



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00377
41

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS EN
ESPECIES ALGALES EXPUESTAS AL AGUA
RESIDUAL DE ORIGEN DOMÉSTICO E
INDUSTRIAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

BIÓL. VÍCTOR MANUEL TORRES FLORES

DIRECTORA: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ

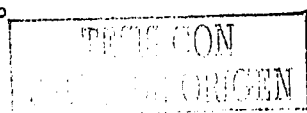
MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

A

ABRIL 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

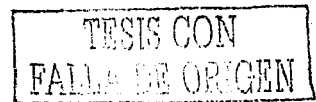
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de abril de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del alumno(a) Torres Flores Víctor Manuel, con número de cuenta 91602947, y número de expediente 3991126, con la tesis titulada: "Evaluación de proteínas de estrés en especies algales expuestas al agua residual de origen doméstico e industrial", bajo la dirección de la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez.

Presidente: Dra. Irma Aurora Rosas Pérez
Vocal: Dra. Claudia María García Cuellar
Secretario: Dra. Amelia Farres González Saravia
Suplente: Dra. María Amparo Martínez Arroyo
Suplente: Dr. Eberto Novelo Maldonado

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de noviembre de 2002


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa



c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Victor Torres Flores

FECHA: 23/Abril/2003

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina, Al Centro de Ciencia de la Atmósfera, de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo en este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado:

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez
Dra. Claudia María García Cuellar
Dra. Amelia Farrez González Saravia
Dra. María Amparo Martínez Arroyo
Dr. Eberto Novelo Maldonado

Por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, así como por sus correcciones y sus valiosas sugerencias, las cuales contribuyeron sin duda a mejorar la calidad de este trabajo.

En especial a las Doctoras Irma Aurora Rosas Pérez, Dra. Claudia María García Cuellar y Dra. Amparo Martínez Arroyo; por su incalculable apoyo, profesionalismo, consejos, estímulos y mucha paciencia que me ayudaron a que este trabajo se concluyera

Al Dr. Alvaro Osornio Vargas, por su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela Salgado, por su colaboración en el análisis de los pesos moleculares en los geles.

A la M. en C. Leticia Martínez, por su valioso apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Gerardo Flores, por su valioso apoyo brindado en el análisis estadístico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

Con cariño a mi hija: **VIVIAN**

Quien le ha dado un significado especial a mi vida,
espero que en el futuro esto sea un motivo
de superación, mi querida hija.

Con amor a mi esposa: **VIANNEY**

Por estar a mi lado, y por tú apoyo
tanto en casa como profesionalmente,
pero sobre todo por el cariño que he recibido.

A mis padres: **EVODIA Y ROBERTO**

Por darme el ser y brindarme su apoyo
y confianza para seguir adelante con
la seguridad de contar siempre con ustedes.

A mis hermanos: **ROBERTO, MARCO ANTONIO Y MIRIAM**

Por tener un carácter de lucha
y sobretodo por formar parte
de mi familia.

A mis sobrinos: **PERLA, DANIELA, MARCO ANTONIO,
KARLA Y FERNANDO**

Para que esté trabajo le sirva de estímulo
y con la esperanza de que sean los futuros
universitarios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
GENERALIDADES:	6
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	63
APÉNSICE	74

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E

RESUMEN

Se evaluó la síntesis de proteínas de estrés en especies algales expuestas a choque térmico, así como al agua residual de origen doméstico e industrial. Las especies algales seleccionadas fueron *Scenedesmus quadricauda* (UTEX 76) y *Microcystis aeruginosa* (UTEX LB 2383), las cuales fueron cultivadas en medio Bold 3N. Una vez obtenido un número considerable de organismos (2×10^4), éstos fueron expuestos a choque térmico de 10 y 38°C durante 15, 30, 60 y 90 minutos. Por otro lado los organismos también fueron expuestos a agua de origen doméstico e industrial durante 30 min, 60 min, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de tiempo a 25°C.

Al término de estos tratamientos se determinó la concentración de clorofila *a* por el método de extracción de acetona al 90% y la síntesis de proteínas *in novo* analizadas en un gel al 12% SDS-PAGE usando el método de Laemmli, visualizando los pesos moleculares por medio de fluorografía.

La concentración de clorofila *a* en ambas especies expuestas durante 15 y 30 minutos a 10 y 38°C disminuye ligeramente. En las aguas de origen doméstico e industrial, ambas especies bajan su concentración de clorofila *a* considerablemente.

En la exposición a choque térmico tenemos que a 10°C en todos los tiempos de exposición hay una inhibición de síntesis de proteínas tanto en *S. quadricauda* como en *M. aeruginosa*. En la temperatura de 38°C aumenta la síntesis *de novo* de la proteína de 60 kDa en ambas especies.

S. quadricauda al ser expuesta a agua de origen doméstico aumenta la síntesis de la proteína de 93 kDa conforme transcurre el tiempo de exposición; y *M. aeruginosa* sintetiza dos proteínas las de 83 y 60 kDa.

El efecto del agua de origen industrial sobre *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* se vio reflejado en el aumento en la síntesis de proteína de 60 kDa.

S. quadricauda y *M. aeruginosa* estresadas térmicamente y por agua de origen doméstico e industrial mostraron una ligera disminución de clorofila *a*.

Los resultados demuestran que la exposición a estrés térmico, agua de origen doméstico y agua de origen industrial inducen a la síntesis de proteínas de estrés en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos interactúan con los diversos componentes del ambiente, responden ante ello y a su vez influyen de modo diverso sobre el medio. El fitoplancton, como todos los organismos, es vulnerable a diversos tipos de estrés ambiental (bióticos y abióticos).

Un estrés ambiental puede ser definido como un factor externo que demanda una respuesta en un organismo con un gasto en su presupuesto energético para procesos de regulación, compensación, excreción, o por reparación ante exposición que puede ser crónica o aguda a un factor imperante.

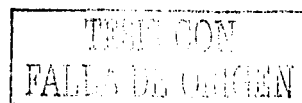
Un ejemplo de este estrés ambiental es la temperatura del agua que puede afectar a la mayoría de los organismos acuáticos, influyendo en su temperatura corporal, que llega a ser algunas veces igual que la del medio (Feder y Hofmann 1999).

Los organismos acuáticos han creado un ambiente interno que los protege, de tal manera que su metabolismo no esté bajo tensión aun cuando el ambiente externo sea desfavorable (Bidwel, 1979), el cual se observa en la mayoría de los organismos.

Las condiciones estresantes del medio se ven reflejadas con mayor claridad en los organismos del fitoplancton, tanto eucariontes como procariontes (Lindquist, 1986). Esto se observa por ejemplo en la síntesis de proteínas específicas como las denominadas de choque térmico (en inglés heat shock proteins ó HSPs), lo cual es considerado un mecanismo de supervivencia en todos los organismos (Welch y Feramisco 1984; Welch y Mizzen 1988).

Las proteínas de choque térmico son inducidas cuando los organismos están expuestos a altas temperaturas y otros factores de estrés. Las HSPs son chaperones que ayudan a la célula a hacer frente a esta crisis, por diferentes tipos de caminos (Feder y Hofmann 1999). Otro de los beneficios de la producción de proteínas de este tipo es prevenir la inducción de anomalías morfológicas de los organismos (Lindquist y Craig; 1988; Welch y Feramisco, 1984).

Se ha observado que la mayoría de los organismos fotosintéticos se aclimatan rápidamente a condiciones nutrimentales críticas, así como a temperaturas superiores a



25°C, lo cual se debe a la síntesis de proteínas de choque térmico con diferentes pesos moleculares (Valliammai *et al.*, 1987).

Esto implica que en los próximos años se tendrá que dar especial atención al conjunto de mensajeros que se producen en una célula en un momento dado, las proteínas que se expresan y las funciones para las cuales están destinadas. Pueden estar correlacionadas con enfermedades específicas o con etapas de alguna enfermedad. Por lo tanto, sin duda alguna, en un futuro cercano serán las proteínas las que provocarán un cambio significativo en el mundo de la genética y la medicina en general.

En el presente proyecto se propone estudiar la síntesis de proteínas de estrés y la respuesta fotosintética de *Microcystis aeruginosa* y *Scenedesmus quadricauda* expuestas a diferentes condiciones de estrés, como con diferente temperatura y aguas contaminadas de diferentes orígenes.

En estas condiciones de contaminación los organismos que habitan en este tipo de agua están sometidos a diferentes tipos de estrés. Al someter poblaciones cultivadas en laboratorio a estos tipos de agua se tendrá una respuesta reflejada en el patrón proteico de estos organismos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

Diversos investigadores han observado que en tejidos de diferentes organismos se induce la síntesis de grupos específicos de proteínas en condiciones ambientales estresantes, principalmente ante cambios drásticos de temperatura. Estas proteínas fueron llamadas proteínas de choque térmico (Ritosa, 1962; Yost y Lindquist, 1986; Lindquist, 1986; Lindquist y Craig 1988; Young y Ellinoit, 1989; Vanbogele y Neidhardt, 1990).

Valliammai *et al.*, (1987) evaluaron la respuesta del choque térmico en *Chlorella* (Chlorophyta) bajo condiciones de nutrimentos diferentes, expuesta a temperaturas que varían entre 25 y 35°C, el objetivo principal fue observar la síntesis de proteínas. Los autores concluyen que la formación de éstas se dio como protección de la célula, y registraron proteínas con los siguientes pesos moleculares: 96, 92, 80, 71, 70, 68, 44, y 19 kDa.

Aráoz *et al.*, (1998) estudiaron la actividad de traducción bajo radiación UV y temperatura estresante en *Nostoc* sp. (cianobacteria) aislada de Yanacocha, un lago Andino (Cuzco, Perú), detectaron un grupo de nueve proteínas de choque térmico las cuales son inducidas por la temperatura de 18 a 50°C, los pesos fueron de 90, 75, 69, 67, 45, 22 18 y 16 kDa. El estrés térmico aumentó la síntesis de proteínas, lo que no ocurrió con la radiación UVR, que sólo indujo la síntesis de la proteína de 18 kDa.

Las proteínas de choque térmico (HSPs) reciben mayor atención en organismos modelo que están bajo un estrés a nivel laboratorio. La variación de HSP en los genes que las codifican, revelan que: a) la expresión de las HSPs puede ocurrir constitutivamente; b) todas las especies tienen genes HSP pero pueden variar en los patrones de expresión; c) la expresión de HSPs puede ser correlacionada con la resistencia hacia un estrés; y d) las especies en su propio medio experimentan ciertos niveles de estrés (Feder y Hofmann 1999).

Por otro lado, es importante tener en cuenta la respuesta fotosintética a diversas condiciones ambientales. Michel y Key en 1987 evaluaron esta actividad y construyeron experimentalmente curvas de capacidad de fotosíntesis. Al ser este un proceso metabólico fundamental en las microalgas que se relaciona directamente con la captura y transformación de energía.

Masojidek *et al.*,(1999) observaron el papel de la xantofila en la adaptación de dos algas clorococcales; *S. quadricauda* y *C. sorokiniana* a alta irradiación bajo condiciones de laboratorio y campo. Encontraron que el ciclo de xantofilia es operativo en ambas especies *S. quadricauda* muestra una gran gama de pigmentos xantofilicos, en comparación a *C. sorokiniana* , cuya sensibilidad baja a la fotoinhibición. En general ambas algas tienen mayor xantofilia en campo que en laboratorio. *S. quadricauda* exhibe una alta capacidad de adaptación a la irradiación.

La respuesta inmediata de los organismos a un factor de estrés puede ser una inhibición de su desarrollo. Las algas han desarrollado una alta capacidad para enfrentarse a diferentes factores de estrés utilizando varios mecanismos de respuesta que operan a diferentes tiempos y que dependen de la naturaleza, de la intensidad y del tiempo de exposición al estrés, así como del proceso fisiológico involucrado. Este mecanismo de respuesta es compensatorio y en muchas ocasiones le permiten a las algas mantener una tasa constante de un proceso fisiológico aún bajo condiciones de estrés (Larcher, 1995 tomado de Ayala, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GENERALIDADES

Respuesta al estrés

El término estrés fue originalmente descrito por Hans Selye para describir la respuesta estereotipada e inespecífica de macroorganismos a una amplia variedad de estímulos externos y se ha aplicado el mismo término a la reacción uniforme de la célula a varios estresores, tales como lesión oxidativa, etanol, infecciones bacterianas y virales, metales pesados, inhibidores del metabolismo energético y cambios de pH. En términos globales se considera que la respuesta al estrés es una respuesta inmediata, compleja y transitoria de la actividad celular ante estímulos externos (Kaufmann, 1990).

El mecanismo por el cual el estrés es registrado por la célula y las vías involucradas en la transducción de esta señal para la activación de factores transcripcionales no están aún muy esclarecidas. Se ha propuesto que la acumulación de proteínas de choque juega un papel importante en la estimulación de la respuesta al estrés (Lindquist, 1986; Lindquist y Creig, 1988). Otros autores sugieren que la disrupción del balance en la oxido-reducción y el transporte de electrones en la mitocondria pueden ser el primer blanco de muchos agentes involucrados en dicha respuesta (Vanbogelen y Neidhardt, 1990).

Proteínas de estrés

Los trabajos experimentales sobre la respuesta al choque térmico en glándulas salivales de *Drosophila busckii* y *Drosophila melanogaster*, condujeron al descubrimiento de genes activos (puffs) o sitios de transcripción activa en el cromosoma, que eran inducidos por el choque térmico, el dinitrofenol y el salicilato de sodio, y cuyas variaciones comprometían bandas involucradas en actividades metabólicas específicas. Dichos genes fueron llamados genes de choque térmico (Ritosa, 1962 y 1964).

En los años 70's, la respuesta al choque térmico fue estudiada básicamente a nivel celular, lográndose llegar a importantes conclusiones sobre los genes involucrados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en dicha respuesta, inducidos en pocos minutos por muchos tipos de estrés celular. Por la misma época, Tissieres y colaboradores (1979) estudiaron la respuesta a nivel molecular y reportaron que este fenómeno estaba asociado a la síntesis de un grupo de proteínas que fueron denominadas proteínas de choque térmico y a la inhibición de la síntesis normal de proteínas.

La naturaleza generalizada de esta respuesta fue descubierta gradualmente y en 1985 Craig acuñó el término genérico de proteínas de estrés, al demostrar que muchos otros estresores ambientales, tales como anoxia, peróxido de hidrógeno, metales pesados, drogas, desacopladores de la fosforilación oxidativa, aminoácidos análogos, etc.; pueden inducir la síntesis de las proteínas de choque térmico (Craig, 1985; Linqvist, 1986) y no solamente en *Drosophila* sino también en otros organismos como levaduras, células aviares y *Tetrahymena* (Linqvist, 1986).

La respuesta al estrés es generalizada; es decir, que existen proteínas con esta función en todos los organismos y figuran entre las moléculas más conservadas que se conocen en la filogenia, tanto estructural como funcionalmente, representando por lo tanto un sistema adaptativo ancestral de convergencia en la evolución (Linqvist, 1986; Lewis y Pelham, 1986; Ellis *et al.*, 1989).

Las proteínas de choque térmico constituyen una superfamilia de proteínas, cuyo nombre deriva de su inducción específica durante el estudio de la respuesta celular al choque térmico en los organismos. Sin embargo, muchos de los miembros de esta familia son expresados constitutivamente en ausencia de cualquier tipo de estrés y son esenciales para la actividad y el crecimiento celular; además, muchas de estas proteínas, incluyendo aquellas que no responden significativamente al choque térmico, son inducidas por otras condiciones de estrés, cuyo común denominador es quizás la acumulación de proteínas alteradas en su estructura terciaria y cuaternaria o desdobladas en la célula (Botero, 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CLASIFICACIÓN

Las HSP pueden ser agrupadas en familias con base en su peso molecular (Nover y Neumann, 1989).

- Familia HSP 110-kDa (100-110 kDa)
 - Hsp 110 kDa
- Familia HSP 90 kDa (80-94 kDa)
 - HSP 90 kDa
 - GRP 94 kDa
- Familia HSP 70 kDa (65-78 kDa)
 - HSP 70 kDa o HSX 70 kDa
 - HSPc 70 kDa o p72
 - HSP 72 kDa o GRP 75 kDa o p70
 - GRP 78 kDa o BiP
- Familia HSP 60 kDa (56-61 kDa)
 - HSP 58.6 kDa
 - HSP 56 kDa o p56
- Familia HSP 20 kDa (10-46 kDa) o sep
 - HSP - H2B
 - Ubiquitina
 - HSP 28 kDa
 - ORP 32 kDa
 - HSP 47 kDa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FUNCIÓN

Familia HSP 110-kDa

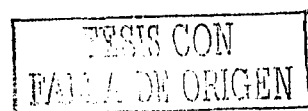
Las HSP (100 – 110 kDa) de esta familia son producidas por la mayoría de los eucariontes; pero sólo se han caracterizado detalladamente en mamíferos (Álvarez y Palacios; 1991). Las HSP son proteínas constitutivas y predominan en el núcleo concentradas en el nucleolo. Durante la respuesta al choque térmico de corta duración,

las HSP 110 se separan de la fase densa del cuerpo nucleolar, sin fragmentarlo y se hacen confluentes. Cuando el choque térmico es más prolongado, las HSP 110 forman un anillo en torno al nucleolo (Shyy *et al.*; 1986). Se postula que las HSP 110 se asocian con el ARN o con un complejo de proteínas que se unen al ARN y, dado que la producción celular de ribosomas es muy sensible al calor, se ha sugerido que las HSP 110 confieren protección a dichas estructuras ante cambios térmicos (Vanbogelen y Neidhardt, 1990; Nover *et al.*, 1988). Bajo condiciones de estrés y en particular cuando disminuyen los niveles de glucosa intracelular, dicha familia y otras proteínas reguladas por los niveles de glucosa son inducidas conjuntamente, independientemente o recíprocamente (Lindquist y Craig, 1988; Nover *et al.*, 1988).

Para determinar si la proteína HSP100 está asociada con la termotolerancia, en el frijol se clonaron dos genes homólogos de *hsp100/clpB* los cuales se copiaron y se sometieron bajo las mismas condiciones de estrés térmico con el fin de inducir la termotolerancia. Se realizó esto en el laboratorio y campo se demostró una asociación en la expresión de *hsp100/clpB* como una respuesta térmica en esta especie (Keeler *et al.*, 2000). También se realizó un ensayo con *Synechococcus sp.* para determinar si el gen *clpB* codifica la proteína de 97 kDa, se encontró que el gen *clpB* no era capaz de sintetizar proteínas de choque térmico sino quien lo hace es el gen *clpBII* demostrando por lo tanto que la proteína de 97kDa no es constitutiva; por lo que se concluye que el gen *clpBII* proporciona termotolerancia (Mats-Jerry *et al.*, 2001).

Familia HSP 90 kDa

Esta familia de proteínas ocupa el segundo lugar en tamaño de las HSP, está presente en todas las células y su síntesis es inducida por el choque térmico y por otras condiciones de estrés celular. Están localizadas en el citoplasma donde se encuentran asociadas con muchas proteínas celulares importantes, tales como la pp60src y otras proteínas oncogénicas codificadas por retrovirus, receptores de hormonas esteroides en su forma no transformada cinasas, actina y tubulina. Las HSP 90 son proteínas ácidas fosforiladas en residuos de serina que aunque no poseen actividad ATPasa se



unen al ATP bajo condiciones catiónicas y llevan a cabo su autofosforilación (Lindquist y Craig, 1988).

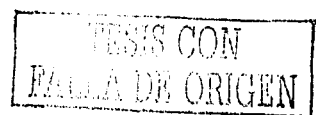
En el caso de glucocorticoides, el receptor interactúa con el complejo HSP 90-HSP 56-59 kDa, con una proteína de 23 kDa y con HSP 70. Se ha sugerido que el complejo heteromérico de proteínas HSP 90-HSP 56- HSP 70-p23 puede estar presente en el citoplasma independientemente de la presencia de receptores esteroidales, los cuales interaccionarían con estos complejos preexistentes. No se conoce la vía por la cual HSP 90 interaccionan con la HSP 56 (Sánchez, 1990).

La asociación de la HSP 90 con las proteínas mencionadas se ajusta a la función de chaperones moleculares que acompañan la síntesis o actividad de las moléculas constitutivas y biológicamente necesarias (Ellis, 1987; Lindquist y Craig; 1988; Ellis *et al.*, 1989; Gething y Sambrook, 1992).

Familia HSP 70 kDa

Esta familia de proteínas (homólogas a Dnak en *Escherichia coli*), consiste de por lo menos cuatro miembros estrechamente relacionados en su estructura y cuya principal característica es que hidrolizan el ATP. El primer nombre corresponde a la HSPc 70 o p72, que es una proteína de 23 kDa expresada constitutivamente en el citoplasma y el núcleo; el segundo miembro corresponde a la HSP 70, una proteína de 72 kDa que está presente en el citoplasma, núcleo y nucleolo; el tercer miembro corresponde a la GRP 78, HSP 80 o Bip, es una proteína de 78 kDa, la cual es expresada constitutivamente en el retículo endoplásmico; el cuarto miembro corresponde a la GRP 75, que es una proteína de 75 kDa identificada en la mitocondria. Los genes que codifican para la HSP 70 están localizados en los cromosomas humanos (Lindquist y Craig, 1988; Sargent *et al.*, 1989).

