos de las valvas antes de llegar a los polos. En función de esta descripción de las características visualizadas se identificó a este aislado como *Sellaphora* spp. (Figura 11).

Cabe recalcar, que la identificación de diatomeas es complicada, requiere otro tipo de microscopía y de un análisis morfométrico

- e) RECC-DM/Pnb 9.2, identificado como *Pseudoanabaena* spp. presentó tricomas cilíndricos largos de color azul verdoso, formados por células cilíndricas más anchas que largas. Internamente no se aprecian granulaciones ni vesículas. A lo largo del tricoma se observan abundantes septos transversales y las células terminales o apicales son levemente más estrechas sin presencia de caliptra (Figura 12).
- f) La microalga RECC-DM/Klb, 10.1 corresponde a *Klebsormidium* spp, perteneciente al grupo de las Chlorophytas. Presenta filamentos no ramificados formados por células rectangulares uniformes hialinas con contenido verdoso. No presentan ninguna diferenciación entre las células basales o apicales y se encuentran laminadas. Esta microalga carece de estructuras u ornamentaciones como espinas o septos, aunque se aprecia claramente un cloroplasto parietal bien definido (Figura 13).

5.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA RECC-DM/Chl 2.1

Para la cepa RECC-DM/Ch 2.1 se procedió a su identificación molecular. El método de extracción produjo ADN de concentración y pureza adecuada, con valores de 1,89 y 1,96, lo que indica que se encuentran dentro del rango de pureza óptima (1,80 - 2,00) (Tabla 12).

La amplificación de la región ITS, dio como resultado dos amplicones iniciales de 650 y 550 pares de bases. El gradiente de temperatura que se empleó permitió mejorar la especificidad de la reacción, dando como resultado un solo amplicón de 650 pb, que se purificó y concentró en 20 µl. La temperatura de hibridación optimizada fue de 60°C.

El resultado del análisis de la secuencia mediante BLAST (Anexo 5) indicó un 97,35% de identidad para *Chlorococcum* sp., confirmando el género de este aislado (Tabla 13).

5.5. CONDICIONES DE ESCALAMIENTO DE *Chlorococcum* sp.

La cepa RECC-DM/Chl 2.1 se escaló a partir de biomasa obtenida en placas de Petri con medio Nitrofoska, las cuales se colocaron en tubos Falcon con 6 ml de medio en agitación, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a temperatura ambiente de 20-24 °C.

Tras una semana bajo estas condiciones se colocó la biomasa en agitación en un matraz de 100 ml y se aforó a hasta alcanzar 80 ml de medio, se lo selló con Parafilm y se dejó en fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad sin agitación durante tres semanas a temperatura ambiente y se repitió este proceso hasta alcanzar un volumen de 400 ml.

Estas condiciones permitieron la obtención de la biomasa en medio líquido, manteniendo la pureza del cultivo sin la implementación de antibióticos o antifúngicos. Los resultados de la tinción Gram y la siembra en los medios de cultivo indican que el cultivo se encontraba axénico, pues no se observaron microscópicamente agentes contaminantes, ni hubo crecimiento de bacterias u hongos en agar nutritivo y PDA respectivamente.

5.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EMPLEANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF

Se empleó el método de Taguchi L8 (2⁷) siguiendo el diseño experimental de la Tabla 4, resultando en ocho diferentes tratamientos. Los tratamientos del método de Taguchi evaluaron siete factores cada uno con dos niveles (Tabla 4).

Tras la extracción de las biomoléculas se leyó en MALDI-TOF y se utilizó el programa informático AXIMA Shimadzu Biotech MALDI-MS para obtener el número de picos por cada tratamiento del método Taguchi (Tabla 14) y posteriormente se obtuvo el número de picos por cada nivel evaluado (Tabla 15) dentro de cada factor analizado.

Mediante el ANOVA multifactorial, que cumplió con todos los supuestos (Anexo 6), se determinó que el único factor con diferencias significativas entre sus niveles es el “A” (inactivación inicial), en el que se aprecia que al emplear biomasa seca (A2) se obtienen más picos que al emplear biomasa húmeda con inactivación (A1) (Anexo 7). Por

otro lado, el resto de los factores no presentan diferencias significativas entre sus niveles (Figura 15, Anexo 6).

En base a la distribución cuartil del diagrama de cajas (Box Plot) (Figura 15), se establecieron los parámetros para la siguiente extracción, seleccionando los siguientes niveles de cada factor: biomasa seca (A2), sin disrupción por microondas (B2), cantidad de solvente de 1:100 p/v (D2), tiempo de exposición al solvente de 48 horas (E2), con agitación (F1) y con sonicación (G1) (Anexo 2 y 7). No obstante, no se pudo determinar qué solvente es el mejor, por lo que se decidió realizar una segunda extracción con los parámetros previamente mencionados, variando el solvente empleado: etilacetato o metanol al 100%.

5.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DE *Chlorococcum* sp. EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO .

Se realizó una segunda extracción en triplicado mediante un diseño unifactorial, en el que se evaluó dos solventes (etilacetato y metanol al 100%), utilizando los lineamientos establecidos previamente por los resultados del Método Taguchi: biomasa seca, sin microondas, empleando una relación biomasa húmeda: solvente de 1:100 p/v, tiempo de exposición al solvente de 48 horas, en agitación y con sonicación. A partir de 100 ml de cultivo de *Chlorococcum* sp. se obtuvo un extracto con un promedio de $2,63 \pm 0,72$ mg para etilacetato y $3,10 \pm 1,45$ mg para metanol.

Para evaluar el efecto del solvente se analizaron dos variables, el número de compuestos expresados en picos y bioactividad contra bacterias sin resistencia antibiótica.

5.7.1. Cuantificación de números de compuestos mediante MALDI-TOF.

El número de compuestos se obtuvo en base al análisis mediante MALDI-TOF, donde la prueba estadística mostró que no hay diferencias significativas (p value: 0,951) entre los solventes empleados y el número de picos obtenidos (Tabla 16-17 y Anexo 8). En la Tabla 16 se puede apreciar un promedio de 41,33 posibles compuestos (picos) al realizar la extracción con metanol, mientras que el promedio con etilacetato es de 40,67.

5.7.2. Pruebas de microdilución con los extractos obtenidos.

Los análisis de bioactividad se realizaron con bacterias fenotípicamente identificadas como *S. aureus* y *E. coli* sin resistencia antibiótica (Tabla 6 y 7). Según la prueba estadística de Kruskal-Wallis, se determinó que no hay diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición y el solvente empleado (p value: 0.057) contra ninguna de las bacterias evaluadas (Tabla 18 y Anexo 9). Sin embargo, solo se registró bioactividad frente *S. aureus*, en todos los tratamientos (Tabla 18). A pesar de no registrarse diferencias significativas entre los solventes evaluados para ninguna de las variables, para los siguientes ensayos se escogió etilacetato.

5.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS.

La extracción final siguiendo el protocolo del Anexo 4, con los parámetros establecidos por el Método de Taguchi y el diseño unifactorial, permitió obtener un extracto crudo (Chl.E3) de 9,70 mg.

El extracto Chl.E3, a la concentración final de 3,2 mg/ml, no mostró inhibición de *Escherichia coli*, mientras que para *Staphylococcus aureus* se obtuvo un porcentaje de inhibición de 26,19 % (Tabla 19).

La prueba de microdilución del extracto crudo frente seis cepas resistentes de *S. aureus* indicó inhibición para dos cepas: 104 SAUR y 37C ORSA, con porcentajes de inhibición de 39,01% y 16,51% respectivamente (Tabla 5). La prueba de viabilidad bacteriana mostró una acción bacteriostática posterior a la inhibición por el extracto. Cabe recalcar que en función de los resultados de bioactividad de *E. coli* obtenidos en el ensayo anterior, no se evaluó el extracto frente a cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos.

La concentración más alta del MIC y CMB no inhibió completamente la cepa 104 SAUR, por lo que no se reportan valores experimentales para estos parámetros (Tabla 5 y Figura 16-18). Sin embargo, se calculó el valor del MIC mediante la herramienta informática IC₅₀ Calculator de AAT Bioquest, obteniéndose un resultado de 18,79 mg/ml, en el que el porcentaje de inhibición alcanzaría un valor de 100%. Adicionalmente, se calculó el IC₅₀, el cual es la concentración que inhibe el 50% de las bacterias, obteniéndose un resultado de 14,68 mg/ml (Figura 16).

6. DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS.

La identidad de las bacterias utilizadas para los ensayos antimicrobianos, se confirmaron mediante 10 pruebas bioquímicas para *E. coli* y cinco pruebas para Gram positivos respectivamente (Tablas 6 y 7), aunque se recomienda completar la identificación de *S. aureus* con la prueba de DNasa y termonucleasa, pues favorecen y complementan la identificación fenotípica de esta especie bacteriana (MacFaddin, 2003), pruebas que no se llevaron a cabo en el presente estudio. Debido a que estas cepas ya fueron identificadas en la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA), la identidad de estas bacterias es bastante confiable.

Por otro lado, la prueba de Kirby Bauer confirmó los perfiles de resistencia a antibióticos para todas las cepas de *E. coli* y *S. aureus* reportados por la colección anteriormente mencionada, a excepción de *S. aureus* 104C ORSA, en la que se apreció la pérdida de la resistencia a STX (trimetoprima sulfametoxazol). Esto se puede deber principalmente a la ausencia de presión selectiva, pues la bacteria ha sido sembrada en medios sin antibióticos por varias generaciones y ha experimentado una pérdida o inestabilidad plasmidial (Andersson y Hughes, 2011, Standley, Million-Weaver, Alexander, Hu y Camps, 2018).

6.2. AISLAMIENTO DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS.

Se muestrearon diferentes lagunas, ríos y cascadas artificiales a lo largo de 13 lugares del Páramo de la Virgen en el Parque Nacional Cayambe-Coca (Anexo 10) y se aislaron seis géneros pertenecientes a tres Fílum. Al comparar con el estudio de Guamán y González (2016), en donde se analiza la diversidad de estos microorganismos para el mismo parque nacional, se observa una similitud en el número de géneros identificados, a pesar de tener un muestreo y procesamiento diferente. Uno de los aportes de este estudio es que se identificó un género del Filo Bacillariophyta, que no ha sido reportado previamente en esta localidad (Guamán y González, 2016). Sin embargo, cerca de 80% los géneros reportados no coinciden entre ambos estudios, lo que sugiere que existe una diversidad de estos microorganismos todavía inexplorada.

En cuanto a los métodos de aislamiento, se empleó la técnica de placa en agar, sugerida por Arredondo-Vega y Voltonia (2007). No obstante, las muestras tenían la presencia de bacterias y hongos, además de las microalgas y cianobacterias, por lo que se

esperaba que con siembras consecutivas se lograra aislar los microorganismos fotosintéticos. Sin embargo, esto no fue así, de los seis aislados obtenidos se logró obtener un cultivo axénico solo de RECC-DM/Chl 2.1, que se identificó como *Chlorococcum* sp. (Figura 8 y Tabla 11) que pertenece a las Chlorophytas. Este Fílum posee microorganismos que son aislados con mayor frecuencia, pues son más abundantes y poseen una mejor adaptación que otras microalgas y cianobacterias (Flores-Moya, Costas, Bañares-España, García-Villada, Altamirano y López-Rodas, 2005; Masojídek, Torzillo, Koblížek, Kopecký, Bernardini, Sacchi y Komenda, 1999).

Arredondo-Vega y Voltonia (2007), recomiendan realizar la técnica de aislamiento en placa en agar en combinación con otras técnicas. Una de las sugerencias para purificar estos microorganismos de hongos y bacterias es el cultivo mediante diluciones seriadas, sin embargo, esta técnica no se realizó en este estudio, pues una de sus limitaciones es que, si la microalga es de crecimiento lento, las bacterias presentes en las muestras colonizarían el medio más rápido, dificultando su separación (Pumarola, 1999).

Otra alternativa sugerida por varios autores para la eliminación de bacterias y hongos es el empleo de antibióticos o antifúngicos específicos en función de la especie de interés (Arredondo-Vega y Voltonia, 2007; Mahan, Odom y Herrin, 2005). Se utilizó la combinación de penicilina/estreptomicina de 10 000 unidades al 0,1% inicialmente, pero al observar la persistencia de bacterias se aumentó la concentración al 1%. El incremento del antibiótico provocó un descenso en la densidad poblacional que condujo a la muerte de los microorganismos fotosintéticos. Esto probablemente se debe a que la tolerancia de estos microorganismos es muy variable, y se sugiere una evaluación de otros antibióticos y antifúngicos a diferentes concentraciones (Mahan, Odom y Herrin, 2005).

El uso de diferentes medios de cultivo, puede favorecer al crecimiento, aislamiento y purificación de microalgas y cianobacterias. Se emplearon dos medios para el aislamiento: Nitrofoska, debido a que es económico y apto para el cultivo de Chlorophytas (Maldonado, Morales y Romero, 2014) y BG11 debido a que permite el crecimiento de algunas de microalgas y cianobacterias principalmente (Dubey, Parveen y Rout, 2016). Para incrementar el número de microorganismos fotosintéticos aislados se recomienda el uso de otros medios de cultivo como Zarrouk o Jordan (*Spirullina* spp. o *Arthrospira* spp.), Medio Basal Bold (para Euglenophytas y otras Chlorophytas) y F/2 suplementado con sílice o también conocido como Medio de Guillard para diatomeas (Arévalo y Ontaneda, 2016; European Regional Development Fund, 2017).

Por otro lado, un factor que podría modificarse para obtener más cepas es la temperatura (Converti, Casazza, Ortiz, Perego y Del Borghi, 2009; Xin, Hong-Yind y Yu-Ping, 2011). Para el cultivo de microalgas y cianobacterias provenientes de ambientes extremos como los páramos, se recomienda realizar el aislamiento a temperaturas similares (Guamán y González, 2016). Estos ecosistemas presentan un clima de alta montaña tropical, con una gran amplitud térmica durante el día (Llambí, Soto-W, Céleri, De Bievre, Ochoa y Borja, 2012), lo que dificulta escoger la temperatura adecuada. En esta investigación se incubaron los microorganismos fotosintéticos a temperatura ambiente, 20-24 °C. Se sugiere cultivarlos a temperaturas bajas aproximadamente de 10 °C (Guamán y González, 2016; INAMI, 2018) y tratar de incrementar gradualmente hasta alcanzar la temperatura óptima de crecimiento, pues Hernández-Pérez y Labbé (2014) mencionan que la producción algal es directamente proporcional a la temperatura.

6.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.

En el presente estudio, se realizó la identificación morfológica mediante microscopía óptica de los seis aislados.

La identificación de *Chlorococcum* sp. (RECC-DM/Chl 2.1) se realizó en base al Catálogo de Microalgas y Cianobacterias del Ecuador, la cual concuerda con las características descritas en los resultados para este aislado. Sin embargo, es importante mencionar que este género es morfológicamente muy parecido a *Chlorella* spp. por lo que la identificación molecular fue importante en este estudio y confirmó la identificación morfológica (Hadi et al., 2016).

Los aislados RECC-DM/Scn 7.1; RECC-DM/Ntc 9.1 y RECC-DM/Klb 10.1 presentaron características particulares que permitieron su identificación al compararlos con las claves y publicaciones empleadas (Guamán y González, 2016; Núñez, Marciales y Beltrán, 2008; Wehr, Sheath y Kociolek, 2015). Estos aislados pertenecen a los géneros *Scenedesmus*, *Nostoc* y *Klebsormidium* respectivamente.

Por otro lado, los aislados RECC-DM/Slp 9.1 y RECC-DM/Pnb 9.2 presentan características que si bien pueden ser distintivas para los géneros *Sellaphora* y *Pseudanabaena* (Núñez, Marciales y Beltrán, 2008; Wehr, Sheath y Kociolek, 2015), no son conclusivas para asegurar la identificación de los géneros mencionados y se recomienda el uso de microscopía electrónica (Morales, Mosquera y Rivas, 2008).

De acuerdo con Guamán y González (2016), la identificación en base a microscopía óptica para la observación de características morfológicas de microalgas y cianobacterias es importante para su identificación, debido a que, a diferencia de bacterias y hongos, estos microorganismos fotosintéticos poseen una diversidad muy amplia de formas, estados, agrupaciones, pigmentos, productos de almacenamiento intracelulares y características que permiten llegar a su identificación aun cuando no se encuentren puros los cultivos, como en este estudio.

No obstante, debido a las limitaciones que tiene la identificación de algunas microalgas y cianobacterias, se sugiere emplear complementariamente otro tipo de identificación como MALDI-TOF si se tiene acceso a la base de datos, la identificación mediante técnicas moleculares para cultivos axénicos y microscopía electrónica, especialmente en el caso de diatomeas (Morales, Mosquera y Rivas, 2008).

Estos géneros identificados morfológicamente en este estudio se han registrados en ambientes similares al Páramo de la Virgen dentro del Parque Nacional Cayambe-Coca (lugar de muestreo) como el Parque Nacional Sangay, Reserva Ecológica Antisana, Reserva Ecológica Ilinizas, Laguna Magdalena y Laguna de Chinchillas (Guamán y González, 2016).

6.4. IDENTIFICACIÓN MOLÉCULAR DE MICROALGAS.

La identificación molecular de microalgas, debido a su gran diversidad es muy complicada. Se desconoce qué primers universales emplear para una amplificación exitosa, siendo un tema que aún no ha llegado a un consenso. Diversos estudios proponen el uso de diferentes regiones como ITS, *rbcL*, 18S, CAT, *matK*, entre otros (Abed, Abdulhasan y Najem, 2018; Radha, Aliya, Iyappan y Ramya, 2013; Sehgal, Goswami, Pal, Chikkaputtaiah, Chetia y Boruah, 2019; Sherwood y Presting, 2007), pero aún es complicada la determinación de cebadores universales para estos microorganismos.

El IBOL (International Barcode of Life) (2019), ha sugerido primers solo para microalgas con alta producción de lípidos, lo cual excluye gran parte de la diversidad de estos microorganismos.

Esta discrepancia y falta de información concluyente se debe a que las microalgas, sobre todo las Chlorophytas, son un grupo altamente diverso y ninguno de los cebadores mencionados permiten la identificación de los diferentes linajes identificados (Sehgal, Goswami, Pal, Chikkaputtaiah, Chetia y Boruah, 2019; Sherwood y Presting, 2007). Se propuso una solución, al usar dos pares de cebadores (*rbcL* y *matK*), sin embargo, el

blanco de este último no está disponible en Chlorophytas (Hadi, Santana, Brunale, Gomes, Oliviera, Matthiensen, Oliviera, Silva, y Brasil, 2016).

No obstante, se ha visto buenos resultados al emplear la región del espaciador transcrito interno (ITS1 e ITS4) para la identificación de microalgas, teniendo un éxito de secuenciación de 92,15% (Hadi et al., 2016). En este estudio se emplearon estos primers, lográndose amplificar esta región para el aislado de *Chlorococcum* sp. (RECC-DM/Chl 2.1). Sin embargo, el protocolo de la PCR sugerido tuvo que ajustarse y se realizó una gradiente de la temperatura de hibridación. Al emplear una temperatura de 60°C, se mejoró la especificidad de la reacción y con esto se pudo realizar la secuenciación y posterior análisis, confirmando la identidad de este microorganismo hasta nivel de género (Tabla 13).

Se sugiere que para la identificación de esta microalga hasta nivel de especie se utilice la región de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (*rbcL*) del genoma del cloroplasto, pues tiene un éxito en la secuenciación de un 82.35% (Hadi et al., 2016) y ha sido utilizado para identificación de Chlorophytas.

6.5. ESCALAMIENTO DE MICROALGAS.

Una de las principales limitantes para el escalamiento fue el tiempo de crecimiento de los microorganismos fotosintéticos. Se estima que las Chlorophytas tienen un tiempo de generación que puede variar entre 1,14 horas hasta 51 horas, dependiendo de las condiciones de cultivo (Astocondor, Huataco, Terreros y Delgado, 2017; Rodas-Gaitán, Rodríguez-Fuentes, Flores-Mendiola, Vidales-Contreras, Aranda-Ruiz y Luna-Maldonado, 2012). Sin embargo, el lento crecimiento de esta cepa de *Chlorococcum* sp. indica que posee un tiempo de generación mayor, dificultando la obtención de biomasa.

Para mejorar el crecimiento del cultivo se decidió probar diferentes condiciones lumínicas. Estudios han demostrado que la intensidad lumínica es un factor fundamental del crecimiento (Vásquez-Villalobos, Vergaray, Méndez, Barrios, Baquedano, Caldas, Cruz, Gamboa y Rivera, 2017; Villa, Herazo y Torregrosa, 2014). Una intensidad muy baja de luz limita el crecimiento de las microalgas y una exposición excesiva puede conllevar a una fotooxidación (Vásquez-Villalobos et al., 2017). De igual manera, se ha determinado que en algunos géneros no hay diferencias en el crecimiento al emplear un fotoperiodo de 12/12 o 24/0 (luz/oscuridad) (Krzemińska, Pawlik-Skowrońska, Trzcińska y Tys, 2014; Vásquez-Villalobos et al., 2017). Para *Chlorococcum* sp. se obtuvieron

mejores resultados con una intensidad lumínica intermedia y cuando se aplicó un fotoperiodo de 12/12 (luz/oscuridad).

Otra condición que se ensayó para mejorar el crecimiento de *Chlorococcum* sp. fue la aireación. Se conoce que este factor es muy importante para el desarrollo microalgal, pues sin este el crecimiento es mucho menor y limitado (Martínez y Orús, 1991; Mujtaba, Choi, Lee y Lee, 2012; Takashima, Shihiraishikawa y Hase, 1964). Sin embargo, se optó por no airear los matraces con bombas de acuario, cerrándolos completamente con Parafilm para eliminar la contaminación por hongos. No obstante, se recomienda realizar la agitación con un tanque de CO₂ para promover el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos (Abou-Shanab, Kumar y Hwang, 2014).

Adicionalmente, se sembró al aislado RECC/DM.Chl 2.1 en los dos medios empleados en el estudio, observando menor crecimiento microalgal en el medio BG11, que en Nitrofoska, por lo que se decidió seguir cultivándolo y escalando a las microalgas en este último. A pesar de que se conocen los requerimientos nutricionales de las microalgas como *Chlorella* spp., *Chlamydomonas* spp., *Scenedesmus* spp., se sugiere seguir afinando la metodología para el crecimiento y posterior escalamiento a volúmenes medianos de la cepa nativa estudiada.

6.6. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS APLICANDO EL MÉTODO DE TAGUCHI Y ANÁLISIS MEDIANTE MALDI-TOF.

El método de Taguchi es un diseño experimental incompleto que permite la comparación de diversos parámetros simultáneamente con pocas combinaciones, empleando un número reducido de ensayos, siendo ideal para estudios con baja disponibilidad de materiales (Athreya y Venkatesh, 2012; University of Texas, 2013). En el presente ensayo, al emplear el Método de Taguchi se realizaron ocho tratamientos por triplicado con sus controles respectivos, lo cual demuestra que se puede evaluar varios factores con una menor cantidad de experimentaciones. Mientras que, si se hubiese realizado un factorial completo, para evaluar todas las combinaciones de los siete factores con dos niveles cada uno, se hubiesen necesitado 128 (2⁷) tratamientos con sus controles respectivos por triplicado, lo cual no se hubiese podido hacer al mismo tiempo, o con el mismo cultivo (debido a su lento crecimiento) y hubiese afectado el procesamiento posterior de las muestras y limitado el acceso a su análisis por MALDI-TOF.

En este estudio el método de Taguchi fue apropiado debido a que, si se lo emplea en las primeras etapas del desarrollo de un proceso, como el método propuesto en este estudio resulta más efectivo (University of Texas, 2013). Esto se evidenció en los resultados, debido a que se pudo probar siete factores, dentro de los cuales se escogieron los niveles más adecuados al emplear un volumen pequeño (1 ml). Lo interesante de este método es que tuvo resultados similares a los obtenidos cuando se empleó un diseño unifactorial completo para uno de los factores (solvente), incluso cuando se utilizó un volumen mayor en este último (100 ml), debido a que no hubo diferencias significativas entre el número de picos obtenidos en ambos diseños experimentales. Lo cual demuestra que con los resultados del Método de Taguchi se pudo mejorar el método de extracción.

Sin embargo, el método de Taguchi posee varias limitaciones, pues la obtención de resultados puede ser relativa y no permite ver fácilmente que parámetro tienen mayor efecto, es decir, no permite observar interacciones entre los factores. Por otro lado, debido a que no evalúa todas las combinaciones posibles, no debe emplearse cuando se necesita observar el efecto de las interacciones de las variables (University of Texas, 2013). En el estudio, un limitante fue la repetitividad, pues la desviación estándar fue mayor en el Método de Taguchi que al emplear el diseño unifactorial. Esto se debe probablemente al volumen inicial que se utilizó en ambos ensayos. Por lo que se recomienda el uso de volúmenes mayores a los empleados en el Método de Taguchi.

Adicionalmente, cada uno de los extractos resultantes de los tratamientos se analizaron mediante la técnica espectrofotométrica MALDI-TOF, es una herramienta ampliamente empleada para la identificación bacteriana en función del perfil proteico, aunque su uso se ha extendido a hongos y otros microorganismos (Danielewicz, Anderson y Franz, 2013; Hae-Won, Seong, Kichul, Kil-Nam, In-Tae, Kyung, Hye, Young-Do y Tatsuya, 2015). Sin embargo, su utilización no solo se limita a la detección de proteínas, sino que, dependiendo de la matriz empleada, se pueden usar para la detección de diferentes metabolitos como taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, carotenoides, xantofilos, compuestos fenólicos, esteroides, lípidos y carbohidratos (Silva, Pepporine y Silva, 2016). El uso de esta técnica permitió la obtención de datos cuantitativos acerca del número de posibles compuestos extraídos (Anexo 11) a partir de *Chlorococcum* sp.

El interés de la detección de una gran variedad de biomoléculas se debe a que los metabolitos antimicrobianos de las microalgas incluyen varios grupos de compuestos (Barbano et al., 2015). Debido a reportes de actividades antimicrobianas de microalgas en trabajos previos, se incluyeron rangos específicos para flavonoides, lípidos, alcaloides

y proteínas (Barbano, Diaz, Zhang, Sandrin, Gerken y Dempster, 2015; Gurumoorthy y Saravanan, 2016; Pasch, Pizzi, y Rode, 2001; Pasco y Pugh, 2010; Wu, Liang, Zhao y Cai, 2007), algunas moléculas no fueron tomadas en cuenta para el análisis y podrían incluirse al utilizar otro tipo de matriz.

En el estudio se utilizó la matriz CHCA (ácido α cyano 4 hidroxicinámico), que se usa principalmente para proteínas, pero también puede emplearse para flavonoides, aflatoxinas, taninos, saponinas, algunos carbohidratos y otras moléculas antes mencionadas. No obstante, autores como Silva, Lopes y Silva (2016), sugieren el uso de la matriz DHB (2,5 ácido dihidroxibenzóico), pues permite la obtención de resultados de una mayor cantidad de biomoléculas y metabolitos que no se pueden analizar con la otra matriz, como alcaloides, carotenoides, taninos, flavonoides, fosfolípidos, lípidos y algunos compuestos hidrocarbonados. Por lo que se recomienda el uso de esta última en conjunto con la CHCA para ampliar el rango de moléculas estudiadas.

Adicionalmente, al eliminar los compuestos que presentaron los controles se eliminó ruido o detecciones que se deben al medio de cultivo y solvente utilizado donde se encontraba la microalga y no a un compuesto producido por los microorganismos, reduciendo sesgos en el número de moléculas obtenidas. Cabe mencionar que el número de picos obtenidos es un aproximado del número de compuestos presentes, debido a que dos picos pueden representar una misma molécula, pero esto sucedería en todos los tratamientos por igual, por lo que un mayor número de picos sí implica un mayor número de biomoléculas.

6.7. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EVALUANDO EL SOLVENTE EMPLEADO.

Metanol y etilacetato al 100% han sido utilizados para extraer biomoléculas en microalgas (Cicci, Sed y Bravi, 2017; Desai, Streefland, Wijffels y Eppink, 2016; Gall, Lelchat, Hupel, Jégou y Stiger-Pouvreau, 2015; Mattos, Romasnos, de Sousa, Sassaki y Barreto-Bergter, 2011; Prakash, Seshikala y Singara, 2007; Uma, Sivasubramanian y Devaraj, 2011). En el ensayo se observó que no hay diferencias significativas entre el número de biomoléculas obtenidas al utilizar ambos solventes. No obstante, se desconoce la identidad de esos compuestos, por lo que es posible que existan diferencias a ese nivel.

El metanol es un solvente levemente más polar que permite la extracción de metabolitos como aminoácidos, azúcares, glucolípidos, lípidos, antioxidantes, alcoholes y carotenoides (Mattos, Romasnos, de Sousa, Sassaki y Barreto-Bergter, 2011; Prakash,

Seshikala y Singara, 2007; Uma, Sivasubramanian y Devaraj, 2011). Mientras que al emplear el etilacetato como solvente se pueden obtener más variedad de compuestos, que incluyen astaxantina (pigmentos), taninos, ácidos grasos, proteínas, carbohidratos, saponinas, alcoholes, carotenoides, alcaloides y flavonoides (Bhagavathy, Sumathi y Jancy, 2011; Desai, Streefland, Wijffels y Eppink, 2016; Gall, Lelchat, Hupel, Jégou y Stiger-Pouvreau, 2015; Rajesh, Raja, Rathi y Sahayaraj, 2012).

Es importante mencionar, que el o los compuestos presentes en el extracto crudo que inhiben el crecimiento bacteriano, no se han visto afectados por el solvente empleado (etilacetato o metanol), debido a que no se evidencia una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, en los ensayos donde se evaluó la capacidad antimicrobiana frente a estas dos bacterias.

Estos resultados concuerdan con investigaciones que han reportado mejores resultados de bioactividad frente a microorganismos patogénicos cuando se realiza una extracción de biomoléculas con etilacetato que con metanol (Patra, Patra, Mahapatra, Thatoi, Das, Sahu y Swain, 2009).

Al enfrentar extractos crudos de microalgas obtenidos a partir de etilacetato ante varias bacterias (*S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. brevis*, *S. flexneri* y *V. cholerae*) y hongos (*C. albicans*, *A. niger* y *A. flavus*), se observó inhibición en todas las cepas. Mientras que los extractos con metanol tienen menor bioactividad (Bhagavathy, Sumathi y Jancy, 2011; Patra et al., 2009). No obstante, la repetibilidad fue mayor en etilacetato, por lo que se empleó en el siguiente protocolo de extracción. Adicionalmente, se sugiere emplear otros solventes con diferente polaridad para ver si se obtienen otro tipo de compuestos.

6.8. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

Después de probar varias metodologías para la obtención de biomoléculas (Método de Taguchi y el diseño unifactorial) y estandarizar el protocolo de extracción se realizaron pruebas de inhibición frente una bacteria Gram positiva (*S. aureus*) y otra Gram negativa (*E. coli*). Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la bioactividad de los extractos crudos es mayor frente a *S. aureus*, mientras que en *E. coli* es casi nula.

Varios estudios realizados por Uma, Sivasubramanian y Devaraj, (2011); Ghasemi et al., (2007); Andrade, (2018); Debro y Ward, (1979), muestran que la actividad

antimicrobiana de los extractos crudos de Chlorophytas (sobre todo, de especies de *Chlorella* como *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* y *C. ellipsoidea*, así como de *Chlorococcum humicola*) es mayor frente a bacterias Gram positivas como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* que frente a bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, en esta última se ha visto incluso que no hay bioactividad o la inhibición es muy reducida. Esto puede deberse a la membrana extracelular que está presente en las bacterias Gram negativas le podría dar una protección adicional (Andrade, 2018). En el presente estudio se evaluaron dos bacterias, de las cuales una era Gram negativa, por lo que se recomienda evaluar otras bacterias Gram negativas, para la ver si este patrón de inhibición nula o reducida se mantiene para este extracto evaluado o sólo es inefectivo frente a *E. coli*. Si este no se mantiene, el mecanismo de acción podría estar relacionado con la inhibición de la síntesis de peptidoglicano. Por otro lado, si este patrón de resistencia en Gram negativos persiste, podría indicar que el compuesto bioactivo es muy grande y por lo tanto incapaz de atravesar la membrana extracelular bacteriana (Andrade, 2018).

Se realizaron pruebas para evaluar la capacidad antibacteriana del extracto frente a seis cepas resistentes de *S. aureus* que fueron seleccionadas por tener una de las siguientes resistencias cefalosporinas, macrólidos, β -lactámicos, tetraciclinas, quinolonas o sulfonamidas (Tabla 5), donde se aprecia que *S. aureus* 104C ORSA, tuvo un porcentaje de inhibición de 39,01%. Esta cepa mostró ser resistente frente a gentamicina, penicilina y cefoxitín. Adicionalmente, mostró resistencia intermedia para clindamicina, lo cual llama la atención, pues es un antibiótico que, en algunos casos, se puede emplear como opción terapéutica frente a infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) (CLSI, 2019; Silvagni, Guillen, Rodríguez, Espínola, Grau y Velázquez, 2019).

El extracto al inhibir a esta bacteria muestra su gran potencial para seguir evaluando su capacidad antibacteriana, pues la clindamicina es un antibiótico que se puede utilizar para tratar infecciones causadas por *S. aureus* meticilino resistentes que son sensibles a este antibiótico (Mensa et al., 2014).