En condiciones basales, HSP 70 y HSPc 70 se localizan en el citoplasma y durante el choque térmico se translocan a las membranas celulares y al núcleo donde se unen a ribosomas parcialmente ensamblados, para concentrarse nuevamente en el citoplasma después del choque térmico. Este mecanismo es particularmente importante



en la termotolerancia traduccional confiriéndole a la célula protección a condiciones adversas del medio (Pelham, 1988; Welch y Feramisco, 1984; Welch y Mizzen, 1988). La HSPc 70 participa también en el desensamble de la clatrina que recubre las vesículas durante el transporte intracelular mediado por receptores. Dicho mecanismo ocurre como consecuencia de cambios conformacionales inducidos por el flujo de iones (Ca^{++} y/o K^{+}) del lumen de las vesículas al citoplasma, lo cual favorece la interacción de regiones específicas de las cadenas ligeras de clatrina con la HSPc 70 y estimula la actividad ATPásica de la misma con la consecuente hidrólisis de ATP y el inicio de la reacción de desensamble (DeLuca *et al.*, 1990; Nathke *et al.*, 1990).

La captura de proteínas anormales e insolubles en el retículo endoplásmico es efectuada por las GRP 78, las cuales solubilizan agregados de la misma manera que la HSP 70 actúa sobre proteínas nucleares desnaturalizadas. La abundancia de la GRP 78 en las células sugiere que estas proteínas participan también en el ensamble normal de proteínas de secreción. Esta idea es apoyada por el hallazgo de que GRP 78 es idéntica a la proteína BiP o proteína unidora de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, localizada en el retículo endoplásmico. Dicha proteína se une a las formas monoméricas de las cadenas pesadas (H) de la IgG, y favorece el ensamble de las mismas con las cadenas ligeras (L), para formar la estructura madura (H2L2) en los linfocitos pre-B (Lindquist y Craig, 1988; Pelham, 1986; y Haas y Wabel, 1983). Por lo tanto, la HSP 70, como chaperon molecular, participa en varios procesos celulares importantes como replicación del ADN y síntesis del ARN (en *E. coli*), transporte de péptidos a través de membranas y su unión con receptores del retículo endoplásmico (Lindquist y Craig, 1988; Gething y Sambrook, 1992).

Ortiz y Cardemil, (2001), compararon semillas de *Propopis chilensis* y *Glycine max*, y encontraron que al aumentar la temperatura a 35°C durante 30 min se incremento la concentración de ubiquitina, conjugada con el incremento de HSP 70 en ambas especies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

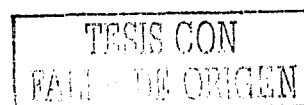
Numerosos estudios indican que las proteínas de estrés tienen un potencial como indicadores de exposición a contaminantes ambientales; El área con mayor investigaciones en esta campo es el de las plantas.

La expresión de Hsp 70 en *E. intestinalis*, fue estudiada bajo una variedad de estresores, para evaluar el uso potencial de Hsp como biomarcador de contaminación. *E. intestinalis* fue expuesta a estrés térmico, a diferentes concentraciones de cobre, nutrimentos y herbicidas. Se observó que la expresión de Hsp 70 aumenta con la exposición de cobre y decrece el crecimiento con el herbicida; Concluyeron que el uso de la expresión de Hsp 70 como un biomarcador en *E. intestinalis* aun no es muy claro (Lewis *et al.*, 2001).

El papel del ciclo de xanthophila en la adaptación de dos algas *chlorococcales* *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sorokiniana* a alta iradianza fue estudiado en campo y en laboratorio. El ciclo xantofilico se encontró operativo en ambas especies. No obstante esta contribución es distinguible sólo en *Scenedesmus*, cuyos cultivos muestran una gran gama de pigmentos xanthophilicos que *Chlorella* y baja sensibilidad a la fotoinhibición.

En general ambas algas tienen un gran gama de xanthophila cuando crecen en campo que en los cultivos en laboratorio. Comparando las dos especies; *Scenedesmus* presenta una alta capacidad de adaptación a la alta iradianza, en contraste, *Chlorella* representa una especie con un sistema atenué (Masojide *et al.*, 1999).

Se estudió la participación de Hsp 70B en el proceso de daño, reparación y recuperación del fotosistema II (PSII) en *Dunaliella salina*. El gen de hsp 70B fue clonado y secuenciado, los patrones de expresión fueron analizados bajo las condiciones de poca y alta luz asegurando el fotodaño del fotosistema II, los resultados fueron analizados por Northern blot y corrimiento nuclear, revelando un significativo pero transitoria inducción de la síntesis y acumulación de la HSP 70B (Yokthongwattana *et al.*, 2001).



En este estudio se hace uso del ensayo de ELISA para detectar la síntesis de Hsp 70 in *Raphidocelis subcapitata* en respuesta a cambios de pH, temperatura, ácidos húmicos, nitratos y fosfatos. Los resultados muestran que el alga responde a estos cambios en el ambiente por un incremento transitorio en los niveles de Hsp 70, lo cual depende del parámetro en investigación. Fuera de estos cinco parámetros estudiados, solamente la temperatura y posiblemente pH fueron capaces de generar tolerancia, por ejemplo el alga creció a un pH o a una temperatura diferente de las condiciones del control mostrando una adquisición de resistencia al Zn (5-10 M).

Ajustando el pH y la temperatura en dos cuerpos de agua se demuestra que son suficientes para inducir patrones similares a los presentados a la exposición con Zn. Estos resultados distinguen a la Hsp 70 como un buen biomarcador para contaminación ambiental (Bierkens *et al.*, 1998).

Las pequeñas proteínas de choque térmico (smHSPs) son ubiquitina en natural pero son inusualmente abundantes y diversas en plantas superiores al contrario de otros eucariontes. Los rangos de tamaño de las smHSPs son de 17 a 30 kDa. En plantas superiores seis genes nucleares codifican las smHSPs son definidos. Cada familia de genes codifica las proteínas encontradas en un compartimento celular distinto, incluyendo citosol, cloroplasto, ER y mitocondria.

FAMILIA HSP 60 kDa

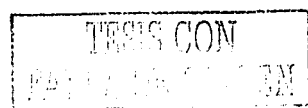
Pertencen a esta familia la HSP 58.6 homóloga a GroEL en *E. coli* y la HSP 56 clasificada como HSP (Sánchez, 1990). En las células humanas, la HSP 58.6 está localizada dentro de las mitocondrias (Álvarez y Palacios, 1991; Munk *et al.*, 1989). Bajo condiciones de estrés, la molécula es procesada y presentada en asociación con moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. Además se ha reportado que esta proteína estimula la producción de una fracción grande de células T con receptores gamma y delta de humanos. Se sugiere que esta molécula podría servir como blanco para la respuesta inmune protectora y autorreactiva (Young y Ellinoit, 1989; Lamb *et al.*, 1989). Se le ha asignado el nombre de chaperonina molecular por su participación en el plegamiento y ensamble correcto de polipéptidos después de su

translocación en la mitocondria, probablemente para exportarlos a la superficie (Gething y Sambrook, 1992; Mizzen *et al.*, 1991; Deshaies y Koch, 1988; Cheng y Ulrich, 1990). La HSP 56, antes conocida como p56, está presente en el citoplasma formando complejos heteroméricos con otras proteínas de choque térmico (HSP 90 y HSP 79). Los receptores esteroidales de glucocorticoides interaccionan con estos complejos y permanecen inactivos hasta que se recibe la señal hormonal (Picard, 1990; Sánchez, 1990).

FAMILIA hsp 20 kDa (sHSP)

Esta familia de proteínas tiene un peso molecular entre 10 y 46 kDa (GroE en *E. coli*). Las HSPs de bajo peso molecular o 28 kDa, la cual consiste de cuatro isoformas, tres de las cuales son proteínas fosforiladas en residuos de serina. Otras proteínas pertenecientes a esta familia son las 32 kDa, inducidas en algunas células por la luz ultravioleta, por varios promotores de tumores y carcinógenos químicos, metales pesados y peróxido de hidrógeno; pero no por la hipertermia. Otra enzima de aproximadamente 32 kDa con características de proteínas de estrés es la superoxidasa, la cual cataliza la reacción de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Esta enzima puede desempeñar la función de protección celular contra el daño oxidativo y es inducida tanto por la hipertermia como por la reoxigenación de los tejidos después de hipoxia. A este tipo de proteínas se les ha acuñado el nombre de proteínas reguladas por los niveles de oxígeno (Zimmerman *et al.*, 1991; Heacock y Sutherland, 1990). La inducción de estas proteínas durante la hipoxia aguda y la síntesis continua durante la hipoxia crónica, sugiere que las HAPs juegan un papel importante en la integridad del endotelio celular en aquellas condiciones donde descende el oxígeno ambiental (Hurst, 1990; Zimmerman *et al.*, 1991).

El análisis evolutivo sugiere que las familias de genes de smHSP surgen por la duplicación de los genes y divergencia posterior a la radiación de angiospermas. En general, las smHSPs no se encuentran en membrana normal vegetativa, pero se acumulan altos niveles en respuesta al estrés por calor. Las smHSPs específicas también expresan durante varias fases del desarrollo de la planta como parte del desarrollo endógeno programado. De tal manera, sí bien las smHSPs aparentemente



no son esenciales para el funcionamiento basal de la célula, como son las HSPs de alto peso molecular tales como HSP 90, HSP 70 y HSP 60, sus funciones son probablemente críticas para la sobrevivencia y recuperación del estrés térmico, así como también para proceso específico de desarrollo. Un análisis bioquímico indica que la smHSPs son encontradas en complejos de pesos moleculares altos entre 200-400 kDa que probablemente compensadas solamente de múltiples subunidades de smHSPs. Basado en estos datos, se sugiere que la smHSPs actúan *in vivo* como un tipo de chaperones moleculares particularmente para ligar a proteínas desnaturalizadas previniendo la inactivación irreversible de la proteína y agregación, y que los chaperones activos de smHSPs contribuyan a el desarrollo de la termotolerancia (Waters *et al.*, 1996).

FAMILIA 8.5 kDa

Las ubiquitinas constituyen una familia de proteínas inducibles por el calor y consta de aproximadamente 76 aminoácidos (Lindquist y Craig, 1988; Bond y Álvarez y Palacios, 1991). Estas proteínas están conservadas en todos los eucariotes y se observa que la sobrecarga o inactivación del sistema de ubiquitina induce la síntesis de otras HSP, lo que sugiere que la señal común de inducción de la respuesta de choque térmico es la desnaturalización proteica. Por tal motivo, se ha pensado que esta familia de proteínas es necesaria para la degradación de proteínas anormales durante el estrés celular o después del choque térmico (Lindquist y Craig, 1988; Finley *et al.*, 1984). En la respuesta inmune se ha demostrado que las ubiquitinas son elementos integrales del receptor de linfocitos (identificado con el anticuerpo monoclonal MEL-14) involucrado en la interacción de dichas células con el endotelio (Kaufmann, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ORGANISMOS DE PRUEBA

Scenedesmus quadricauda (Turp.) Bréb.

El cenobio está formado por células elipsoidales en número de 2,4,8 y a veces 16 ó 32 colocadas en una serie simple o alternada, presentan espinas en las células terminales, él número de espinas es siempre de 4. Presentan reproducción asexual: cada cenobio produce un autocenobio y el número de células del autocenobio no es necesariamente igual al número del cenobio madre.

El género *Scenedesmus* está comúnmente en aguas salobres y frescas especialmente en condiciones ricas en nutrimentos y comúnmente usado en investigaciones fisiológicas en plantas.

CLASIFICACIÓN

(Smith, 1916; citado por Ramos, 1976)

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Scenedesmaceae

Genero: *Scenedesmus*

Especie: *Scenedesmus quadricauda*



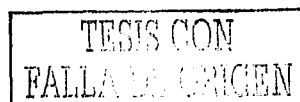
Figura 1 *Scenedesmus quadricauda*

Fuente: Pickett-Heaps, 1975

Datos de UTEX

76 *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb.:

MEDIUM: proteose; ORIGIN: *isolation*: 8/40 by E.G. Pringsheim from garden pond; Cambridge, England; *deposition*: 1952-5 from CCAP 276/4b; RELATIVES: CCAP 276/4B; SAG 276-4b *Scenedesmus communis*; ATCC 30428, ATCC 11460; NOTES: a.k.a. *Scenedesmus communis* (Hegewald 1989)



Microcystis aeruginosa Kütz. em. Elenkin:

Consiste de colonias de pequeñas células, que son uniformemente distribuidas en una matriz gelatinosa.

Cuando jóvenes las colonias son esféricas.

La reproducción se lleva a cabo por medio de la división celular, incluyendo la formación de nanocitos.

CLASIFICACIÓN

División: Cyanoprokaryota

Clase: Cyanophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Chlorococcaceae

Genero: *Microcystis*

Especie: *Microcystis aeruginosa*

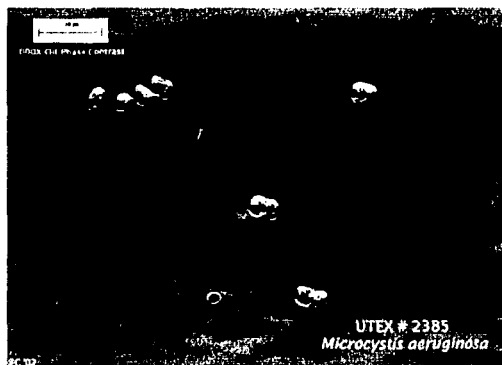


Figura 2: *Microcystis aeruginosa*

Fuente: UTEX, 2001

Datos de UTEX

LB 2385 *Microcystis aeruginosa* Kütz. em. Elenkin:

MEDIUM: bold 3N; ORIGIN: *isolation*: 9/54 by A. Zehnder; Little Rideau Lake, Ontario, Canada; *deposition*: 4/84 by P. Gorham as NRC-1, produces toxin microcystin; RELATIVES: CCAP 1450/6; NOTES: (Hughes et al. 1958)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de proteínas de estrés y clorofila *a* en *Scenedesmus quadricauda* y *Microcystis aeruginosa*, expuestas a 10 y 38°C y al agua residual tanto de origen doméstico como industrial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si a 10 y 38°C y al agua residual de origen doméstico e industrial, *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* afectan la concentración de sus pigmentos fotosintéticos.
- Determinar el patrón de las proteínas que se sintetizan *de novo* y su concentración en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa*, expuestas a diferentes temperaturas y al agua residual de diferentes orígenes
- Determinar si las proteínas de estrés son indicadores de exposición a contaminantes ambientales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cultivos de *Scenedesmus quadricauda*, UTEX 76 y *Microcystis aeruginosa*, UTEX LB 2385, de la Universidad de Texas. Se mantuvieron en condiciones de aereación continua e iluminación, $(400-500 \mu E m^{-2} s^{-1})^2$ proveída por dos lámparas de halógeno) en medio Bold 3N (anexo I), sincronizando el crecimiento por luz-oscuridad (14-10h luz/8-10h oscuridad) El ciclo celular fue medido por conteo del número relativo de células usando un microscopio óptico invertido (Zeiss)

EXPERIMENTO I

Se tomaron submuestras de la población (2×10^4 Ub/ml) y se colocaron en baños térmicos (marca HAAKE D8) a las temperaturas y tiempos de exposición que se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Diseño experimental para *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* en medio de cultivo expuestos a 10°C y 38°C por diferentes tiempos

Temperatura	T°. Amb 25°C. (testigos)	10°C				38°C			
		Minutos							
Tiempo de Exposición		15	30	60	90	15	30	60	90

EXPERIMENTO II

Por otro lado con diferentes tiempos de exposición (tabla 2) los organismos se colocaron en muestras de agua contaminada procedente de origen doméstico e industrial libres de organismos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Diseño experimental para <i>S. quadricauda</i> y <i>M. aeruginosa</i> expuestos en agua de origen doméstico (Xochimilco) e industrial (Río La Compañía) a 25°C por diferentes tiempos						
30 minutos	Horas					
	1	2	3	4	5	6

Para elegir los cuerpos de agua se realizó un análisis sobre el grado de contaminación de cada uno de ellos, tomando en cuenta las posibles fuentes de contaminación, que son las descargas de agua tanto de origen doméstico como industrial. Una vez realizado este estudio se eligieron los canales de Xochimilco (Distrito Federal) y el Río La Compañía, ubicado en el municipio de Netzahualcóyotl (Estado de México).

La toma de muestra de agua fue a una profundidad de 50 cm para Xochimilco y a 30 cm en el Río La Compañía, con botella van Door. Posteriormente las muestras se transportaron en botellas de plástico de polietileno al laboratorio.

Las muestras obtenidas en cada cuerpo de agua se homogeneizaron perfectamente y se dividieron para filtrar 100 ml a través de papel filtro (con una abertura de poro de 0.2 μm) con el fin de obtener una muestra de agua libre de organismos, pero conservando las características físicas y químicas del agua, así como sus concentraciones de nutrimentos.

TRABAJO DE LABORATORIO

Para observar el efecto de las condiciones estresantes en las poblaciones algales, se determinó la concentración de clorofila *a*, proteínas de estrés y sus pesos moleculares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANÁLISIS DE CLOROFILA *a*

Después de ser sometidas las poblaciones algales a los diferentes tratamientos se filtraron 10 ml de cada muestra a través de papel filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F (con una abertura de poro de 0.7 μm), para su análisis por el método de extracción con acetona al 90%; se leyeron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 552A, utilizando la fórmula de Strickland y Parson (1977).

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

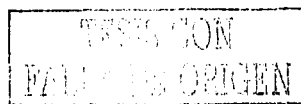
Para la inducción de la expresión de las HSPs, al cultivo de la población (2×10^4 Ubl/ml) se alicuotaron en 1 ml y se sometieron a los tratamientos como se describe en las tablas 1 y 2, se agregó L-[^{35}S] Metionina (925 KBq/ml^{-1} Hertmann Analytic, Germany). Una vez pasado el tiempo de cada tratamiento se paró la reacción con 10 mg/ml de metionina no radiactiva. Las células se lisaron con buffer Tris-HCl 20 mM (pH 8.0) conteniendo NP-40 1 % y NaCl 150 mM dejándolas en éste por 30 minutos a 4°C y para ayudar al lisado se realizó una fricción de cristal porcelana durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 15,000 X g por 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para el análisis de proteínas.

SDS-PAGE

Las proteínas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%- SDS, usando el método Laemmli (1970). Las muestras de proteínas fueron solubilizadas con buffer (Tris 0.5 M, pH 6.8), SDS 12%, 2 Mercaptoetanol 2%, Azul de Bromofenol 1% y glicerol 15%. Las muestras fueron calentadas a 90°C por 2 min y centrifugadas a 3000 X g durante dos minutos y se cargó el sobrenadante al gel.

La electroforesis se corrió a 150 volts, por una hora y 20 minutos.

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie Brilliant R-25, 0.1% y destañidos con una mezcla de metanol al 50%, ácido acético 10%. Los geles fueron procesados por fluorografía de acuerdo a Bonner y Laskey (1974) y expuestos a un Hyperfilm



(Amersham Pharmacia HP79NA) a -70°C por una semana. Los marcadores de peso molecular usados fueron la miosina (220 kDa), fosforilasa b (97 kDa), fosforilasa b (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidores tripsina (20,1 kDa) y lisozima (14.3 kDa), de Amersham Pharmacia.

La intensidad de las bandas fue determinada con el programa Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

Finalmente, a los resultados experimentales se les aplicó una prueba de significancia (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), ver apéndice.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGUA DE ORIGEN ORIGEN DOMÉSTICO

Xochimilco

CLIMA. El clima de Xochimilco, de acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por E. García (1981), se clasifica como C (wo) (w) b (i), es decir, clima templado húmedo, considerado como el más seco de los templados subhúmedos con lluvias en verano, con una P/T 43.2 mm. Los meses más lluviosos comprenden el periodo de junio a septiembre y los más secos de febrero a marzo, con veranos frescos, largos, con una temperatura media del mes más caliente entre 6.5 y 22°C. Temperatura media mensual con una oscilación entre 5 y 7°C

Este es un ejemplo de agua de origen doméstico.

Tabla 3. CONCENTRACIÓN DE NUTRIMENTOS (mg/l) EN EL LAGO DE XOCHIMILCO

	<i>ÉPOCA DE LLUVIAS</i>	<i>ÉPOCA DE SECAS</i>
NO ₃	0.24	0.24
NO ₂	0.01	0.01
NH ₄	0.26	0.32
PO ₄	2.67	0.72

(Torres, 1999)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ORIGEN INDUSTRIAL

Río La Compañía

El Río La Compañía es un claro ejemplo de contaminación industrial y doméstica, existen 5 municipios que potencialmente vierten sus aguas residuales a su cauce como son: Tlalmanalco, Cocotitlán, Ixtapaluca, Los Reyes La Paz y Ciudad Netzahualcóyotl. Las aguas residuales arrastran una gran carga contaminante de aproximadamente 4,948 establecimientos manufactureros, entre los que sobresalen la manufactura de productos alimenticios, bebidas, tabaco, productos minerales no metálicos, fabricación de materiales de arcilla para la construcción, elaboración de productos de panadería, molienda, textiles, industria de cuero, industria de la madera, productos metálicos, de productos de papel; de tal forma que el curso de este río se encuentra totalmente afectado por estas descargas.

Netzahualcóyotl se encuentra en una zona de clima semiseco templado, presenta lluvias de verano y un porcentaje de precipitación invernal entre 5 y 10.2. La precipitación media anual es de 500 a 600 mm., el rango térmico medio tiene un valor menor entre 14 y 18°C.

Tabla 4. Concentración de contaminantes del Río La Compañía

pH	7.86	Temperatura (°C)	24
Conductividad eléctrica (micromhos/S.ms)	48803	Oxígeno Disuelto(mg O ₂ /L)	N.D.
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	794.53	Acidez (mg CaCO ₃ /L)	32.59
Sólidos totales(mg/L)	1776.43	Sólidos Sedimentables (mg/L)	2.1
Grasas y Aceites (mg/L)	443.77	Extracción con cloroformo (mg/L)	4.81
DBO (mg O ₂ /L)	191.19	DQO (mg/L)	483.31
Detergentes (mg/L)	18.30	Coliformes Fecales (NMP/100 ml.)	4347
Fe (mg/L)	5.22	Cu (mg/L)	0.471

(Hernández y Rivera, 1996)

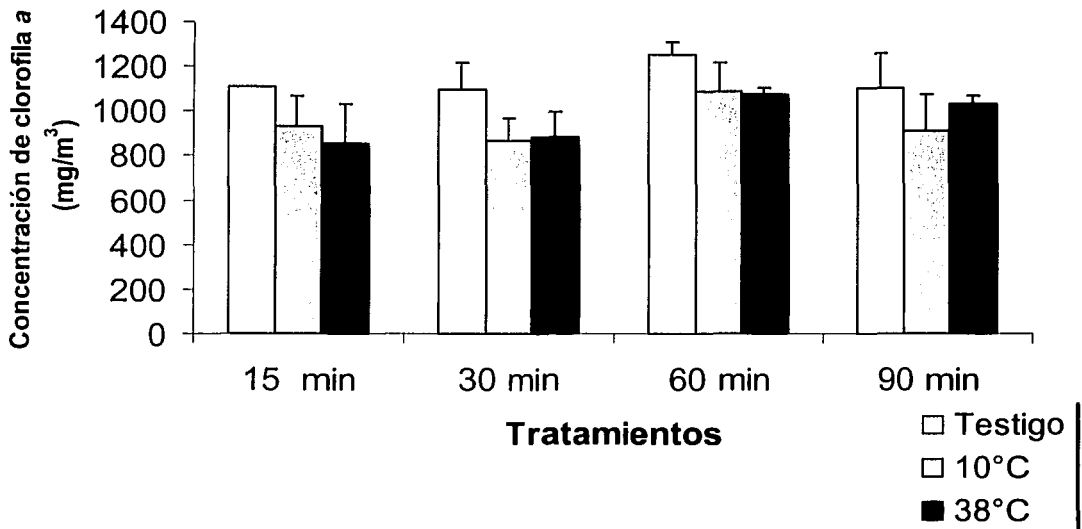
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA *a*

Scenedesmus quadricauda

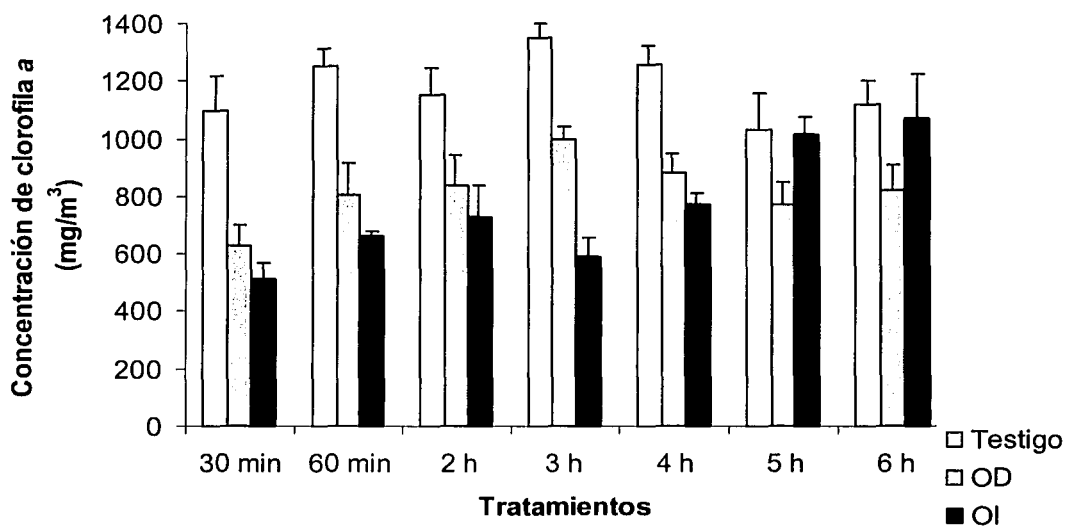
La gráfica 1 muestra la concentración de clorofila *a* obtenida en *S. quadricauda* expuesto a 10 y 38°C por diferentes tiempos. La temperatura ambiente (25°C) fue tomada como testigo en el experimento. Comparando los valores obtenidos a 10°C al cabo de 30 minutos se presentó un valor inferior de 867 mg/m³ y a 60 min 1086 mg/m³, sin embargo ambos valores no superan al testigo. Por otro lado a 38°C el comportamiento es diferente, ya que a 15 min se obtuvo una concentración de 854 mg/m³, inferior a 1072 mg/m³ que se presenta al término de 60 min, sin diferencia estadística entre los tiempos de tratamientos en ambas temperaturas (10°C P> 0.9970 y a 38°C P> 0.2798).



Gráfica 1. Concentración de clorofila *a* de *Scenedesmus quadricauda* expuesto a 10 y 38°C por diferentes tiempos en medio de cultivo Bold 3N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

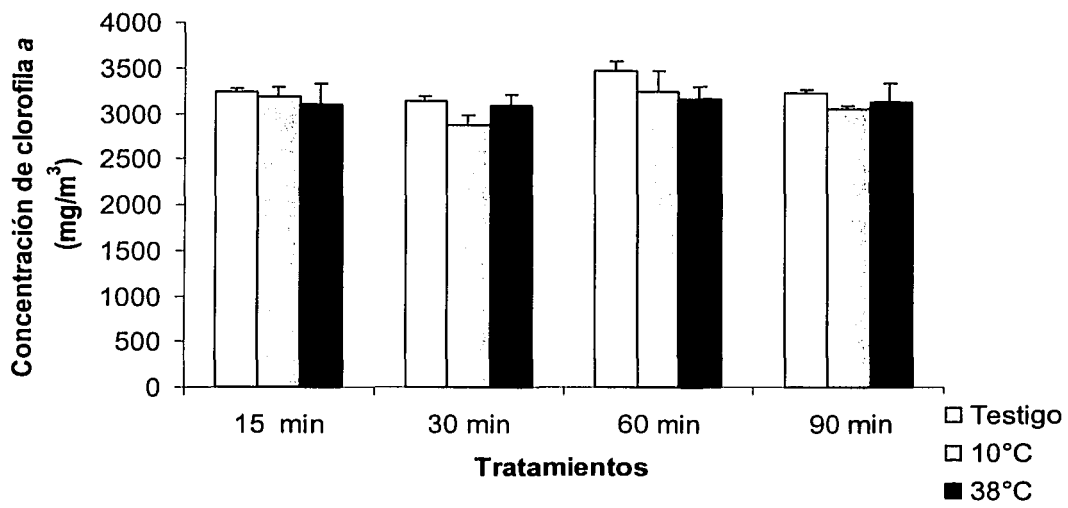
La respuesta que tuvo *S. quadricauda* en su concentración de clorofila *a* al ser expuesto a diferentes tiempos en agua de origen doméstico e industrial se compara en la gráfica 2. En respuesta a los tratamientos en el agua de origen doméstico a 30 min el valor es 630 mg/m³. Al cabo de 3 horas la concentración aumentó a 1000 mg/m³. En la concentración de clorofila *a* obtenida en el tratamiento con agua de origen industrial a 30 min se tuvo un dato de 513 mg/m³ y a 6 horas el valor aumento hasta 1071 mg/m³ lo que la concentración aumenta al transcurrir el tiempo de exposición, nunca igualando o superando los valores de los testigos. Cabe resaltar que aun cuando el comportamiento de *S. quadricauda* expuesto a estos tipos de agua contaminada presenta variación entre un tiempo y otro, no hay diferencia estadística significativa (origen doméstico $P > 0.9852$ y origen industrial $P > 0.4465$).



Gráfica 2. Concentración de clorofila *a* de *Scenedesmus quadricauda* expuesto al agua de origen doméstico (Canales de Xochimilco) e industrial (Río La Compañía) por diferentes tiempos.

Microcystis aeruginosa

En la gráfica 3 se observa la concentración de clorofila *a* en *M. aeruginosa*, expuesto a 10 y 38°C. A 10°C durante 30 min se tuvo un valor de 2867 mg/m³, y a esta misma temperatura pero a 60 min la concentración fue 3237 mg/m³. Por otro lado a 38°C durante 30 min se registra una concentración de 3083 mg/m³ siendo un comportamiento semejante con 10°C, ya que también a 60 min se tuvo el valor superior de 3144 mg/m³, similar a los testigos, por lo que aquí tampoco hay diferencia significativa (10°C $P > 0.5303$ y 38°C $P > 0.2088$).

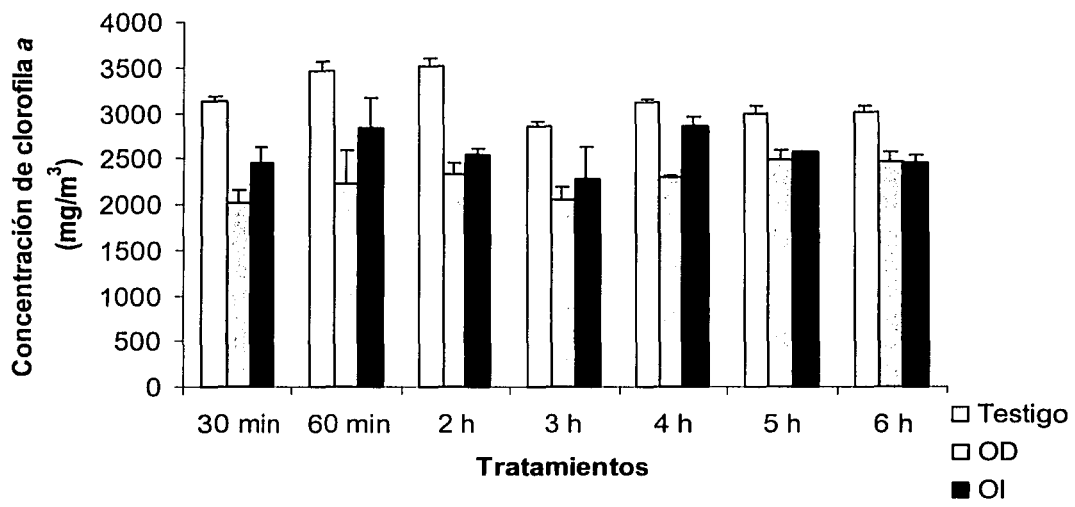


Gráfica 3. Concentración de clorofila *a* de *Microcystis aeruginosa* expuesto a 10 y 38°C por diferentes tiempos en medio de cultivo Bold 3N.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La gráfica 4 presenta la concentración de clorofila *a* obtenidas para *M. aeruginosa* al someterla en agua de origen doméstico e industrial durante diferentes tiempos (tabla 2). Al observar los datos se estableció que a 30 min en agua de origen doméstico disminuye a 2009 mg/m³. Después de 5 horas la concentración aumentó ligeramente a 2482 mg/m³ sin tener diferencia estadística con algún testigo $P > 0.1696$

En el tratamiento con agua de origen industrial el valor inferior se obtiene a 3 horas con una concentración de 2271 mg/m³ y a 4 horas aumento a 2850 mg/m³. No se encuentra diferencia estadística significativa entre los valores registrados a diferentes tiempos, $P > 0.8648$



Gráfica 4. Concentración de clorofila *a* de *Microcystis aeruginosa* expuesto en agua de origen doméstica (canales de Xochimilco) e industrial (Río La Compañía) por diferentes tiempos.

TESIS CON
FALLA EN ORIGEN

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Scenedesmus quadricauda

En la figura 3 se observa la apariencia de proteínas extraídas en los testigos de *S. quadricauda* incubados en medio Bold 3N a 25°C, en la cual a 15 y 30 min se presentan las proteínas de pesos moleculares de 26 hasta 150 kilodaltones (kDa), con ligeras variaciones de intensidad entre un tiempo y otro (anexo II, tabla 5). A los 60 y 90 min se observaron las mismas proteínas de pesos moleculares que a 15 y 30 min, se sintetizó además la proteína de 150 kDa, que disminuye su intensidad al cabo de 90 minutos.

Con respecto a los pesos que se presentan en los testigos a partir de 2, 3, 4, 5, y 6 horas que se observan en la figura 3, podemos notar que en todos estos tiempos, se presentaron pesos de 150, 98, 93, 86, 83, 75, 70, 65, 60, 50, 42, 41, 35, 29, 28, 27 y 26 kDa, los cuales aumentan su intensidad a partir de las 4 horas de exposición y disminuye en el tratamiento de 5 y 6 horas. Con relación al análisis estadístico tenemos que el testigo 60 minutos es diferente a 3 y 5 horas ($P > 0.0006$).

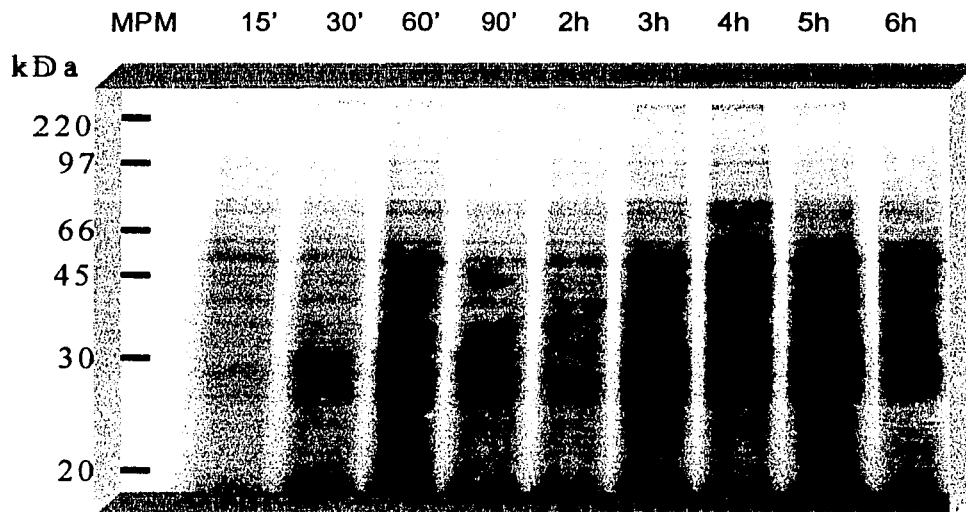


Figura 3. Patrón de la síntesis de proteínas en de *S. quadricauda* incubados en medio Bold 3N a 25°C (testigos). Los aminoácidos fueron marcados radioactivamente con 925 KBq/ml. de [³⁵S Metionina], separados por SDS-PAGE usando geles al 12 % y visualizados por fluorografía. Los carriles fueron cargados con 2×10^6 células.

En la figura 4 se observa las proteínas de *S. quadricauda* expuesta a 10°C. Durante 15 min sintetiza proteínas con pesos moleculares de 75, 50, 42, 35, 29 y 26 kDa. A 30 min se expresó, además, una proteína con un peso molecular de 60 kDa. La concentración de la proteína de un tiempo a otro, aumenta ligeramente en todos los pesos. En 60 min se observa que la expresión disminuye debido a que sólo están presentes las proteínas de 75, 35, 29 y 26 kDa. A los 90 min, además de las proteínas que se expresaron en el tiempo anterior, se expresaron dos proteínas de 50 y 42 kDa. Comparando estadísticamente las concentraciones de las proteínas sintetizadas se observó que a estas temperaturas no hay diferencias significativas ($P > 0.1191$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La respuesta de *S. quadricauda* a 38 °C se observa en la figura 4 después de 15, 30, 60 y 90 min de exposición. A través del análisis fluorográfico se determinó que a 15 min se presentaron las proteínas con pesos moleculares de 93, 83, 75, 60, 50, 42, 35, 29, y 26 kDa. Para esta misma temperatura, pero a 30 min, las proteínas son las mismas y se sintetizan dos más (150 y 28 kDa). Con respecto a la intensidad en 93, 83, 50, 42, 35 y 29 kDa es similar entre 15 y 30 min, se observó un ligero aumento en las proteínas de 75 y 60 kDa. Al transcurrir 60 min de exposición los pesos moleculares permanecen constantes con respecto al tratamiento de 30 min se agregó únicamente el de 98 kDa, sin embargo en todos los pesos (tabla 6) la intensidad aumenta significativamente con respecto al tiempo anterior. Para los 90 min el número de bandas siguen constantes, aumenta únicamente la intensidad de ahí se resalta que conforme pasa el tiempo aumenta la concentración de las mismas.

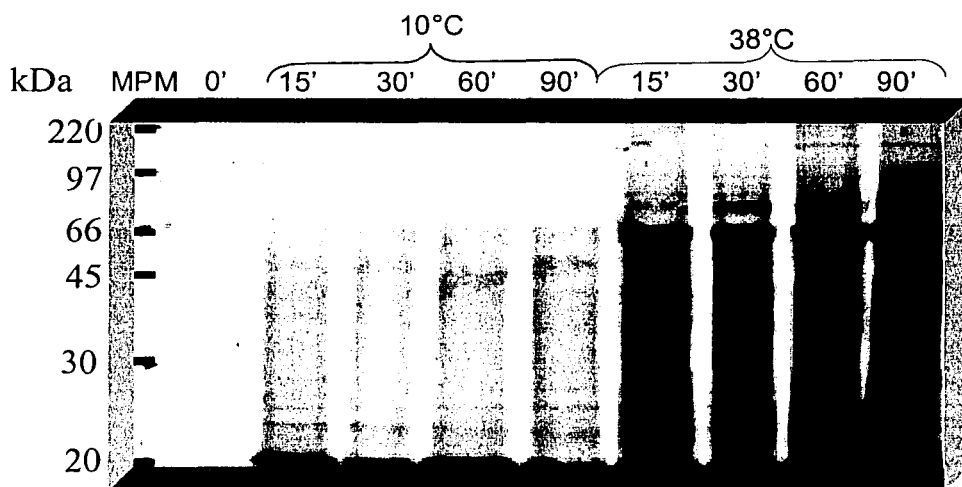


Figura 4. Patrón de la síntesis de proteínas de *S. quadricauda* incubados en medio Bold 3N a 10 y 38°C en diferentes tiempos

Dada la gran variación de bandas de proteínas que presentaron los tratamientos, se realizó una selección de las proteínas tomando en cuenta su mayor variación en cuanto a su concentración, así como su presencia o ausencia en algún tratamiento. Los pesos moleculares seleccionados se encontraron en el intervalo de 97 a 45 kDa. En la figura 5-A, se observan los testigos obtenidos en *S. quadricauda*, podemos resaltar que no hay variación en la intensidad con respecto al tiempo, ya que la diferencia no fue significativa.

De la figura 5-B se resaltó la variación de las proteínas entre los pesos de 97 y 45 kDa expresadas por *S. quadricauda*, a 38°C. Podemos destacar que la intensidad cambia con respecto al tiempo, siendo más significativo el incremento en la síntesis de proteínas de 75 y 60 kDa.

En la figura 5-C se observa la síntesis de proteínas en los intervalos de 97 a 45 kDa producida por *S. quadricauda* a 10°C. De esto se puede describir que sólo están presentes los pesos moleculares de 75, 60 y 50 kDa y su intensidad es muy baja, comparada con la que se expresó en 38°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

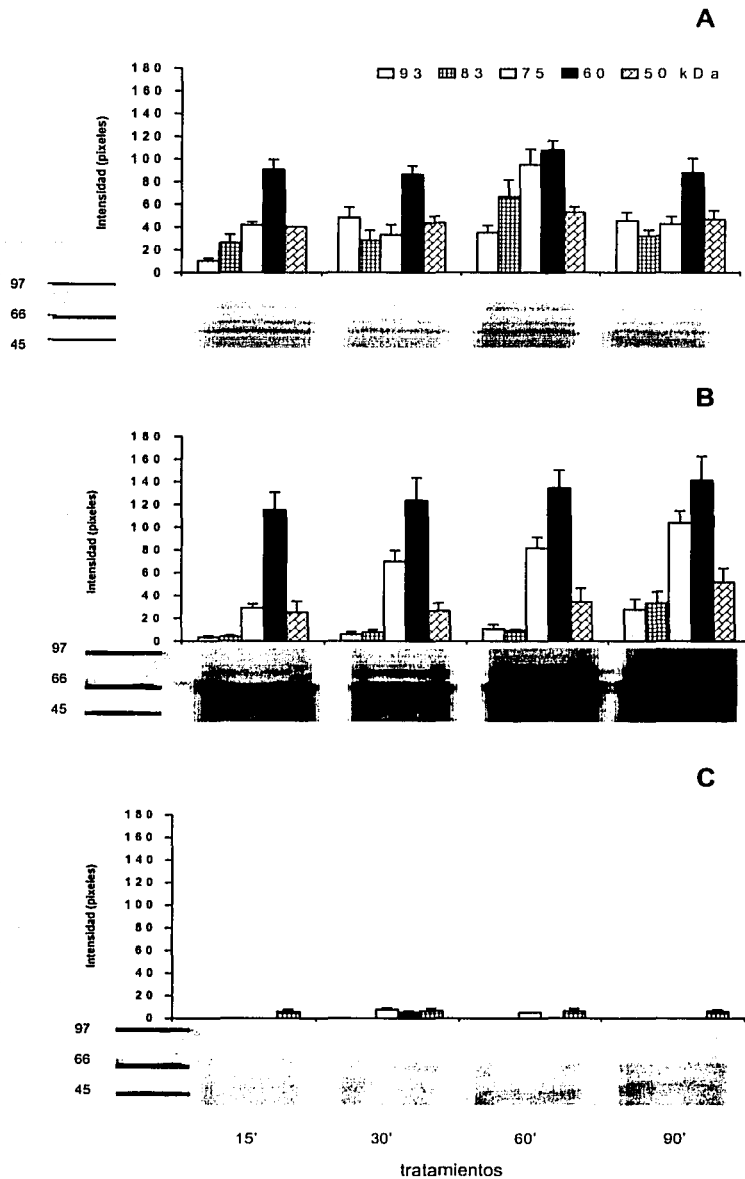


Figura.5. Patrón de la síntesis de proteínas de *S. quadricauda*: incubados en medio Bold 3N; **A.** testigos a 25°C.; **B.** Choque térmico a 38°C y **C.** 10°C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 6 se presenta el patrón de la síntesis de proteínas de estrés en de *S. quadricauda* incubada en agua de origen doméstico a 25°C por diferentes tiempos. A 30 min de exposición las proteínas que se encontraron son 75, 65, 42, 41, 35 y 29 kDa; al cabo de una hora continuaron las mismas bandas y se sintetizaron dos proteínas más, de 93 y 70 kDa; en la intensidad no se tuvo ninguna variación significativa. A las 2 horas de exposición además de las proteínas ya presentes en 1 hora se agregaron las de 33, 27, y 26 kDa. (Tabla 7). Así también, se presenta este comportamiento a las 3 horas. Para las 4 y 5 horas los pesos moleculares expresados son 93, 75, 70, 65, 50, 41, 37, 35, 33, 29, 27 y 26 kDa. A las 6 horas se presentan dos proteínas con pesos moleculares más que son de 98 y 42 kDa. Con los demás pesos la diferencia radica en la intensidad, de ahí que al observar a 6 horas de exposición se torne más intenso. Se verificó a través del análisis estadístico siendo este tiempo de exposición el que presenta un comportamiento distinto a los demás al transcurrir el tiempo se intensifica la banda de 93 y la de 75 kDa.