El valor aproximado del MIC e IC₅₀ es igual o mayor en comparación con otros estudios (Ghasemi, Moradian, Mohagheghzadeh, Shokravi y Hossein, 2007; Maadane, Merghoub, Mernissi y Tarik, 2017) y es un factor a considerar en los ensayos de citotoxicidad que se realicen a futuro.

7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron por microscopía óptica dos cepas de cianobacterias *Nostoc* spp. y *Pseudoanabaena* spp., y cuatro de microalgas *Chlorococcum* sp., *Scenedesmus* spp., *Sellaphora* spp. y *Klebsormidium* spp., provenientes del Parque Nacional Cayambe-Coca.
2. Se purificó un solo aislado, la cepa RECC-DM/Chl.2.1, *Chlorococcum* sp., cuya identificación fue confirmada con análisis moleculares y se utilizó en los ensayos posteriores.
3. De los siete factores evaluados en el Método de Taguchi, se determinó que el procesamiento inicial es el único factor que presentó diferencias entre sus niveles. El uso de biomasa seca en el proceso de la extracción produce un mayor número de compuestos.
4. Al realizar el diseño experimental unifactorial, en el que se evaluó el solvente, se corroboraron los resultados del Método de Taguchi. A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los solventes, se seleccionó el etilacetato para los pasos posteriores.
5. Se observó que los extractos obtenidos presentan mayor bioactividad frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que la inhibición frente a *Escherichia coli* fue menor o casi nula.
6. Se evaluaron seis cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, de las cuales *S. aureus* 104C ORSA, que presenta resistencia intermedia a la clindamicina, fue inhibida por el extracto en concentraciones similares o mayores a las reportadas para otros extractos de microalgas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, I., Abdulhasan, G. y Najem, A. (2018). GENOTYPE VERSUS PHENOTYPE TO DETERMINE THE DEFINITIVE IDENTIFICATION OF THE GENERACHLORELLA BEIJERINCK, 1890 (CHLORELLACEAE) AND COELASTRELLACHODAT, 1922 (SCENDESMACEAE). *Bull. Iraq nat. Hist*, 15(1), p.p. 101-111. Recuperado de <http://jnhm.uobaghdad.edu.iq/index.php/BINHM/article/view/27/14>
- Abed, R., Dobretsov, S. y Sudesh, K. (2009). Application of cyanibacteria in biotechnonology. *Journal of Applied Microbiology*, 106, p.p. 1-12. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/287103697_Application_of_cyanobacteria_in_biotechnology
- About-Shanab, R., Kumar, M. y Hwang, J. (2014). Influence of CO₂ and light spectra on the enhancement of microalgal growth and lipid content. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 6(6). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/269096292_Influence_of_CO2_and_light_spectra_on_the_enhancement_of_microalgal_growth_and_lipid_content
- Aguayo, A., Mella, S., Riedel, G., Bello, H., Domínguez, M. y González-Rocha, G. (2016). Colistin in the post-antibiotic era. *Revista Chilena de Infectología*, 33(2), p.p. 166-176. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000200006
- Ahmed, A. (1999). Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix Parietina*. *Research Gate*, 8, p.p. 33-37. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/222939525_Antibiotic_production_by_the_cyanobacteria_Oscillatoria_angustissima_and_Calothrix_Parietina
- Andersson, D. y Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), p.p. 901–911. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707669>
- Andrade, N. (2018). Antibacterial activity of freshwater green microalgae isolated from water bodies near abandoned mine sites in Ontario, Canada. (Tesis de Pregrado), Laurentian University, Ontario, Canada. Recuperado de

<https://pdfs.semanticscholar.org/af3c/7010e34da3791df3d3d3dfa971af0d42a28c.pdf>

- Angles, E. (2018). Rational use of antimicrobials and bacterial resistance. Where do we go? *Rev. Med. Hered*, 29, p.p. 3-4. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v29n1/a01v29n1.pdf>
- Aquiahuatl, M., y Pérez, M. (2012). Manual De Prácticas De Microbiología General. Recuperado de: http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf
- Arévalo, A. y Ontaneda, D. (2016). Manual de Laboratorio Ficología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Arredondo-Vega, B. y Voltonia, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Ciudad de México, México. CONACYT.
- Arrieta, E. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14(1), p.p. 8-12. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/266730483_Aplicaciones_biotecnologicas_de_las_microalgas_Biotechnologic_uses_of_microalgae
- Astocondor, M., Huataco, E., Terreros, H. y Delgado, R. (2017). Population growth and productivity of the native microalga *Chlorella peruviana* under different salinities. *Rev. Inv Vet Perú*, 28(4), p.p. 976-986. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a23v28n4.pdf>
- ATCC. (2020). *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™). Recuperado de <https://www.atcc.org/products/all/25922.aspx>
- Athreya, S. y Venkatesh, Y. (2012). Application Of Taguchi Method For Optimization Of Process Parameters In Improving The Surface Roughness Of Lathe Facing Operation. *International Refereed Journal of Engineering and Science*, 1(3), p.p. 13-19. Recuperado de <http://irjes.com/Papers/vol1-issue3/Version%201/C131319.pdf>
- Avanza, M., Mazza, S., Martínez, G. y Giménez, L. (2004). Uso de transformaciones para el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, para

- modelos lineales. Recuperado de: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/05-Agrarias/A-033.pdf>
- Barbano, D., Díaz, R., Zhang, L., Sandrin, T., Gerken, H. y Dempester, T. (2015). Rapid Characterization of Microalgae and Microalgae Mixtures Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS ONE*, 10(8). Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135337>
- Bascom-Slack, A., Arnold, E. y Strobel, A. (2012). Supplementary Materials for Student-Directed Discovery of the Plant Microbiome and Its Products. *Science* 338, 485: 1-67.
- Becton Dickinson. (2005). Patrón de turbidez BBL preparado. MacFarland Turbidity Standard No.0,5. Recuperado de https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421%280205%29_es.pdf
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. y Jancy, I. (2011). Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1). Recuperado de <https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169111601111#>
- Bloor, S. y England, R. (1989). Antibiotic production by the cyanobacterium. *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology*, 1(4), p.p. 367-372. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00003474>
- Bush, L. (2015). Infecciones por E. coli. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-escherichia-coli#>
- Camacho, M. (2013). Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. Recuperado de: <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/anales/article/download/1241/1227/>.
- Cicci, A., Sed, G. y Bravi, M. (2017). Potential of Choline Chloride – Based Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) in the Extraction of Microalgal Metabolites. *Italian Association of Chemical Engineering*, 57, p.p. 61-65. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/af91/e2a328faf7d75269d451b9c9eb1656971ba8.pdf>

- Clinical Standard and Laboratory Institute. (2012). Método De Determinación De Sensibilidad Antimicrobiana Por Dilución. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. y Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), p.p. 1146–1151. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255270109000415>
- Danielewicz, M., Anderson, L. y Franz, A. (2013). Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 54, p.p. 290-305. Recuperado de <http://www.jlr.org/content/54/1/290.full.pdf+html>
- De Sousa e Silva, A., Moreira, M., de Magalhães, T., Farias, L., Rocha, P. y Bastos, P. (2017). Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), p.p. 2101–2106. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343717301446>
- Debro, L. y Ward, H. (1979). Antibacterial Activity of Freshwater Green Algae. *Planta Medica*, 36(8), p.p. 375–378. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0028-1097284>
- Desai, R., Streefland, M., Wijffels, R. y Eppink, M. (2016). Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids. *Green Chemistry*, 18(5), p.p. 1261–1267. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/gc/c5gc01301a/unauth#!divAbstract>
- Diana, H., Reginald, M., y Parthipan, B. (2014). Antibiotic activity of Cyanobacteria isolated from salt pans of Kanyakumari District (South India) against human pathogenic bacteria. *Journal of Science*, 11, p.p. 32-39. Recuperado de:

- <http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/Antibact%20of%20Cyanobact.pdf>
- Doyle, E. y Dolores, E. (1996). *Medical Microbiology*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7710/>
- Dubey, K., Parveen, S. y Rout, S. (2016). Influence of BG-11 culture media on growth of Cyanobacteria, Oscillatoria Species. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/319356355_Influence_of_BG-11_culture_media_on_growth_of_Cyanobacteria_Oscillatoria_Species
- European Regional Development Fund. (2017). *Microalgae strains catalogue*. Recuperado de <https://www.enhancemicroalgae.eu/wp-content/uploads/2019/09/EMA-Strain-Catalogue.pdf>
- Farfán-García, A., Ariza-Rojas, S., Vargas-Cárdenas, F. y Vargas-Remolina, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Chil. Infecto*, 33(4), p.p. 438-450. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n4/art09.pdf>
- Fernández, A., García, C., Sáenz, J. y Valdezate, S. (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Flores-Moya, A., Costas, E., Bañares-España, E., García-Villada, L., Altamirano, M. y López-Rodas, V. (2005). Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through preselective mutations. *New Phytologist Trust*, 166(2). Recuperado de <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2005.01325.x>
- Gall, A., Lelchat, F., Hupel, M., Jégou, C. y Stiger-Pouvreau, V. (2015). Extraction and Purification of Phlorotannins from Brown Algae. *Natural Products From Marine Algae*, p.p. 131–143. Recuperado de https://sci-hub.se/https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2684-8_7
- García, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. *Sanid. Mil*, 69(4). Recuperado de

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712013000400003

- Garza-Velasco, R., Zuñiga-Rangel, O. y Perea-Mejía, L. (2013). La importancia clínica actual de *Staphylococcus* en el ambiente intrahospitalario. *Educ. Quím*, 24(1), p.p. 8-13. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v24n1/v24n1a2.pdf>
- Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S. y Hossein, M. (2007). Antifungal and Antibacterial Activity of the Microalgae Collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of Antimicrobial Activity of *Chroococcus dispersus*. *Journal of Biological Sciences*, 7, p.p. 904-910. Recuperado de <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=jbs.2007.904.910>
- Gnanamani, A., Hariharan, P. y Paul-Satyaseela, P. (2017). *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/frontiers-in-i-staphylococcus-aureus-i-/staphylococcus-aureus-overview-of-bacteriology-clinical-diseases-epidemiology-antibiotic-resistance->
- González, C., Maribel, J., Mena, P. y Armindo, J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Scielo*, 38(1), p.p. 18-35. Recuperado de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003
- Guamán, M., y González, N. (2016). Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Recuperado de: http://www.academia.edu/36570470/Catlogo_de_Microalgas_y_Cianobacterias_del_Ecuador
- Guerrero, S. (2007). *Susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus y su relación con el perfil plasmidial*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Gurumoorthy, P. y Saravanan A. (2016). Biofuel Production from Microalga *Nannochloropsis oculata* using Dairy Industry Wastewater. *International Journal of ChemTech Research*, 9(5), p.p. 346-351. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Saravanan_Arumugam5/publication/30399

- 7743_Biofuel_Production_from_Microalga_Nannochloropsis_oculata_using_dairy_industry_waste_water/links/5834116808ae102f0736cc86/Biofuel-Production-from-Microalga-Nannochloropsis-oculata-using-dairy-industry-
- Hadi, S. Santana, H., Brunale, P., Gomes, T., Oliviera, M., Matthiensen, A., Oliviera, M., Silva, F., y Brasil, B. (2016). DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *PLOS ONE*, 11 (2), p.p. 1-18. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767179/pdf/pone.0149284.pdf>
- Hae-Won L., Seong, R., Kichul C., Kil-Nam, K., In-Tae, C., Kyung, Y., Hye, S., Young-Do, N. y Tatsuya, O. (2015). Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Elsevier*, 132, p.p. 630-634. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914014008108?via%3Dihub>
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), p.p. 157-173. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- Hofstede, R., Segarra, P. y Mena, R. (2003.). Los Páramos del Mundo. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Recuperado de: <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56486.pdf>
- Ibarra, P. (2017). Prevalencia de Escherichia coli productora de Beta- Lactamasas de espectro extendido (BLEE) en urocultivos en pacientes de consulta externa en el Hospital San Francisco de Quito en el periodo de octubre 2016 – abril 2017. (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12780/1/T-UCE-0006-016-2017.pdf>
- Ibrahim, K., Ramli, R., Rashi, A. y Mohd, Y. (2015). Antimicrobial Property of Water and Ethanol Extract Chlorella vulgaris: A Value-Added Advantage for a New Wound Dressing Material. *International Medical Journey*, 22 (5), p.p. 399-401. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Ramliza_Ramli/publication/283506719_Antimicrobial_Property_of_Water_and_Ethanol_Extract_Chlorella_vulgaris_A_Value-Added_Advantage_for_a_New_Wound_Dressing_Material/links/563c1d1b08ae

- c6f17dd4fba7/Antimicrobial-Property-of-Water-and-Ethanol-Extract-Chlorella-vulgaris-A-Value-Added-Advantage-for-a-New-Wound-Dressing-Material.pdf
- Ignacio-Alós, J. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *ELSEVIER*, 33(10), p.p. 639-702. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2018). *Anuarios históricos de Estación Meteorológica M0188 PAPALLACTA*. Recuperado de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
- International Barcoding Of Life. (2019). Primer search. Recuperado de http://v3.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M. y Tys, J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37(4), p.p. 735–741. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968445/pdf/449_2013_Article_1044.pdf
- Kurobe, T., Baxa, D., Mioni, C., Kudela, R., Smythe, T., Chapman, A y Teh, S. (2013). Identification of harmful cyanobacteria in the Sacramento-San Joaquin Delta and Clear Lake, California by DNA barcoding. *Springer*, 2 (491), p.p. 1-12. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797325/>
- Lacueva, M. (2017). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. (Tesis de Pregrado), Universidad Complutense, España. Recuperado de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUEL%20LACUEVA%20ARNEDO.pdf>
- Lacueva, M. (2017). Resistencia a los antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. (Tesis de Pregrado). Universidad Complutense. España. Recuperado de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUEL%20LACUEVA%20ARNEDO.pdf>
- Leoro-Garzón, P., Ortega-Paredes, D. y Fernández-Moreira, F. (2017). Alta prevalencia de *Escherichia coli* multi-resistente aislada de heces caninas en un parque público

- en Quito-Ecuador. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/321239953_Alta_prevalencia_de_Escherichia_coli_multi-resistente_aislada_de_heces_caninas_en_un_parque_publico_en_Quito-Ecuador
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferrugínea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- Llambí, L., Soto-W, A., Célleri, R., De Bievre, B., Ochoa, B. y Borja, P. (2012). Ecología, hidrología y suelos de páramos. Recuperado de <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56475.pdf>
- Lowry, F. (2003). Antimicrobial resistance: the example os Staphylococcus aureus. *Science in Medicine*, 111(9), p.p. 1265-1273. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154455/pdf/JCI0318535.pdf>
- Lupatini, A., de Oliveira Bispo, L., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Canan, C. y Colla, E. (2017). Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. *Food Research International*, 99. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996916305798>
- Maadane, A., Merghoub, N., Mernissi, N. y Tarik, A. (2017). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MARINE MICROALGAE ISOLATED FROM MOROCCAN COASTLINES. *Journal of Microbiology*, 6(6), p.p. 1257-1260. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/317279233_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_OF_MARINE_MICROALGAE_ISOLATED_FROM_MOROCCAN_COASTLINES
- MacFaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&dq=identificacion+de+bacterias&source=gbs_navlinks_s

- Magana-Archchi, D., y Wanigatunge, H. (2011). A simple and rapid extraction method for cyanobacteria and monocots. *Ceylon Journal of Science*, 40(1), p.p. 59-63. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/266679745_A_simple_and_rapid_DNA_extraction_method_for_cyanobacteria_and_monocots
- Mahan, K., Odom, O. y Herrin, D. (2005). Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *BioTechniques*, 39, p.p. 457-458. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/da4a/cb3c6f665715f1165f8933e53104515888fe.pdf>
- Malajovich, M. (2015). Introducción a las técnicas microbiológicas. Recuperado De https://Bteduc.Com/Roteiros_Es/2015_Tecnicas_Microbiologicas.Pdf
- Maldonado, E., Morales, E. y Romero, P. (2014). Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Grasiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos. (Tesis de Pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/8568/AC-B-ESPE-047755.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maldonado, N., Robledo, C. y Robledo, J (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), p.p. 35-45. Recuperado <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n1/0123-9392-inf-22-01-00035.pdf>
- Maramorosch, K. y Koprowski, H. (2014). *Methods in Virology*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=rKziBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Martinez, F. y Orús, M. (1991). Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 1011. *Plant Physiolo*, 95, p.p. 1150-1155. Recuperado de <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/95/4/1150.full.pdf>
- Mashhadinejad, A., Zamani, H., y Sarmad, J. (2017). Effect of growth conditions and extraction solvents on enhancement of antimicrobial activity of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2(4), p.p. 65-73. Recuperado de <http://pbr.mazums.ac.ir/article-1-152-en.pdf>

- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M., Kopecký, J., Bernardini, P., Sacchi, A. y Komenda, J. (1999). Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (Scenedesmus and Chlorella) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta*, 209, p.p. 126-135. Recuperado de <https://page-one.springer.com/pdf/preview/10.1007/s004250050614>
- Mattos, B., Romasnos, T., de Sousa, L., Sasaki, G. y Barreto-Bergter, E. (2011). Glycolipids from macroalgae: potential biomolecules for marine biotechnology. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(2). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2011000200008&script=sci_arttext&tlng=pt
- Mello, V., Meccheri, S., Bagatini, L., Rodrigues-Filho, E. y Vieira, H. (2017). MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). *Algal Research*, 28, p.p. 151–160. Recuperado de <https://scihub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417301340>
- Mena, P. y Hofstede, R. (2006). Loa paramos ecuatorianos. Botánica Económica de los Andes Centrales. Recuperado de: <http://beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2006.pdf>
- Mensa et al. (2014). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter*, 26(1), p.p. 1-84. Recuperado de <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
- Mi, Y., Zhang, J., He, Shan y Yan, Xiaojun. (2017). New peptides isolated from marine cyanobacteria, an overview over the past decade. *Marine Drug*, 15 (5), p.p. 2-27. Recuperado de: <https://www.mdpi.com/1660-3397/15/5/132>
- Ministerio de Salud Pública. (2017). Ecuador participa en la semana mundial de la concientización sobre el uso de antibióticos. Recuperado de <http://www.salud.gob.ec/ecuador-participa-en-la-semana-mundial-de-la-concienciacion-sobre-el-uso-de-antibioticos/>
- Mittal, M. (2015). Application of Taguchi Method for Optimization of Process Parameters in Improving the Productivity of Corrugation Operation. *International Journal of Research*, 2(10). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/325961101_Application_of_Taguchi_

Method_for_Optimization_of_Process_Parameters_in_Improving_the_Productivity_of_Corrugation_Operation

- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A. y Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Naturales*, 34(1), p.p. 129-149. Recuperado de; www.remcb-puce.edu.ec/index.php/remcb/article/download/240/187
- Morales, S., Mosquera, L. y Rivas, S. (2008). Transmission electron microscopy (TEM) applied to the bacillariophytas identification. 6(1), p.p. 9-15. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es> > descarga > articulo
- Morillas, P. (2010). GUIA PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO DE AGUAS. Recuperado de <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientolaboratoriosensayoaguas2.pdf>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. y Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana Medica de Salud Pública*, 28(4), p.p. 648-656. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G. y Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, 123, p.p. 279–283. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412011042>
- Muro de Zaro, M. (2017). CARBAPENEMASAS: UN MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA FRENTE LAS CARBAPENEMAS, ANTIBIÓTICOS DE ÚLTIMO RECURSO. (Tesis de Pregrado), Universidad Complutense, España. Recuperado de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUELA%20MURO%20DE%20ZARO%20ALCALA.pdf>
- Nubel, U., Garcia-Pichel, F. y Muyzer, G. (1997). PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl. Envir. Microbiol*, 63 (8), p.p. 3327–3332. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168636/pdf/633327.pdf>

- Núñez, M., Marciales, L. y Beltrán, M. (2008). Microalgas acuáticas: la otra cara de la biodiversidad en la Amazonía colombiana. Recuperado de <https://www.sinchi.org.co/files/publicaciones/publicaciones/pdf/Microalgas%20reeload.pdf>
- Oluwasola, F., Oriade, D. y Lamakanra, A. (2013). Antibiotic Resistance and Virulence Properties in Escherichia Coli Strains from Cases of Urinary Tract Infections. *African Journal of Infectious Diseases*, 7(1), p.p. 1-7. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647523/>
- Orellana, L. (2001). Estadística Descriptiva. Recuperado de http://www.dm.uba.ar/materias/estadistica_Q/2011/1/modulo%20descriptiva.pdf
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2017). Diseño experimental. Recuperado de <http://www.fao.org/3/T0848S/t0848s03.htm>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). Alerta Epidemiológica. Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud pública en las Américas. Recuperado de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>
- Paganini, H et al. (2009). Infecciones por Staphylococcus aureus resistentes a meticilina adquiridas en la comunidad en niños antes sanos y en niños relacionados al hospital en la Argentina. *Rev. Chi. Infect*, 26(5), p.p. 406-412. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v26n5/art02.pdf>
- Pantosti, A., Sanchini, A. y Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Future Microbiology*, 2(3), p.p. 323–334. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17661706#>

- Pasch, H., Pizzi, A. y Rode, K. (2001). MALDI–TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polymer*, 42(18), p.p. 531–7539. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386101002166>
- Pasco, D. y Pugh, N. (2010). Potent immunostimulatory extracts from microalgae. Recuperado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/99/b7/6f/1b48e5b2918aa7/US7846452.pdf>
- Patra, K., Patra, A., Mahapatra, N., Thatoi, H., Das, S., Sahu, R. y Swain, G. (2009). Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2), p.p. 129-131. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/c6e1/f6642263842c17adb8edc44a5e8f867a7215.pdf>
- Picazo, J. (2013). Procedimientos En Microbiología Clínica. Recuperado de: Http://Coesant-Seimc.Org/Documents/M%C3%A9todosb%C3%A1sicos_Sensibilidadantibi%C3%B3ticos.Pdf
- Prakash, J., Seshikala, D. y Singara, M. (2007). Antibacterial activity and biomolecular composition of certain freshwater microalgae collected from River Godavari (India). *International Journal of Algae*, 9(4). Recuperado de <http://www.dl.begellhouse.com/journals/7dd4467e7de5b7ef,1ada523c3a46b9f0,2d7eb371601e5d1c.html>
- Pumarola, A. (1999). Microbiología y parasitología médica. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=Nlego0fDRUQC&pg=PA65&dq=tiempo+de+generacion+de+S.aureus&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwivvcCEloTmAhXBtVkKHU8mA_gQ6AEIKDAA#v=onepage&q=tiempo%20de%20generacion%20de%20S.aureus&f=false
- Radha, S., Aliya, A., Iyappan, S. y Ramya, M. (2013). Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), p.p. 609-613. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-012-9895-0>

- Rajesh, S., Raja, P., Rathi, J. y Sahayaraj, K. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. *JBiopest*, p.p. 119-128. Recuperado de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/30389140/rajesh_jbiopest.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBiosynthesis_of_silver_nanoparticles_usi.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191208%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20191208T134527Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=6ad12c29694c74563a99952a08e7e61ea5017635170c69b4b42b08087a65bff8
- Ramírez-Mérida, L., Ragagnin de Menezes, C., Queiroz Zepka, L., y Jacob-Lopes, E. (2015). Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Revista de Centro de Ciencias Exactas y Naturales UFSM*. 37, p.p. 7-17. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/293027216_Microalgas_potencial_para_la_produccion_de_compuestos_bioactivos_nanoencapsulados
- Ranga, A., Harshavardhan, A. y Aradhya, S. (2010). Antibacterial properties of *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Botryococcus braunii* micro algal extracts. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4(3), p.p. 89-819. Recuperado de http://abap.co.in/sites/default/files/Paper-10_1.pdf
- Rivadeneira, S. (2014). PREVALENCIA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA, AISLADOS EN TRABAJADORES DE GRANJAS PORCINAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA 2014. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/7322>
- Rivas, K., Rivas, M., Dávila, E. y Rodríguez, M. (2002). Cefalosporinas de la primera a la cuarta generación. *Revista de la Facultad de Medicina*, 252(2). Recuperado de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003.

- Rodas-Gaitán, H., Rodríguez-Fuentes, H., Flores-Mendiola, G., Vidales-Contreras, J., Aranda-Ruiz, J. y Luna-Maldonado, A. (2012). Effect of inoculation cellular density on *Chlorella vulgaris* clv2 growth cultivated under mixotrophic conditions. *Rev. Fitotec.Mex*, 35(50), p.p. 93-96. Recuperado de https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/35-3_Especial_5/14r.pdf
- Rosales, K. (2018). Determinación de la capacidad antimicrobiana de extractos de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito - Católica (CEQCA) sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/15834>
- Salazar-González, M. (2005). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. (Monografía de Grado). Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México. Recuperado de: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n59ne/algas.pdf>
- Sánchez, P., Muñoz, R. y Gutierrez, N. (2012). Bacterial Resistance to Antibiotics: Mechanisms of Transfer. *Revista Spei Domus*, 8(17), p.p. 31-37. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/274372945_Resistencia_bacteriana_a_los_antibioticos_mecanismos_de_transferencia_Bacterial_Resistance_to_Antibiotics_Mechanisms_of_Transfer
- Sangwan, A. (2017). *Escherichia Coli* (E. Coli): Meaning, Morphology and Characteristics. Recuperado de <http://www.biologydiscussion.com/bacteriology/systematic-bacteriology/escherichia-coli-e-coli-meaning-morphology-and-characteristics/30821>
- Sarwa, P. y Verma, S. (2017). Identification and Characterization of Green Microalgae, *Scenedesmus* spp. MCC26 and *Acutodesmus obliquus* MCC33 Isolated from Industrial Polluted Site Using Morphological and Molecular Markers. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol*, 5(4), p.p. 415-422. Recuperado de <http://oaji.net/articles/2017/475-1514205812.pdf>.
- Sehgal, A., Goswami, K., Pal, M., Chikkaputtaiah, C., Chetia, P., & Boruah, H. P. D. (2019). Morpho-taxonomic, genetic, and biochemical characterization of freshwater microalgae as potential biodiesel feedstock. 3 *Biotech*, 9(4).

- Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-019-1664-1>
- Seija, V. y Vignoli, R. (2015). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
- Senhorinho, G., Ross, G. y Scott, J. (2015). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Rev. Phycologia*, 54(3), p.p. 271-282. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Gerusa_Senhorinho/publication/279545318_Cyanobacteria_and_eukaryotic_microalgae_as_potential_sources_of_antibiotics/links/5596bb5a08ae21086d21fa06.pdf
- Sherwood, A. y Presting, G. (2007). UNIVERSAL PRIMERS AMPLIFY A 23S rDNA PLASTID MARKER IN EUKARYOTIC ALGAE AND CYANOBACTERIA1. *Journal of Phycology*. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1529-8817.2007.00341.x>
- Sigh, R., Tiwari, S., Rai, A. y Mohapatra, T. (2011). Cyanobacteria: an emerging source for drug Discovery. *The Journal of Antibiotics*, 64, p.p. 401-4012. Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/ja201121>
- Silva, R. Lopes, N. y Silva, D. (2016). Application of MALDI Mass Spectrometry in Natural Products Analysis. *Planta Medica*, 82(08), p.p. 671–689. Recuperado de https://sci-hub.tw/https://www.researchgate.net/publication/301696934_Application_of_MALDI_Mass_Spectrometry_in_Natural_Products_Analysis
- Silva, R., Pepporine, N. y Silva, D. (2016). Application of MALDI Mass Spectrometry in Natural Products Analysis. *Plant Med.* 82, p.p. 671-689. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/9efa/6418fc294ea9d12788e60079f5376a6b4a9b.pdf>
- Silvagni, M., Guillen, R., Rodríguez, F., Espínola, C., Grau, L. y Velázquez, G. (2019). Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de pacientes pediátricos en Paraguay. *Rev. Chilena*, 36(4), p.p.

455-460. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v36n4/0716-1018-rci-36-04-0455.pdf>

Standley, M., Million-Weaver, S., Alexander, D., Hu, S. y Camps, M. (2018). Genetic control of ColE1 plasmid stability that is independent of plasmid copy number regulation. *Current Genetics*. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://link.springer.com/article/10.1007/s00294-018-0858-0>

Sussman, M. (1997). *Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=7vFpeDcjBH0C&pg=PA4&dq=characteristics+of+E.coli&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjmm9mRvYHmAhVMnFkKHSYQD9UQ6AEIKzAA#v=onepage&q=characteristics%20of%20E.coli&f=false>

Takashima, K., Shihiraishikawa, I. y Hase, E. (1964). Further notes on the growth and chlorophyll formation of chlorella protothecoides. *Plant and Cell Physiology*, 5, p.p. 321-332. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/5/3/321/1805966>

Thanh -Sang, V., Dai-Hung, N. y Se-Kwon, K. (2015). Nutritional and Pharmaceutical Properties of Microalgal Spirulina. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007761000194>

Uma, R., Sivasubramanian, V. y Devaraj, N. (2011). Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(3), p.p. 82-83. Recuperado de <http://www.jalgalbiomass.com/paper8vol2no3.pdf>

Uma, R., Sivasubramanian, V. y Devaraj, S. (2011). Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(3), p.p. 74-81. Recuperado de <http://www.jalgalbiomass.com/paper7vol2no3.pdf>

Universidad de Salamanca. (2011). Pruebas de sensibilidad bacteriana. Recuperado de http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html

- University of Texas. (2013). Advantages and disadvantages an advantage of the Taguchi Method. Recuperado de <https://www.coursehero.com/file/p19cvisg/Advantages-and-Disadvantages-An-advantage-of-the-Taguchi-method-is-that-it/>
- Vaca, S. (2016). PREVALENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE EN PORTADORES NASALES DEL PERSONAL DE SALUD DE LAS ÁREAS: UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS, NEONATOLOGÍA, QUIRÓFANOS Y EL ANEXO DE TRAUMATOLOGÍA DEL HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARÍN, DE OCTUBRE A DICIEMBRE 2015. (Tesis de Pregrado), Universidad Central del Ecuador, Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6817/1/T-UCE-0006-012.pdf>.
- Valer, S. (2014). Métodos de colecta, identificación y análisis de comunidades biológicas: plancton, perifiton, bentos (macroinvertebrados) y necton (peces) en aguas continentales del Perú. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2014/02/M%C3%A9todos-de-Colecta-identificaci%C3%B3n-y-an%C3%A1lisis-de-comunidades-biol%C3%B3gicas.compressed.pdf>
- Vásquez-Villalobos, V., Vergaray, D., Méndez, J., Barrios, I., Baquedano, R., Caldas, C., Cruz, J., Gamboa, J. y Rivera, I. (2017). Effect of the light emitting diodes intensity and photoperiod in the optimization of the Spirulina (Arthrospira) biomass production. *Scientia Agropecuaria*, 8 (1), p.p. 43–55. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v8n1/a04v8n1.pdf>
- Victory, K (2009). Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesized by Microcystis spp. (Tesis de Postgrado). Universidad de Adelaide, Australia. Recuperado de: <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/57613>
- Vijayakumar, S. y Menakha, M. (2015). Pharmaceutical applications of cyanobacteria. *Journal of Acute Medicine*, 5(1), p.p. 15-23. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221155871500028X>
- Villa, A., Herazo, D. y Torregrosa, A. (2014). EFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA DIATOMEA Chaetoceros calcitrans (CLON C-CAL) EN CULTIVOS ESTÁTICOS. *Rev. Intropica*. 9, p.p. 111-117. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5111593.pdf>

- Villacís, J., Reyes, J., Vásquez, R. y Villavicencio, F. (2014). Resistencia Bacteriana en el Ecuador 2014. *Research Gate*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/277597647_Resistencia_Bacteriana_en_el_Ecuador_2014waste-water.pdf
- Wehr, J., Sheath, R. y Kociolek, P. (2015). Freshwater Algae of North America Ecology and Classification. Recuperado de https://book.cc/book/2569091/f1a5fd?fbclid=IwAR2i-OwXoRyNrGOyjEYARDg3Ds1VTq_eN6EZmpImVwkcXJ2somLX9GQujLA
- Wu, W., Liang, Z., Zhao, Z., y Cai, Z. (2007). Direct analysis of alkaloid profiling in plant tissue by using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(1), p.p. 58–69. Recuperado de <https://sci-hub.se/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jms.1138>
- Xin, L., Hong-ying, H. y Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), p.p. 3098–3102. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410017116>
- Yasser, E. y Adli, A. (2015). Toxicity of Single and Mixtures of Antibiotics to Cyanobacteria. *Journal of Environmental y Analytical Toxicology*, 5(3), p.p. 2-8. Recuperado de: <https://www.omicsonline.org/open-access/toxicity-of-single-and-mixtures-of-antibiotics-to-cyanobacteria-2161-0525-1000274.php?aid=51881>
- Yeh, K.-L., & Chang, J.-S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, p.p. 120–127. Recuperado de sci-hub.tw/10.1016/j.biortech.2011.11.103

9. FIGURAS

Tratm.	Factor							Repetición		
	1 (A)	2 (B)	3 (C)	4 (D)	5 (E)	6 (F)	7 (G)	R1	R2	R3
1	1	1	1	1	2	1	1	26	19	14
2	1	1	1	2	1	2	2	18	22	14
3	1	2	2	1	2	2	2	9	28	14
4	1	2	2	2	1	1	1	29	14	28
5	2	1	2	1	1	1	2	29	17	34
6	2	1	2	2	2	2	1	28	40	28
7	2	2	1	1	1	2	1	28	25	26
8	2	2	1	2	2	1	2	25	16	27

$\frac{\Sigma (26 + 18 + 14 + 18 + 22 + 14 + 9 + 28 + 14 + 29 + 14 + 28)}{12} = 19,58$										
$\frac{\Sigma (29 + 17 + 34 + 28 + 40 + 28 + 28 + 25 + 26 + 25 + 16 + 27)}{12} = 26,92$										

Figura 1. Análisis Método de Taguchi. Obtención de número de posibles compuestos de acuerdo con el nivel. Donde (1) es el primer nivel y (2) es el segundo nivel de cada factor (columna).