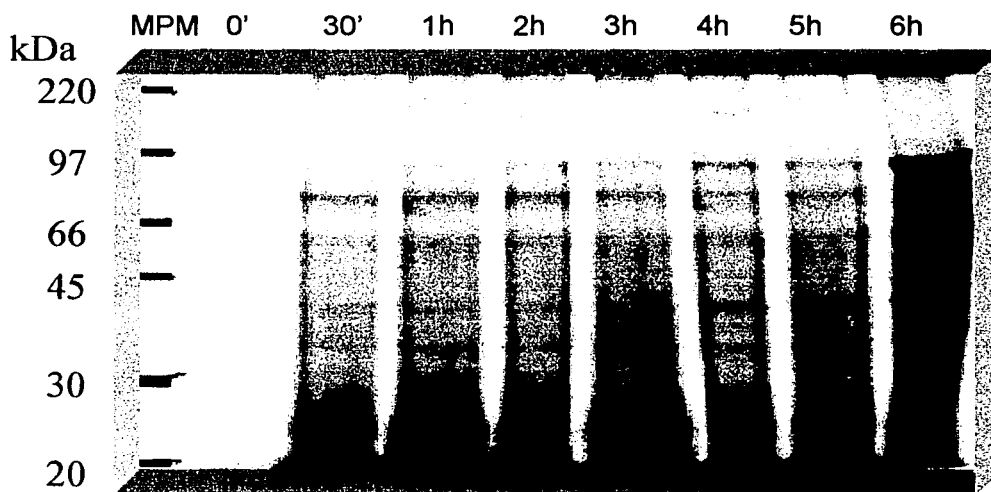


Figura 6. Patrón de la síntesis de proteínas de estrés en de *S. quadricauda* incubados en agua de origen doméstico (Xochimilco) a 25°C en diferentes tiempos.

De igual manera al describir los resultados en la expresión de las bandas de proteínas la cantidad de éstas fue muy grande; por lo que sólo se seleccionó el rango con mayor variación en peso e intensidad. En la figura 7-A se representó la expresión de proteínas para los controles. En ella podemos ver que los cambios en las variantes que se tomaron en cuenta (tipo de proteína y su intensidad) no fueron significativos.

En la figura 7-B se observa el comportamiento que expresó *S. quadricauda* en los tratamientos establecidos para las aguas de origen doméstico. De esto se puede describir que sólo están presentes los pesos moleculares de 83, 70, 60 y 50 kDa y que su intensidad aumenta de acuerdo al tiempo de exposición.

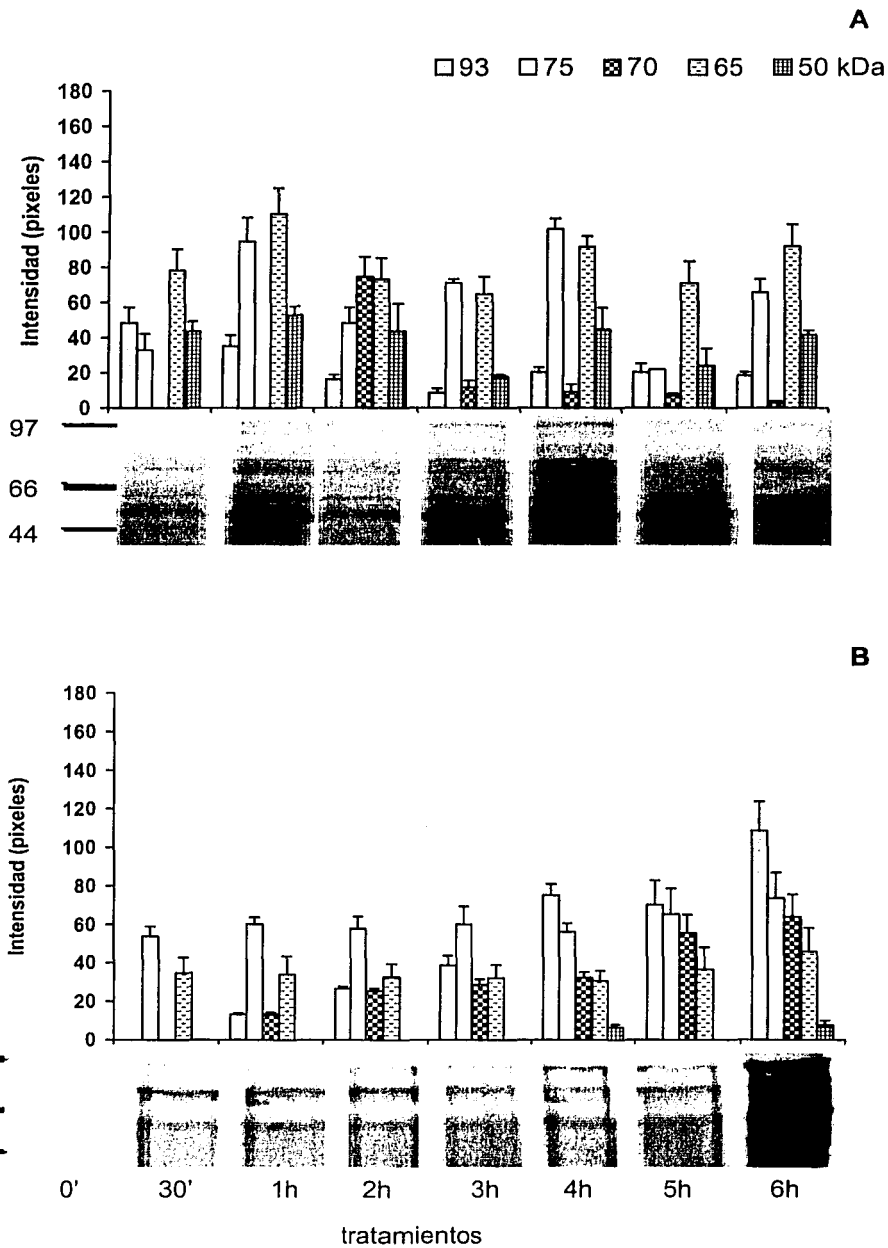


Figura 7. Patrón de la síntesis de proteínas de *S. quadricauda* incubados a 25°C. **A** testigos y **B** en agua de origen doméstico (Xochimilco) por diferentes tiempos

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

En la figura 8 se muestra el patrón de la síntesis de proteínas de estrés a diferentes tiempos de exposición en *S. quadricauda* incubado en agua de origen industrial (Río La Compañía). En cada uno de los tratamientos se observaron cambios específicos en la expresión de proteínas. A 30 min. se presentaron las proteínas con pesos moleculares de 150, 98, 83, 75, 70, 60, 50, 42, 41, 35, 29, 28, 27 y 26 kDa. En el tratamiento de una hora están presentes las mismas proteínas y sintetizó uno a 90 kDa; con respecto a la intensidad, en la mayoría aumentó, de ahí que en la figura 6 el segundo carril tenga las proteínas ligeramente más notorias. Al cabo de 2 horas de tratamiento se observó una nueva proteína de 93 kDa; el resto de las proteínas aumentó la intensidad, de ahí que en este tiempo la respuesta sea notoria no sólo por la presencia de un nuevo peso molecular, sino también en la intensidad de respuesta. A las 3 horas se registra un peso molecular nuevo que es de 65 kDa, sin embargo cabe resaltar que en este tiempo la intensidad disminuye para las proteínas sintetizadas en 2 horas. Los tratamientos de 4, 5 y 6 horas los pesos permanecen constantes (tabla 8), únicamente ocurrió que a las 4 horas se aumenta la intensidad con respecto a 3 horas; a las 5 horas disminuye y a las 6 horas aumenta ligeramente la intensidad. Aún cuando se menciona variación entre un tiempo y otro, los resultados no tienen diferencia estadística ($P > 0.5292$).

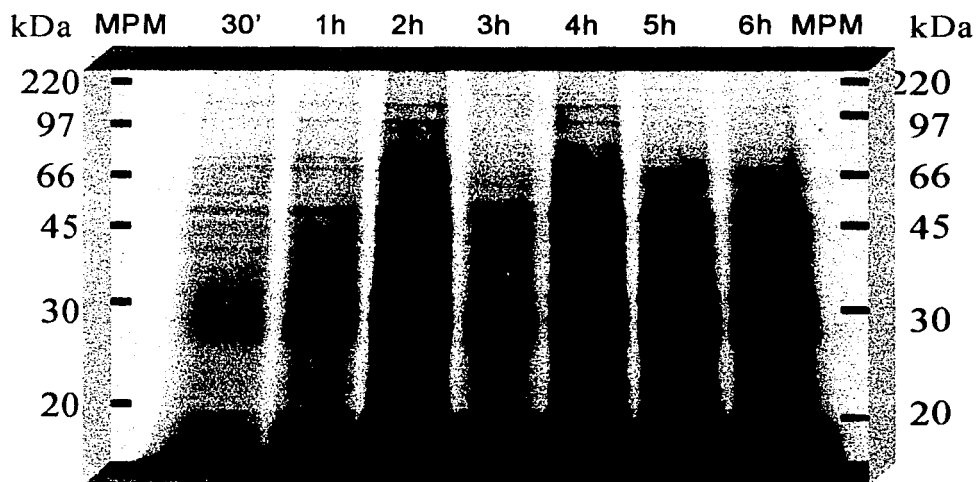


Figura 8. Patrón de la síntesis de proteínas de estrés en de *S. quadricauda* incubados en agua de origen Industrial (Río La Compañía) a 25°C en diferentes tiempos.

En la Figura 9-A se representó la expresión de proteínas para los testigos, de *S. quadricauda* al estar sometidos en aguas de origen industrial. Los cambios en las variantes que se tomaron en cuenta (tipo de proteína y su intensidad) no fueron significativos.

En la Figura 9-B se observa el comportamiento que expresó *S. quadricauda* en los tratamientos establecidos para las aguas de origen industrial. Se puede resaltar que las proteínas aumentan su intensidad al transcurrir el tiempo de exposición.

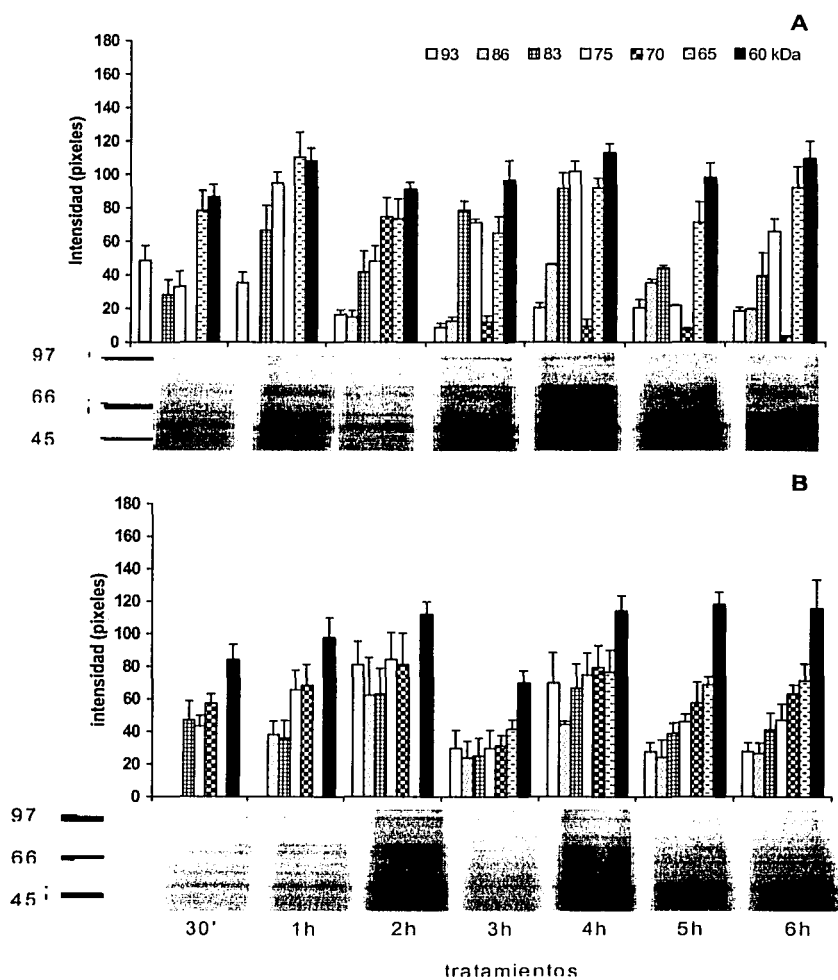


Figura 9. Patrón de la síntesis de proteínas de *S. quadricauda* incubados a 25°C. **A** testigos y **B** en agua de origen industrial (Río La Compañía) en diferentes tiempos

Microcystis aeruginosa

Comparando los patrones de las bandas de proteínas de los testigos (figura 10) para cada tiempo de exposición observamos que en 15 min la respuesta es baja ya que se tiene únicamente pesos moleculares de 70, 60, 50, 42, 35, 29 y 26 kDa; en el tratamiento de 30 min desaparece la proteína de 70 kDa y para el resto de los proteínas, la diferencia radica en la intensidad de las bandas, que aumentará con respecto al tiempo.

Al cabo de una hora la respuesta aumenta ya que se tienen nuevas proteínas de 150, 98, 93, 83, 60, 50, 42, 35 y 26 kDa. En el tratamiento de 90 min se tiene la presencia además de las proteínas anteriores, la de 90 kDa. Aun cuando a 2, 3 y 4 horas permanecen constantes los pesos moleculares (tabla 9) la intensidad disminuye ligeramente a medida que pasa el tiempo, se presentan diferencias estadísticas entre 3 horas y 60 min. Además, al ver la figura se observa una proteína de 29 kDa, que no se encontró a 2 horas. Al cabo de 5 horas se presenta nuevamente el peso de 70 kDa, el cual había estado a los 15 min. La intensidad de algunas bandas aumenta y en otros disminuye, esto mismo ocurre al término de las 6 horas de tratamiento la intensidad varía ligeramente entre un peso y otro. Se tiene una diferencia estadística significativa ($P > 0.0001$) de este tiempo con 30 min, 3 y 4 horas.

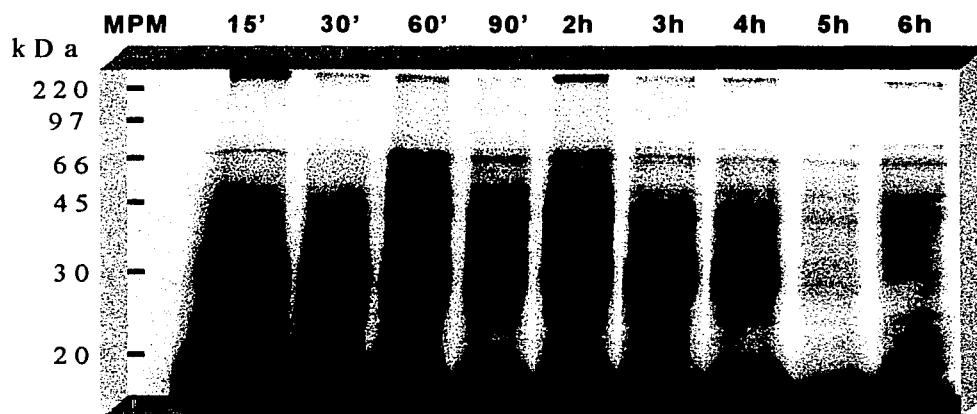


Figura 10. Patrón de la síntesis de proteínas en testigos de *Microcystis aeruginosa* incubados en medio Bold 3N a 25°C.

El análisis por marcaje metabólico correspondiente a la fluorografía del gel con muestras de 10°C en los diferentes tiempos se muestra en la figura 11. Se observó que en ninguno de los tiempos hubo respuesta ya que no se observan proteínas, lo cual corrobora la respuesta, a esta misma temperatura por *S. quadricauda* que las bandas de las proteínas son muy tenues. Sin embargo a 38°C en el tratamiento de 15 min se presentan proteínas de 42, 35, 29 y 26 kDa, lo cual también ocurre a 30 min presentándose poca variación en la intensidad, entre un tiempo y otro. Al cabo de 60 min la respuesta fue mayor aumentando nuevas proteínas (tabla 10); además de las bandas anteriores, en este tiempo de exposición también se aumenta la intensidad. Para el tratamiento de 90 min, la variación de las proteínas es la misma, únicamente desaparece la proteína de 26 kDa, con respecto a la intensidad, no hay variación ya que en unos disminuye y en otros aumenta pero sin que el resultado sea notorio, no hay en este caso una diferencia significativa ($P > 0.3075$).

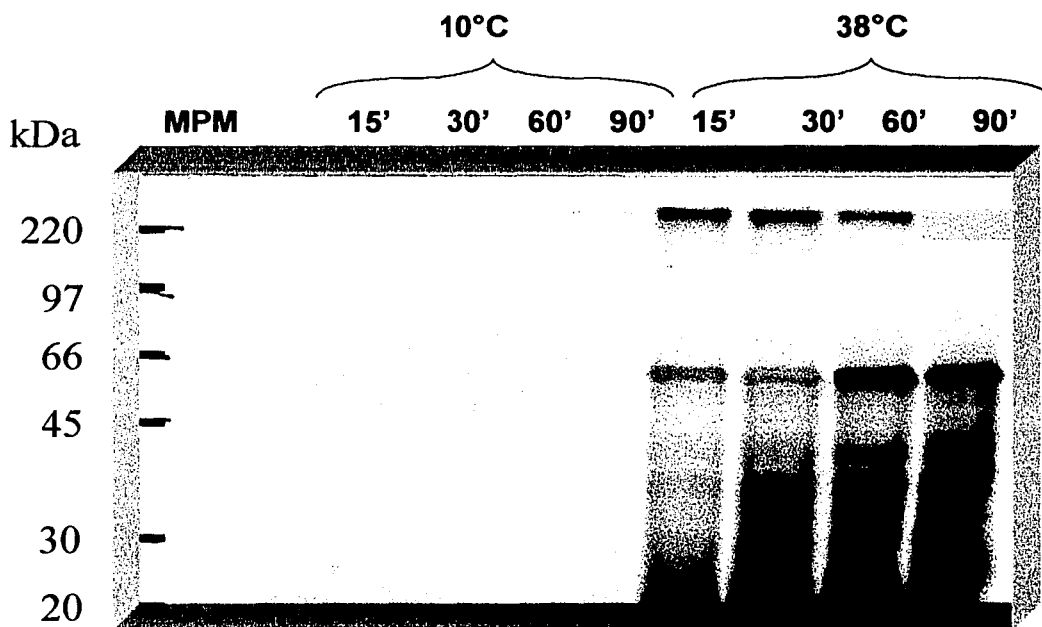


Figura 11. Patrón de la síntesis de proteínas de *M. aeruginosa* incubados en medio Bold 3N a 10 y 38°C en diferentes tiempos.

Las proteínas observadas en la figura 11 señalan una gran variedad en cuanto al tiempo y tratamiento por lo que en la figura 12-A resalta solo los cambios que ocurrieron de 97 a 45 kDa, resalta solo las proteínas de 70 y 60 kDa con cambios muy drástico en cuanto a intensidad. No sólo porque la proteína de 70 kDa sólo se presenta a 15 min.

Dada que no se observa síntesis de proteínas a 10°C por *M. aeruginosa*; sólo se realiza la figura 12-B que muestra la síntesis de proteínas de este organismo a 38°C, que al observarla vemos que sólo hay dos proteínas de 70 y 60 kDa, las cuales aumentaron su síntesis a medida que pasó el tiempo, sin embargo la que sobresale es la de 60 kDa.

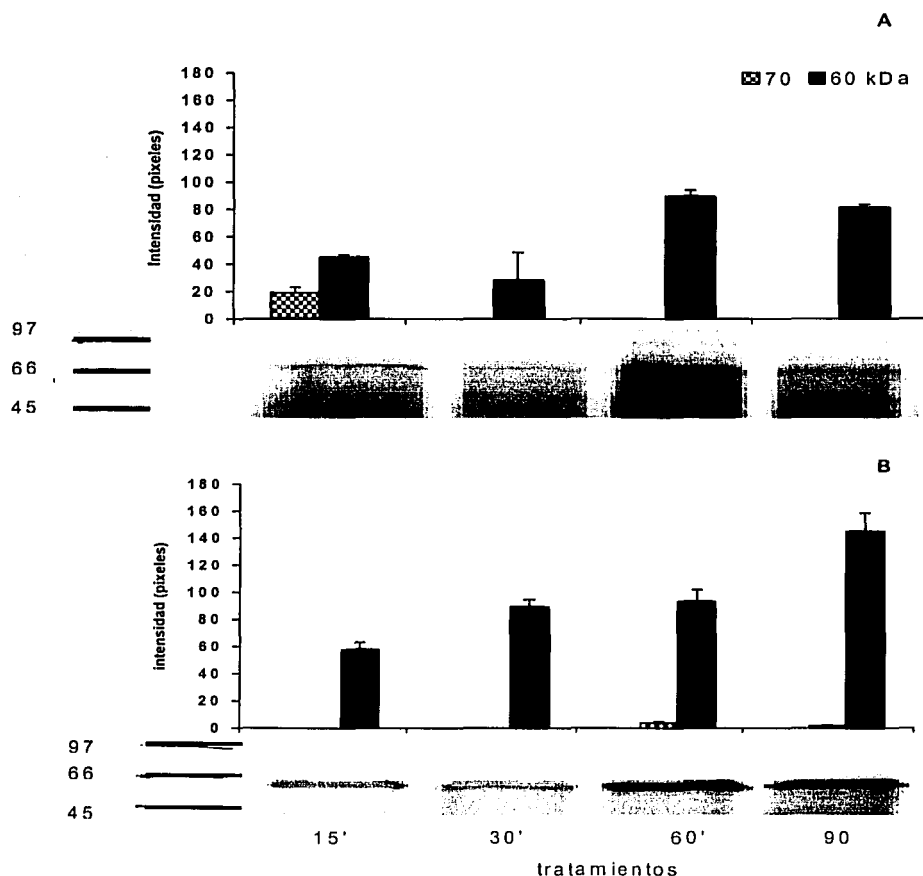


Figura 12. Patrón de la síntesis de proteínas de *M. aeruginosa* incubadas en Bold 3N; **A** Testigos a 25°C; **B** Choque térmico a 38°C

TESTEADO CON
 FALLA DE ORIGEN

En la gráfica 13 se presenta la expresión de proteínas de *M. aeruginosa*. En los tratamientos de agua de origen doméstico se observan en cada uno cambios específicos en la expresión de éstas. A 30 min de exposición sólo se tienen 7 proteínas diferentes (tabla 11), a medida que pasó el tiempo, es decir una hora, también aumentó la presencia de nuevas proteínas (98, 83, 70, 60, 50, 42, 38, 35, 33 y 29 kDa) con respecto a los que se repitieron, la intensidad aumentó en la mayoría, siendo un resultado significativo. Al cabo de 2 horas, sólo se presentaron dos pesos más (45 y 39 kDa). En los últimos tiempos de exposición 3, 4, 5 y 6 horas, los pesos presentes en todos son 98, 83, 70, 60, 50, 45, 42, 41, 39, 38, 35, 33, 29 y 28 kDa existiendo diferencia estadística ($P > 0.0001$).

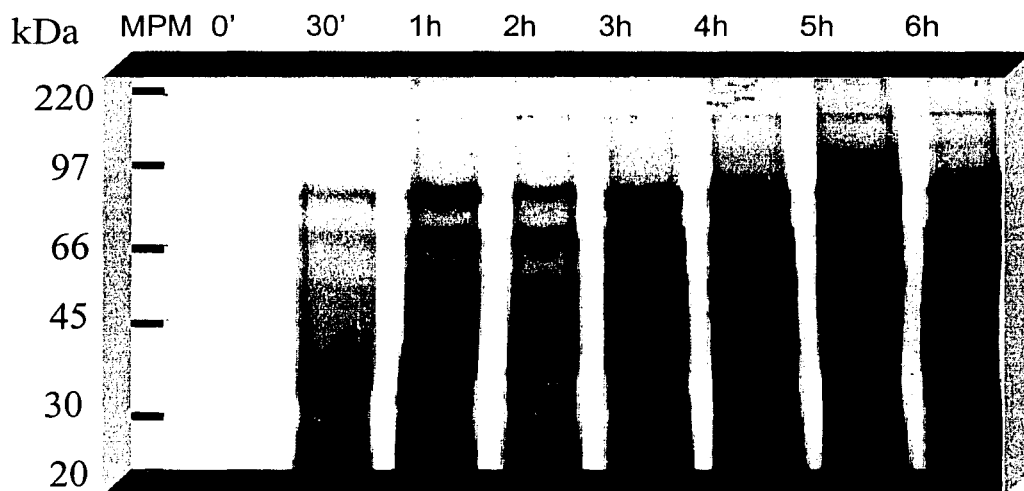


Figura 13. Patrón de la síntesis de proteínas de estrés en de *M. aeruginosa* incubados en agua de origen doméstico (Xochimilco) a 25°C en diferentes tiempos.

La respuesta de *M. aeruginosa* en agua de origen doméstico fue mayor comparada con la presentada en los testigos; sin embargo en los aparecen señalan únicamente cuatro pesos moleculares que son de 83, 76, 60 y 50 kDa (figura 14-A), los cuales tienen baja intensidad, y ésta no sufre cambios entre los un tratamiento y otro. Sin embargo, al ver la respuesta de *M. aeruginosa* en los tratamientos (figura 14-B), que se establecieron en este tipo de agua, sólo se presentaron cuatro proteínas que son 83, 70, 60 y 50 kDa en el rango de 97 a 45 kDa. La diferencia radica en que las concentraciones de las proteínas de, 70, 60 y 50kDa aumentan a medida que pasa el tiempo y la de 83 sube y baja su concentración entre un tiempo y otro.

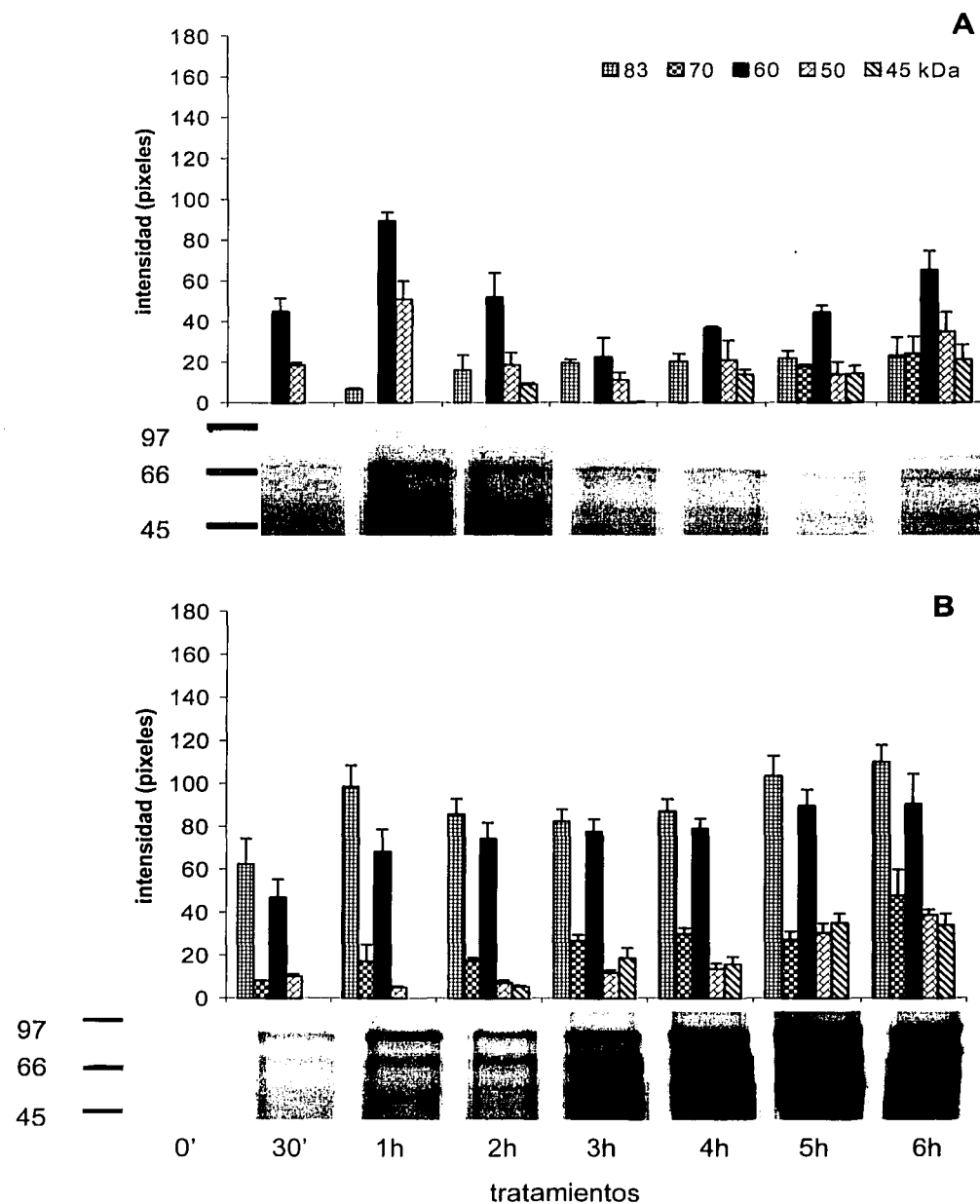


Figura 14. Patrón de la síntesis de proteínas de *M. aeruginosa* incubado a 25°C. **A.** Testigos y **B.** En agua de origen doméstico (Xochimilco) por diferentes tiempos.

Finalmente se comparó la respuesta de *M. aeruginosa* al agua de origen industrial. En la figura 15 se presentan los resultados, y se observa que a 30 min hay diferentes proteínas (150, 98, 60, 50, 45, 42, 38, 35 y 29 kDa; tabla 12). Aparecen únicamente dos tras una hora, que son las de 93 y 28 kDa, y desaparece la banda de 98 kDa. En el tratamiento de 2 horas de exposición desapareció la banda de 150 kDa y se presentó nuevamente el peso de 98 kDa; con respecto a la intensidad los cambios son en algunos pocos significativos, pero a 2 horas la intensidad aumenta en la mayoría de las bandas. A 3 horas aparecen nuevamente las banda de 150 kDa y una de 83 kDa, por lo que los pesos presentes son: 150, 98, 93, 83, 80, 60, 50, 45, 42, 38, 35, 29 y 28 kDa, mismos que aparecieron para el resto de los tratamientos (4, 5 y 6 horas). La intensidad varía ligeramente entre una banda y otra. Finalmente en el análisis estadístico se observó que hay diferencia estadística ($P > 0.0001$) entre los tratamientos de 4, 5 y 6 horas de exposición.

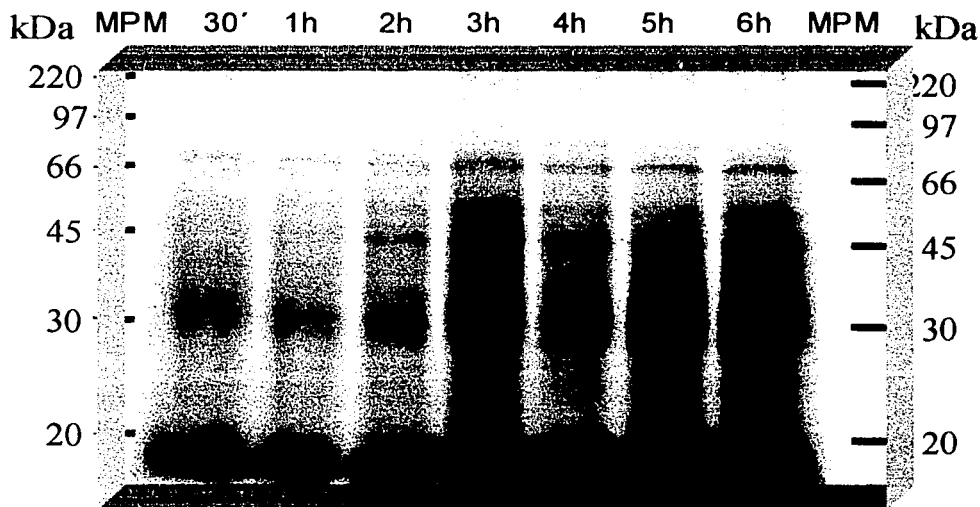


Figura 15. Patrón de la síntesis de proteínas de estrés en de *M. aeruginosa* incubados en agua de origen Industrial (Río La Compañía) a 25°C en diferentes tiempos.

Los testigos de *M. aeruginosa* en el rango ya mencionado sintetizaron proteínas de 93, 83, 60 y 50 kDa (figura 16-A), las cuales tienen pocos cambios en su intensidad lo cual era de esperarse siendo los testigos. En la figura 16-B se muestra la síntesis de proteínas de este organismo expuesta en agua de origen industrial, donde su intensidad cambia entre un tiempo y otro.

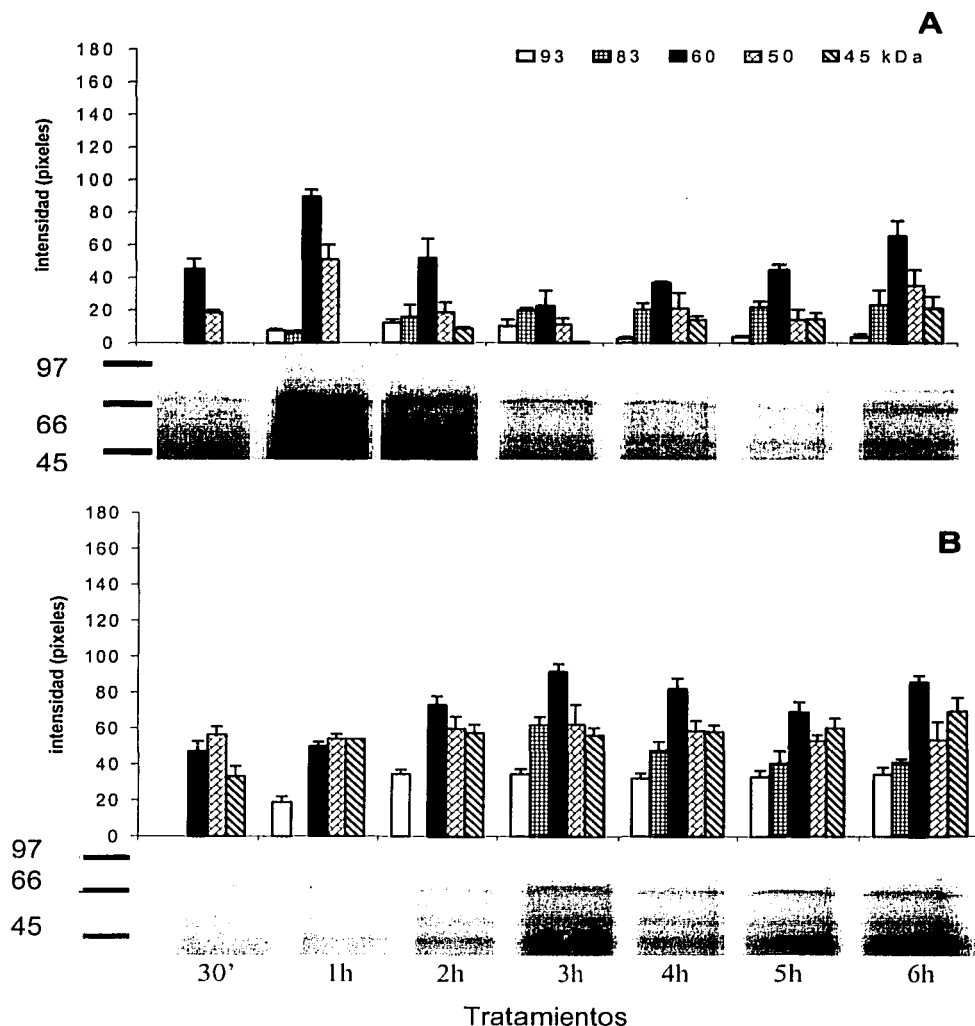


Figura 16. Patrón de la síntesis de proteínas de *M. aeruginosa* incubado a 25°C. **A.** testigos y **B.** Incubada en agua de origen industrial (Río La Compañía) por diferentes tiempos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA *a*

Scenedesmus quadricauda

Los resultados en la determinación de clorofila *a* de *S. quadricauda* al estar expuesta a 10°C por 30 minutos y 38°C por 15 minutos, fueron 867 y 854 mg/m³ respectivamente, y al estar por debajo de los demás tratamientos y sus testigos, se permite decir que la concentración depende de la variación en la temperatura, ya que es uno de los principales factores que influye en la velocidad de fotosíntesis en las algas (Davison, 1991).

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de clorofila *a*, en el caso de *S. quadricauda* al ser expuesta al agua de origen doméstico permiten determinar que en poco tiempo de exposición los valores son bajos y que a medida que aumenta el tiempo la concentración aumenta, como ocurrió al cabo de 3 horas. No hay diferencia significativa con el control. Por lo que en este caso se observa que el tiempo de exposición es un factor que puede influir sobre la variación de clorofila, como lo reporta la literatura que indica las variaciones térmicas por períodos cortos de exposición afectan la respuesta fotosintética (Davison, 1991).

En los resultados que se obtuvieron en la determinación de concentración de clorofila *a* por parte de *S. quadricauda* al estar expuesta al agua de origen industrial, podemos decir que la concentración a temperatura ambiente supera los valores de todos los tratamientos, aún cuando en estas condiciones de agua al término de 6 horas la concentración aumentó a 1071 mg/m³ sin alcanzar la concentración del testigo, pero tampoco con diferencia significativa.

Microcystis aeruginosa

En la respuesta de *M. aeruginosa* bajo las mismas condiciones que *S. quadricauda*, a temperatura ambiente presenta el valor superior, y el valor inferior se encuentra a 10°C y 38°C durante 30 minutos. Los resultados tan semejantes permiten detectar una condición que influye sobre la concentración, que es la variación en la temperatura. Esto se corrobora con la literatura que señala que la temperatura es un factor de especial importancia ecofisiológica en un ambiente acuático ya que interactúa con la limitación de los nutrimentos en la naturaleza afectando el crecimiento del fitoplancton, y de manera general la fisiología metabólica características de macro y microalgas (Kinne, 1978). No solamente fue un comportamiento por la temperatura y el tiempo sino por el tipo de organismo.

Así también, Davison (1991) señala tres respuestas básicas de la fotosíntesis a cambios de temperatura: a) Afectación en el tiempo corto del metabolismo fotosintético en el agua. b) Hay cambios en el metabolismo fotosintético durante el crecimiento, como respuesta a temperaturas diferentes. c) Se da una diferencia en el metabolismo fotosintético entre especies expuestas a diferentes ambientes termales.

Por otro lado al analizar los resultados de *M. aeruginosa* en agua de origen doméstico e industrial, en ambas condiciones el testigo tiene una concentración superior. Posiblemente la concentración de clorofila *a* varía entre los tratamientos con respecto al testigo por las condiciones nutrimentales que tienen los tipos de agua ya que la cantidad de nutrimentos (nitrógeno y fósforo) son esenciales para el crecimiento del fitoplancton. (Nalewajko y Lean 1980; Paache, 1980). Ante esta explicación podemos ver que al pasar el tiempo de exposición bajo las condiciones de agua de origen doméstico e industrial se ve afectada la concentración de clorofila *a*.

DETERMINACIÓN PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Scenedesmus quadricauda

En la evaluación de los testigos tras los diferentes tiempo de exposición (15, 30, 60 y 90 min), en *S. quadricauda* se encontró de forma general que el tiempo de exposición no influye en la variación de las proteínas, ya que en todos ellos se encuentran las bandas proteicas de 98, 93, 75, 65, 60, 50, 42, 41, 35, 29, 28, 27, y 26 kDa; con la misma intensidad. A partir de 60 min y hasta 6 horas, se presentó una nueva proteína, que fue de 150 kDa. Estos resultados sugieren que la proteína de 150 kDa es sintetizada después de un periodo de 60 min y continua su expresión entre 90 min y 6 horas. La intensidad si cambia con el tiempo, aumenta cuando transcurre este. Las proteínas de 86 y 70 kDa se expresan desde las dos horas y hasta las 6 horas de exposición y aumenta su intensidad al pasar el tiempo.

Por otro lado a 10°C se inducen en todos los tiempos tres proteínas de 35, 29 y 26 kDa, que podrían ser consideradas proteínas de respuesta general al estrés, debido a que hubo otras que se presentaron sólo en algunos tiempos. Existe una diferencia con el testigo en siete proteínas.