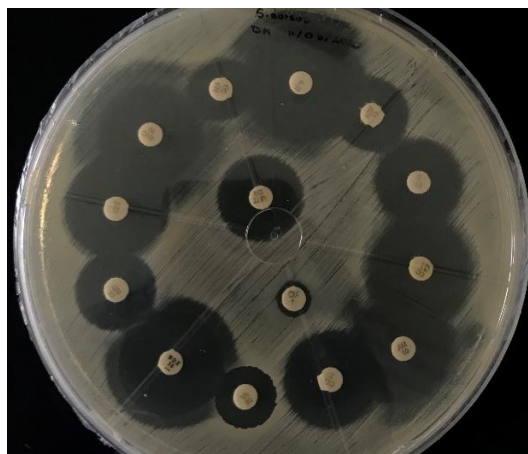


Figura 2. Antibiograma 1. *S. aureus* sin resistencia antibiótica, donde se observan halos de inhibición en los discos a los que presentan sensibilidad.

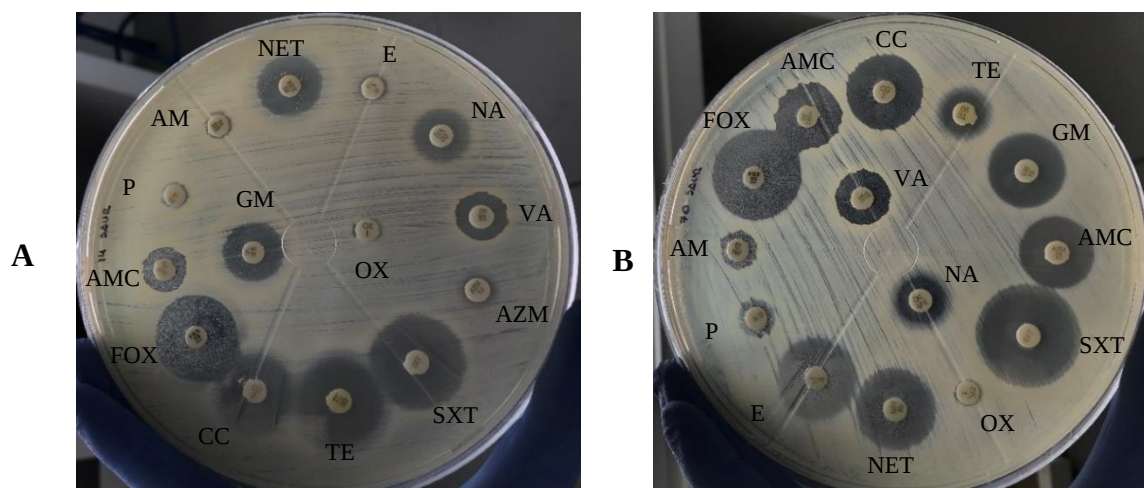


Figura 3. Antibiograma 2. (A) *S. aureus* 14 SAUR y (B) *S. aureus* 70 SAUR donde se observan halos de inhibición en los discos a los que presentan sensibilidad.

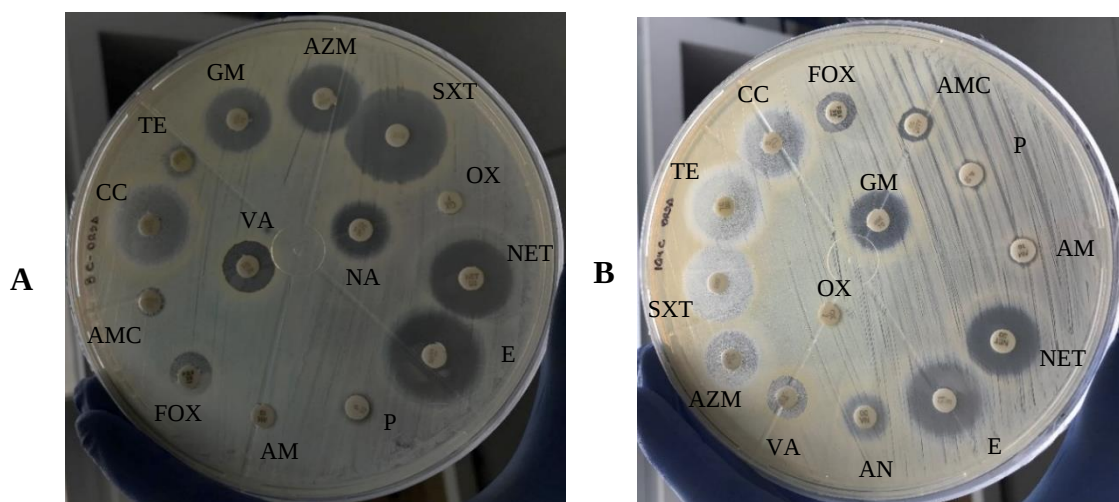


Figura 4. Antibiograma 3. (A) *S. aureus* 8C ORSA y (B) *S. aureus* 104C ORSA donde se observan halos de inhibición en los discos a los que presentan sensibilidad.

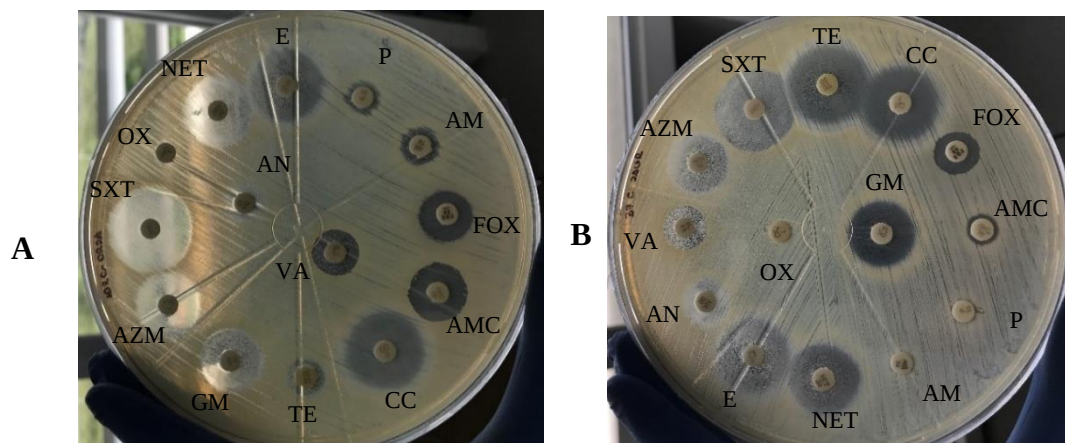


Figura 5. Antibiograma 4. (A) *S. aureus* 102C ORSA y (B) *S. aureus* 37C SAUR donde se observan halos de inhibición en los discos a los que presentan sensibilidad.

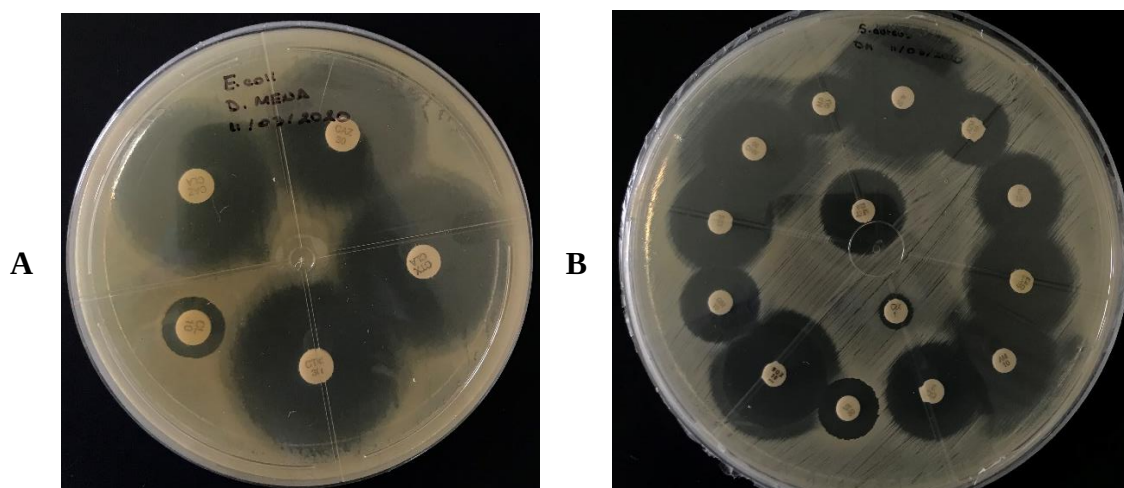


Figura 6. Antibiograma 5. (A) y (B) *E. coli* sin resistencia antibiótica, donde se observan halos de inhibición en los discos a los que presentan sensibilidad.



Figura 7. Mapa del lugar de muestreo. Mapa del páramo de la Virgen (Obtenida de GoogleMaps). Los recuadros indican el lugar de acceso al páramo muestreado.

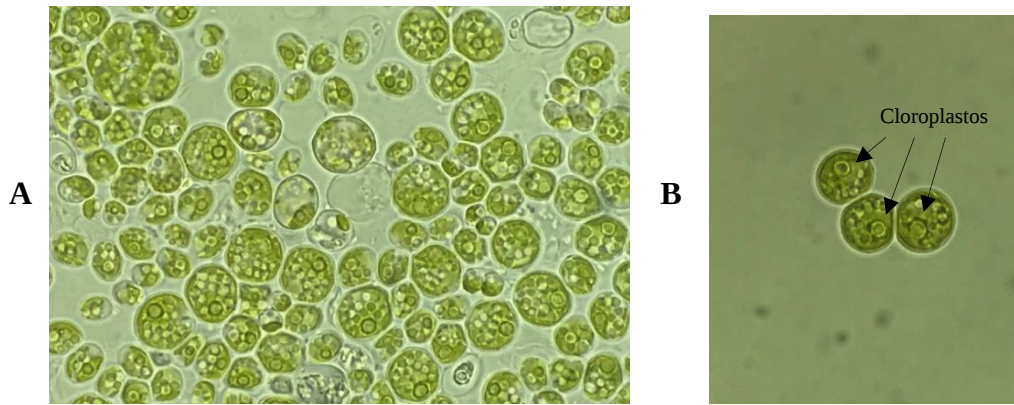


Figura 8. Cultivo de *Chlorococcum* sp. (A) Células verdesas redondas. Aumento 40X y (B) imagen ampliada, las flechas muestran los cloroplastos en forma de copa.

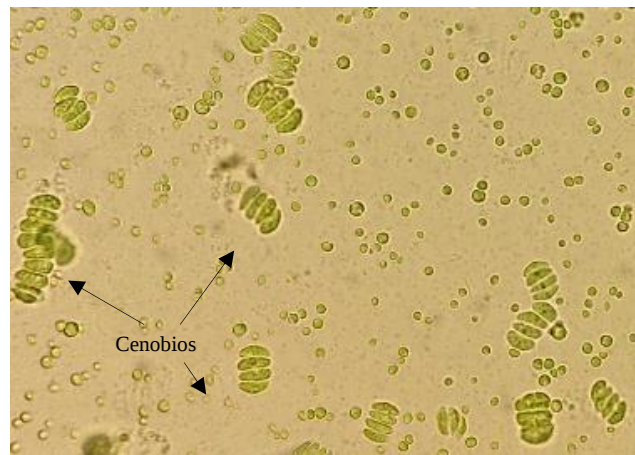


Figura 9. Cultivo de *Scenedesmus* spp. Microalgas en cenobios. Aumento 40X.

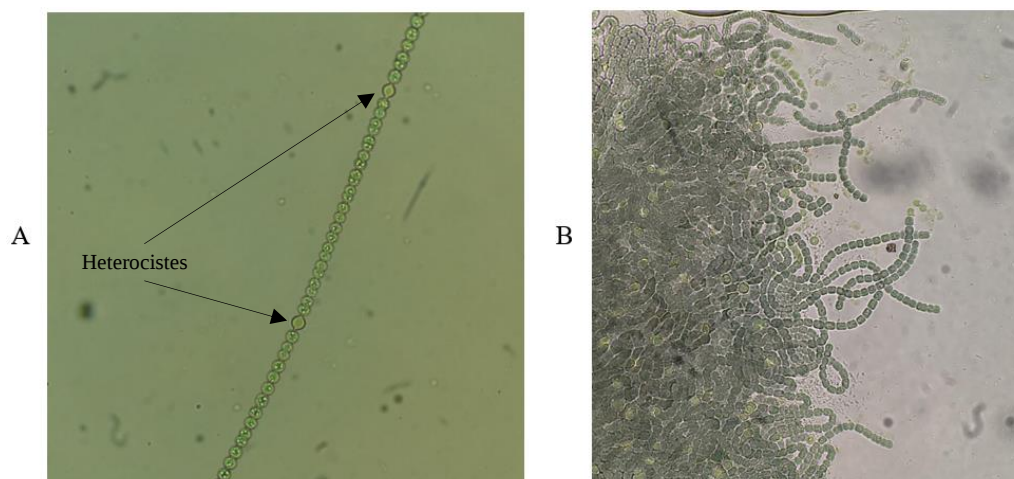


Figura 10. Cultivo de *Nostoc* spp. (A) Filamento individual, las flechas muestran los heterocistos (B) *Nostoc* spp. en división. Aumento 40X.

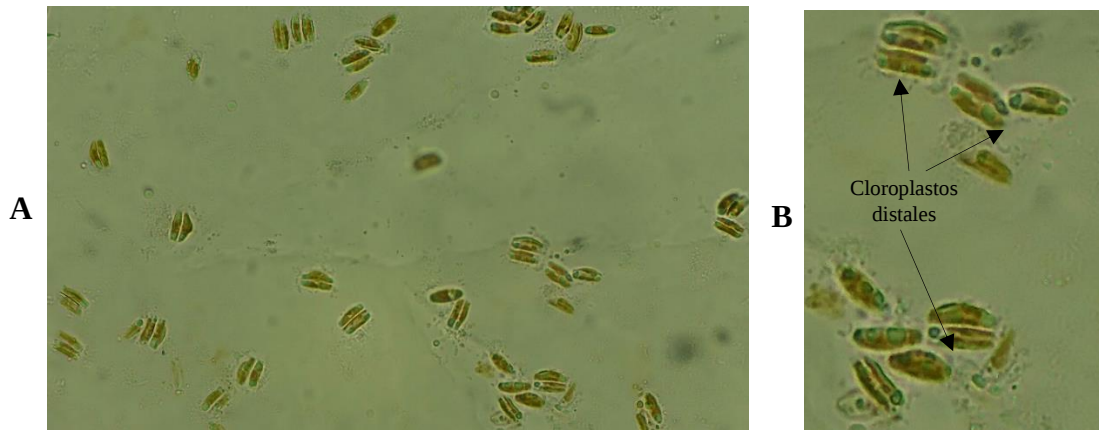


Figura 11. Cultivo de *Sellaphora* spp. (A) Células elipsoidales café verdosas, Aumento 40X y (B) imagen amplificada, las flechas muestran los cloroplastos distales.

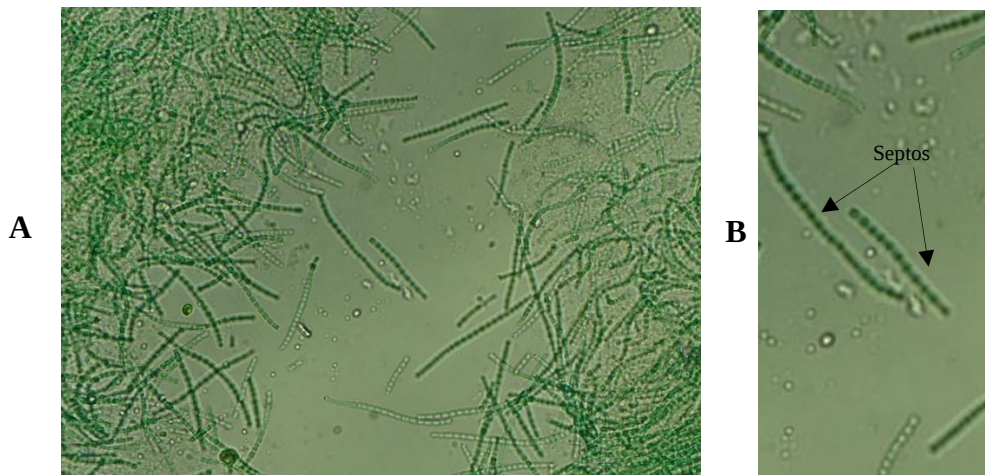


Figura 12. Cultivo de *Pseudoanabaena*. (A) Filamentos verdosos azulados septados, Aumento 40X y (B) Imagen aumentada, las flechas señalan los septos.