A 38°C hubo una mayor homogeneidad de expresión, ya que se presentan en todos los tiempos proteínas de: 93, 83, 75, 60, 50, 42, 35, 29 y 26 kDa con ello se corrobora que los pesos de 35, 29 y 26 kDa son proteínas de respuesta general al estrés sin importar el tiempo de exposición, ni la temperatura. La intensidad en la mayoría de los tiempos sigue el mismo patrón que es aumentar a medida que pasa el tiempo. Se sabe que la familia de la HSP 20 kDa poseen diversas propiedades incluyendo la capacidad de formar grandes agregados moleculares y la fosforilación rápida de proteínas en las células expuestas a factores estresantes (Walker *et al.*, 1985; Behlke *et al.*, 1991; Gaestel *et al.*, 1991), de ahí que su síntesis se induzca en estados de diferenciación en el desarrollo bajo temperaturas normales del organismo quizá porque promueve la termotolerancia (Lindquist y Craig 1988; Behlke *et al.*, 1991; Hurt, 1990).

En la síntesis bajo estrés del agua de origen doméstico, en los primeros cuatro primeros tiempos se encontró un número reducido de bandas de proteínas con baja intensidad, posiblemente por el poco tiempo de exposición que llevaba en este tipo de agua. Al cabo de 4 horas se presenta una proteína diferente, que es de 46 kDa, de la cual podría decirse que es específico de este tiempo ya que no aparece en el testigo; finalmente al término de 6 horas se presentan tres nuevas proteínas que son 110, 83 y 50 kDa.

Al exponer a *S. quadricauda* en agua de origen industrial, se encontró un alto número de proteínas: 150, 98, 83, 75, 70, 60, 50, 42, 41, 35, 29, 28 y 27 kDa, las cuales aumentan su intensidad al cabo de 2 horas. Esto hace suponer que este tipo de agua genera dentro de los organismos una mayor respuesta de protección, dada la función que se conoce de estas proteínas, tal es el caso de la familia 20 kDa que participan en los mecanismos de defensa contra reacciones oxidativas catalíticas por el hierro y otros metales pesados que pudieran contener este tipo de agua (Zimmerman *et al.*, 1991; Heacock y Sutherland, 1990). Por otro lado las proteínas de 100 y 110 kDa son proteínas que se producen en la mayoría de los organismos protegiéndolos de algún tipo de estrés (Álvarez y Palacios, 1991).

Microcystis aeruginosa

En la evaluación de los pesos moleculares en los testigos para *M. aeruginosa* se observó que a los 15 y 30 min, a 25°C la respuesta fue poco significativa ya que únicamente se presentan 7 proteínas diferentes (70, 60, 50, 42, 35, 29 y 26 kDa) que a 30 min aumentaron notoriamente su concentración, lo que permite pensar que estas proteínas son sensibles al tiempo de exposición aún cuando no hay cambios en los tipos de proteína. Al cabo de 1 hora y hasta las 4 horas de tratamiento se aumentan las bandas de proteínas (150, 98, 93, 83, 70, 50, 42, 35, 28, y 26 kDa). Es importante resaltar que la familia de los 90 kDa ocupan el segundo lugar en tamaño de las Hsp, ya que están presentes en todas las células (Lindquist y Craig, 1988; Csermely y Kahn, 1991). Cuando se terminaron las 5 y 6 horas de exposición las bandas de proteínas fueron las mismas, excepto por una nueva proteína, que fue de 60 kDa. Este tipo de

proteína antes conocida como p56, está presentes en el citoplasma formando complejos con otras proteínas de choque térmico (Hsp 90 y Hsp 70). Se cree que este tipo de proteínas ejerce otras funciones vitales dentro de la célula (Picard, 1990; Sánchez, 1990), tal vez sea lógica su presencia al tener relación con las Hsp 90 y Hsp 70 estando estas presentes también. Otro aspecto importante es que aunque se han aumentado las bandas de proteínas de choque térmico la intensidad no cambia.

A 10 y 38°C de temperatura a las que se expuso *M. aeruginosa* por 15, 30, 60 y 90 minutos, se observó un comportamiento interesante. A 10 °C no se presenta ninguna proteína en los cuatro tiempos de tratamiento lo cual permite pensar que existe una inhibición en la síntesis de proteínas en este organismo, ya que *S. quadricauda* tuvo una ligera síntesis; lo que permite suponer que es más resistente a esta temperatura. Además el testigo sólo presentó cinco proteínas diferentes. Para el tratamiento de 38°C en 15 min hay baja respuesta y aparecen solo cuatro proteínas (42, 35, 29 y 26 kDa); estas también están presentes a 30 min cambiando la intensidad, es decir es mayor al aumentar el tiempo de exposición. Al cabo de 60 min el número de proteínas aumentó notoriamente (70, 42, 41, 38, 35, 29 y 26 kDa) siendo igual a 90 min, un cambio en este tiempo es que disminuye la intensidad. Comparar estos resultados con el testigo permite suponer que tiene gran influencia los tratamientos ya que la intensidad de las bandas se ve elevada. Este comportamiento es difícil de interpretar, debido a que las proteínas están presentes tanto en los tratamientos como en el testigo.

En los experimentos con agua de origen doméstico se encontraron tres bandas (83, 60 y 38 kDa) que no están presentes en los testigos y otras que están tanto en el tratamiento como en el testigo son 70, 50, 35 y 29 kDa donde la intensidad disminuye notoriamente en el tratamiento, lo que permitirá pensar dos cosas. 1) Las bandas de 83, 60 y 38 kDa se deben al efecto de este tipo de agua hacia *M. aeruginosa* o 2) que en las bandas que sí coinciden con el testigo la intensidad baja debido al tratamiento. Al terminar el tiempo de 1 y 2 horas de exposición, se presentan tres nuevas bandas 98, 42 y 33 kDa. La familia de proteínas de 90 kDa ocupa el segundo lugar en tamaño de las Hsp, de ahí que hayan estado presentes tanto en el testigo como en todos los tratamientos, además se localizan en el citoplasma con muchas proteínas importantes

tales como las pp 60 src las que han estado presentes en todos los tratamientos (Lindquist y Craig 1988). En el tiempo de 3, 4, 5 y 6 horas esta presente la proteína de 41 kDa y en todos los tiempos (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas) se tienen las bandas de: 98, 83, 70, 60, 50, 45, 41, 39, 38, 35, 33, 29 y 28 kDa. El testigo presenta la banda de 150 kDa la cual se caracteriza por presentarse únicamente cuando el estrés es muy prolongado (Sujeck *et al.*, 1983; Shyy *et al.*, 1986). Finalmente al comparar la intensidad esta va aumentando ligeramente a partir de las 3 horas hasta las 6 horas.

En los tratamientos de estrés con agua de origen industrial, en *M. aeruginosa*, se encontró que a 30 minutos de exposición, hay una mayor variación de proteínas (150, 98, 70, 50, 45, 42, 38, 35 y 29 kDa) con respecto al testigo que sólo presento las proteínas de 70, 50, 42, 35 y 29 kDa; sin embargo la intensidad de estos pesos es mayor en el testigo que en el tratamiento. Al término de una hora desaparece la banda de 98 kDa pero aparecen dos nuevas bandas 83 y 28 kDa, cuya intensidad va aumentando con el tiempo. En el tratamiento de dos horas desaparece la banda de 150 kDa y se presenta nuevamente la de 98 kDa lo cual es un comportamiento que no indica mucho ya que no se sabe si es por el tiempo o el tipo de estrés. Al igual que en las aguas de origen doméstico al terminar las 3 horas y el resto de los tiempos en este tipo de agua también se tiene el mismo comportamiento no hay variación en los pesos moleculares (150, 98, 83, 80, 70, 50, 45, 42, 38, 35, 29 y 28 kDa). Sin embargo la intensidad en la mayoría de las bandas disminuye ligeramente con el tiempo, esto posiblemente se debe a que los organismos se han aclimatado. Este tipo de proteína también son conocidas como chaperones moleculares por su participación en la protección celular (Gething y Sambrook, 1992; Mizzen *et al.*, 1991; Deshaies y Koch, 1988; Cheng y Ulrich, 1990) contra un estrés. El testigo cambia con el resto de los tratamientos por tener la banda de 60 kDa y no presentar la banda de 35 kDa.

CONCLUSIONES

- *Scenedesmus. quadricauda* y *Microcystis aeruginosa* mostraron una ligera disminución en la concentración de clorofila a al estar expuestos a 10, 38°C y en agua de origen doméstico e industrial, por lo que se puede afirmar que este comportamiento es una respuesta a stress.
- *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* tienen capacidad de respuesta a estrés ambiental que se manifiesta en la síntesis de un cierto tipo de proteínas consideradas como de estrés.
- La temperatura afecta la síntesis de proteínas en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa*: a 10°C ocurre una notable inhibición. A 38°C incrementan la síntesis de proteínas de estrés, en forma dependiente del tiempo de exposición.
- *S. quadricauda* sintetizó las proteínas de 60 y 75 kDa al ser expuesta a 38°C y *M. aeruginosa* sintetizó proteínas de 60 kDa
- *S. quadricauda* bajo el estrés en agua de origen doméstico sintetiza proteínas de 75 y 93 kDa y *M. aeruginosa* sintetizó proteínas de 60 y 83 kDa
- El agua de origen industrial provoca un incremento en la síntesis de la proteína de 60 kDa en ambos organismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayala C.G. 2001. Efecto del crecimiento aleloquímico producido por *Callicarpa acuminata*, sobre el patrón de proteínas y la actividad de la catalasa en raíces de *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* y *Lycopersicon esculentum*. Tesis para obtener el título de Biólogo, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Álvarez. O., Palacios, B.A. 1991. Las proteínas de choque térmico. Su importancia Clínica. *Rev. Invest. Clin.* **43**:195-201.
- Aráoz R., Lebert M., Hader D. 1998. Translation activity under ultraviolet radiation and temperature stress in the cyanobacterium *Nostoc* sp. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **47**: 115-120.
- Behlke, J., Lutsch, G., Gaestel, M., Bielka, H. 1991 Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp 25. *FEBS* **288**: 119-122.
- Bidwel, R.G. 1979. *Fisiología vegetal*. AG Editores 2a ed. México. 784 pp
- Bold, H.C. & MacEntee, F.J. 1974. Phycological notes. III. Two new saccate unicellular Chlorophyceae. *J. Phycol.* **10**:189-93.
- Bond, U., Schlesinger, M. J. 1985. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 949-956.
- Bonner, W., Laskey, R. 1974. A film detection method for tritium labelled protein and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 83-88.
- Botero, C. 1992. Proteínas de choque térmico. Tesis de Especialización en bioquímica clínica, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 120 pp

-
- Carper, S. W. Duffy, J.J., Gerner, E. W. 1987. Heat-shock proteins in thermotolerance and other cellular process. *Cancer Res.* **47**:5249-55.
- Craig, E.A. 1985. The shock response. *Crit. Rev. Biochem.* **18**: 239-280.
- Cheng, M. Y., Ulrich, F. 1990. The mitochondrial chaperonin is required for its own assembly. *Nature* **348**: 455-458.
- Davison, R. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis temperature. Minireview *Phycology*; 27-28.
- DeLuca, F. C., McKay, D. B., Parham, P., Hill, B. L. 1990. Uncoatin protein (hsc) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain Lca to stimulate ATP hidrolysis. *Cell* **62**: 875-887.
- Deshai, R., Koch, B. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 300-305.
- Ellis, R.J. 1987 Proteins as molecular chaperones. *Nature* **332**:776-777.
- Ellis, R., Hemmingsen, S. 1989. The molecular chaperones concept. *Biochem. Soc. Symp.* 55:145.
- Feder, E., Hofmann, G. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243-282.
- Finley, D., Crechanover, A., Varshavsky, A. 1984. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from mammale response. *Immunology Today* **11**:129-135

- Gaestel, M., Schoder, W., Benndorf, R. 1991. Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp 25. *J. Biol. Chem.* **266** (22): 14721-14724.
- García, E. 1981. Modificación al sistema de clasificación de Köppen. Instituto de Geografía Universidad Nacional Autónoma de México, México 20-25 pp
- Gething, M. J., Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-35.
- González, S. 1989. Manual de Técnicas básicas para el muestreo de plancton. Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, México. 3-6 pp
- Groyer, A. 1987. Antiglucocorticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA *in vivo* but not *in vitro*. *Nature* **328**: 624-626.
- Hass, I. G., Wabel, M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. **306**: 387-390.
- Heacock, C. S., Sutherland, R. M. 1990. Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism. *J. Cancer* **62** (2): 217-225.
- Hernández, G., Rivera, E., 1996. Evaluación de la calidad del agua del Río La Compañía, en el transepto del municipio de Tlalmanalco a ciudad de Netzahualcoyotl, Estado de México. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Hurt, N. P. 1990. Stress (heat shock) proteins and rheumatic disease. *Rheumatol. Int.* **9**: 271-276.
- Kang, P. J., Ostermann, J. 1990. Requirement for hsp 70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* **348**: 137-143.

- Kaufmann, S.H.E. 1990. Heat-shock proteins: a missing link in the host-parasite relationship?. *Med Microbiol. Immunol.* **179**:61-66.
- Keeler, S., Boettger, C., Haynes, J., Kuches, K., Johnson, M., Thureen, D. Keeler, Jr., Kitto, S. 2000. Acquired trenmotolerance and expression of the HSP100/CiB genes of lima bean. *Plant Physiol.* **123**: 1121-1132.
- Kinne, O. 1978. Marine ecology, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. Ed. Wiley Interscience; Vol 1. Enviromental factors, art I: 347-348.
- Lamb, J. R., Bal, V., Mendez-Samperio, P., 1989. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol.* **1**: 191-196.
- Lewis, M.J., Pelham, H. R. 1986. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar funtions of the 70 kDa heat shock protein. *EMBO J.* **4**: 3137-3143.
- Lewis S, Donkin ME, Deplege Mh. 2001. Hsp 70 expression in Enteromorpha intestinalis (Chorophyta) exposed to enviromental stressors. *Aquat Toxicol* Jan; **5** (183):277-91.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Ann Rev. Biochem.* **55**: 1151-1191.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**:631-677
- Maccarthy, J. 1980. Nitrogen. In the physiological ecology of phytoplankton. Ed. Morris, Blackwell, Oxford. 119-233 pp

- Masojidek J; Torzillo G; Koblizek J; Kopecky J; Bernardin P; Sacchi A; Komenda J. 1999. Photoadaptation of two members of chlorophyta (Senedesmus and Chorella) in laboratory and outdoor cultures: Change in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta Jul*; **209**(1) 126-35.
- Mats-Jerry, E., Jenney, S., Ewa, M., Adrian C. 2001. Novel form of CIB/HSP100 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *J. Bacteriol.* **183**: 7393-7396.
- Michel A. M. Key L. J. 1987. "Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants" *Plant Physiol.* **84**:1007-1017.
- Mizeen, L. A., Kabilling, A. N., Welch, W.J. 1991. The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial protein. *Cell. Regul.* **2**(2): 165-179.
- Munk, M. E., Shoel, B., Modrow, S. 1989. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65 kDa heat shock protein. *J. Immun.* **143**: 1844-4849.
- Nalewajko, C., Lean, S. 1980. Phosphorus in the physiological ecology of phytoplankton. Ed. Morris; Blackwell, Oxford. 235-258.
- Nandan, D., Ball, E. H., Sanwal, B. D. 1990. Two stress proteins of the endoplasmic reticulum bind denatured collagen. *Biochem. Cell Biol.* **68** (7-8): 1057-1061.
- Nathke, I., Hill, B., Parham, P., Brodsky, F. M. 1990. The calcium binding site of clathrin light chains. *J. Biol. Chem.* **264**: 15210-15215.
- Nover, L., Munshe, D., Neumann, D. 1988. Control of ribosome biosynthesis in plant cell cultures under heat-shock condition. Ribosomal RNA. *Eur. J. Biochem.* **160**:297-304.

- Nover, L., Neumann, D. 1989. Heat shock and other stress response systems of plants. Ed. Springe-Verñag. Berlin Heidelberg, New York. 155 pp.
- Nover, L. Scharf, K-D 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **9**(3): 1298-1308.
- Nover, L., Munshe, D., Neumann, D. 1989. Heat shock and other stress response. Systems of plants. Ed. Springe-Verlag: Berlin Heidelberg, New York. 155 pp.
- Ortiz, C. and Cardemil, L. 2001. Heat-Shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J. Exp. Botany* **52**: 1711-1719
- Paache, E. 1980. Silicon. In the physiological ecology of phytoplankton Ed. Morris Blackwell, Oxford. 251-284.
- Pelham, H. 1986. Speculation on the funtions of the major heat shock and glucosa-regulated proteins *Cell* **46**: 956-961.
- Pelham, H. 1988. Coming in from the cold. *Nature* **332**: 776-777
- Picard, D. 1990. Reduced levels of hsp 90 compromise steroid receptor in vivo. *Nature* **348**: 166-168.
- Pickett-Heaps, J. 1975 Green algae structure reproduction and evolution. Sinaver Associates., Publishers. Sunderland, Massachsetts. 606 pp.
- Ramos Cárdenas A. 1976. Establecimiento y análisis de cultivos sincronizados en *Scenedesmus quadricauda* (Meyen). Tesis para obtener el grado de Biólogo facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Rees, A. D. M., Donati, Y., Lombardi, G., Lamb, J., Polla, B., Lechler, R. 1991. Stress-induced modulation of antigen-presenting cell function. *Immunol.* **74**: 386-392.
- Ritosa, F. 1962. A new purifying pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Exp. Cell. Res.* **18**: 571-573.
- Ritosa, F. 1964. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell. Res.* **35**: 601-607.
- Sánchez, E.R. 1990. HSP 56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J. Biol. Chem.* **265** (35): 22067-22070.
- Sanders M. M. 1981. Identification of histone H2b as a heat-shock protein in *Drosophila*. *J. Cell. Biol.* **91**: 579-583.
- Sargent, C. A., Dunham, I., Trowsdale, J., Campbell, R. D. 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein hsp 70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1068-1072.
- Sciandra, J. J., Subject, J. R., Hughes, C. S. 1984. Induction of glucocorticoid-regulated proteins during anaerobic exposure and of heat-shock proteins after reoxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 4843-4847.
- Shinnick, T. M., Vodkin, M. H. And Williams, J. L. 1988. The *Mycobacterium tuberculosis* 65 Kilodalton Antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* Gro EL protein. *Infect. Immune.* **56**: 446-451.
- Shyy, T. T., Subject, J. R., Heinemann R., 1986. Effect of growth state and heat-shock on nucleolar localization of the 110.000 kDa heat-shock protein in mouse embryo fibroblasts. *Cancer Res.* **46**: 4738-4745.

- Strickland and Parson T.R. 1977. A practical handbook of seawater analysis. Sec. Ed. Edit. Minister of Supply and Services.
- Tan, E. M., Can, E. K. 1988. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **47**: 121-141.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., Tracey, U.M. 1979. Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**: 389-398.
- Torres, V. 1999. Evaluación de proteínas en plancton de sistemas acuáticos urbanos. Tesis de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1999.
- Valliammai, T., Arumugham G., Kuppamuthu D. 1987. Heat Shock response in *Chorella protothecoides*. *Plant. Cell. Physiol.* **28**(6):975-985.
- Vanbogelen, R.A., Neidhardt, F.C. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5589-5593.
- Vanbuskirk, A., Crump, B. L. 1989. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the hsp 70 heat shock family. *J. Exp. Med.* **170**: 1799-1809.
- Welch, W. J. Feramisco, J.R. 1984. Nuclear and nucleolar localization of the 72 kDa heat shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 4501-4513.
- Welch, W. J., Mizzen, A. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. II Effects on the intracellular distribution of hsp70, intermediate filament, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* **106**:1117-1130.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Winfield J. B. 1989. Stress proteins, arthritis, and autoimmunity. *Arthr. and Rheum.* **32**: 1497-1504.
- Yost, H.J., Lindquist, S. 1986. RNA splicing is interrupted by heat shock proteins synthesis. *Cell* **45**:185-193.
- Young, R.A., Ellinoit, T.J. 1989. Stress proteins, Infection and Immune Surveillance. *Cell* **59**: 5-8.
- Zimmerman, L. H., Levine, R. A., Farber, H. W. 1991. Hipoxia induces a specific set of stress protein in cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **87** (3): 904-914.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO I

MEDIO DE CULTIVO Bold 3N

Medio de cultivo Bold 3N (Bold y MacEntee, 1974.)