Figura 13. Cultivo de *Klebsormidium* spp. Filamentos largos no ramificados. Aumento 40X.

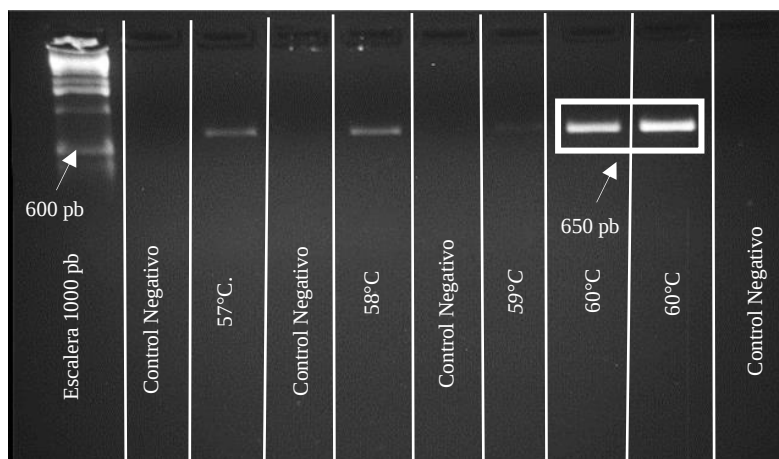


Figura 14. PCR con gradiente de hibridación para la región ITS de *Chlorococcum* sp. En el recuadro se observan bandas gruesas, definidas y brillantes de aprox.650 pb.

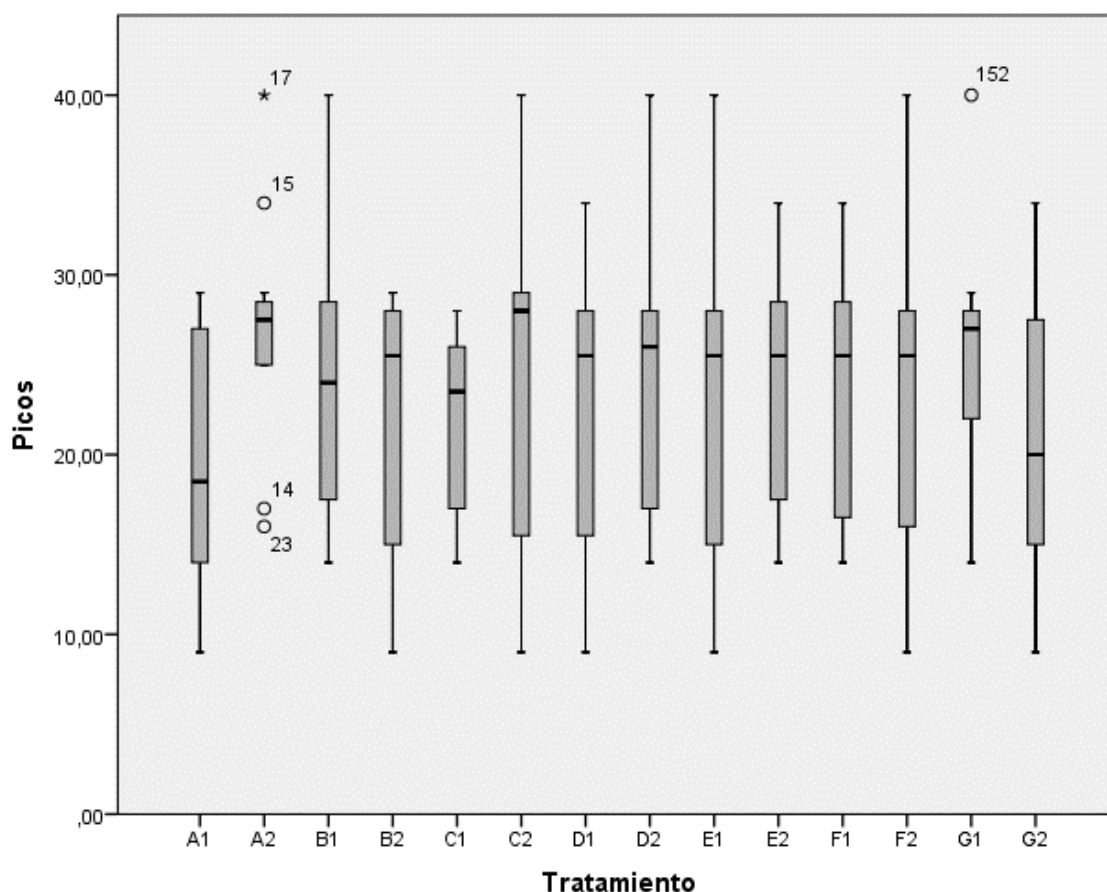


Figura 15. Distribución cuartilar de compuestos obtenidos en la optimización de extractos mediante el Método Taguchi. Los compuestos se obtuvieron a partir del número de picos medidos por espectrometría (MALDI-TOF). Cada caja representa un nivel evaluado: biomasa húmeda inactivada (A1), biomasa seca (A2), microondas (B1), sin microondas (B2), etilacetato (C1), metanol (C2), relación solvente 1:10 (p/v) (D1), relación solvente 1:100 (p/v) (D2), 40 minutos de exposición al solvente (E1), 48 horas de exposición al solvente (E2), agitación (F1), sin agitación (F2), sonicación (G1) y sin sonicación (G2).

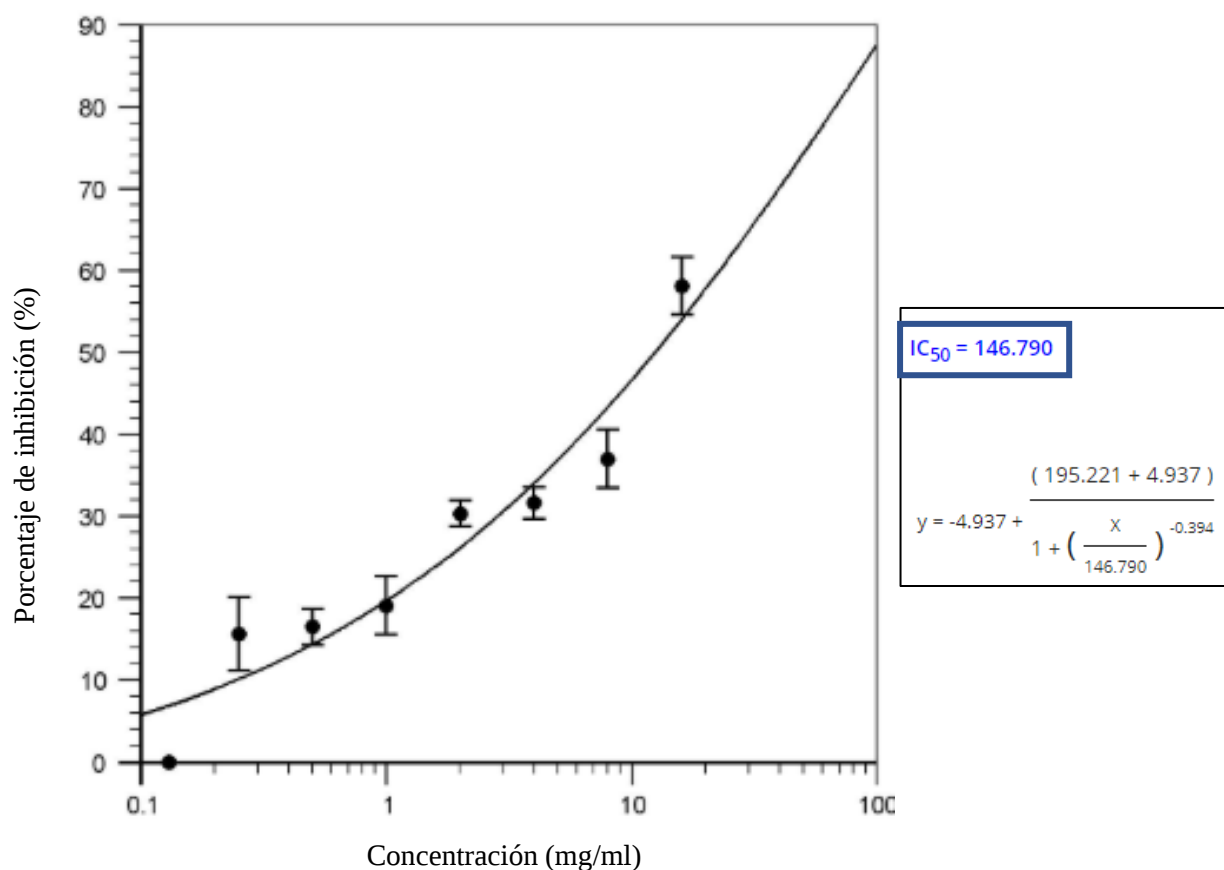


Figura 16. Variación de porcentaje de inhibición de *S. aureus* 104C ORSA a diferentes concentraciones el extracto Chl. E3. Se observa la curva de calibración usada como base para determinar el IC_{50} , que es la concentración en la cual un extracto alcanza la mitad del máximo porcentaje de inhibición (valor seleccionado en el recuadro azul). Análisis realizado con la herramienta IC_{50} Calculator de AAT Bioquest.

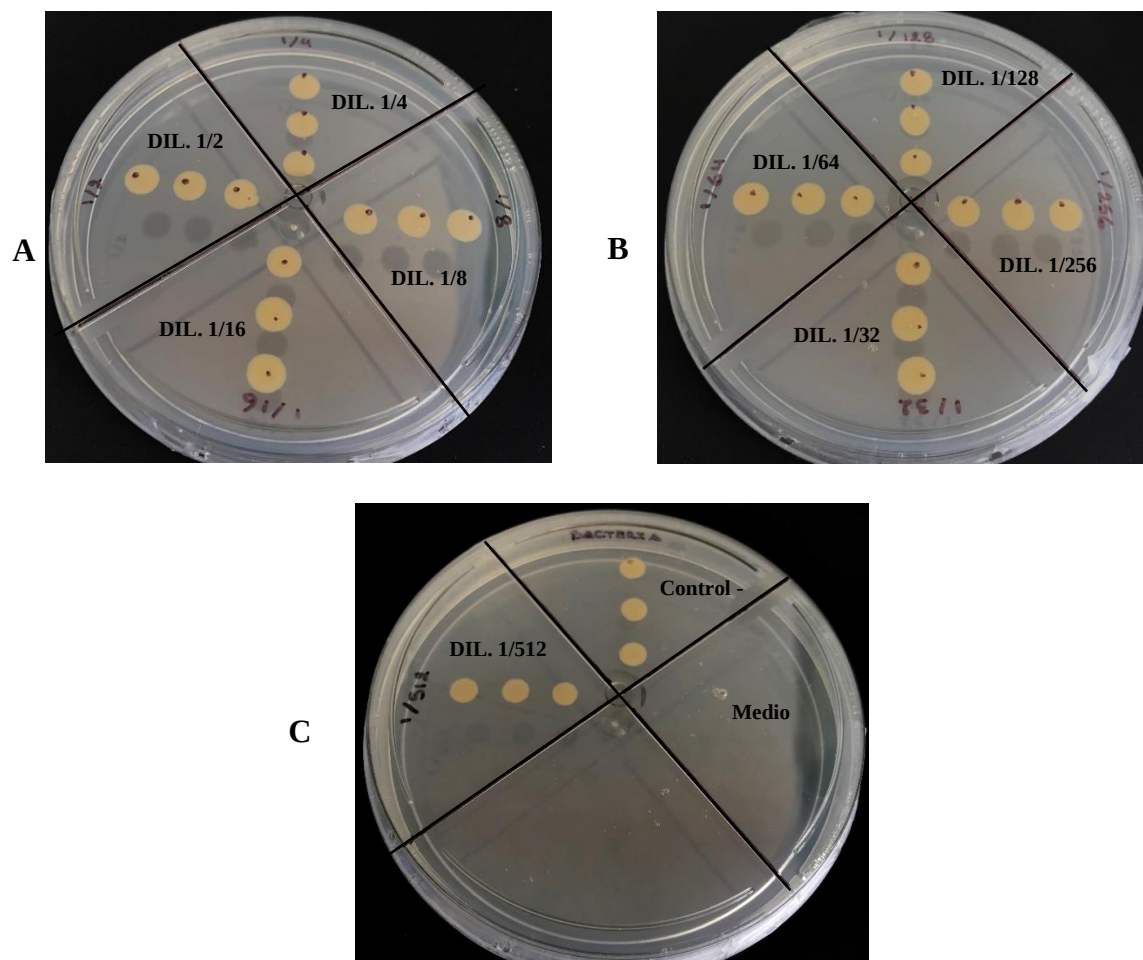


Figura 17. Concentración mínima bactericida (CMB) de *S. aureus* 104C ORSA. Se aprecia el crecimiento de la bacteria en todos los pocillos sembrados A) Dil.1/2, Dil. 1/4, Dil. 1/8, Dil. 1/16, Dil. 1/32 y B) Dil. 1/64, Dil. 1/128, Dil. 1/256 (C) Dil.1/512, control negativo (bacteria con metanol) y control positivo (medio con metanol).

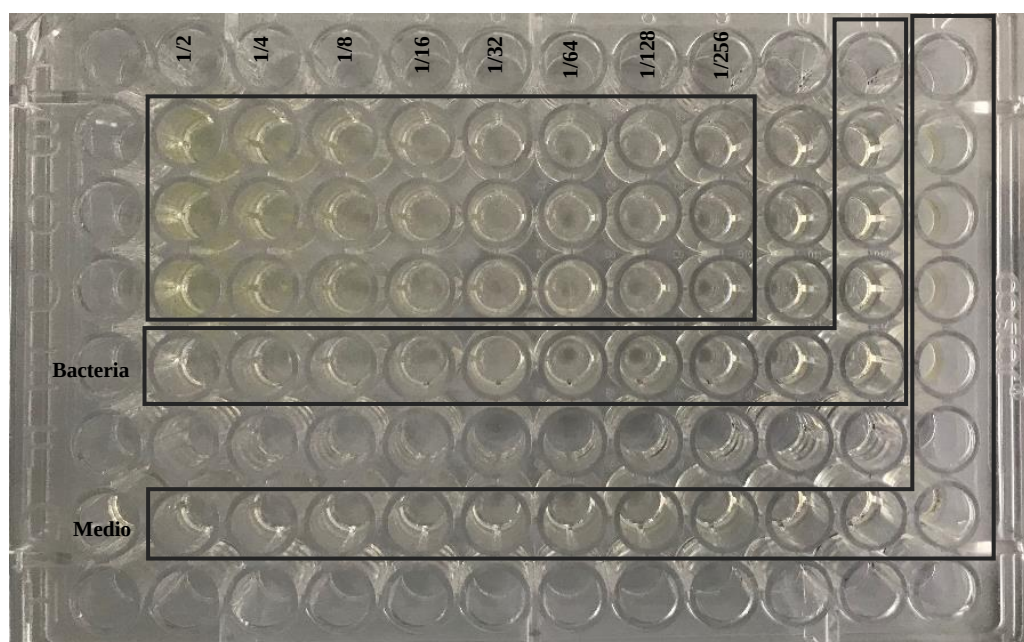


Figura 18. Placa de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de *S. aureus* 104C ORSA. Diluciones, control negativo (bacteria con metanol) y control positivo (medio con mentanol).

10.TABLAS

Tabla 1. Lista de antibióticos empleados en el antibiograma de *S. aureus*.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración del disco
Oxacilina	OX	1 µg
Gentamicina	GM	10 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Sulfametoxazol/Trimetoprima	SXT	1,25/23,75 µg
Azitromicina	AZM	15 µg
Vancomicina	VA	30 µg
Ácido nalidíxico	NA	30 µg
Eritromicina	E	15 µg
Netilmicina	NET	30 µg
Ampicilina	AM	10 µg
Penicilina	P	10 unidades
Ampicilina/Ácido clavulánico	AMC	20/10 µg
Cefoxitín	FOX	30 µg
Clindamicina	CC	2 µg

Tabla 2. Lista de antibióticos empleados en el antibiograma de *E. coli*.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración del disco
Gentamicina	GM	10 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Sulfametoxazol/Trimetoprima	SXT	1,25/23,75 µg
Azitromicina	AZM	15 µg
Ácido nalidíxico	NA	30 µg
Ceftazidime	CAZ	30 µg
Ceftazidime/Ácido clavulánico	CAZ/CLA	30/10 µg
Netilmicina	NET	30 µg
Ampicilina	AM	10 µg
Cefotaxime	CTX	30 µg
Cefotaxime/Ácido clavulánico	CTX/CLA	30/10 µg
Cefoxitín	FOX	30 µg
Colistina	CL	10 µg

Tabla 3. Lista de lugares muestreados en el Páramo de la Virgen.

Código de Campo	Coordenadas	Cuerpo de Agua
RECC 1,1	0° 19' 10'' S 78° 0' 88'' O	Laguna
RECC 1,2	0° 19' 10'' S 78° 94' 76'' O	Laguna
RECC 2,1	0° 19' 12'' S 78° 94' 59'' O	Laguna
RECC 3,1	0° 19' 21'' S 78° 94' 43'' O	Laguna
RECC 4,1	0° 19' 21'' S 78° 9' 30'' O	Laguna
RECC 4,2	0° 19' 21'' S 78° 9' 47'' O	Laguna
RECC 5,1	0° 19' 17'' S 78° 92' 9'' O	Laguna
RECC 6,1	0° 19' 32'' S 78° 85' 4'' O	Laguna
RECC 6,2	0° 19' 32'' S 78° 85' 4'' O	Laguna
RECC 7,1	0° 19' 23'' S 78° 91' 0'' O	Riachuelo
RECC 8,1	0° 32' 51'' S 78° 14' 79'' O	Cascada artificial
RECC 9,1	0° 32' 49'' S 78° 14' 79'' O	Cascada artificial
RECC 9,2	0° 32' 49'' S 78° 14' 80'' O	Cascada artificial
RECC 10,1	0° 32' 49'' S 78° 14' 81'' O	Riachuelo
RECC 10,2	0° 32' 49'' S 78° 14' 81'' O	Cascada artificial
RECC 11,1	0° 32' 49'' S 78° 14' 82'' O	Cascada artificial
RECC 11,2	0° 32' 48'' S 78° 14' 83'' O	Cascada artificial
RECC 12,1	0° 32' 48'' S 78° 14' 83'' O	Cascada artificial
RECC 12,2	0° 32' 48'' S 78° 14' 84'' O	Cascada artificial
RECC 13,1	0° 32' 48'' S 78° 14' 83'' O	Cascada artificial
RECC 13,2	0° 32' 48'' S 78° 14' 85'' O	Cascada artificial

Tabla 4. Niveles y factores de los tratamientos empleados de acuerdo al Método de Taguchi L8 (2⁷).

Tratamiento	Factor 1: Procesamiento inicial	Factor 2: Disrupción	Factor 3: Solventes absolutos	Factor 4: Cantidad de solventes	Factor 5: Tiempo de exposición al solvente	Factor 6: Agitación	Factor 7: Sonicación
	A	B	C	D	E	F	G
Tratm. 1	Inactivación (A1)	Microondas (B1)	Etilacetato (C1)	1:10 (p/v) (D1)	48 horas (E2)	Agitar (F1)	Sonicación (G1)
Tratm. 2	Inactivación (A1)	Microondas (B1)	Etilacetato (C1)	1:100 (p/v) (D2)	40 min (E1)	No agitar (F2)	Nada (G2)
Tratm. 3	Inactivación (A1)	Nada (B2)	Metanol (C2)	1:10 (p/v) (D1)	48 horas (E2)	No agitar (F2)	Nada (G2)
Tratm. 4	Inactivación (A1)	Nada (B2)	Metanol (C2)	1:100 (p/v) (D2)	40 min (E1)	Agitar (F1)	Sonicación (G1)
Tratm. 5	Materia seca (A2)	Microondas (B1)	Metanol (C2)	1:10 (p/v) (D1)	40 min (E1)	Agitar (F1)	Nada (G2)
Tratm. 6	Materia seca (A2)	Microondas (B1)	Metanol (C2)	1:100 (p/v) (D2)	48 horas (E2)	No agitar (F2)	Sonicación (G1)
Tratm. 7	Materia seca (A2)	Nada (B2)	Etilacetato (C1)	1:10 (p/v) (D1)	40 min (E1)	No agitar (F2)	Sonicación (G1)
Tratm. 8	Materia seca (A2)	Nada (B2)	Etilacetato (C1)	1:100 (p/v) (D2)	48 horas (E2)	Agitar (F1)	Nada (G2)

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del extracto crudo frente a seis cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

Extracto	Cepa	Tipo de Resistencia	% de Inhibición
Chl.E.3 (3,2 mg/ml)	<i>S. aureus</i> 8C ORSA	Cefalosporinas	0,00
	<i>S. aureus</i> 14 SAUR	Macrólidos	0,00
	<i>S. aureus</i> 37C ORSA	β -lactámicos	16,51
	<i>S. aureus</i> 70 SAUR	Tetraciclinas	3,76
	<i>S. aureus</i> 102C ORSA	Quinolonas	8,77
	<i>S. aureus</i> 104C ORSA	Sulfonamidas	39,01

Tabla 6. Identificación bioquímica de las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cepa	Catalasa	Oxidasa	Coagulasa	Manitol Salado	Descripción del Gram
<i>S. aureus</i> (SR)	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Cocos Gram
<i>S. aureus</i> 8C ORSA	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	positivos, dispuestos
<i>S. aureus</i> 14 SAUR	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	individualmente, en
<i>S. aureus</i> 37C SAUR	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	pares, tétradas,
<i>S. aureus</i> 70 SAUR	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	cadena cortas de
<i>S. aureus</i> 102C ORSA	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	hasta seis células y
<i>S. aureus</i> 104C ORSA	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	racimos

(SR): sin resistencia antibiótica.

Tabla 7. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* (SR).

Prueba Bioquímica	Resultado
TSI	A/A (fermenta lactosa, glucosa y sacarosa), no produce SH ₂ y se evidencia la presencia de gas
SIM	Se apreció motilidad y producción de indol
LIA (Lisina Iron Agar)	K/K (decarboxilación de la lisina positiva)
Citrato	Negativo
Malonato	Negativo
Urea	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Vogues Proskauer	Negativo
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
Descripción del Gram	Bacilos con bordes redondos Gram negativos

(SR): sin resistencia antibiótica.

Tabla 8. Perfil de resistencia antibiótica de la cepa de *S. aureus* sin resistencia.

Antibiótico Empleado	Diámetro de inhibición (mm)
OX (Oxacilina)	9 (N)*
GM (Gentamicina)	22 (S)
TE (Tetraciclina)	31 (S)
SXT (Sulfa-Trimetoprim)	29 (S)
AZM (Azitromicina)	21 (S)
VA (Vancomicina)	17 (N)*
NA (Ácido Nalidíxico)	16 (N)*
E (Eritromicina)	24 (S)
NET (Netilmicina)	24 (N)*
AM (Ampicilina)	28 (N)*
P (Penicilina)	34 (S)
AMC (Amoxicilina/Ác.Clav)	28 (N)*
FOX (Cefoxitin)	35 (S)
CC (Clindamicina)	25 (S)

(N)*: No se reporta; (R): Resistente; (I): Intermedio; (S): Sensible.

Tabla 9. Perfiles de resistencia antibiótica de las cepas resistentes representantes de *S. aureus*.

Antibiótico Empleado	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>					
	14	102 C	104 C	8 C	70	37 C
	SAUR	ORSA	ORSA	ORSA	SAUR	SAUR
OX (Oxacilina)	6 (N)*	6 (N)*	6 (N)*	6 (N)*	6 (N)*	6 (N)*
GM (Gentamicina)	12 (R)	18 (S)	10 (R)	20 (S)	21 (S)	19 (S)
TE (Tetraciclina)	22 (S)	11 (R)	23 (S)	10 (R)	11 (R)	23 (S)
SXT (Sulfa-Trimetoprim)	24 (S)	27 (S)	24 (S)	28 (S)	27 (S)	25 (S)
AZM (Azitromicina)	6 (R)	20 (S)	19 (S)	22 (S)	20 (S)	19 (S)
VA (Vancomicina)	13 (N)*	14 (N)*	13 (N)*	15 (N)*	16 (N)*	14 (N)*
NA (Ácido Nalidíxico)	16 (N)*	11 (N)*	13 (N)*	16 (N)*	13 (N)*	13 (N)*
E (Eritromicina)	6 (R)	22 (I)	21 (I)	23 (S)	23 (S)	22 (I)
NET (Netilmicina)	19 (N)*	22 (N)*	20 (N)*	21 (N)*	22 (N)*	20 (N)*
AM (Ampicilina)	8 (N)*	11 (N)*	9 (N)*	6 (N)*	11 (N)*	6 (N)*
P (Penicilina)	8 (R)	10 (R)	9 (R)	6 (R)	11 (R)	6 (R)
AMC (Amoxicilina/Ác.Clav)	14 (N)*	17 (N)*	10 (N)*	9 (N)*	19 (N)*	9 (N)*
FOX (Cefoxitin)	24 (S)	15 (R)	12 (R)	12 (R)	27 (S)	13 (R)
CC (Clindamicina)	21 (S)	23 (S)	20 (I)	25 (S)	22 (S)	21 (S)

(N)*: No se reporta; (R): Resistente; (I): Intermedio; (S): Sensible.

Tabla 10. Perfil de resistencia antibiótica de la cepa de *E. coli* sin resistencia.

Antibiótico Empleado	Diámetro de inhibición (mm)
GM (Gentamicina)	17 (S)
TE (Tetraciclina)	22 (S)
SXT (Sulfa-Trimetoprim)	19 (S)
AZM (Azitromicina)	16 (S)
NA (Ácido nalidíxico)	25 (S)
CAZ (Ceftazidime)	30 (S)
CAZ/CLA (Ceftazidime/Ác.Clav)	33 (S)
NET (Netilmicina)	21 (S)
AM (Ampicilina)	20 (S)
CTX (Cefotaxime)	33 (S)
CTX/CLA (Cefotaxime /Ác.Clav)	34 (S)
FOX (Cefoxitin)	23 (S)
CL (Colistina)	12 (S)

(R): Resistente; (I): Intermedio; (S): Sensible.

Tabla 11. Identificación morfológica de los aislados.

Código del aislado	Género identificado	Fílum	Código del lugar de muestreo
RECC-DM/Chl 2.1	<i>Chlorococcum</i> sp.	Chlorophyta	RECC 2,1
RECC-DM/Scn 7.1	<i>Scendesmus</i> spp.	Chlorophyta	RECC 7,1
RECC-DM/Slp 9.1	<i>Sellaphora</i> spp.	Bacillaryophyta	RECC 9,1
RECC-DM/Ntc 9.1	<i>Nostoc</i> spp.	Cyanophyta	RECC 9,1
RECC-DM/Pnb 9.2	<i>Pseudoanabaena</i> spp.	Cyanophyta	RECC 9,2
RECC-DM/Klb 10.1	<i>Klebsormidium</i> spp.	Chlorophyta	RECC 10,1

Tabla 12. Parámetros de calidad del ADN obtenidos mediante NanoDrop.

# de Muestra	Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230	Tipo de Muestra
1.1	<i>Chlorococcum</i> primera elución	50,6	1,89	0,96	DNA
1.2	<i>Chlorococcum</i> segunda elución	18,7	1,96	0,46	DNA

Tabla 13. Información molecular de *Chlorococcum* sp. (RECC-DM/Chl 2.1).

Género	Especie	Query Cover	E Value	% de Identificación	Número de GenBank
<i>Chlorococcum</i> sp.	ND*	84%	6e-94	97,35	LT594569.1

ND* : No determinado.

Tabla 14. Número de picos obtenidos mediante MALDI-TOF para cada tratamiento.

Tratamiento	Número de Picos (MALDI-TOF)		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Tratamiento 1	26	19	14
Tratamiento 2	18	22	14
Tratamiento 3	9	28	14
Tratamiento 4	29	14	28
Tratamiento 5	29	17	34
Tratamiento 6	28	40	28
Tratamiento 7	28	25	26
Tratamiento 8	25	16	27

Tabla 15. Promedios de número de picos por nivel de cada factor.

Nivel	Promedio de Picos (MALDI-TOF)	Desv. Estand
A1 (Inactivación)	19,58	6,86
A2 (Biomasa seca)	26,92	6,43
B1 (Microondas)	24,08	8,15
B2 (Sin microondas)	22,42	7,05
C1 (Etilacetato)	21,67	5,21
C2 (Metanol)	24,83	9,22
D1(1:10 p/v)	22,42	7,60
D2 (1:100 p/v)	24,08	7,65
E1 (40 min)	22,83	8,61
E2 (48 horas)	23,67	6,57
F1 (Agitación)	23,17	6,81
F2 (Sin agitación)	23,33	8,45
G1 (Sonicación)	25,42	7,10
G2 (Sin sonicación)	21,08	7,55

Tabla 16. Número de picos obtenidos a partir del diseño unifactorial (Segunda extracción).

Solvente empleado	Promedio de compuestos	Desv. Estand. del promedio de compuestos
Metanol	41,33	15,01
Etilacetato	40,67	9,45

Tabla 17. Pruebas estadísticas realizadas con los extractos obtenidos con metanol y etilacetato de la segunda ronda.

Factor Analizado	Prueba Estadística	P Value
% Inhibición del extracto crudo	Kruskal-Wallis	0,057
Número de compuestos obtenidos	T de student	0,951

Tabla 18. Resultado de la microdilución con los extractos crudos obtenidos (0,80 mg/ml) con etilacetato y metanol frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Extracto	Microorganismo	% de inhibición	Desv. Estand
Chl.E2.1	<i>S. aureus</i>	23,76	0,03
	<i>E. coli</i>	17,03	0,02
Chl.E2.2	<i>S. aureus</i>	38,29	0,02
	<i>E. coli</i>	0,00	0,14
Chl.E2.3	<i>S. aureus</i>	25,45	0,06
	<i>E. coli</i>	7,41	0,00
Chl.M2.1	<i>S. aureus</i>	29,87	0,01
	<i>E. coli</i>	11,66	0,00
Chl.M2.2	<i>S. aureus</i>	12,19	0,01
	<i>E. coli</i>	9,63	0,00
Chl.M2.3	<i>S. aureus</i>	30,29	0,04
	<i>E. coli</i>	8,71	0,00

Tabla 19. Porcentaje de inhibición del extracto crudo obtenido frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Extracto	Microorganismo	Solvente	% de Inhibición	Desv. Estand
Chl.E3	<i>S. aureus</i>	Etilacetato	26,19	0,00
	<i>E. coli</i>	(100%)	0	0,01

11. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de amplificación sugerido por Sarwa y Verma (2017).

Desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización de 1 minuto a 94 °C; 1,5 minutos de hibridación a 57 °C y una extensión de 2 minutos a 72 °C), terminando con una extensión final de 4 minutos a 72 °C.

ANEXO 2. Tratamientos de extracción empleados con el método de Taguchi.

Tratamiento 1:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante.
- b. El pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante.
- c. El pellet se inactiva durante una hora en 300 µl de agua milliQ y 900 µl de etanol absoluto.
- d. Se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- e. El pellet resultante se resuspende en 1 ml de agua milliQ y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- f. Al pellet se le agrega agua en relación 1:10 (1g/10ml) y se coloca en el microondas durante 20 segundos.
- g. Tras la exposición al microondas, se agrega el solvente (Etilacetato soluto) en relación 10:1 (volumen/peso).
- h. Se deja con el solvente durante 48 horas, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- i. Transcurridas las 48 horas con el solvente sonicar durante 15 minutos las muestras.
- j. Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- k. Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 2:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante.
- b. El pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante.
- c. El pellet se inactiva durante una hora en 300 µl de agua milliQ y 900 µl de etanol absoluto.
- d. Se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- e. El pellet resultante se resuspende en 1 ml de agua milliQ y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- f. Al pellet se le agrega agua en relación 1:10 (1g/10ml) y se coloca en el microondas durante 20 segundos.
- g. Tras la exposición al microondas, se agrega el solvente (Etilacetato absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso).
- h. Se deja con el solvente durante 40 min.
- i. Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- j. Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 3:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante.
- b. El pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante.
- c. El pellet se inactiva durante una hora en 300 µl de agua milliQ y 900 µl de etanol absoluto.
- d. Se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.

- e. El pellet resultante se resuspende en 1 ml de agua milliQ y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- f. Al pellet se agrega el solvente (Metanol absoluto) en relación 10:1 (volumen/peso).
- g. Se deja con el solvente durante 48 horas.
- h. Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- i. Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 4:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante.
- b. El pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante.
- c. El pellet se inactiva durante una hora en 300 µl de agua milliQ y 900 µl de etanol absoluto.
- d. Se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- e. El pellet resultante se resuspende en 1 ml de agua milliQ y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante.
- f. Al pellet se agrega el solvente (Metanol absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso).
- g. Se deja con el solvente durante 40 min, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- h. Transcurridas los 40 min con el solvente sonicar durante 15 minutos las muestras.
- i. Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- j. Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 5:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 3000g por 5 minutos.
- b. El pellet se lava dos veces con agua destilada (al pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante) y se seca a 70C en un horno hasta que no cambie el peso
- c. Al pellet resultante se le agrega agua en relación 1:10 (1g/10ml) y se coloca en el microondas durante 20 segundos.
- d. Tras la exposición al microondas, se agrega el solvente (Metanol absoluto) en relación 10:1 (volumen/peso).
- e. Se deja con el solvente durante 40 min, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- f. Transcurridos los 40 min se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- g. Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 6:

- a. 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 3000g por 5 minutos.
- b. El pellet se lava dos veces con agua destilada (al pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante) y se seca a 70C en un horno hasta que no cambie el peso.
- c. Al pellet resultante se le agrega agua en relación 1:10 (1g/10ml) y se coloca en el microondas durante 20 segundos.
- d. Tras la exposición al microondas, se agrega el solvente (Metanol absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso).
- e. Se deja con el solvente durante 48 horas.
- f. Transcurridas las 48 horas con el solvente sonicar durante 15 minutos las muestras.
- g. Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.

- h.** Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 7:

- a.** 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 3000g por 5 minutos.
- b.** El pellet se lava dos veces con agua destilada (al pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante) y se seca a 70C en un horno hasta que no cambie el peso
- c.** Al pellet resultante se agrega el solvente (Etilacetato absoluto) en relación 10:1 (volumen/peso).
- d.** Se deja con el solvente durante 40 min.
- e.** Transcurridos los 40 min con el solvente sonicar las muestras durante 15 minutos las muestras.
- f.** Finalmente, se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- g.** Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Tratamiento 8:

- a.** 1 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 3000g por 5 minutos.
- b.** El pellet se lava dos veces con agua destilada (al pellet se lava con 1 ml de agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) y se descarta el sobrenadante) y se seca a 70C en un horno hasta que no cambie el peso
- c.** Al pellet resultante se le agrega el solvente (Etilacetato absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso).
- d.** Se deja con el solvente durante 48 horas, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- e.** Transcurridas las 48 horas se centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante para usarlo.
- f.** Se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

ANEXO 3: Protocolo empleado en la segunda extracción.

- a. 100 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifuga a 3000g por 5 minutos.
- b. El pellet se lava dos veces con agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a 20-24 °C y se descarta el sobrenadante.
- c. Seca el pellet a 70 C en un horno hasta que no cambie el peso.
- d. A la biomasa seca de le agrega el solvente (etilacetato absoluto o metanol absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso de biomas húmeda).
- e. Se deja con el solvente durante 48 horas, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- f. Transcurridos los dos días, se sónica durante 10 minutos.
- g. Posteriormente se filtra para remover restos de biomasa.
- h. El extracto obtenido se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

ANEXO 4: Protocolo empleado en la tercera extracción.

- a. 550 ml del cultivo con una densidad óptica medida a 750 nm de 0,15-0,30 se centrifugan a 3000g por 5 minutos.
- b. El pellet se lava dos veces con agua destilada milliQ estéril y se centrifuga a 10 000 g por 2 minutos a 20-24 °C y se descarta el sobrenadante.
- c. Seca el pellet a 55 C en un horno hasta que no cambie el peso.
- d. A la biomasa seca de le agrega el solvente (etilacetato absoluto) en relación 100:1 (volumen/peso de biomas húmeda).
- e. Se deja con el solvente durante 48 horas, en agitación todo el tiempo a 60 rpm.
- f. Transcurridos los dos días, se sónica durante 10 minutos.
- g. Posteriormente se filtra para remover restos de biomasa.
- h. El extracto obtenido se rotavapora y se almacena a 4°C en oscuridad hasta su uso.

ANEXO 5: Secuencia limpia de *Chlorococcum* sp.

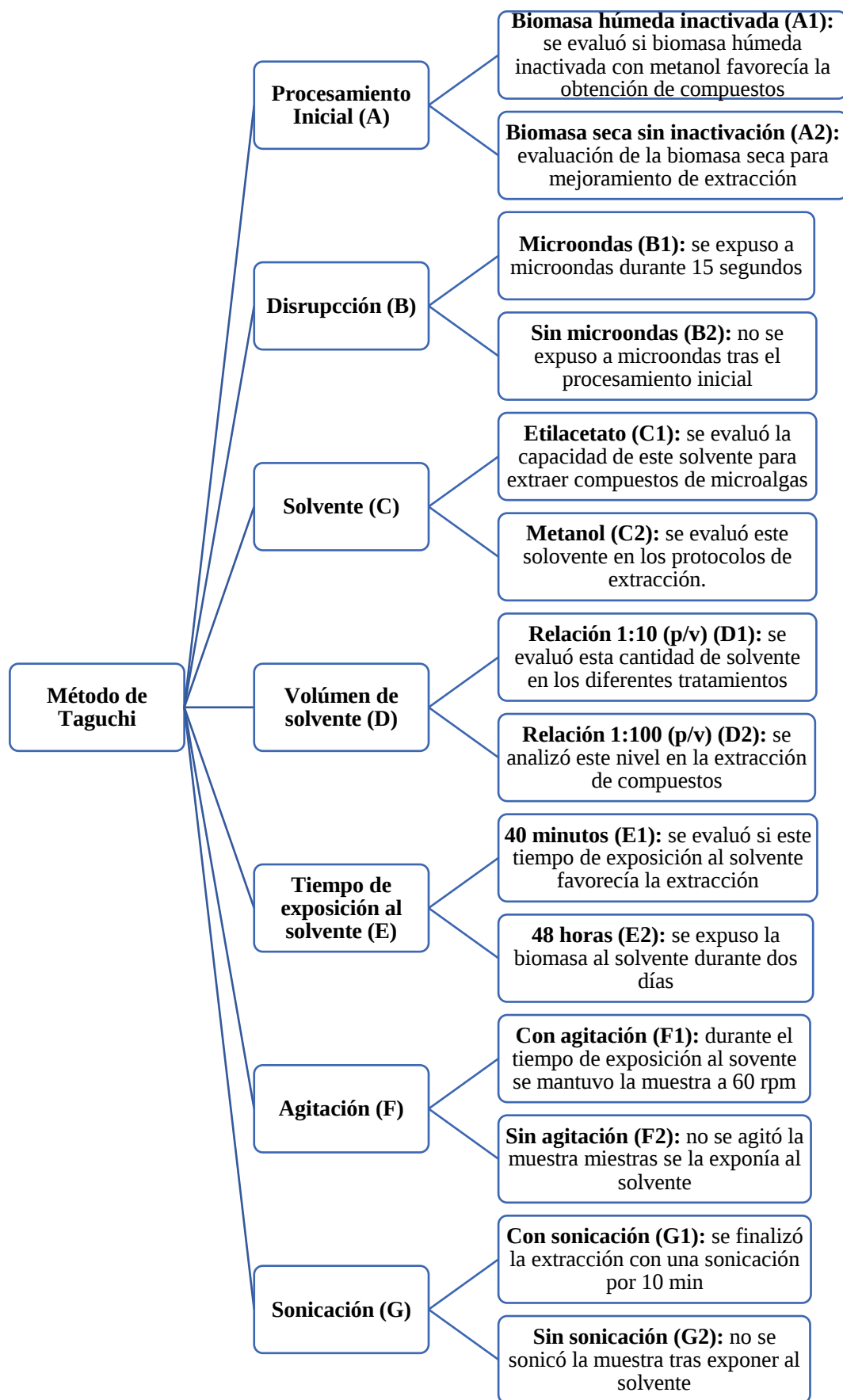
5'TTCCAGCTATGCAGTTYGAATCAYTCGYGATTYGGGCATCTATGCACCTG
 GATCAGCTGAAGACCAGAGGCTAACCAAGGACCCGATAAGGGCCGCAACT
 GGGTGGGCTGTCAAAGGCTATATTCTTAGTTGTTGGTCTGGGACTTTGTGTT
 YGGCCCTCAAACAGGAACCTATAAACCATAATCTCAAAAAGAAAGAGGCK
 AGCTAGTGAATRASAACASAAGG3'

ANEXO 6: Pruebas inter-sujetos tras el ANOVA multifactorial.

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	VAR00002	322,667 ^a	1	322,667	7,304	,013
	VAR00004	16,667 ^b	1	16,667	,287	,598
	VAR00006	60,167 ^c	1	60,167	1,072	,312
	VAR00008	16,667 ^d	1	16,667	,287	,598
	VAR00010	4,167 ^e	1	4,167	,071	,792
	VAR00012	,167 ^f	1	,167	,003	,958
	VAR00014	112,667 ^g	1	112,667	2,097	,162

En el recuadro verde se observa que hay diferencias significativas entre los niveles del factor (A), procesamiento inicial de la biomasa.

ANEXO 7. Explicación de los niveles empleados en el Método de Taguchi.



Factor analizado

Niveles de cada factor

ANEXO 8: Prueba estadística de t de student.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Se asumen varianzas iguales	1,538	,283	-,065	4	,951	-,667	10,242	-29,102	27,768
No se asumen varianzas iguales			-,065	3,370	,952	-,667	10,242	-31,324	29,991

En el recuadro azul se aprecia el p value de la prueba de Levene (0,283), en la que se indica igualdad de las varianzas, mientras que en el recuadro verde se observa la significancia de la prueba de t de student con varianzas iguales, donde se determina que no hay diferencias significativas entre los solventes empleados (metanol y etilacetato) y el número de picos.

ANEXO 9: Prueba estadística de Kruskal-Wallis.

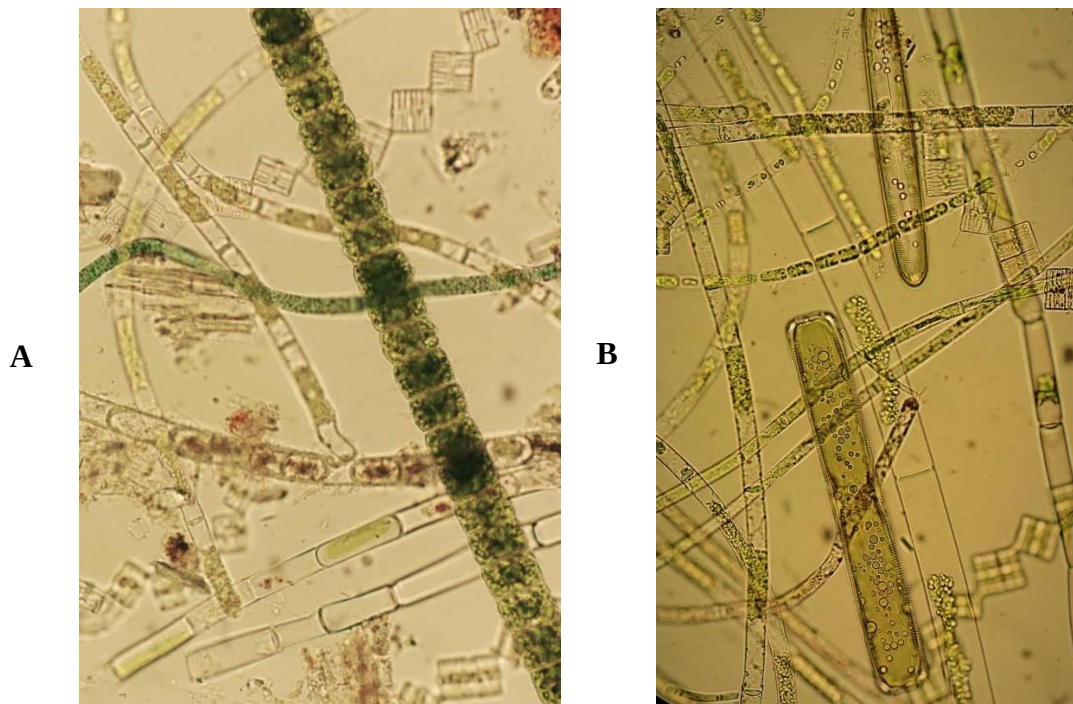
Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	Valor
Chi-cuadrado	7,513
gl	3
Sig. asintótica	,057

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

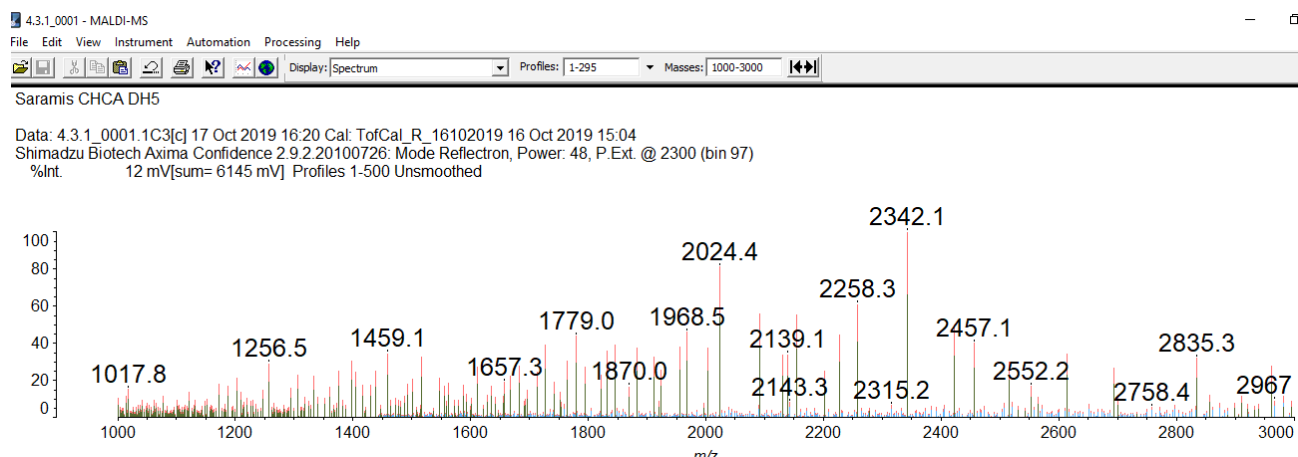
En esta prueba no paramétrica se observa una significancia de 0,057, lo cual indica que tampoco hay diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición y el solvente empleado.

ANEXO 10. Montaje fresco de muestras obtenidas de cuerpos de agua provenientes del Páramo de la Virgen en el Parque Nacional Cayambe-Coca.



Imágenes (A) y (B) demuestran la gran diversidad de microalgas y cianobacterias presentes en las muestras recolectadas de los diferentes lugares muestreados del Parque Nacional Cayambe-Coca, donde se aprecia gran variedad de Chlorophytas, Bacillaryophytas y Cyanophytas.

ANEXO 11. Lectura de MALDI-TOF (Rango 1000-3000 Da).



ANEXO 12. Tabla de equipos empleados para los diferentes procedimientos realizados.

Equipo	Código PUCE	Proceso en el que se empleó
Cabina de bioseguridad ESCO Class II BSC	0216146	Procesamiento de muestras, dispensar medio, inoculación de bacterias, microalgas y cianobacterias, realización de MIC e IC ₅₀
Incubadora SHELLAB	02162324	Incubación de bacterias a 37°C
Lector de microplacas BIO-RAD IMark Microplate Reader	0212493	Lectura de microplacas de 96 pocillo a 630 nm (Microdiluciones)
Espectrofotómetro Thermo Scientific ORION AQUAMATE 800	02121953	Lectura de densidad óptica de bacterias a 630 nm y microalgas a 750 nm
Microcentrífuga Spectranfuge 24D Labnet	021305125	Centrifugar tubos Eppendorf
Termobloque	02164213	Secado de biomasa microalgal
Refrigeradora Whirlpool	022512103	Almacenamiento de material a -4°C
Refrigeradora Frigidaine	C-0225051	Almacenamiento de material y reactivos de PCR
Termociclador BIO-RAD MyCycler	C-0212421	Reacción en cadena de la polimerasa
Fuente de poder FisherBiotech Electrophoresis Systems	02090999	Electroforesis horizontal de los productos de PCR
Balanza BOECO Germany BWL 51	02027423	Pesaje de medios, materiales y tubos
Autoclave horizontal Tuttnauer	02140818	Autoclavar material sucio, biopeligroso o de desecho
Autoclave Vetical Tuttnauer	02140817	Autoclavar material de vidrio, plástico o medios de cultivo
Destilador de Agua Tipo I - PURELAB Clssic EliCroM	02164532	Obtención de agua tipo I para preparación de material empleado en biología molecular
Destilador de Agua Tipo II - PURELAB Option ELCA	02164531	Obtención de agua destilada para medios de cultivo, autoclave, entre otros.