Preparación

Medio usado especialmente para algas azul-verde y rojas.

ml	solucion stock	g/400 ml H ₂ O
30	NaNO ₃	10.0
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0
10	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.0
10	K ₂ HPO ₄	3.0
10	KH ₂ PO ₄	7.0
10	NaCl	1.0
1	Vitamina B12	60.0 x 10 ⁶
6	Solución de metales (PIV *)	

Adicionar 923 ml de agua destilada

*PIV A 1000 ml de agua destilada adicionar 0.750 g de Na₂ EDTA

Adicionar;

FeCl ₃ .6H ₂ O	97mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	41mg
ZnCl ₂	5mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	2mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4mg

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO II

TABLAS DE PATRONES PROTEICOS E INTENSIDADES DE *Scenedesmus quadricauda* y *Microcystis aeruginosa* EXPUESTAS A CHOQUE TÉRMICO (10 y 38°C) Y EN AGUA DE ORIGEN DOMÉSTICO E INDUSTRIAL

Tabla 5. Patrón proteico e intensidad de *Scenedesmus quadricauda* expuesto a 25°C a diferentes tiempos en medio de cultivo Bold 3N (testigos)

No. de banda	PM (kDa)	15 min	30 min	1h	90 min	2h	3h	4h	5h	6h
		intensidad (píxeles)								
1	150			16.55	0.88	10.66	10.11	23.31	20.11	21.87
2	98	12.44	11.82	28.77	13.04	27.42	23.07	31.6	10.61	19.31
3	93	10.45	48.43	35.30	45.67	16.32	8.73	20.44	20.53	18.66
4	86					14.82	12.41	45.98	35.28	19.35
5	83	25.98	28.12	66.59	31.98	41.55	78.48	91.34	44.14	39.41
6	75	42.00	33.10	94.59	42.58	48.11	71.10	101.69	21.81	65.89
7	70					74.37	11.79	9.25	7.11	3.12
8	65	66.29	78.32	110.29	79.67	73.25	64.92	91.61	70.99	81.80
9	60	90.75	86.28	107.67	87.48	90.9	96.15	112.72	97.86	109.32
10	50	40.16	43.69	52.74	46.73	43.62	17.86	44.76	23.99	41.60
11	42	72.63	75.07	91.66	82.79	78.92	74.42	84.69	70.50	82.67
12	41	71.51	70.62	91.82	46.10	48.25	41.53	82.46	77.91	80.51
13	35	59.23	5.94	75.88	56.43	52.89	65.38	70.44	85.45	72.04
14	29	13.32	23.55	85.30	36.96	40.35	54.27	74.16	14.08	43.95
15	28	26.60	26.09	74.76	36.38	36.95	15.24	63.20	20.68	47.14
16	27	19.58	20.91	30.64	33.19	32.15	21.12	34.3	35.85	41.29
17	26	17.02	15.48	22.78	26.06	29.89	25.39	27.93	22.19	26.70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Patrón proteico e intensidad en *Scenedesmus quadricauda* expuesto a 10 y 38°C por diferentes tiempos en medio de cultivo

Banda	PM (kDa)	10°C				38°C			
		15 min	30min	60 min	90 min	15 min	30 min	60 min	90 min
		Intensidad (píxeles)							
1	150						0.62	3.27	20.75
2	98							2.26	18.33
3	93					3.52	6.23	10.94	27.91
4	83					3.86	7.96	9.33	33.10
5	75	0.72	7.44	5.22		29.01	70.02	81.53	103.88
6	60		5.04			115.03	123.65	134.31	140.99
7	50	1.69	6.34		6.07	25.26	26.66	34.32	51.74
8	42	2.11	4.08		5.74	21.04	31.86	43.99	54.04
9	35	3.48	4.91	3.09	6.32	22.91	27.42	39.33	60.27
10	29	6.62	5.44	3.39	3.44	15.06	19.19	25.03	45.98
11	28						8.51	15.87	21.16
12	26	12.47	5.33	6.40	7.57	13.79	12.17	16.94	23.10

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Patrón proteico e intensidad de *Scenedesmus quadricauda* expuesto al agua de origen doméstico por diferentes tiempos

		30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Banda	PM (kDa)	Intensidad (píxeles)						
1	98							6.66
2	93		13.25	26.53	38.69	74.99	70.15	108.61
3	75	53.78	60.05	57.82	59.85	50.95	65.19	73.42
4	70		13.15	25.29	28.76	32.13	55.46	63.79
5	65	34.69	33.99	32.62	32.05	30.44	36.63	45.83
6	50					6.51	20.14	27.73
7	42	4.10			7.02			25.32
8	41	28.11	30.11	31.21	32.45	34.81	34.79	39.20
9	37				7.80	5.04	10.12	16.73
10	35	11.27	13.24	15.12	17.24	16.88	14.46	13.96
11	33			4.21	5.05	0.98	1.10	11.05
12	29	0.79	0.83	0.99	1.40	4.21	5.26	6.21
13	27			2.51	3.78	1.55	4.12	19.02
14	26			2.54		3.78	18.25	21.18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Patrón proteico e intensidad de *Scenedesmus quadricauda* expuesto al agua de origen industrial por diferentes tiempos

	30 min.	30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Banda	PM (kDa)	Intensidad (píxeles)						
1	150	27.17	19.86	41.87	34.19	42.03	30.00	23.74
2	98	20.34	45.82	49.48	29.40	49.55	21.52	25.52
3	93			80.92	29.55	69.76	27.54	27.82
4	90		37.94	62.19	23.95	44.37	24.45	26.60
5	83	46.73	35.70	62.82	24.83	66.45	38.78	40.82
6	75	43.12	65.55	84.09	29.61	74.57	45.91	46.97
7	70	57.05	68.32	80.96	31.19	79.28	57.39	63.01
8	65				41.28	76.24	68.27	71.14
9	60	83.79	97.48	111.69	69.65	113.93	117.86	115.35
10	50	74.90	87.55	96.62	54.37	99.65	90.68	84.84
11	42	56.21	69.76	81.01	41.30	79.08	77.32	71.13
12	41	55.86	72.60	75.89	45.41	79.27	76.70	68.49
13	35	61.61	69.05	62.89	24.93	61.22	64.71	53.53
14	29	71.48	75.00	63.59	18.69	65.01	73.28	64.07
15	28	72.32	70.53	50.98	27.08	53.30	58.80	44.91
16	27	66.50	66.46	35.06	83.86	39.87	56.10	39.83
17	26	36.09	61.29	50.31			45.69	31.10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Patrón proteico e intensidad de *Microcystis aeruginosa* expuesto a 25°C por diferentes tiempos en medio de cultivo (testigos)

Banda	PM (kDa)	15 min	30 min	1h	90 min	2h	3h	4h	5h	6h
		Intensidad (píxeles)								
1	150			3.79	3.25	2.53	5.00	0.98	0.56	0.98
2	98			4.33	3.55	4.85	6.58	5.64	6.52	5.32
3	93			7.60	9.08	12.20	10.12	2.45	3.65	3.24
4	83			6.82	3.77	15.97	19.59	20.21	21.76	23.02
5	70	19.00							17.49	24.1
6	60	45.11	28.25	89.36	81.18	51.84	22.49	36.69	44.35	65.07
7	50	13.02	18.75	50.94	41.21	18.65	11.28	20.84	13.84	35.42
8	45					8.87	0.49	13.86	14.24	21.04
9	42	13.02	10.94	21.42	31.01	33.03	14.76	21.10	36.48	41.00
10	38					21.12	17.86	25.616	25.81	54.26
11	35	17,846	11.94	11.84	9.08					
12	29	32.90	11.06		11.26		7.89		28.65	
13	28					20.29	21.08	26.20	25.62	10.08
14	26	12.23	11.53	16.94	10.81					

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10. Patrón proteico e intensidad de *Microcystis aeruginosa* expuesto a 10 y 38°C por diferentes tiempos en medio de cultivo

Banda	PM (kDa)	10°C				38°C			
		15 min	30min	60min	90 min	15 min	30 min	60 min	90 min
		Intensidad (píxeles)							
1	70							3.99	1.77
2	60					57.76	89.01	93.36	144.76
3	41							19.76	13.18
4	38							12.46	8.78
5	35					12.30	12.19	24.14	10.41
6	29					19.68	23.74	32.72	29.40
7	26					13.09	11.95	12.74	

Tabla 11. Patrón proteico e intensidad de *Microcystis aeruginosa* expuesto al agua de origen doméstico por diferentes tiempos

Banda	PM (kDa)	30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h
		Intensidad (píxeles)						
1	98		6.48	9.77	1.29	6.78	16.60	17.77
2	83	62.33	98.55	85.8	82.31	87.1	103.38	110.00
3	70	8.14	17.09	17.50	26.60	29.7	27.14	47.72
4	60	46.81	68.35	74.36	77.51	79.04	89.6	90.46
5	50	10.24	5.05	7.28	11.81	13.74	30.42	38.81
6	45			5.4	18.79	15.73	35.11	33.94
7	42		10.03	8.98	16.12	18.24	36.12	38.33
8	41				17.34	17.17	27.65	29.23
9	39			19.00	17.34	7.09	28.21	26.10
10	38	21.36	14.67	8.05	7.197	6.05	10.12	20.51
11	35	7.12	18.27	70.68	13.70	8.02	18.71	15.43
12	33		0.45	0.39	0.49	0.58	1.72	1.07
13	29	9.21	15.65	23.56	33.65	26.23	12.08	9.82
14	28			35.12	22.54	7.82	7.49	4.09

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 12. Patrón proteico de *Microcystis aeruginosa* expuesto al agua de origen industrial por diferentes tiempos

		30 min	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Banda	PM (kDa)	Intensidad (píxeles)						
1	150	10.35	13.56		11.84	17.85	7.10	7.61
2	98	10.54		9.71	17.93	22.00	15.05	13.35
3	93		19.08	34.50	34.56	32.32	33.25	34.44
4	83				61.93	47.46	40.44	41.10
5	60	47.00	49.68	73.05	91.52	81.88	68.69	85.59
6	50	56.57	54.04	59.85	62.16	58.47	52.92	53.61
7	45	33.35	54.07	57.70	56.04	58.2	60.04	69.25
8	42	4.22	17.88	19.8	28.37	23.15	28.15	25.49
9	38	7.80	17.01	18.48	19.53	19.99	18.54	20.76
10	35	8.49	9.30	8.61	12.17	19.02	23.39	20.81
11	29	5.12	21.16	26.69	29.00	27.83	24.24	19.53
12	28		7.33	8.62	5.04	8.76	9.81	6.13

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO III

TABLAS COMPARTIVAS DEL ANÁLISIS PROTEICO SINTETIZADO *de novo* ANTE ESTRÉS POR TEMPERATURA Y AGUA DE RESIDUAL EN *Scenedesmus. quadricauda* y *Microcystis aeruginosa*

Tabla 13. Comparación de número de bandas proteicas sintetizadas *de novo* en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* por diferentes tiempos

<i>S. quadricauda</i>	15 min	30 min	60 min	90 min	2 h	3 h	4h	5 h	6 h	observaciones
Tratamientos	Número de proteínas sintetizadas <i>de novo</i>									Proteínas con mayor concentración (kDa)
Testigos	14	14	15	15	17	17	17	17	17	60
10°C	6	7	4	5	----	----	----	----	----	----
38°C	9	11	12	12	----	----	----	----	----	60 y 75
Origen. Doméstico	----	6	7	----	10	11	12	12	14	93 y 75
Origen Industrial	----	14	12	----	16	16	16	17	17	60
<i>M. aeruginosa</i>										
Tratamientos										
Testigos	7	6	9	10	10	11	10	12	11	60
10°C	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----
38°C	4	4	7	6	----	----	----	----	----	60
Origen. Doméstico	----	7	10	----	13	14	14	14	14	83 y 60
Origen Industrial	----	9	10	----	10	12	12	12	12	60

TESIS CON
YALLA DE ORIGEN

Tabla 14 comparación de bandas proteicas sintetizadas *de novo* en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* por diferentes tiempos

<i>S. quadricauda</i>	15 min	30 min	60 min	90 min	2 h	3 h	4h	5 h	6 h	observaciones
Tratamientos	Concentración de proteínas sintetizadas <i>de novo</i>									Proteínas con mayor concentración (kDa)
Testigos	90.75	86.28	107.67	87.48	90.90	96.15	112.72	97.86	109.32	60
10°C		5.04			---	---	---	---	---	---
38°C	115.03	123.65	134.31	140.99	---	---	---	---	---	60
	29.01	70.02	81.53	103.88						75
Origen. Doméstico	---		13.25	---	26.53	38.69	74.99	70.15	108.61	93
	---	53.78	60.05	---	57.82	59.85	50.95	65.19	73.42	75
Origen Industrial	---	83.79	97.48	---	111.69	69.65	113.93	117.86	115.35	60
<i>M. aeruginosa</i>										
Tratamientos										
Testigos	45.11	28.25	89.36	81.18	51.84	22.49	36.69	44.35	65.07	60
10°C					---	---	---	---	---	No hay síntesis
38°C	57.76	89.01	93.36	144.76	---	---	---	---	---	60
Origen. Doméstico	---	62.33	98.55	---	85.80	82.31	87.10	103.38	110.00	83
	---	46.81	68.35	---	74.36	77.51	79.04	89.60	90.46	60
Origen Industrial	---	47.00	49.68	---	73.05	91.52	81.88	68.69	85.59	60

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla15. Comparación de la desviación estándar en las concentración de las bandas proteicas sintetizadas *de novo* en *S. quadricauda* y *M. aeruginosa* por diferentes tiempos

<i>S. quadricauda</i>	15 min	30 min	60 min	90 min	2 h	3 h	4h	5 h	6 h	observaciones
Tratamientos										Diferencia estadística
Testigos			■			■		■		P>0.0006
10°C					---	---	---	---	---	P>0.1191
38°C	■	■	■	■	---	---	---	---	---	P>0.0001
Origen. Doméstico	---	■	■	---	■	■	■	■	■	P>0.0001
Origen Industrial	---			---						P>0.5292
<i>M. aeruginosa</i>										
tratamientos										
Testigos		■	■			■	■	■	■	P>0.0001
10°C					---	---	---	---	---	No hay síntesis
38°C					---	---	---	---	---	P>0.3075
Origen. Doméstico	---	■	■	---		■	■	■	■	P>0.0004
Origen Industrial	---	■	■	---		■	■	■	■	P>0.0001

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

A continuación se muestra el análisis estadístico realizado con el programa SAS (análisis estadístico de datos experimentales), el cual señala la diferencia estadística con tres asteriscos.

CLAVES

1. 15 minutos
2. 30 min.
3. 60 min.
4. 90 min.
5. 2 horas
6. 3 h
7. 4 h
8. 5 h
9. 6 h

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

Análisis estadístico de la determinación de clorofila *a* en *Scenedesmus quadricauda*

Clorofila *a* en *S. quadricauda* expuesto a 10°C

```

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class      Levels  Values
org         1      1
tratam     1      1
tiemp      10     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
repeti     3      1 2 3
    
```

```

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent
Sum of
Source      DF      Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model       6      79992.5129    13332.0855    0.44    0.8350
Error       8      243605.3393    30450.6674
Corrected Total    14    323597.8522
R-Square    Coeff Var    Root MSE    concent Mean
0.247187    17.78873    174.5012    980.9647
Source      DF      Anova SS    Mean Square    F Value    Pr > F
tiemp      4      79806.72944    19951.68236    0.66    0.6396
repeti     2      185.78341     92.89171     0.00    0.9970
    
```

Clorofila *a* en *S. quadricauda* expuesto a 38°C

```

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class      Levels  Values
org         1      1
tratam     1      2
tiemp      10     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
repeti     3      1 2 3
    
```

```

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent
Sum of
Source      DF      Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model       6      174253.8069    29042.3012    6.31    0.0103
Error       8      36839.3315     4604.9164
Corrected Total    14    211093.1384
R-Square    Coeff Var    Root MSE    concent Mean
0.825483    6.863960    87.85953    988.6353
Source      DF      Anova SS    Mean Square    F Value    Pr > F
tiemp      4      160441.4329    40110.3582    8.71    0.0052
repeti     2      13812.3740     6906.1870    1.50    0.2798
    
```

Clorofila *a* en *S. quadricauda* expuesto al agua de origen doméstico

```

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class      Levels  Values
org         1      1
tratam     1      3
tiemp      10     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
repeti     3      1 2 3
    
```

```

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent
Sum of
Source      DF      Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model       9      443217.2911    49246.3657    14.67    <.0001
Error       14      46981.7613    3355.8401
Corrected Total    23    490199.0524
R-Square    Coeff Var    Root MSE    concent Mean
0.904158    6.756231    57.92961    857.4250
Source      DF      Anova SS    Mean Square    F Value    Pr > F
tiemp      7      443117.3235    63302.4748    18.86    <.0001
repeti     2      99.9675      49.9838     0.01    0.9852
    
```

Clorofila *a* en *S. quadricauda* expuesto al agua de origen industrial

```

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information
Class      Levels  Values
org         1      1
tratam     1      4
tiemp      10     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
repeti     3      1 2 3
    
```

```

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent
Sum of
Source      DF      Squares    Mean Square    F Value    Pr > F
Model       9      5191729.17    576858.80    0.77    0.6483
Error       14      10531136.80    752224.06
Corrected Total    23    15722865.97
R-Square    Coeff Var    Root MSE    concent Mean
0.330202    87.69310    867.3085    989.0271
Source      DF      Anova SS    Mean Square    F Value    Pr > F
tiemp      7      3905918.263    557988.323    0.74    0.6419
repeti     2      1285810.903    642905.452    0.85    0.4465
    
```

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico de la determinación de clorofila a en *Microcystis aeruginosa*

Clorofila a en *M. aeruginosa* expuesto a 10°C

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
org	1 2	
tratam	1 1	
tiemp	10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
repeti	3 1 2 3	

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	308420.8503	51403.4751	8.46	0.0098
Error	8	63666.7318	7958.3415		
Corrected Total	14	372087.5821			
R-Square					
0.828893		2.866255	89.20954	3112.407	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	4	297481.2958	74370.3240	9.34	0.0041
repeti	2	10939.5545	5469.7772	0.69	0.5303

Clorofila a en *M. aeruginosa* expuesto a 38°C

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
org	1 2	
tratam	1 2	
tiemp	10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
repeti	3 1 2 3	

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	86689.5130	14448.2522	1.27	0.3674
Error	8	91124.6894	11390.5862		
Corrected Total	14	177814.2024			
R-Square					
0.487529		3.406325	106.7267	3133.191	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	4	43015.57417	10753.89354	0.94	0.4861
repeti	2	43673.93881	21836.96941	1.92	0.2088

Clorofila a en *M. aeruginosa* expuesto en agua de origen doméstico

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
org	1 2	
tratam	1 3	
tiemp	10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
repeti	3 1 2 3	

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	3074163.626	341573.736	16.68	<.0001
Error	14	286625.108	20473.222		
Corrected Total	23	3360788.734			
R-Square					
0.914715		5.995001	143.0847	2386.733	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	7	2991461.497	427351.642	20.87	<.0001
repeti	2	82702.128	41351.064	2.02	0.1696

Clorofila a en *M. aeruginosa* expuesto en agua de origen industrial

The SAS System
The ANOVA Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
org	1 2	
tratam	1 4	
tiemp	10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
repeti	3 1 2 3	

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concent

Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	2005207.924	222800.880	3.32	0.0220
Error	14	939667.594	67119.114		
Corrected Total	23	2944875.517			
R-Square					
0.680914		9.785992	259.0736	2647.392	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	7	1985509.114	283644.159	4.23	0.0105
repeti	2	19698.810	9849.405	0.15	0.8648

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis estadístico del patrón de proteínas de *Scenedesmus quadricauda*

Proteínas de *S. quadricauda* a 25°C en medio de cultivo (Testigo)

The SAS System
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
tiemp 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeti 3 1 2 3

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concnet

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	26	332928.9584	12804.9599	8.79	<.0001
Error	401	584019.4566	1456.4076		
Corrected Total		427	916948.4149		
R-Square		Coeff Var	Root MSE	concnet Mean	
	0.363084	78.18326	38.16291	48.81212	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	8	41198.4768	5149.8096	3.54	0.0006
repeti	2	2324.8829	1162.4415	0.80	0.4509

The ANOVA Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concnet

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 401
Error Mean Square 1456.408
Critical Value of Studentized Range 4.41069
Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

tiemp Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
3 -9	4.041	-20.302 28.385
3 -7	6.155	-18.188 30.498
3 -4	21.071	-4.022 46.163
3 -5	21.409	-2.934 45.753
3 -1	24.831	-0.705 50.368
3 -8	24.868	0.411 49.325
3 -6	25.083	0.740 49.426
3 -2	25.321	-0.216 50.857
9 -3	-4.041	-28.385 20.302
9 -7	2.113	-21.457 25.683
9 -4	17.029	-7.314 41.372
9 -5	17.368	-6.202 40.938
9 -1	20.790	-4.011 45.590
9 -8	20.827	-2.861 44.515
9 -6	21.041	-2.529 44.612
9 -2	21.279	-3.521 46.080
7 -3	-6.155	-30.498 18.188
7 -9	-2.113	-25.683 21.457
7 -4	14.916	-9.427 39.259
7 -5	15.255	-8.315 38.825
7 -1	18.676	-6.124 43.477
7 -8	18.714	-4.974 42.401
7 -6	18.928	-4.642 42.498
7 -2	19.166	-5.635 43.967
4 -3	-21.071	-46.163 4.022
4 -9	-17.029	-41.372 7.314
4 -7	-14.916	-39.259 9.427
4 -5	0.339	-24.004 24.682
4 -1	3.760	-21.776 29.297
4 -8	3.798	-20.659 28.255
4 -6	4.012	-20.331 28.355
4 -2	4.250	-21.286 29.787

The ANOVA Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concnet
Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

tiemp Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
5 -3	-21.409	-45.753 2.934
5 -9	-17.368	-40.938 6.202
5 -7	-15.255	-38.825 8.315
5 -4	-0.339	-24.682 24.004
5 -1	3.422	-21.379 28.222
5 -8	3.459	-20.229 27.147
5 -6	3.673	-19.897 27.244
5 -2	3.911	-20.889 28.712
1 -3	-24.831	-50.368 0.705
1 -9	-20.790	-45.590 4.011
1 -7	-18.676	-43.477 6.124
1 -4	-3.760	-29.297 21.776
1 -5	-3.422	-28.222 21.379
1 -8	0.037	-24.875 24.950
1 -6	0.252	-24.549 25.052
1 -2	0.490	-25.483 26.463
8 -3	-24.868	-49.325 -0.411
8 -9	-20.827	-44.515 2.861
8 -7	-18.714	-42.401 4.974
8 -4	-3.798	-28.255 20.659
8 -5	-3.459	-27.147 20.229
8 -1	-0.037	-24.950 24.875
8 -6	0.214	-23.473 23.902
8 -2	0.452	-24.460 25.365
6 -3	-25.083	-49.426 -0.740
6 -9	-21.041	-44.612 2.529
6 -7	-18.928	-42.498 4.642
6 -4	-4.012	-28.355 20.331
6 -5	-3.673	-27.244 19.897
6 -1	-0.252	-25.052 24.549
6 -8	-0.214	-23.902 23.473
6 -2	0.238	-24.563 25.039
2 -3	-25.321	-50.857 0.216
2 -9	-21.279	-46.080 3.521
2 -7	-19.166	-43.967 5.635
2 -4	-4.250	-29.787 21.286
2 -5	-3.911	-28.712 20.889
2 -1	-0.490	-26.463 25.483
2 -8	-0.452	-25.365 24.460
2 -6	-0.238	-25.039 24.563

Proteínas de *S. quadricauda* expuesta a 10°C en medio de cultivo

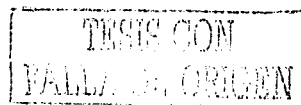
The SAS System
The ANOVA Procedure

Class Level Information
Class Levels Values
tiemp 9 1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeti 3 1 2 3

The ANOVA Procedure
Dependent Variable: concnet

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	192.5982957	14.8152535	3.77	0.0003
Error	54	212.1409837	3.9285367		
Corrected Total		67	404.7392794		
R-Square		Coeff Var	Root MSE	concnet Mean	
	0.475858	38.73578	1.982054	5.116854	

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	3	24.0480700	8.0160233	2.04	0.1191
repeti	2	0.8216668	0.4108334	0.10	0.9009



The ANOVA Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for con-cent
 Critical Value of Studentized Range 3.74886
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	tiemp	Between	Simultaneous 95%		
			Means	Confidence Limits	
4 -2		0.9933	-0.7505	2.7370	
4 -3		1.4174	-0.6175	3.4523	
4 -1		1.6224	-0.2145	3.4593	
2 -4		-0.9933	-2.7370	0.7505	
2 -3		0.4241	-1.4469	2.2951	
2 -1		0.6291	-1.0243	2.2826	
3 -4		-1.4174	-3.4523	0.6175	
3 -2		-0.4241	-2.2951	1.4469	
3 -1		0.2050	-1.7531	2.1631	
1 -4		-1.6224	-3.4593	0.2145	
1 -2		-0.6291	-2.2826	1.0243	
1 -3		-0.2050	-2.1631	1.7531	

Proteínas de *Scenedesmus* a 38°C en medio de cultivo

The SAS System
 The ANOVA Procedure

Class	Levels	Values
tiemp	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeli	3	1 2 3

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: con-cent					
Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	16	162315.3435	10144.7090	100.69	<.0001
Error	115	11585.9419	100.7473		
Corrected Total	131	173901.2854			
R-Square					
0.933376	27.40982	10.03730	36.61934		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	3	9946.9785	3315.6595	32.91	<.0001
repeli	2	5.4034	2.7017	0.03	0.9735

The ANOVA Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for con-cent
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 115
 Error Mean Square 100.7473
 Critical Value of Studentized Range 3.68686
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	tiemp	Between	Simultaneous 95%		
			Means	Confidence Limits	
4 -3		15.265	9.097	21.433	***
4 -2		19.864	13.558	26.170	***
4 -1		21.975	15.313	28.637	***
3 -4		-15.265	-21.433	-9.097	***
3 -2		4.599	-1.707	10.905	
3 -1		6.710	0.048	13.372	***
2 -4		-19.864	-28.170	-13.558	***
2 -3		-4.599	-10.905	1.707	
2 -1		2.111	-4.680	8.901	
1 -4		-21.975	-28.637	-15.313	***
1 -3		-6.710	-13.372	-0.048	***
1 -2		-2.111	-8.901	4.680	

Proteínas de *S. quadricauda* expuesto al agua de origen doméstico a 25°C

The SAS System
 The ANOVA Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
tralam	1	4
tiemp	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeli	3	1 2 3

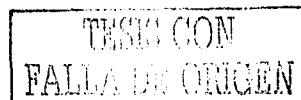
The ANOVA Procedure

Dependent Variable: con-cent					
Sum of					
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	21	80050.9786	3811.9514	24.60	<.0001
Error	194	30064.6066	154.9722		
Corrected Total	215	110115.5851			
R-Square					
0.728972	49.35478	12.44875	25.22305		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	6	5658.91298	943.15216	6.09	<.0001
repeli	2	2.63864	1.31932	0.01	0.9915

The ANOVA Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for con-cent
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 194
 Error Mean Square 154.9722
 Critical Value of Studentized Range 4.21370
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Comparison	tiemp	Between	Simultaneous 95%		
			Means	Confidence Limits	
9 -8		5.727	-2.697	14.152	
9 -3		10.423	0.510	20.336	***
9 -2		11.385	0.936	21.835	***
9 -7		12.115	3.690	20.540	***
9 -6		12.643	4.015	21.272	***
9 -5		14.602	5.735	23.469	***
8 -9		-5.727	-14.152	2.697	
8 -3		4.695	-5.489	14.880	
8 -2		5.658	-5.050	16.365	
8 -7		6.388	-2.355	15.130	
8 -6		6.916	-2.023	15.855	
8 -5		8.874	-0.295	18.044	
3 -9		-10.423	-20.336	-0.510	***
3 -8		-4.695	-14.880	5.489	
3 -2		0.962	-10.952	12.877	
3 -7		1.692	-8.493	11.877	
3 -6		2.220	-8.133	12.574	
3 -5		4.179	-6.374	14.732	
2 -9		-11.385	-21.835	-0.936	***
2 -8		-5.658	-16.365	5.050	
2 -3		-0.962	-12.877	10.952	
2 -7		0.730	-9.978	11.437	
2 -6		1.258	-9.610	12.126	
2 -5		3.217	-7.842	14.275	
7 -9		-12.115	-20.540	-3.690	***
7 -8		-6.388	-15.130	2.355	
7 -3		-1.692	-11.877	6.493	
7 -2		-0.730	-11.437	9.978	
7 -6		0.528	-8.411	9.467	
7 -5		2.487	-6.682	11.656	
6 -9		-12.643	-21.272	-4.015	***
6 -8		-6.916	-15.855	2.023	



The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

tiemp Comparison	Between Means	Difference Simultaneous 95% Confidence Limits		
		Means	Lower	Upper
6 - 3	-2.220	-12.574	8.133	
6 - 2	-1.258	-12.126	9.610	
6 - 7	-0.528	-9.467	8.411	
6 - 5	1.959	-7.398	11.315	
5 - 9	-14.602	-23.469	-5.735 ***	
5 - 8	-8.874	-18.044	0.295	
5 - 3	-4.179	-14.732	6.374	
5 - 2	-3.217	-14.275	7.842	
5 - 7	-2.487	-11.656	6.682	
5 - 6	-1.959	-11.315	7.398	

Proteínas de *S. quadricauda* expuesto al agua
 de origen industrial a 25°C

The SAS System
 The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
tiemp	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeti	3	1 2 3

The ANOVA Procedure
 Dependent Variable: concent

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	24	876497.518	36520.730	3.78	<.0001
Error	306	2957193.992	9664.033		
Corrected Total		330	3833691.510		

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	6	49519.1014	8253.1836	0.85	0.5292
repeti	2	31557.7398	15778.8699	1.63	0.1971

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.
 Alpha 0.05

Error Degrees of Freedom	306
Error Mean Square	9664.033
Critical Value of Studentized Range	4.19749
Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.	
Difference	Simultaneous
tiemp	Between 95% Confidence
Comparison	Means Limits

5 - 8	12.44	-46.23	71.12
5 - 9	16.32	-42.36	74.99
5 - 7	20.20	-39.35	79.76
5 - 3	26.24	-34.31	86.78
5 - 2	34.98	-27.48	97.45
5 - 6	38.34	-21.22	97.90
8 - 5	-12.44	-71.12	46.23
8 - 9	3.87	-53.91	61.65
8 - 7	7.76	-50.92	66.44
8 - 3	13.80	-45.88	73.47
8 - 2	22.54	-39.09	84.17
8 - 6	25.90	-32.78	84.58
9 - 5	-16.32	-74.99	42.36
9 - 8	-3.87	-61.65	53.91
9 - 7	3.89	-54.79	62.57
9 - 3	9.92	-49.75	69.60
9 - 2	18.67	-42.96	80.29
9 - 6	22.03	-36.65	80.71
7 - 5	-20.20	-79.76	39.35

7 - 8	-7.76	-66.44	50.92
7 - 9	-3.89	-62.57	54.79
7 - 3	6.03	-54.51	66.58

7 - 2	14.78	-47.69	77.24
7 - 6	18.14	-41.42	77.70
3 - 5	-26.24	-86.78	34.31
3 - 8	-13.80	-73.47	45.88
3 - 9	-9.92	-69.60	49.75
3 - 7	-6.03	-66.58	54.51
3 - 2	8.74	-54.66	72.15
3 - 6	12.11	-48.44	72.65
2 - 5	-34.98	-97.45	27.48
2 - 8	-22.54	-84.17	39.09

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

tiemp Comparison	Between Means	Difference Simultaneous 95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
2 - 9	-18.67	-80.29	42.96
2 - 7	-14.78	-77.24	47.69
2 - 3	-8.74	-72.15	54.66
2 - 6	3.36	-59.11	65.83
6 - 5	-38.34	-97.90	21.22
6 - 8	-25.90	-84.58	32.78
6 - 9	-22.03	-80.71	36.65
6 - 7	-18.14	-77.70	41.42
6 - 3	-12.11	-72.65	48.44
6 - 2	-3.36	-65.83	59.11

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
 DEL ARCHIVO

Análisis estadístico del patrón de proteínas de *Microcystis aeruginosa*

Proteínas de *M. aeruginosa*
a 25°C en medio de cultivo (Testigo)

The SAS System
The ANOVA Procedure

Class Level Information	
Class	Levels Values
tiemp	9 1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeli	3 1 2 3

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: concent

Sum of	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	50669.64805	2026.78592	19.56	<.0001
Error	233	24139.69117	103.60382		
Corrected Total	258	74809.33922			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	concent Mean
0.677317	51.79588	10.17860	19.65136

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	8	3620.37981	452.54748	4.37	<.0001
repeli	2	17.00872	8.50436	0.08	0.9212

The ANOVA Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent

Alpha 0.05

Error Degrees of Freedom 233

Error Mean Square 103.6038

Critical Value of Studentized Range 4.42819

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Difference	tiemp	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
	9 - 3	3.016	-5.173 11.205
	9 - 1	3.971	-5.060 13.003
	9 - 4	5.652	-2.388 13.692
	9 - 8	6.101	-1.580 13.782
	9 - 5	6.822	-1.290 14.934
	9 - 7	8.658	0.545 16.770 ***
	9 - 2	10.420	1.081 19.759 ***
	9 - 6	12.563	4.882 20.244 ***
	3 - 9	-3.016	-11.205 5.173
	3 - 1	0.955	-8.376 10.286
	3 - 4	2.635	-5.740 11.010
	3 - 8	3.084	-4.946 11.115
	3 - 5	3.806	-4.639 12.250
	3 - 7	5.641	-2.803 14.085
	3 - 2	7.403	-2.225 17.032
	3 - 6	9.546	1.516 17.577 ***
	1 - 9	-3.971	-13.003 5.060
	1 - 3	-0.955	-10.286 8.376
	1 - 4	1.680	-7.520 10.881
	1 - 8	2.129	-6.759 11.018
	1 - 5	2.851	-6.413 12.114
	1 - 7	4.686	-4.577 13.950
	1 - 2	6.448	-3.906 16.803
	1 - 6	8.592	-0.297 17.480
	4 - 9	-5.652	-13.692 2.388
	4 - 3	-2.635	-11.010 5.740
	4 - 1	-1.680	-10.881 7.520
	4 - 8	0.449	-7.430 8.328
	4 - 5	1.170	-7.129 9.470
	4 - 7	3.006	-5.294 11.306
	4 - 2	4.768	-4.734 14.270
	4 - 6	6.911	-0.988 14.790

The ANOVA Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Difference	tiemp	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
	8 - 9	-6.101	-13.782 1.580
	8 - 3	-3.084	-11.115 4.946
	8 - 1	-2.129	-11.018 6.759
	8 - 4	-0.449	-8.328 7.430
	8 - 5	0.721	-7.231 8.674
	8 - 7	2.557	-5.396 10.509
	8 - 2	4.319	-4.881 13.519
	8 - 6	6.462	-1.050 13.974
	5 - 9	-6.822	-14.934 1.290
	5 - 3	-3.806	-12.250 4.639
	5 - 1	-2.851	-12.114 6.413
	5 - 4	-1.170	-9.470 7.129
	5 - 8	-0.721	-8.674 7.231
	5 - 7	1.836	-6.534 10.205
	5 - 2	3.598	-5.966 13.161
	5 - 6	5.741	-2.212 13.693
	7 - 9	-8.658	-16.770 -0.545 ***
	7 - 3	-5.641	-14.085 2.803
	7 - 1	-4.686	-13.950 4.577
	7 - 4	-3.006	-11.306 5.294
	7 - 8	-2.557	-10.509 5.396
	7 - 5	-1.836	-10.205 6.534
	7 - 2	1.762	-7.801 11.328
	7 - 6	3.905	-4.047 11.858
	2 - 9	-10.420	-19.759 -1.081 ***
	2 - 3	-7.403	-17.032 2.225
	2 - 1	-6.448	-16.803 3.906
	2 - 4	-4.768	-14.270 4.734
	2 - 8	-4.319	-13.519 4.881
	2 - 5	-3.598	-13.161 5.966
	2 - 7	-1.762	-11.328 7.801
	2 - 6	2.143	-7.057 11.344
	6 - 9	-12.563	-20.244 -4.882 ***
	6 - 3	-9.546	-17.577 -1.516 ***
	6 - 1	-8.592	-17.480 0.297
	6 - 4	-6.911	-14.790 0.968
	6 - 8	-6.462	-13.974 1.050
	6 - 5	-5.741	-13.693 2.212
	6 - 7	-3.905	-11.858 4.047
	6 - 2	-2.143	-11.344 7.057

Proteínas de *M. aeruginosa* a 38°C en medio de cultivo

The SAS System
The ANOVA Procedure

Class Level Information	
Class	Levels Values
tiemp	9 1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeli	3 1 2 3

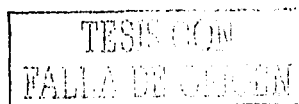
The ANOVA Procedure

Dependent Variable: concent

Sum of	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	68000.75442	6181.89677	25.88	<.0001
Error	51	12182.64624	238.87542		
Corrected Total	62	80183.40066			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	concent Mean
0.848065	50.03590	15.45559	30.88901

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	3	883.25080	294.41693	1.23	0.3075
repeli	2	1.89210	0.94605	0.00	0.9960



The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for conцент
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 51
 Error Mean Square 238.8754
 Critical Value of Studentized Range 3.75588
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.
 Difference Simultaneous
 tiemp Between 95% Confidence
 Comparison Means Limits

4	-2	0.706	-14.591	16.004
4	-3	6.509	-6.675	19.694
4	-1	9.269	-6.028	24.566
2	-4	-0.706	-16.004	14.591
2	-3	5.803	-9.051	20.657
2	-1	8.562	-8.195	25.320
3	-4	-6.509	-19.694	6.675
3	-2	-5.803	-20.657	9.051
3	-1	2.759	-12.094	17.613
1	-4	-9.269	-24.566	6.028
1	-2	-8.562	-25.320	8.195
1	-3	-2.759	-17.613	12.094

8	-9	-2.116	-11.162	6.930
8	-5	3.703	-5.665	13.090
8	-3	7.510	-2.336	17.355
8	-6	7.726	-1.320	16.772
8	-2	9.071	-1.865	20.006
8	-7	9.268	0.223	18.314 ***
5	-9	-5.819	-14.864	3.227
5	-8	-3.703	-13.090	5.685
5	-3	3.807	-6.038	13.653
5	-6	4.023	-5.022	13.069
5	-2	5.368	-5.568	16.304
5	-7	5.566	-3.480	14.612
3	-9	-9.626	-19.146	-0.105 ***
3	-8	-7.510	-17.355	2.336
3	-5	-3.807	-13.653	6.038
3	-6	0.216	-9.304	9.737
3	-2	1.581	-9.771	12.892
3	-7	1.759	-7.762	11.279
6	-9	-9.842	-18.533	-1.151 ***
6	-8	-7.726	-16.772	1.320
6	-5	-4.023	-13.069	5.022
6	-3	-0.216	-9.737	9.304
6	-2	1.345	-9.300	11.989
6	-7	1.542	-7.149	10.233
2	-9	-11.187	-21.831	-0.542 ***
2	-8	-9.071	-20.006	1.665

Proteínas de *M. aeruginosa* expuesto al agua de origen doméstico

The SAS System
 The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
tiemp	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeti	3	1 2 3

The ANOVA Procedure
 Dependent Variable: conцент

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	135737.1502	5901.6152	32.93	<.0001
Error	225	40317.8353	179.1904		
Corrected Total	248	176054.9855			
R-Square					
Coef Var					
Root MSE					
conцент Mean					
0.770993	48.04707	13.38620	27.86060		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	6	4681.3794	780.2299	4.35	0.0004
repeti	2	8.6960	4.3480	0.02	0.9760

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for conцент
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 225
 Error Mean Square 179.1904
 Critical Value of Studentized Range 4.20759
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.
 Difference Simultaneous
 tiemp Between 95% Confidence
 Comparison Means Limits

9	-8	2.116	-6.930	11.162
9	-5	5.819	-3.227	14.864
9	-3	9.626	0.105	19.146 ***
9	-6	9.842	1.151	18.533 ***
9	-2	11.187	0.542	21.831 ***
9	-7	11.384	2.693	20.075 ***

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for conцент
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.
 Difference Simultaneous 95%
 tiemp Between Confidence Limits

2	-5	-5.368	-16.304	5.568
2	-3	-1.561	-12.892	9.771
2	-6	-1.345	-11.989	9.300
2	-7	0.198	-10.446	10.842
7	-9	-11.384	-20.075	-2.693 ***
7	-8	-9.268	-18.314	-0.223 ***
7	-5	-5.566	-14.612	3.480
7	-3	-1.759	-11.279	7.762
7	-6	-1.542	-10.233	7.149
7	-2	-0.198	-10.842	10.446

Proteínas de *M. aeruginosa* expuesto al agua de origen industrial

The SAS System
 The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
tiemp	9	1 2 3 4 5 6 7 8 9
repeti	3	1 2 3

The ANOVA Procedure
 Dependent Variable: conцент

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	24	114968.3305	4790.3471	39.38	<.0001
Error	212	25790.1118	121.6515		
Corrected Total	236	140758.4423			
R-Square					
Coef Var					
Root MSE					
conцент Mean					
0.816778	34.82005	11.02957	31.67592		
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tiemp	6	3787.7105	631.2851	5.19	<.0001
repeti	2	44.7263	22.3632	0.18	0.8322

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
 NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 212
 Error Mean Square 121.6515
 Critical Value of Studentized Range 4.20994
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Difference	tiemp	Comparison	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
	6	-7	0.403	-7.336 8.142
	6	-9	1.426	-6.312 9.165
	6	-8	3.663	-3.794 11.121
	6	-5	3.837	-4.280 11.953
	6	-3	9.248	1.131 17.365 ***
	6	-2	11.880	3.521 20.239 ***
	7	-6	-0.403	-8.142 7.336
	7	-9	1.024	-6.715 8.763
	7	-8	3.260	-4.197 10.718
	7	-5	3.434	-4.683 11.551
	7	-3	8.845	0.729 16.962 ***
	7	-2	11.477	3.118 19.836 ***
	9	-6	-1.426	-9.165 6.312
	9	-7	-1.024	-8.763 6.715
	9	-8	2.237	-5.221 9.694
	9	-5	2.410	-5.707 10.527
	9	-3	7.821	-0.295 15.938
	9	-2	10.454	2.094 18.813 ***
	8	-6	-3.663	-11.121 3.794

8	-7	-3.260	-10.718	4.197
8	-9	-2.237	-9.694	5.221
8	-5	0.174	-7.675	8.022
8	-3	5.585	-2.264	13.434
8	-2	8.217	0.118	16.316 ***
5	-6	-3.837	-11.953	4.280
5	-7	-3.434	-11.551	4.683
5	-9	-2.410	-10.527	5.707
5	-8	-0.174	-8.022	7.675
5	-3	5.411	-3.066	13.889
5	-2	8.043	-0.667	16.753
3	-6	-9.248	-17.365	-1.131 ***
3	-7	-8.845	-16.962	-0.729 ***

The ANOVA Procedure
 Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concent
 Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

Difference	tiemp	Comparison	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
	3	-9	-7.821	-15.938 0.295
	3	-8	-5.585	-13.434 2.264
	3	-5	-5.411	-13.889 3.066
	3	-2	2.632	-6.078 11.342
	2	-6	-11.880	-20.239 -3.521 ***
	2	-7	-11.477	-19.836 -3.118 ***
	2	-9	-10.454	-18.813 -2.094 ***
	2	-8	-8.217	-16.316 -0.118 ***
	2	-5	-8.043	-16.753 0.667
	2	-3	-2.632	-11.342 6.078

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN