



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Determinación del crecimiento y la  
actividad fotosintética de *Chlorella  
vulgaris* cultivada en presencia de  
azitromicina”

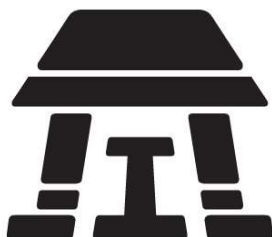
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DONOVAN ENRIQUE BARCENAS SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA  
TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

## **Dedicatoria**

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

## **Agradecimientos**

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

*¿Te importa que te cuente una historia, una que quizás no  
hayas oído? Todos los elementos de tu cuerpo fueron  
forjados hace muchos, muchos millones de años en el  
corazón de una estrella lejana que explotó y murió. Esa  
explosión esparció esos elementos a través de ese espacio  
profundo. Después de muchos, muchísimos millones de  
años, esos elementos se unieron para formar nuevas  
estrellas, nuevos planetas y así siguieron sin cesar. Los  
elementos se unieron y se separaron formando zapatos,  
barcos, flores y reyes, hasta que al final se unieron para  
crearte a ti en este rincón, de un país, en un continente, en  
un planeta en el rincón de la galaxia, que es el rincón de un  
universo que no para de crecer y de encogerse, de crear y  
destruir y que no permanece igual ni un solo milisegundo. Y  
aún, hay tanto, tanto que ver aquí...*

*Doctor Who.*

## INDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
A. Contaminantes emergentes.....	3
B. Antibióticos .....	5
C. Modo de acción.....	6
D. Macrólidos .....	8
E. Azitromicina .....	9
a. Descripción.....	9
b. Actividad biológica de azitromicina.....	12
c. Usos de azitromicina.....	13
F. Microalgas.....	14
a. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	15
II. Antecedentes.....	16
III. JUSTIFICACION .....	19
IV. HIPOTESIS.....	19
V. Objetivo General .....	19
VI. Objetivos particulares.....	19
VII. Materiales y métodos.....	20
1. Organismo.....	20
2. Medio de cultivo.....	20
3. Protocolo experimental.....	20
4. Variables experimentales de respuesta.....	21
A) Crecimiento.....	21
B) Pigmentos fotosintéticos .....	22
C) Actividad fotosintética por oximetría.....	22
D) Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia. ....	23
E) El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico .....	24
F) Análisis estadístico.....	26
VIII. Resultados y discusión.....	27
A. Crecimiento.....	27

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

B.	Contenido de clorofila a, b y carotenoides totales .....	32
C.	Actividad fotosintética: Liberación de oxígeno, transporte electrónico y disipación térmica de energía de excitación.....	37
D.	Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila a en el fotosistema II.....	45
E.	Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II .....	54
IX.	CONCLUSIONES .....	60
X.	Bibliografía .....	63
XI.	Apéndice .....	70

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA AZITROMICINA, CON SU NOMENCLATURA QUÍMICA CORRESPONDIENTE (TOMADO DE ZUCKERMAN Y KAYE, 1995). .....	10
<b>FIGURA 2</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ERITROMICINA, TOMADO DE: <a href="https://goo.gl/3iDKW6">HTTPS://GOO.GL/3iDKW6</a> .....	11
<b>FIGURA 3</b> SÍNTESIS DE AZITROMICINA A PARTIR DE LA INCORPORACIÓN DE UN ÁTOMO DE NITRÓGENO MEDIANTE LA REACCIÓN DE TRANSPOSICIÓN DE ERNST OTTO BECKMANN DEL CARBONILO C10 DE LA OXIMA INTERMEDIARIA, CON REDUCCIÓN Y METILACIÓN DE LA AMINA RESULTANTE (TOMADO DE LALAK Y MORRIS, 1993). .....	11
<b>FIGURA 4.</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN EL CRECIMIENTO DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3).....	27
<b>FIGURA 5.</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN LA TASA DE CRECIMIENTO DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3).....	30
<b>FIGURA 6</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN TIEMPO DE DUPLICACIÓN DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3).....	31
<b>FIGURA 7.</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN EL CONTENIDO VOLUMÉTRICO DE CLOROFILA TOTAL EN <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3) .....	33
<b>FIGURA 8.</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN EL CONTENIDO DE CLOROFILA TOTAL POR PESO SECO DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3).....	34
<b>FIGURA 9.</b> EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES POR PESO SECO DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS MUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE ACUERDO CON LA PRUEBA ESTADÍSTICA LSD. (N=3).....	36
<b>FIGURA 10.</b> LIBERACIÓN DE OXÍGENO (FOTOSÍNTESIS) DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA DE LSD. (N=3) .....	37
<b>FIGURA 11.</b> CONSUMO DE OXÍGENO (RESPIRACIÓN) DE <i>C. VULGARIS</i> . LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA DE LSD. (N=3) .....	38
<b>FIGURA 12.</b> EFECTO DE LA AZITROMICINA SOBRE LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO APARENTE (ETRAP). LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA LSD. N=15.....	41
<b>FIGURA 13.</b> PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA LA FOTOQUÍMICA PRIMARIA DEL PSII. LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA DE LSD. N=15.....	43
<b>FIGURA 14.</b> EFECTO DE LA AZITROMICINA SOBRE LA RELAJACIÓN NO FOTOQUÍMICA (QNP) DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> EXPUESTA A 72 HRS. LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA LSD. N=15.....	44
<b>FIGURA 15.</b> MODELO DE ABSORCIÓN Y DISIPACIÓN DE ENERGÍA FOTÓNICA A TRAVÉS DEL COMPLEJO COSECHADOR DE LUZ (LHCII) Y EL CENTRO DE REACCIÓN (RC). .....	47
<b>FIGURA 16.</b> MODELO DE CINÉTICA DE FLUORESCENCIA VARIABLE (CURVA DE KAUSKY) GRAFICADO EN TIEMPO LOGARÍTMICO (O-K-J-I-P).....	48
<b>FIGURA 17.</b> FLUORESCENCIA VARIABLE RELATIVA DE <i>C. VULGARIS</i> EXPUESTA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE AZITROMICINA DURANTE 72 HORAS (ESTA EXPRESIÓN PERMITE OBSERVAR LA REDUCCIÓN DE $Q_A$ ). .....	51
<b>FIGURA 18.</b> EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE LA AZITROMICINA SOBRE LA FLUORESCENCIA VARIABLE RELATIVA ( $\Delta V_T$ ) EN <i>C. VULGARIS</i> . N=5 .....	52



<b>FIGURA 19.</b> PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA EL TRANSPORTE ELECTRÓNICO DE PSII HACIA LOS ACARREADORES INTERMEDIOS. LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA INDICAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SEGÚN LA PRUEBA LSD. N=15.....	55
<b>FIGURA 20.</b> PROBABILIDAD DE QUE UN EXCITÓN TRANSPORTADO MUEVA UN ELECTRÓN DESPUÉS DE PSI ( $\Delta R_0$ ) N=15 .....	56
<b>FIGURA 21.</b> PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA LA REDUCCIÓN DE LOS ACARREADORES FINALES DEL FOTOSISTEMA I, LAS LETRAS SOBRE CADA BARRA DEMUESTRAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON PRUEBA LSD. N=15.....	57

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b> PRINCIPALES CONTAMINANTES EMERGENTES REGISTRADOS EN EL MEDIO AMBIENTE (BECERRIL BRAVO, 2009).....	4
<b>TABLA 2</b> PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PRUEBA DE OJIP (VAN HEREDEN ET AL., 2004).....	25
<b>TABLA 3.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA CRECIMIENTO PESO SECO MG. L <sup>-1</sup> ..	70
<b>TABLA 4.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) CRECIMIENTO PESO SECO MG. L <sup>-1</sup> .....	70
<b>TABLA 5.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA LA TASA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ -D <sup>-1</sup> ) ....	71
<b>TABLA 6.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA TASA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ -D <sup>-1</sup> ) .....	71
<b>TABLA 7.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA TIEMPO DE DUPLICACIÓN (TD.H <sup>-1</sup> ) ...	72
<b>TABLA 8.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA TIEMPO DE DUPLICACIÓN (TD.H <sup>-1</sup> ).....	72
<b>TABLA 9.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA CLOROFILA TOTAL (MG. L <sup>-1</sup> ).....	73
<b>TABLA 10.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA CLOROFILA TOTAL (MG. L <sup>-1</sup> ).....	73
<b>TABLA 11.</b> PRUEBA MINIA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA CLOROFILA TOTAL (MG.MG <sup>-1</sup> P.S.).....	74
<b>TABLA 12.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA CLOROFILA TOTAL (MG.MG <sup>-1</sup> P.S.) .....	74
<b>TABLA 13.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA CAROTENOIDES TOTALES (MG. G P.S <sup>-1</sup> ) .....	75
<b>TABLA 14.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA CAROTENOIDES TOTALES (MG. G P.S <sup>-1</sup> ) .....	75
<b>TABLA 15.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA FOTOSÍNTESIS (NMOLES O <sub>2</sub> .MG CHL TOTAL <sup>-1</sup> . MIN <sup>-1</sup> ).....	76
<b>TABLA 16.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA FOTOSÍNTESIS (NMOLES O <sub>2</sub> .MG CHL TOTAL <sup>-1</sup> . MIN <sup>-1</sup> ) ...	76
<b>TABLA 17.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA RESPIRACIÓN (NMOLES O <sub>2</sub> .MG CHL TOTAL <sup>-1</sup> . MIN <sup>-1</sup> ).....	77
<b>TABLA 18.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA FOTOSÍNTESIS (NMOLES O <sub>2</sub> .MG CHL TOTAL <sup>-1</sup> . MIN <sup>-1</sup> ) ...	77
<b>TABLA 19.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO APARENTE (ETR <sub>AP</sub> ) .....	78
<b>TABLA 20.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA VELOCIDAD DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO APARENTE (ETR <sub>AP</sub> ) .....	78
<b>TABLA 21.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO POTENCIAL PARA LA FOTOQUÍMICA PRIMARIA EN PSII( $\Phi$ PSII=FV/FM) .....	79
<b>TABLA 22.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO POTENCIAL PARA LA FOTOQUÍMICA PRIMARIA EN PSII( $\Phi$ PSII=FV/FM).....	79
<b>TABLA 23.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA LA RELAJACIÓN NO-FOTOQUÍMICA EN PSII (QNP) .....	80
<b>TABLA 24.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA RELAJACIÓN NO-FOTOQUÍMICA EN PSII (QNP).....	80
<b>TABLA 25.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA EL RENDIMIENTO CUÁNTICO OPERACIONAL ( $\Phi$ PSII) .....	81

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

<b>TABLA 26.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL RENDIMIENTO CUÁNTICO OPERACIONAL ( $\Phi$ PSII) ....	81
<b>TABLA 27.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA EL TRANSPORTE ELECTRÓNICO DE PSII HACIA LOS ACARREADORES INTERMEDIOS ( $\Phi$ E0) .....	82
<b>TABLA 28.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA EL TRANSPORTE ELECTRÓNICO DE PSII HACIA LOS ACARREADORES INTERMEDIOS ( $\Phi$ E0) .....	82
<b>TABLA 29.</b> PRUEBA DE MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA LA REDUCCIÓN DE LOS ACARREADORES FINALES DE PSI ( $\Phi$ RO) .....	83
<b>TABLA 30.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PRODUCTO CUÁNTICO MÁXIMO PARA LA REDUCCIÓN DE LOS ACARREADORES FINALES DE PSI ( $\Phi$ RO).....	83

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CE – Contaminante emergente

FDA - Food and Drugs Administration ( Administración de alimentos y medicamentos)

CLO – Complejo liberador de oxígeno

EDTA – Ácido etildiaminotetraacético

LHCII – Complejo cosechador de luz del fotosistema II

MDA – Malondialdehído

NPQ – Decaimiento no fotoquímico

PPCP – Productos farmacéuticos y de aseo personal

PSI – Fotosistema I

PSII – Fotosistema II

RCA – Centros de reacción activos

RCI – Centros de reacción inactivos

## Resumen

El incremento mundial en el uso de antibióticos en la medicina humana y veterinaria ha contribuido a su aumento en aguas residuales, en particular se ha reportado el incremento de los macrólidos en el ambiente acuático. Estos macrólidos, tienen la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en cloroplastos y mitocondrias del fitoplancton. Se desconoce el impacto de la contaminación con dichos compuestos, en la dinámica de los organismos fotosintéticos de los ecosistemas acuáticos, por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del macrólido azitromicina en el crecimiento y actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris*. Las células fueron cultivadas en el medio mineral PCG, siendo expuestas a: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg·L<sup>-1</sup> de azitromicina durante 72 h. El crecimiento se cuantificó por peso seco, la concentración de pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría y la actividad metabólica por oximetría y fluorimetría. Los resultados muestran que a la máxima concentración del antibiótico (5 mg. L<sup>-1</sup>), la tasa de crecimiento se reduce significativamente en 53%. El contenido de clorofila total por biomasa no se modifica significativamente, sin embargo, el contenido de carotenoides aumenta 47%. La exposición a la máxima concentración del antibiótico reduce en 87% la actividad fotoquímica primaria ( $\phi P_o$ ) y en 92% el transporte electrónico después del primer aceptor estable QA. De igual manera la liberación fotosintética de oxígeno se inhibe significativamente hasta en 64 % y la respiración en 43%. Las investigaciones realizadas por otros autores, reportan que la azitromicina inhibe la síntesis de proteínas en los ribosomas 70S, por lo que la reducción del crecimiento y la actividad metabólica podrían estar relacionadas de manera directa o indirecta a la inhibición de la síntesis de proteínas en estos organelos. Lo anterior nos permite concluir que concentraciones micromolares de azitromicina pueden afectar la dinámica de los organismos fotosintéticos de los ecosistemas acuáticos naturales.

## I. Introducción

Con el aumento del empleo de materiales de uso personal en la población humana era evidente que el crecimiento de desechos cosméticos fuese aumentando en las últimas décadas, desechos que incluyen residuos químicos de laboratorios y farmacéuticas procedentes de veterinarias y hospitales; residuos sanitarios y de medicamentos de consumo doméstico, los cuales han sido denominados como productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP por sus siglas en inglés). Estudios de ecosistemas acuáticos revelan una contaminación de hormonas, antiinflamatorios antisépticos ansiolíticos y antibióticos (Tillo, 2010).

Entre dichos contaminantes (PPCP), los antibióticos de uso actual son unos los de mayor preocupación; por ejemplo, los macrólidos (Eritromicina y sus derivados). En estudios actuales, se han registrado residuos de estos antibióticos no metabolizados en medios acuáticos (Ling Fu *et al.*, 2016).

Pocos trabajos se han relacionado con el efecto de los antibióticos desechados sobre los organismos del medio acuático (Gonzalez-Pleiter *et al.*, 2013), ya que la mayoría de los estudios registrados son relacionados a bacterias y su resistencia a estos compuestos sin tomar en cuenta que organismos como microalgas son considerados como parte fundamental de los primeros niveles tróficos en una cadena de consumidores y productores del medio acuático (Moreno-Ortiz *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha reportado que el efecto de algunos contaminantes en el medio acuático puede alterar el crecimiento y metabolismo de microorganismos fotosintéticos considerándose como un estrés tóxico; ya que el alterar su nicho

afecta considerablemente la estructura y función de todo un sistema predefinido por el organismo (Prósperi C. 2000). Para dichas investigaciones pueden ser utilizados organismos del género *Chlorella* por su nivel de importancia económica, ecológica y su tolerancia a concentraciones de pH, salinidad, temperatura y luminosidad (Gómez 2012). Así se han podido registrar las diferencias en sus tasas de crecimiento, en la generación de biomasa y cambios metabólicos como evidencias de sensibilidad a la presencia de diferentes contaminantes y concentraciones que fueron registrados en el ecosistema.

#### **A. Contaminantes emergentes**

El término de contaminantes emergentes (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud. (Janet *et al.* 2012)

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, de los residuos de las plantas de tratamiento, de los efluentes hospitalarios, de las actividades agrícolas y ganaderas y de los tanques sépticos;

los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y CEs que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras (Janet *et al.* 2012).

Los compuestos que han emergido recientemente como particularmente relevantes son: los surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua (Tabla 1).

**Tabla 1** Principales contaminantes emergentes registrados en el medio ambiente (Becerril Bravo, 2009)

- ❖ Pesticidas o Plaguicidas
- ❖ Surfactantes
- ❖ Productos para tratamiento de aguas
- ❖ Aditivos industriales y subproductos
- ❖ Retardantes de llama fuego
- ❖ Aditivos alimentarios
- ❖ Productos Farmacéuticos
  - Analgésicos
  - Antihipertensivos
  - Antibióticos
  - Drogas ilícitas
  - Hormonas esteroides
  - Cuidado personal (cremas, geles, bloqueadores y perfumes)

Entre los contaminantes emergentes encontramos algunos que pueden causar alteraciones endocrinas, entre los que se incluyen pesticidas, productos químicos industriales, productos farmacéuticos y fitoquímicos. Estos productos químicos se distribuyen extensamente en el ambiente, y pueden presentar efectos similares o antagónicos en las funciones biológicas de las hormonas naturales (Becerril Bravo, 2009).

### **B. Antibióticos**

Los antibióticos son un grupo de sustancias químicas producidas por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su producción puede ser completamente biológica, es decir, se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias ó semisintético, a partir de moléculas obtenidas de forma natural, las cuales se modifican químicamente para mejorar sus propiedades y así aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes y Roca 2004).

Estos fármacos por lo general van dirigidos a un blanco específico; sin embargo, en el medio ambiente acuático y terrestre la similitud de los procesos fisiológicos de los diversos microorganismos no blancos, puede afectar la cadena trófica. La razón del incremento global de los fármacos en el ambiente es que la mitad de estos medicamentos se prescriben, se dispensan, se consumen y desechan de forma inadecuada (Dresler *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha incrementado la atención hacia los lugares con posible presencia de antibióticos: Los sistemas de desecho de agua de hospitales,



municipios, la industria farmacéutica y la agricultura. Varios estudios han destacado que el uso y desecho de antibióticos en el medioambiente, durante más de 60 años desde su descubrimiento, ha promovido la adaptación, desaparición y resistencia de diversos microorganismos ya sean bacteria patógenas o no patógenas, incluso organismos los cuales, no son objetivo directo de estos antibióticos (Rocha *et al.* 2015).

### **C. Modo de acción**

Los mecanismos de los antibióticos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos (No produce muerte a la bacteria, pero inhibe su duplicación) y pueden ser clasificados como:

- ❖ Inhibición de la síntesis de la pared celular - Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte; por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del peptidoglucano se lleva a cabo en tres etapas y los distintos antimicrobianos pueden afectar cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las penicilinas y cefalosporinas.
- ❖ Desorganización de la membrana citoplasmática- La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo. Si la integridad funcional de la membrana se altera la célula se lesiona y muere. Ejemplos de este grupo son las Polimixinas, anfotericina B y nistatina.

- ❖ Inhibición de la síntesis de proteínas - Diversos antibióticos se fijan a una de las 2 subunidades de los ribosomas bacterianos e inhiben la síntesis proteica.

Se los puede clasificar según 2 criterios distintos:

1. Según la unidad ribosomal a la que se unen: 30s o 50s
2. Según sus efectos sobre la síntesis proteica: inhibidores de la iniciación, de la elongación o inductores de la síntesis de proteínas anómalas

- ❖ Interferencia en la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos – Interfieren a diferentes niveles en la síntesis de los ácidos nucleicos; pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o causar una interconversión de nucleótidos, pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN. Un grupo numeroso de agentes interfieren con la síntesis de purinas y pirimidinas dando lugar a interconversión de nucleótidos o actuando como análogos de nucleótidos e incorporarse a la cadena de polinucleótidos.

La rifampicina, un antibiótico, inhibe la actividad de la RNA polimerasa bacteriana dependiente de DNA, uniéndose en forma no covalente pero muy firme a esta enzima. La inhibición de la replicación del DNA puede provocarse por antimicrobianos que inhiben la actividad de la DNA girasa, involucrada en el rompimiento y reunión de tiras de DNA (Molina 2015).

#### **D. Macrólidos**

Con el descubrimiento de la Eritromicina aislada de *Streptomyces erythraeus* 1952 se desarrolla una nueva familia de antimicrobianos denominados por su estructura química, macrólidos. Estos se encuentran constituidos por un anillo de lactona macrocíclica formado por varios desoxiazúcares aminados. Se los clasifica de acuerdo al número de átomos que conforman el anillo, y cada grupo dentro de la familia posee características químicas y biológicas diferenciales. A su vez pueden catalogarse según su origen en naturales y sintéticos. De acuerdo a las dos clasificaciones mencionadas, se los agrupa de la siguiente manera:

Con 14 átomos: Eritromicina, Oleandomiicina, Roxitromicina, Claritromicina, Dirirtromiín y Fluritromicina.

Con 15 átomos: Azitromicina.

Con 16 átomos: Espiramicina, Josamicina, Midecamycin, Miocamicina, Rokitamicina, Rosaramicina, Kitamicina y Carbomicina.

Los desoxiazúcares aminados se encuentran unidos al anillo lactona por medio de enlaces glucosídicos para conformar la molécula. La desosamina, uno de los aminoazúcares mencionados, funciona como una amina protonada, brindándole a la molécula carácter catiónico e incidiendo de manera relevante en su comportamiento farmacocinético. El otro aminoazúcar es la clánidoso, cuya presencia afecta básicamente al perfil farmacodinámico del compuesto (Lucas et al. 2007).

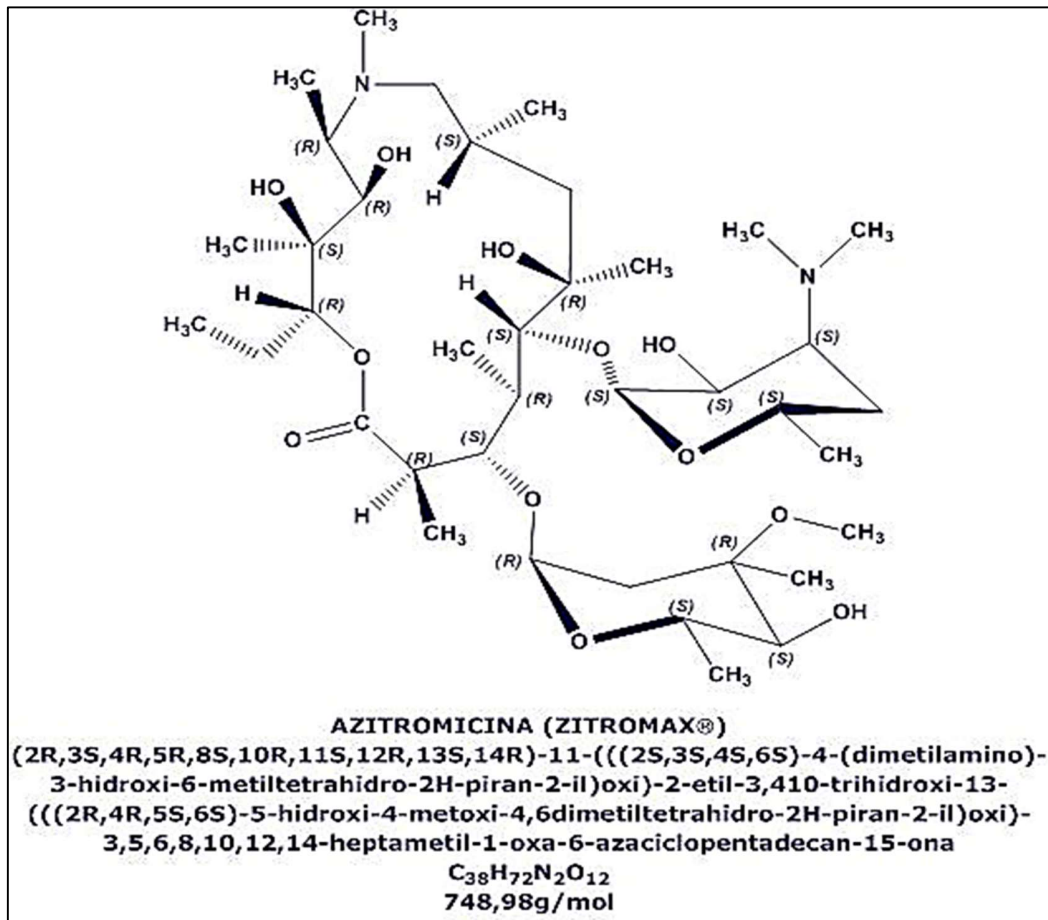
## **E. Azitromicina**

### a. Descripción

Aprobada por la Food Drugs Alimentation (FDA) en noviembre de 1990. Tiene 15 átomos en su estructura y se la clasifican como un azalide por su átomo de nitrógeno en el anillo principal (figura 1). En la azitromicina se ha expandido el anillo de la eritromicina, incorporando un átomo de nitrógeno mediante la reacción de transposición de Ernst Otto Beckmann del carbonilo C10 de la oxima intermediaria, con reducción y metilación de la amina resultante (figura 3) (Lalak y Morris 1993).

Así, partiendo de la Eritromicina, la secuencia de etapas que conducen a la síntesis de Azitromicina son las siguientes:

- 1) Formación de la oxima.
- 2) Transposición de Beckmann.
- 3) Reducción.
- 4) N-metilación.



*Figura 1* Estructura química de la Azitromicina, con su nomenclatura química correspondiente (tomado de Zuckerman y Kaye, 1995).

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

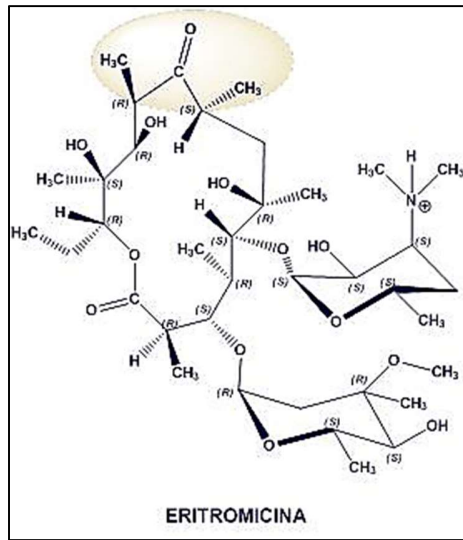


Figura 2 Estructura química de la eritromicina, tomado de: <https://goo.gl/3iDKw6>

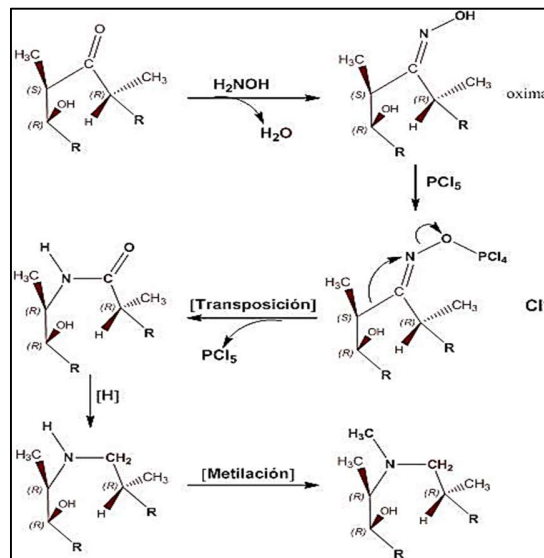


Figura 3 Síntesis de azitromicina a partir de la incorporación de un átomo de nitrógeno mediante la reacción de transposición de Ernst Otto Beckmann del carbonilo C10 de la oxima intermediaria, con reducción y metilación de la amina resultante (tomado de Lalak y Morris, 1993).

La eritromicina fue el primero de los macrólidos “aislados” y aprobados para su uso. Aun cuando es muy efectivo, su vida media en el organismo es muy corta, desechándose en gran cantidad por la orina (Lode 1991). La azitromicina es un macrólido sintetizado considerando la estructura de la eritromicina. A diferencia de esta, la azitromicina tiene una penetración más lenta en el tejido, además con una vida media larga (más de 60 horas). Alcanza concentraciones tisulares altas y eficaces incluso cuando el nivel sérico es menor a la CIM de microorganismos susceptibles. El fármaco se elimina principalmente por el intestino en forma incambiada y por vía urinaria. Azitromicina difiere de la claritromicina en que no interactúa con el sistema del citocromo P450 (González-Piñera, *et al.* 1998).

b. Actividad biológica de azitromicina

Azitromicina es un antibiótico bacteriostático y solo a concentraciones elevadas son bactericidas (esto es que destruye bacterias) frente a algunos microorganismos. La célula eucariótica posee un ribosoma con un coeficiente de sedimentación 80S (S, de Svedberg, una medida de la velocidad de sedimentación) con dos subunidades, la mayor 60S y la menor 40S. La célula procariota posee un ribosoma con un coeficiente de sedimentación 70S y su subunidad mayor es 50S y la menor 30S. La azitromicina se une específicamente a la subunidad 50S de los ribosomas de tipo 70S bloqueando la translocación de aminoácidos desde el acil-ARNt a la cadena peptídica en crecimiento. Los macrólidos no inhiben la formación de los enlaces peptídicos de la cadena que se está sintetizando. Más precisamente, bloquean la translocación del acil-ARNt (transportador de aminoácido) desde el sitio de unión

del ribosoma a la posición desde donde ceden el aminoácido para la formación de un nuevo enlace peptídico (Lode, 1991)

c. Usos de azitromicina

Azitromicina es el macrólido más activo frente a *H. influenzae*. Es más activo que la eritromicina frente a especies de *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Moraxella*, *Legionella*, *Neisseria* y *Bordetella*. Es menos activo que eritromicina frente a gérmenes gram positivos como especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus*. *S. aureus* *meticilino-resistente* y *S. epidermidis* tienden a ser resistentes a azitromicina. Aunque *S. pneumoniae* suele ser sensible a los macrólidos. La sensibilidad de *S. viridans* es variable (Álvarez, Enzler, 1999).

También es eficaz contra *M. catarrhalis* y algunos patógenos entéricos: *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella spp.*; a diferencia de eritromicina y claritromicina que no son activas frente a estos últimos. Es más activo que eritromicina y claritromicina frente a *Campylobacter jejuni*, y menos que claritromicina frente a *H. pylori*. *In vitro* tiene actividad contra *M. hominis*, *Cryptosporidium* y *Pneumocystis carinii*.

El uso de azitromicina está indicado en:

Infecciones respiratorias como son: sinusitis, otitis, exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, bronquitis agudas, neumonías agudas comunitarias leves o moderadas. Es una alternativa para alérgicos a la penicilina que padecen infecciones causadas por *S. pyogenes* o *S. agalactiae*. Es especialmente eficaz para tratar neumonías por: *Mycoplasma*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* y *Legionella*.



Es útil para tratar enfermedades de transmisión sexual causadas por *Chlamydia trachomatis*, *H. ducrey* y *U. urealitycum*. Es uno de los antibióticos recomendados para tratar infecciones gonocócicas no complicadas (cervicitis, uretritis, rectitis y faringitis). Es eficaz para tratar infecciones gastrointestinales por *Campylobacter spp.* La azitromicina puede usarse para tratar infecciones de piel y partes blandas.

Es un fármaco prometedor en infecciones menos frecuentes como angiomatosis bacilar, toxoplasmosis (en combinación con pirimetamina), *Cryptosporidium spp.* y *M. avium*.

Se ha reportado una presencia incluso después de haber sido utilizado, destacando que se ha encontrado residuos de este fármaco en agua de beber, en concentraciones de 1.52 mg. L<sup>-1</sup> sugiriendo que este compuesto es relativamente persistente en el ambiente acuático (Petrovic, 2005).

## **F. Microalgas**

De forma general, las microalgas son de gran relevancia para los ecosistemas acuáticos, donde contribuyen al balance de oxígeno, y gracias a ellas, se inicia el flujo de energía en estos ecosistemas.

Existen algunas especies poco exigentes, que pueden vivir en condiciones extremas: cavernas, suelos desérticos, hielos o nieves perpetuas, lagos hipersalinos, acídulos, alcalinos y con elevadas temperaturas. A pesar de su simplicidad y amplia distribución, las algas habitan en sólo lugares donde existen condiciones favorables para la colonización y el desarrollo. Estos requerimientos o factores ecológicos limitantes son: la radiación luminosa, la temperatura, la

disponibilidad de oxígeno y la concentración de determinados nutrientes, fundamentalmente (Gómez Luna, 2007).

Tradicionalmente, las algas microscópicas han sido cultivadas para diferentes fines: Biomasa, biofertilizante, suplemento nutritivo, fármacos, biorremediación, cosméticos y biocombustibles. Por otra parte, se han utilizado condiciones naturales favorables para su desarrollo, por lo que se conocen lagos donde aparecen crecimientos masivos temporales de especies beneficiosas para el hombre, explotándose el cultivo in situ (Gomez Luna, 2007).

Las ventajas del cultivo de microalgas se pueden resumir en tres puntos:

1. El cultivo de microalgas es un sistema biológico eficiente de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible obtener mayores rendimientos anuales de biomasa.
2. La composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo.
3. Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros.

*a. Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris*, es un alga verde de forma elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las

Chlorophyceae. Se ha cultivado de forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos. El sistema por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación y fácil implementación (Infante *et al.* 2012). Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales (Garza *et al.*, 2010). Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Garza *et al.*, 2010).

## II. Antecedentes

El efecto de los antibióticos sobre el metabolismo de los organismos fotosintéticos del ambiente acuático ha sido poco estudiado. En el 2016 Perales y colaboradores caracterizaron el metabolismo, crecimiento y la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de estreptomicina. Sus resultados muestran que, con respecto al control, el crecimiento disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta en un 50.68% a la máxima concentración ( $2.4 \text{ mg. L}^{-1}$ ) probada. En este mismo estudio se encontró que la velocidad de crecimiento de *Chlorella vulgaris* se redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta un 33.5% en relación con el control, el contenido de clorofila y carotenoides totales se vio afectado de manera significativa ( $p < 0.05$ ), la inhibición de clorofila y carotenoides fue de 52.66% y 37.66% respectivamente; de igual manera la liberación de oxígeno tuvo una inhibición de 73.45 % , el Transporte electrónico aparente (ETRap) disminuyó hasta un 82.87 %, la eficiencia fotoquímica primaria a la luz ( $F_v'/F_m'$ ) fue inhibida un 73.66 %, aumentando en la

disipación de la energía de excitación a través de procesos no fotoquímicos hasta de un 30%.

Por otro lado, Morales en 2014 investigó el efecto de la claritromicina en el crecimiento y metabolismo de *Chlorella vulgaris*, encontrando una disminución en crecimiento y un aumento en el tiempo de duplicación cuando las células fueron cultivadas durante 72 horas a 3 mg.L<sup>-1</sup> del antibiótico claritromicina. En este mismo estudio, la actividad metabólica también se vio afectada, disminuyendo la liberación fotosintética de oxígeno, el transporte electrónico y el contenido de carotenoides y clorofila total.

El análisis de la cinética y decaimiento de la fluorescencia de la clorofila "a", indica que este efecto en el metabolismo fotosintético por parte de la claritromicina se debe a una reducción del número de centros de reacción activos y la disminución en la eficiencia para utilizar la energía lumínica absorbida.

Jiménez en el 2015 realizó un estudio similar al del Gómez en el 2012, encontrando que el antibiótico no solo reduce el crecimiento y el metabolismo, sino también modificaba la estructura celular. Esta investigadora reporta que la exposición a estreptomina provoca una disminución del número de células y un aumento en el tamaño celular hasta de 150% comparado con el tratamiento control.

Por otro lado, Méndez Seoane en 2014 probó el efecto de antibióticos: cloranfenicol (CLO), florfenicol (FLO), oxitetraciclina (OTC) y fármacos: omeprazol (OMP), benzofenona-3 (BP-3), triclosán (TCS) y tonalide (AHTN) sobre microalgas marinas de *Tretaselmis uecica* mediante análisis de citotoxicidad y en vista de los resultados

obtenidos, se pudo observar que el crecimiento y metabolismo fotosintético se vio afectado y además se sufrieron alteraciones morfológicas y fisiológicas todas dependientes de la concentración del compuesto utilizado.

De la misma manera Fu y colaboradores en 2016 probaron el efecto tóxico de 13 antibióticos en *Pseudokirchneriella subcapitata* obteniendo que durante diferentes períodos de exposición (48, 72 y 96 h) los valores de  $\log 1 / \text{ErC50}$  (M) de los antibióticos probados varían de 2.83 a 8.17 donde el antibiótico más tóxico es la azitromicina con un valor  $\log 1 / \text{ErC50}$  de 8.17, que es significativamente mucho más alto que los demás antibióticos probados.

Así también Bielen y colaboradores en 2017 demostraron que el alga *P. subcapitata* es más sensible a la exposición de los efluentes con concentraciones de azitromicina y otros compuestos, esto lo explican con que la presencia de macrólidos en las descargas puede aumentar el efecto tóxico que se observó en los diferentes microorganismos. En 2008 Harada y colaboradores probaron el efecto de varios productos de cuidado personal entre ellos azitromicina en una concentración de 10 mg/L sobre *Pseudokirchneriella subcapitata*, muestra una inhibición de crecimiento mayor que en las bacterias probadas en el trabajo, esta inhibición la relacionaron con el efecto tóxico sobre la síntesis de proteínas que azitromicina puede causar en el crecimiento.

### **III. JUSTIFICACION**

En México no existen mecanismos de regulación y/o evaluaciones periódicas de riesgos ambientales ante el uso constante y excesivo de compuestos farmacéuticos, cabe mencionar que en la NOM-001-ECOL-1996 establece que los límites máximos permisibles de contaminantes en la descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, sin embargo, no contempla la evaluación de ningún tipo de fármaco, lo cual puede convertirse en una gran problemática de contaminación ambiental, por este motivo en este trabajo se evaluó el efecto de la azitromicina sobre el metabolismo de *Chlorella vulgaris* por sus características cosmopolitas.

### **IV. HIPOTESIS**

El metabolismo celular de *Chlorella vulgaris*, se verá afectado debido a la exposición a la azitromicina, lo cual se reflejará en la inhibición del crecimiento y la actividad fotosintética. Particularmente se afectará el metabolismo del cloroplasto ya que poseen ribosomas tipo procarionte, los cuales son blanco de dicho antibiótico.

### **V. Objetivo General**

Evaluar el crecimiento y la actividad metabólica de *Chlorella vulgaris* cultivada en presencia de azitromicina.

### **VI. Objetivos particulares**

- Analizar el crecimiento de *Chlorella vulgaris* cultivada en presencia de azitromicina.
- Determinar la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* cultivada en presencia de diferentes concentraciones de azitromicina.

## **VII. Materiales y métodos**

### **1. Organismo**

Se utilizó el alga verde *Chlorella vulgaris* de la clase Chlorophyceae y del orden Chlorococcales donada por el laboratorio de Biotecnología de Microalgas, del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

### **2. Medio de cultivo**

El mantenimiento de los organismos (cultivos semilla), así como los tratamientos experimentales fueron cultivados en una combinación de los medios minerales Bourrely-Setlik libre de EDTA (Borowitzka y Borowitzka 1988; Kupper *et al.*, 2002).

Las células se mantuvieron en un régimen de cultivo en lote en las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (20-25°C), iluminación (200  $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo (14/10 luz/oscuridad), y flujo de aire 200  $\text{ml}\cdot\text{m}^{-1}$ . Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, botellas cuadradas de vidrio de 500 ml (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 7.5 cm y un volumen de trabajo de 250 ml. Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, aproximadamente células de 72 h de cultivo.

### **3. Protocolo experimental**

El efecto de la azitromicina en el metabolismo se estudió de acuerdo con los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacteria (OECD, 2004).

Las unidades experimentales se inocularon con  $4 \cdot 10^5$  células  $\cdot L^{-1}$ , aproximadamente 50 mg.  $L^{-1}$  de peso seco ó 0.1 de absorbancia a 750 nm.

En las condiciones de cultivo antes mencionadas las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de azitromicina: 0 (testigo), 1, 2, 3,4 y 5 mg.  $L^{-1}$ . Los cultivos se expusieron al antibiótico por 72 h de acuerdo con el protocolo de la OECD. para después determinar el peso seco (PS), el contenido de pigmentos fotosintéticos y la actividad fotosintética.

#### **4. Variables experimentales de respuesta**

##### **A) Crecimiento**

El crecimiento se determinó a través del peso seco. Se tomaron alícuotas de 50 ml de cada muestra experimental ( $n=3$ ) y se filtraron en vacío por membranas de nitrocelulosa de 5.0  $\mu m$  de diámetro de poro (Millipore ®). Previamente, las membranas se llevaron a peso constante manteniéndolas a 70 °C por 24 h. Una vez filtradas las muestras, se secaron en el horno a 70°C por 48 h, para después determinar el PS de la biomasa.

La tasa de crecimiento relativo ( $\mu$ ) se determinó según la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{(\ln x_2 - \ln x_1)}{3}$$

Donde X2 es el crecimiento medido como peso seco a los 3 días y X1 es al tiempo 0 inicial.

La tasa de duplicación celular ( $t_d$ ) se calculó según la siguiente fórmula:



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

El crecimiento se determinó por peso seco a través de la absorbancia (750 nm), ajustando los valores encontrados con una curva de peso seco (PS) vs absorbancia.

Se tomaron alícuotas de 3ml de cada muestra experimental (n=3).

#### B) Pigmentos fotosintéticos

El contenido específico de pigmentos fotosintéticos se cuantificó tomando 1 ml de cultivo de cada tratamiento (n=3). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y a la pastilla de cada tubo se resuspendió con 2 ml de metanol al 100%. La mezcla metanólica se incubó en baño maría por 10 minutos a 60°C. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada tubo se aforó a 5 ml con metanol al 100%, para después leer su absorbancia a 666, 653 y 470 nm de longitud de onda. La concentración de clorofila a, b y carotenoides totales se determinó según las siguientes formulas reportadas por Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}) = (15.65 \times \text{ABS}_{666}) - (7.34 \times \text{ABS}_{653})$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/ml}) = (27.05 \times \text{ABS}_{653}) - (11.21 \times \text{ABS}_{666})$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g/ml}) =$$

$$[(1000 \times \text{ABS}_{470}) - (2.86 \times \text{Clorofila a}) - (129.2 \times \text{Clorofila b})] / 221$$

#### C) Actividad fotosintética por oximetría.

Transcurrido el tiempo de exposición a la azitromicina, se tomaron por triplicado de cada lote experimental, lo equivalente en volumen a 50 µg/ml de clorofila total. Las

muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 1min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de 100 mM  $K_2HPO_4$  pH 7.0. La tasa fotosintética se midió como liberación de oxígeno.

Las mediciones se realizaron en un oxímetro (Oxygraph, Hansatech®, U.K.) a 30°C por medio de un baño de agua circulante. La tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis) se realizó iluminando la muestra con luz blanca actínica (400-700nm) y un flujo fotónico de  $400 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

D) Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila a en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK).

Se tomaron muestras de 2 ml de cada tratamiento (n=5) y fueron incubadas a la oscuridad por 20 min a temperatura ambiente (25°C), para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante ( $3000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte a 685nm y así determinar la emisión de fluorescencia a 750nm. Los valores de la fluorescencia mínima,  $F_0$  a los 50  $\mu\text{s}$ , la fluorescencia máxima, ( $F_m$ ) a los 1000 ms y la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, U.K.) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza.

Los parámetros medidos (tabla 2) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (van Heerden *et al.*, 2004).

E) El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico

Se realizó por medio de la técnica de pulsos saturantes utilizando un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). El valor de  $F_0$  a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ( $0.1 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y después de 60 s se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de  $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 0.8 s, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia FM en después de un periodo de 15 minutos de oscuridad. 30 segundos después del pulso saturante se irradiaron las muestras con una luz actínica blanca no saturante a  $200 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , por cinco minutos hasta alcanzar un estado estacionario y entonces se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de  $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por 0.8 s y obtener el valor de FM'.

Utilizando estos valores se calculó la eficiencia cuántica de operación para el fotosistema II ( $\phi\text{PSII}$ ) según la siguiente fórmula reportada por Maxwell y Johnson (2000):

$$\phi\text{PSII} = F_m' - F_s / F_m'$$

La eficiencia cuántica para la disipación no fotoquímica (qNP) se calculó utilizando la fórmula reportada por Sperdouli y Moustakas (2012).

$$q\text{NP} = 1 - [(F_m' - F_o') / (F_m - F_o)]$$

**Tabla 2** Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP (van Hereden et al., 2004)

Fluorescencia a 50 $\mu$ s	$F_o$	
Fluorescencia 300 $\mu$ s	$F_k$	
Fluorescencia 2 ms	$F_j$	
Fluorescencia 20 ms	$F_i$	
Fluorescencia máxima	$F_M$	
Fluorescencia variable	$F_v$	$= F_M - F_o$
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	$M_o$	$= (F_{300\mu s} - F_o) / (F_M - F_o)$
Fluorescencia variable a 2 ms	$V_j$	$= (F_{2ms} - F_o) / (F_M - F_o)$
<b>Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)</b>		
Absorción por RC	$ABS/RC$	$= (M_o / V_j) / (1 - F_o / F_M)$
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	$TR_o/RC$	$= M_o / V_j = (ABS/RC) \phi P_o$
Disipación a tiempo 0 por RC	$DI_o/RC$	$= (ABS/RC) - (TR_o/RC)$
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	$ET_o/RC$	$= (TR_o/RC) \psi_o$
<b>Productos (o relaciones de flujo)</b>		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	$\phi P_o$	$= TR_o / ABS = (F_M - F_o) / F_M =$
Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica	$\phi D_o$	$= DI_o / ABS = 1 - \phi P_o = F_o / F_M$
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de QA	$\psi_o$	$= ET_o / TR_o = 1 - V_j$
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	$\phi E_o$	$= \phi P_o \cdot \Psi_o = (TR_o / ABS) / (ET_o / TR_o) = ET_o / ABS = (1 - F_o / F_M)(1 - V_j)$
<b>Índices vitales</b>		
Índice de performance	$PI_{ABS}$	$= [RC/ABS][\phi P_o / (1 - \phi P_o)][\Psi_o / (1 - \Psi_o)]$

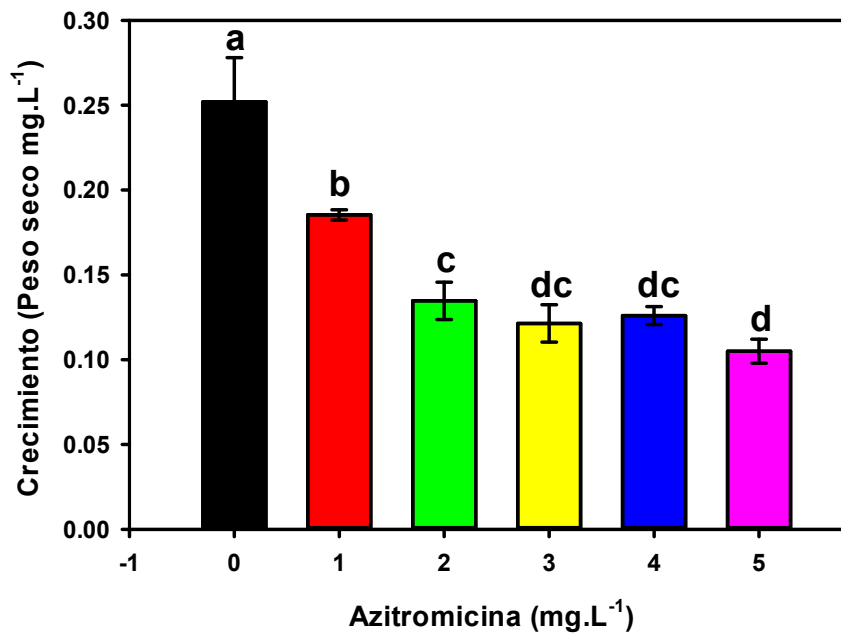
#### F) Análisis estadístico

Para evaluar si existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas del antibiótico en las muestras experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y para conocer entre que grupos existen dichas diferencias se realizó la prueba de mínima diferencia significativa (LSD por sus siglas en inglés) de Fisher con el programa Biostat 2009.

## VIII. Resultados y discusión

### A. Crecimiento

Los resultados de la presente investigación muestran los efectos de la azitromicina en el medio de cultivo de *Chlorella vulgaris*. La figura 4 muestra el efecto de la azitromicina en el crecimiento celular. A la máxima concentración probada (5 mg L<sup>-1</sup>), el crecimiento se reduce significativamente ( $p > 0.05$ ) 46.49% comparado con el control.



**Figura 4.** Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el crecimiento de *C. vulgaris*. Las letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

Resultados similares fueron reportados por Gómez en 2012 quien probó el efecto de estreptomycin en *C. vulgaris* con un 50.68% de inhibición; de la misma manera Seoane Méndez en 2018 obtuvo un crecimiento negativo de microalgas marinas en presencia de diversos antibióticos en su trabajo siendo similares a la azitromicina con función de inhibición en síntesis de proteínas, esto también se observa en el trabajo de Rodríguez en 2014 quien obtuvo inhibiciones en pruebas con antibióticos como oxitetraciclina, florfenicol y cloranfenicol de un 85,37%, 94.26% y 94.87% respectivamente.

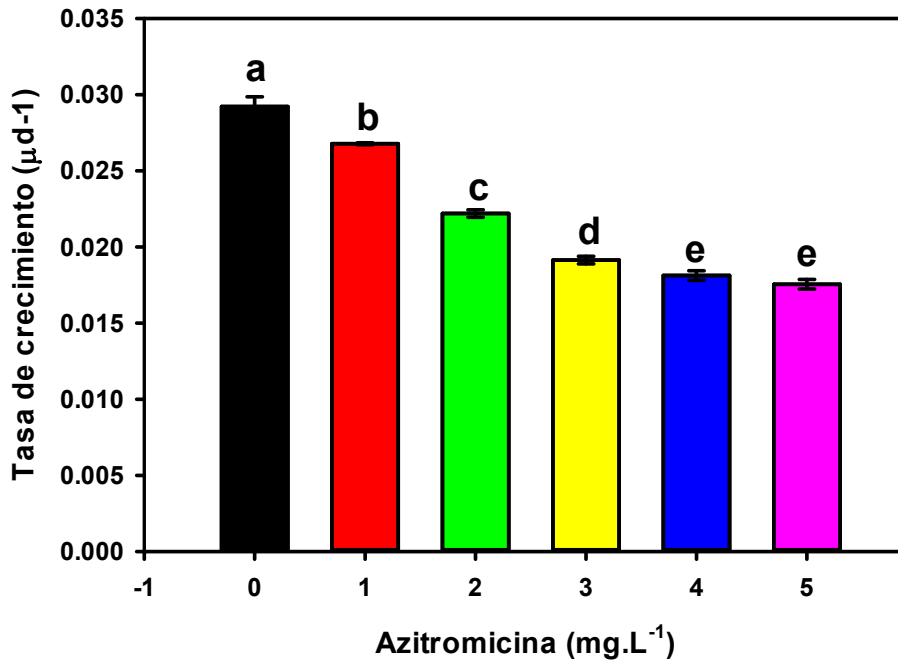
Estas inhibiciones se presentan ya que los fármacos utilizados son diseñados para facilitar el acceso a la membrana celular aumentando las probabilidades de afectar a organismos no-blancos, en este estudio, la toxicidad ejercida por los antibióticos se asocian al origen endosimbiótico de mitocondrias y cloroplastos, lo que los convierte en potenciales dianas de estos fármacos, alterando el estado fisiológico celular y disminuyendo la actividad metabólica y fotosintética, sin alterar la integridad de la membrana o viabilidad, como se refleja en los resultados obtenidos. Este hecho provocaría, por un lado, la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales, especialmente las relacionadas con el transporte electrónico, esenciales para el correcto metabolismo y proceso de respiración celular y, por otro lado, la inhibición de la síntesis de proteínas en el cloroplasto. Debido a las similitudes existentes entre el ARN ribosomal de bacterias y cloroplastos, los ribosomas de los cloroplastos son sensibles a muchos antibióticos. Dado que las proteínas del aparato fotosintético son sintetizadas en los cloroplastos, daños en sus ribosomas podrían afectar la síntesis de clorofila y el rendimiento fotosintético,

como se refleja en el descenso en el contenido celular de este pigmento y el aumento de fluorescencia observado (Seoane, 2014).

En base a los resultados, se encontró que el crecimiento y metabolismo de *Chlorella vulgaris* se ve afectado significativamente por la presencia de azitromicina en el medio en las concentraciones utilizadas en el presente estudio. Se ha reportado que diferentes especies presentan una alta sensibilidad ante la eritromicina y claritromicina; Isidori y colaboradores (2005) posicionan a estos dos antibióticos entre los antibióticos que causan más daños al ambiente basándose en las CE 50 (concentración efectiva máxima media) en este trabajo al calcular la CE 50 se obtuvo un resultado de 2.2636 mg/L a 72 hrs de exposición a azitromicina.

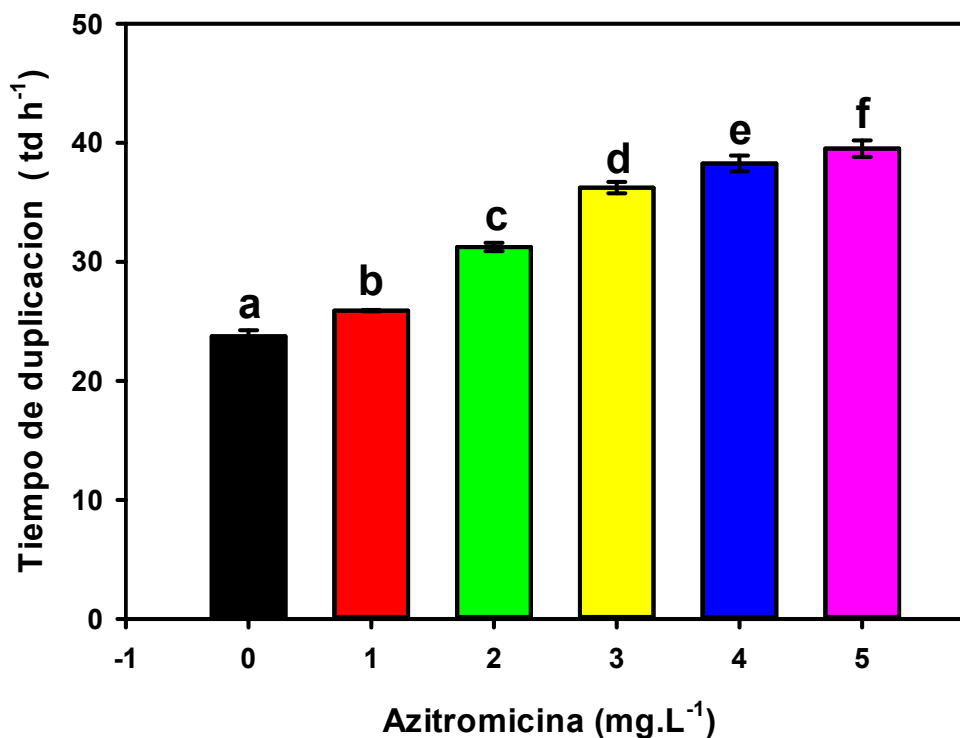
La tasa de crecimiento (Figura 5) muestra una reducción de la velocidad conforme aumenta la concentración del antibiótico en el medio de cultivo.





**Figura 5.** Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de crecimiento de *C. vulgaris*. Las letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

No se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones más elevadas probadas (4 y 5 mg. L<sup>-1</sup>), sin embargo, estas, son 39.6% menores que la muestra control. A partir del crecimiento relativo, se obtuvo el tiempo de duplicación (Figura 6) en el cual se observa que existen diferencias significativas entre el control y el resto de los tratamientos, aumentando hasta un 60% en la concentración más alta del antibiótico (5 mg. L<sup>-1</sup>).



**Figura 6** Efecto de diferentes concentraciones de Azitromicina en tiempo de duplicación de *C. vulgaris*. Las letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

Estos comportamientos observados de tiempo de duplicación en la Figura 6 fueron similares al trabajo de Gómez en 2012 donde su tiempo de duplicación de 23.6 a 35.5 horas en células expuestas a estreptomicina, comparable a este trabajo con tiempos de 23.73 a 39.5, es decir un retraso de 15.7 horas.

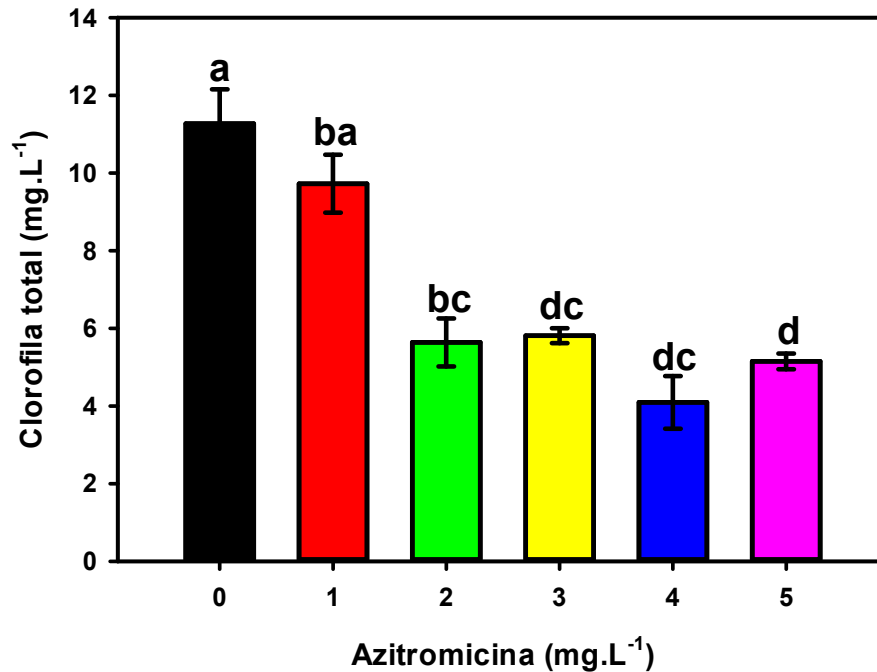
Resultados con acumulación volumétrica de biomasa (Figura 4), tasa de crecimiento (Figura 5) y tiempo de duplicación (Figura 6) fueron similares en trabajos como los de Gómez en 2012, Seoane en 2018 y Rodríguez en 2014, sin embargo, Christi en 2007 y Rodolfi *et al.*, en 2009 determinan que una disminución en la población y un

aumento en el tiempo de duplicación puede ser relacionada al estrés metabólico al que se somete la microalga y por tanto a la dificultad que se presenta para poder tomar los nutrientes del medio de cultivo.

### **B. Contenido de clorofila a, b y carotenoides totales**

La figura 7 muestra que el contenido volumétrico de clorofila total disminuyó significativamente conforme aumentó la concentración de azitromicina en el medio, siendo esta reducción del 36.31% a comparación del control. El análisis de resultados (Figura 8) muestra que el contenido específico de clorofila total por biomasa no se modifica conforme aumenta el antibiótico en el medio de cultivo.

El efecto de azitromicina sobre el contenido de clorofila fue similar al trabajo de Blériot en 2017, donde encontró que la oxitetraciclina causa una disminución en el contenido de clorofila en la microalga *Haematococcus pluvialis* apoyando diversas hipótesis de estrés ante un efecto tóxico, en este caso el antibiótico.

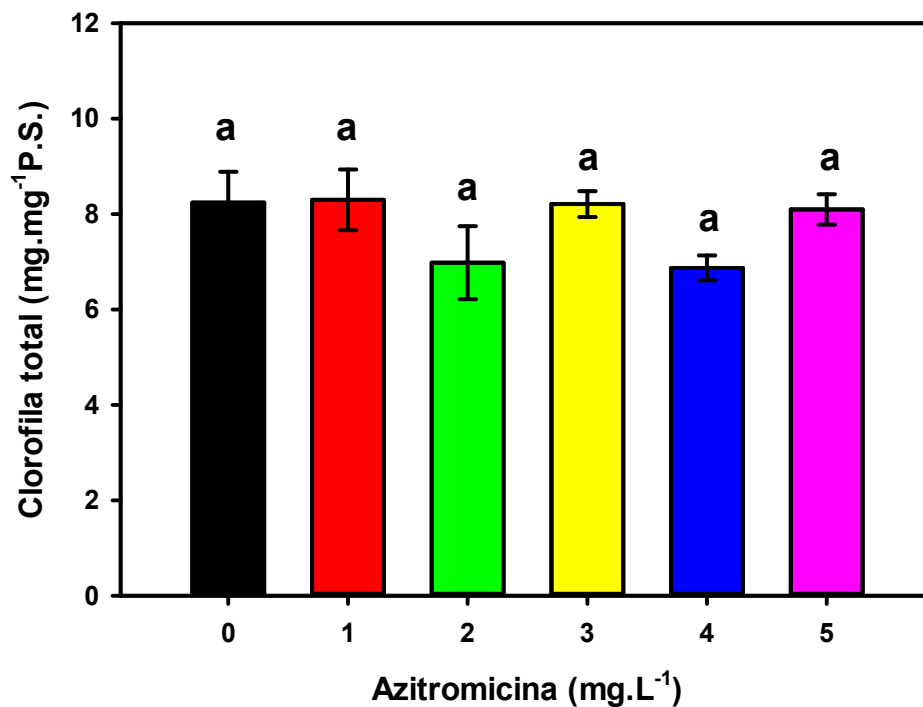


**Figura 7.** Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el contenido volumétrico de clorofila total en *C. vulgaris*. Las letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

Asimismo, Rodríguez en 2014 obtuvo una disminución de contenido de clorofila a y b en pruebas de antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas sobre *Tetraselmis suecica* la causa más probable de esta reducción en el contenido de pigmentos es que estos antibióticos afectan a la síntesis proteica a nivel de las subunidades mayores o menores del ribosoma plastidial, afectando así de forma negativa a la cantidad de pigmentos que contienen las células expuestas a ellos.

El crecimiento de las algas depende del correcto balance entre la energía electromagnética absorbida y su conversión en energía química para fijación de dióxido de carbono. Los organismos fotosintéticos como las algas absorben la

energía electromagnética y la convierten en energía química a través de los pigmentos fotosintéticos. El contenido correcto y la localización precisa son fundamentales para garantizar el proceso de reacciones fotoquímicas (Jiménez 2015)



**Figura 8.** Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el contenido de clorofila total por peso seco de *C. vulgaris*. Las letras muestran que no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

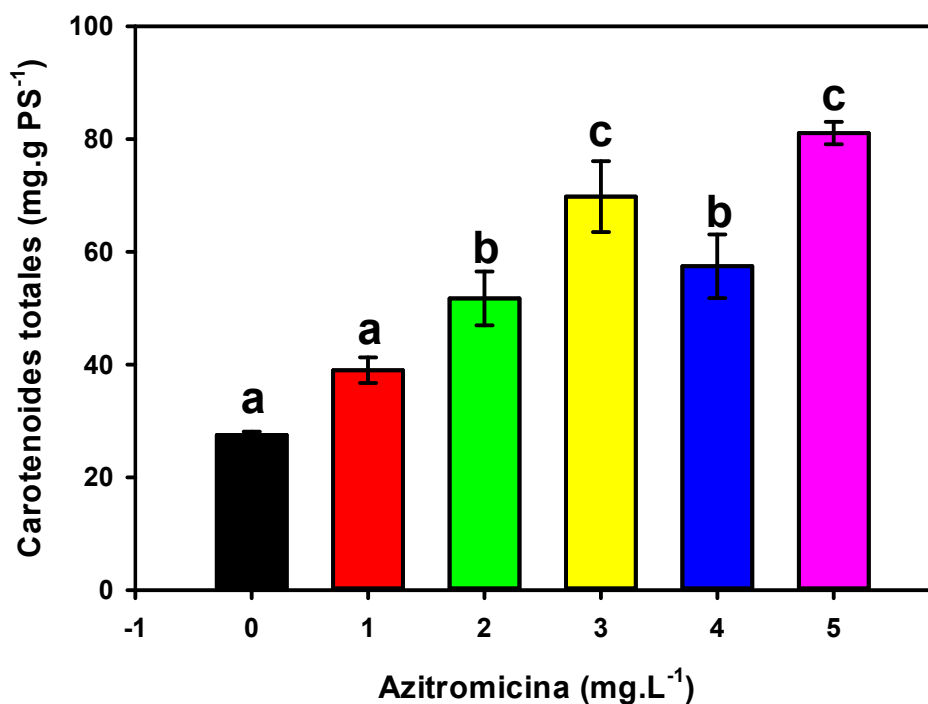
Un gran número de las enzimas necesarias para la síntesis de clorofila, son codificadas por genes nucleares, así que la azitromicina, no debería tener efectos inhibitorios directos en el proceso de síntesis de estas enzimas codificadas en el cloroplasto. Sin embargo, muchos complejos proteínicos importantes para el ensamble de las clorofilas en los complejos antena y centros de reacción son

codificados por el cloroplasto y los genes nucleares, y la expresión correspondiente entre dos genomas es indispensable para la biosíntesis y ensamble de la clorofila. Entonces, los antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas cloroplástica; podrían interferir con la biosíntesis de clorofila, a través de la inhibición de genes del cloroplasto y luego afectar de manera indirecta la expresión de genes nucleares (Liu et al., 2011).

El contenido de carotenoides totales aumenta significativamente un 310% en el tratamiento con mayor concentración (5 mg. L<sup>-1</sup>) con respecto al control y un 141% con el primer tratamiento (1 mg. L<sup>-1</sup>) como se puede observar en la figura 9. Estos resultados muestran un aumento considerable de carotenoides de la misma manera que en el trabajo de Lemus en 2005, donde prueba la obtención de carotenoides de *Scenedesmus incrassatulus* en un fotobioreactor con diversos tipos de estrés (lumínico, nutricional y lumínico-nutricional) en estas pruebas el fotobioreactor con estrés nutricional recibió un aumento del 6.96%, el fotobioreactor que recibió ambos tipos de estrés tuvo un aumento del contenido de carotenoides de un 28% mientras que el fotobioreactor con solo estrés lumínico obtuvo una disminución del 20.3%.

Ese aumento de carotenoides en presencia de estrés en el crecimiento de microalgas también se observó en el trabajo de Romero *et al.* en 2001, ellos probaron el crecimiento de *Chaetoceros sp.* y *Tetraselmis sp.* a diversas concentraciones de cadmio a diversas concentraciones, donde la baja de clorofila también presenta una concentración mayor de carotenoides Ello evidencia que los carotenos pueden estar actuando como protectores de la fotooxidación de la clorofila,

ante un estrés tóxico, tal como ocurre con *Dunaliella salina* cuando es sometida a estrés ambiental (Marín *et al.*, 1998).



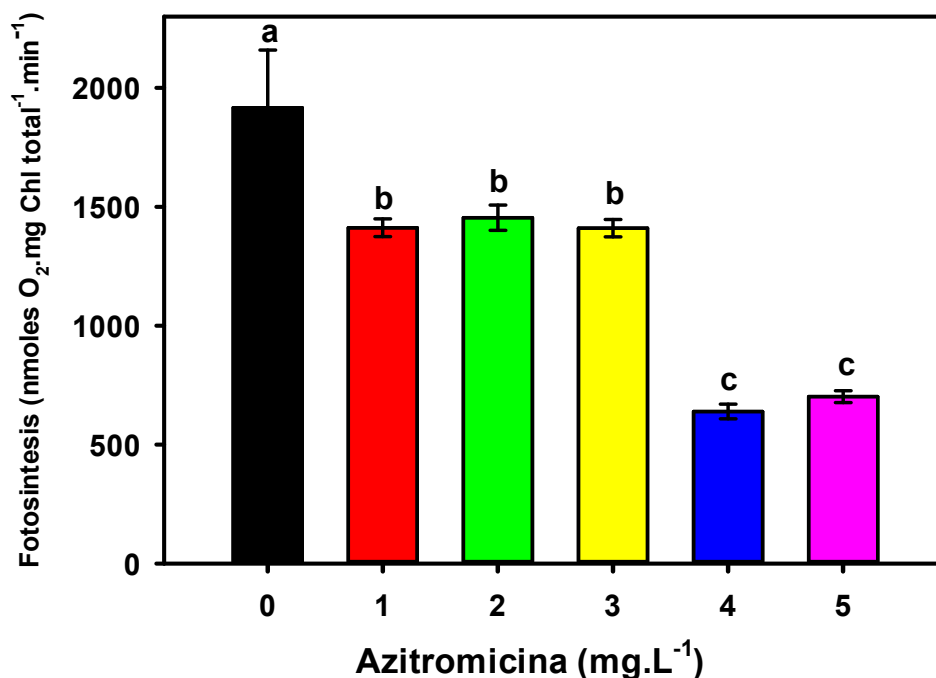
**Figura 9.** Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el contenido de carotenoides totales por peso seco de *C. vulgaris*. Las letras muestran las diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD. (n=3)

En 2014, Morales encontró un bajo descenso de carotenoides en pruebas de *Chlorella vulgaris* expuestas a claritromicina infiere que la poca disminución sobre la cantidad de los carotenos podría tener una función protectora, puesto que estos compuestos (carotenos y xantofilas) presentan en los organismos fotosintéticos una función doble, como pigmentos accesorios en la captación de energía fotónica y como moléculas capaces de disipar energía de excitación excedente en forma de calor, evitando daños importantes a los fotosistemas.

La evidencia anterior puede explicar el efecto de la azitromicina que utilizó sobre el contenido clorofila total (a+b) y carotenoides totales, ya que en las concentraciones más elevadas del antibiótico es posible que se generaran elevadas concentraciones de radicales libres de oxígeno, lo que pudo haber provocado un apagado masivo y desacoplamiento de estructuras proteínicas asociadas a los pigmentos fotosintéticos e indispensables para el correcto funcionamiento de los fotosistemas.

### C. Actividad fotosintética: Liberación de oxígeno, transporte electrónico y disipación térmica de energía de excitación

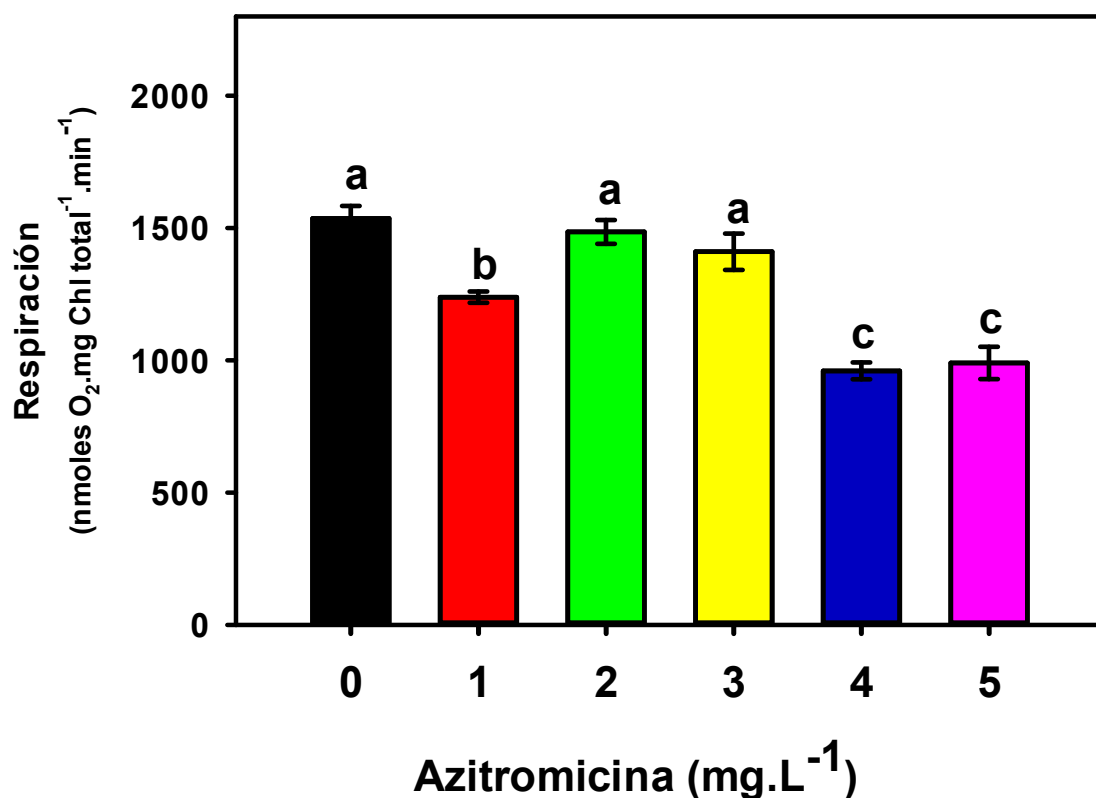
La actividad fotosintética (Figura 10) indica que la azitromicina produce un efecto inhibitorio sobre la liberación de oxígeno.



**Figura 10.** Liberación de oxígeno (fotosíntesis) de *C. vulgaris*. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas según la prueba de LSD. (n=3)



Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en al menos un par de tratamientos (4 y 5 mg. L<sup>-1</sup>) se obtuvo una disminución de 62.49% en comparación del control. Por otro lado, el consumo de oxígeno (respiración) disminuyó con respecto al control hasta en un 33.35% como se puede observar en la figura 11, la actividad respiratoria se ve afectada al aumentar la concentración del antibiótico en el medio de cultivo.



**Figura 11.** Consumo de oxígeno (respiración) de *C. vulgaris*. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas según la prueba de LSD. (n=3)

Jiménez en 2015 reportó una inhibición de un 67% (fotosíntesis) y un 67% (respiración) con estreptomicina en *C. vulgaris*, en este trabajo infieren que el

antibiótico puede inhibir la síntesis de proteínas sobre la membrana en los tilacoides de algas como el centro de reacción PSII y el complejo  $\text{cyt}_{b_6-f}$  y finalmente, da lugar a la disminución del contenido de proteínas de la membrana ya que encontraron investigaciones anteriores donde muchas proteínas importantes en el cloroplasto, tales como el centro de reacción del PS II (7 tipos de proteínas, incluyendo proteínas D1 y D2), el complejo  $\text{cyt}_{b_6-f}$ , son codificadas por genes del cloroplasto.

La liberación de oxígeno, así como el ensamblaje de las proteínas de los complejos antena del PSII (LCHII) depende de la síntesis de estas proteínas (D1 y D2); se puede deducir que muchas de las proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto están siendo inhibidas, lo cual pudiera estar afectando la estructura y función del fotosistema II y el complejo liberador de oxígeno dando como resultado una inhibición de la liberación fotosintética de oxígeno.

Morales en 2014 sus resultados de inhibición de claritromicina en consumo y liberación de oxígeno, sugiere que provocan un desacoplamiento de la membrana tilacoidal y de la membrana interna de la mitocondria, por lo que el gradiente transtilacoidal no tiene una regulación, como resultado el transporte de electrones aumenta, incrementándose la tasa de liberación y consumo de oxígeno), este efecto puede explicar el aumento en las tasas de transporte electrónico fotosintético y mitocondrial en las concentraciones más elevadas del antibiótico

La producción fotosintética de oxígeno es un proceso que está directamente relacionado con la absorción de energía lumínica y el transporte electrónico en la membrana tilacoidal. Estos procesos pueden ser monitoreados a través de la

emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II. La velocidad de transporte electrónico medido por la emisión de fluorescencia representa el producto fotoquímico operacional del PSII (Gómez 2012).

El transporte electrónico medido por fluorescencia (ETR por sus siglas en inglés), se relaciona con la eficiencia del PSII cuando el flujo de electrones entre PSII y PSI está en equilibrio con la fijación de CO<sub>2</sub>, de esta manera cualquier evento que modifique el transporte o equilibrio de electrones en toda la cadena transportadora de electrones [H<sub>2</sub>O → PSII → PSI → NADP<sup>+</sup>], modificará este parámetro de manera directa (Gómez 2012).

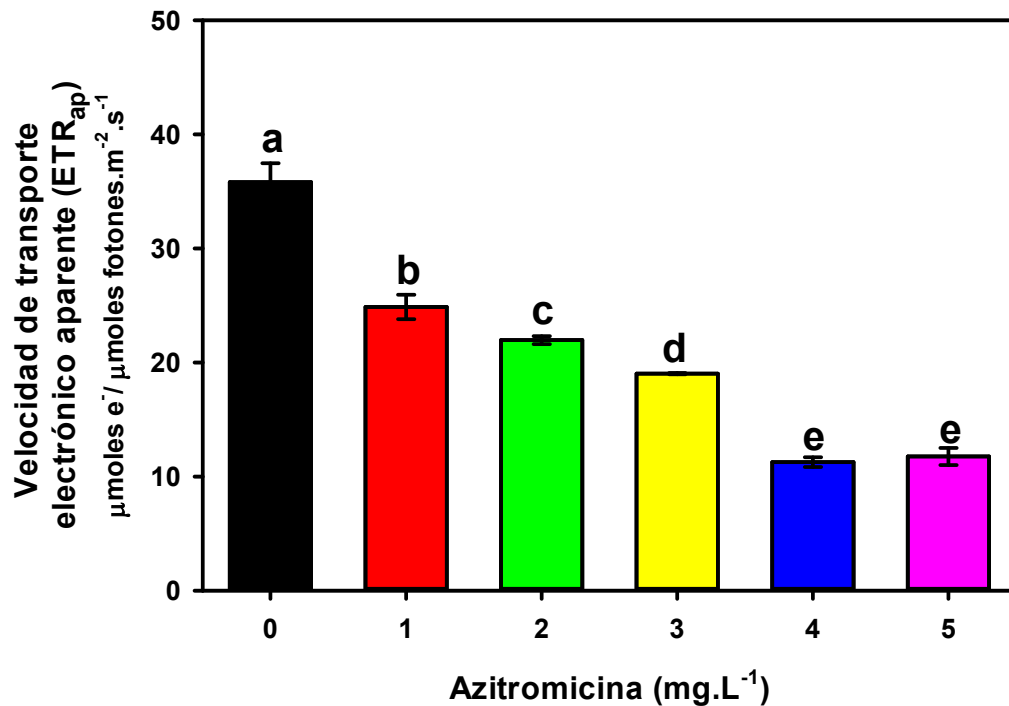
La eficiencia cuántica operacional ( $\phi$ PSII), proporciona una imagen más exacta del funcionamiento del transporte electrónico, ya que esta refleja la capacidad fotosintética del sistema para mantener abiertos los centros de reacción en la luz.

Puede observarse en la figura 12 que a medida que aumentó la concentración del antibiótico, ETRap disminuyó de forma significativa ( $p < 0.05$ ), hasta un 70.87% en la concentración mayor de azitromicina (5 mg. L<sup>-1</sup>) con respecto al control.

La disminución de  $\phi$ PSII nos indica que el incremento en la concentración del antibiótico en el medio de cultivo produce un incremento en el cierre de los centros de reacción, y por lo tanto una disminución en el transporte electrónico fotosintético, lo cual afecta directamente la asimilación de CO<sub>2</sub>.

De la misma manera Gómez en 2012 obtuvo resultados similares al exponer *C. vulgaris* a estreptomina con una inhibición del 82.87% a una concentración de (2.4 mg. L<sup>-1</sup>) Así mismo Seoane en 2014 con pruebas de diferentes antibióticos

inhibidores de síntesis de proteínas obtuvo resultados inhibitorios en la fluorescencia: 45% con cloranfenicol, 22% con florfenicol y 35% con oxitetraciclina.



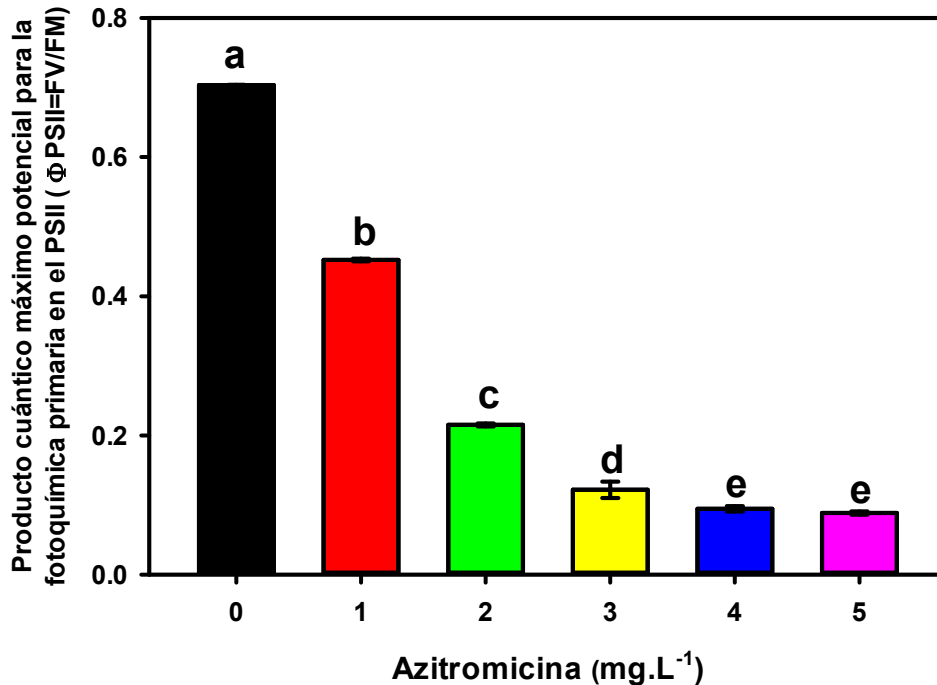
**Figura 12.** Efecto de la azitromicina sobre la Velocidad de transporte electrónico aparente (ETR<sub>ap</sub>). Las letras sobre cada barra indican las diferencias significativas según la prueba LSD. n=15

Se ha demostrado que la reducción de  $\phi$ PSII se debe al aumento de los procesos de decaimiento (relajación) de tipo no fotoquímico (NPQ por sus siglas en inglés), en particular, el ciclo de las xantofilas. Esta regulación es un mecanismo para disipar el exceso de energía de excitación y regular el transporte electrónico, así como la producción de ATP y NADPH, lo cual estaría relacionado con la reducción de la asimilación de CO<sub>2</sub> (Lu *et al.*, 2003).

La relación directa entre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ( $\phi_{Po}$ ) y la fijación neta de  $CO_2$  (Mohapatra *et al.*, 2010), de la misma forma, se ha observado que bajo condiciones de laboratorio hay una relación lineal entre la eficiencia cuántica operacional ( $\phi_{PSII}$ ) y la eficiencia en la fijación de carbono, aunque puede haber variaciones debido a cambios en la fotorespiración o el flujo pseudocíclico (Maxwell y Johnson 2000). Por lo que se infiere que está existiendo una reducción en la fijación de  $CO_2$ , como se ha mencionado.

La figura 13 muestra el efecto de la exposición a azitromicina en el producto cuántico máximo para la fotoquímica primaria en el Fotosistema II cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados o "abiertos" ( $F_v/F_m$ ). Como se puede observar, conforme se aumentó la concentración del antibiótico la capacidad fotoquímica disminuyó significativamente a la máxima concentración probada (5 mg.  $L^{-1}$ ) la capacidad de absorber la energía de excitación y reducir al primer aceptor estable de la cadena (QA) se reduce en un 87.42% con respecto al control.

En 2012 Gómez obtuvo inhibiciones de 73.6% con estreptomycinina a una concentración de 2.4 mg.  $L^{-1}$ , este efecto se debe a la competencia de un incremento de la disipación térmica en la antena con la transferencia de energía de excitación de las antenas a los centros de reacción. La reducción en este parámetro, así como un incremento en NPQ puede ser visto como una respuesta para regular el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ( $\phi_{Po}$ ), el cual también se vio disminuido.

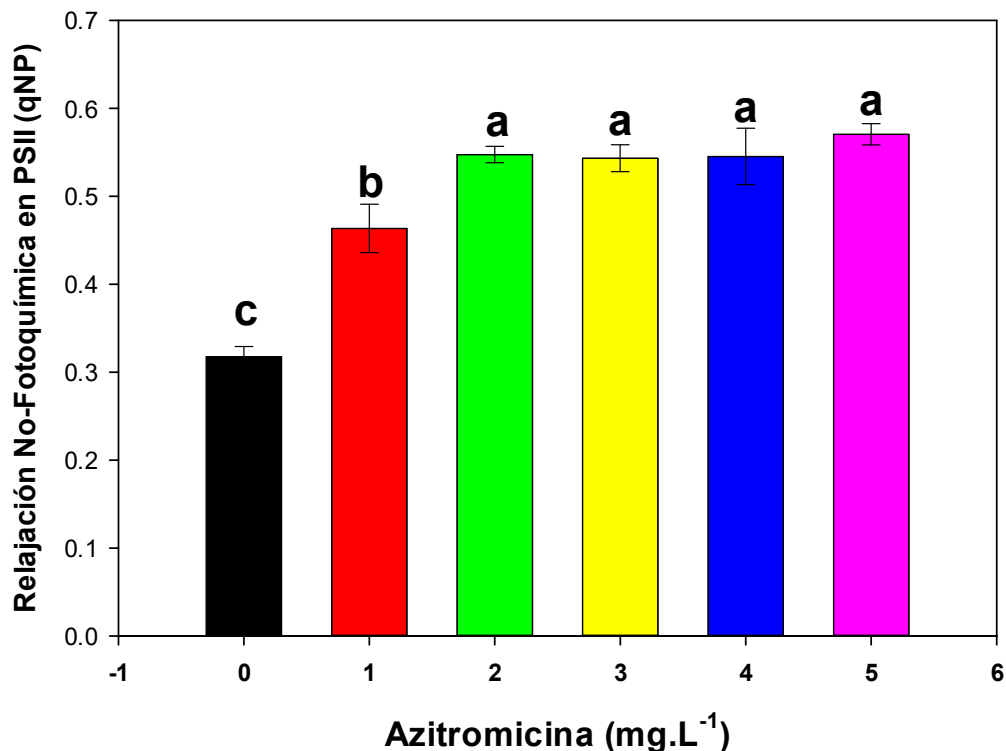


**Figura 13.** Producto cuántico máximo para la fotoquímica primaria del PSII. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas según la prueba de LSD. n=15

La liberación de la energía de excitación fotosintética por cualquier vía que no involucre la del proceso fotoquímico se le denomina “Apagado” o “disipación” No-fotoquímica (NPQ por sus siglas en inglés). El proceso de disipación regula y protege el proceso fotosintético en ambientes o condiciones en las cuales la energía absorbida excede la capacidad de su utilización para llevar a cabo trabajo fotoquímico.

La figura 14 muestra que la presencia de azitromicina en el medio de cultivo provoca un aumento en la disipación de la energía de excitación a través de procesos no fotoquímicos hasta de un 74.59% en la concentración de 5  $mg.L^{-1}$ , sin embargo, a

la concentración más baja del antibiótico ( $1 \text{ mg. L}^{-1}$ ) aumenta un 45.9% en esta grafica se encontraron diferencias significativas al menos en un par de medias ( $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Efecto de la azitromicina sobre la relajación no fotoquímica (qNP) de *Chlorella vulgaris* expuesta a 72 hrs. Las letras sobre cada barra indican las diferencias significativas según la prueba LSD.  $n=15$

En 2012 Gómez, obtuvo un aumento de la disipación de energía de un 30% en *Chlorella vulgaris* en presencia de estreptomina con un descenso de hasta un 12% en sus más altas concentraciones. Sin embargo, Morales en 2014 la claritromicina provocó un descenso sobre la disipación de energía de excitación a través de

procesos no fotoquímicos en un 29.95% en la concentración 0.6 mg. L<sup>-1</sup> con respecto a su control, pero esta tiende a subir su valor conforme aumenta la concentración del antibiótico.

No se han encontrado reportes del efecto de los macrólidos en el proceso de disipación térmica, sin embargo; es probable que la inhibición de la síntesis de proteínas cloroplásticas provocará cambios conformacionales en las proteínas relacionadas con el proceso de relajación no-fotoquímica (NPQ), lo cual indujo a una reducción de NPQ en las células tratadas con claritromicina en el trabajo de Morales. Estudios anteriores han demostrado que la disipación vía NPQ es causado por que la energía de excitación que es transferida a la zeaxantina y esta se convierte en calor; sin embargo, se ha comprobado que la eritromicina tiene un efecto inhibitorio en la concentración de carotenoides totales a diferencia de la azitromicina la cual no presento ese efecto negativo sobre los carotenoides en este estudio, por ende, solo la eritromicina puede tener un impacto medianamente regulado sobre el ciclo de las xantofilas (Morales, 2014).

#### **D. Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila a en el fotosistema II**

El primer paso de la fotosíntesis es la absorción de fotones por moléculas del complejo antena en algunos femtosegundos ( $f_s = 1e^{-15}s$ ), lo que conduce a la formación de clorofilas excitadas (Chl<sup>\*</sup>). La función principal de la antena (el complejo captador de luz) es transferir energía de excitación a los centros de reacción fotosintéticos (Stirbert y Govindjee, 2011). La separación de la carga



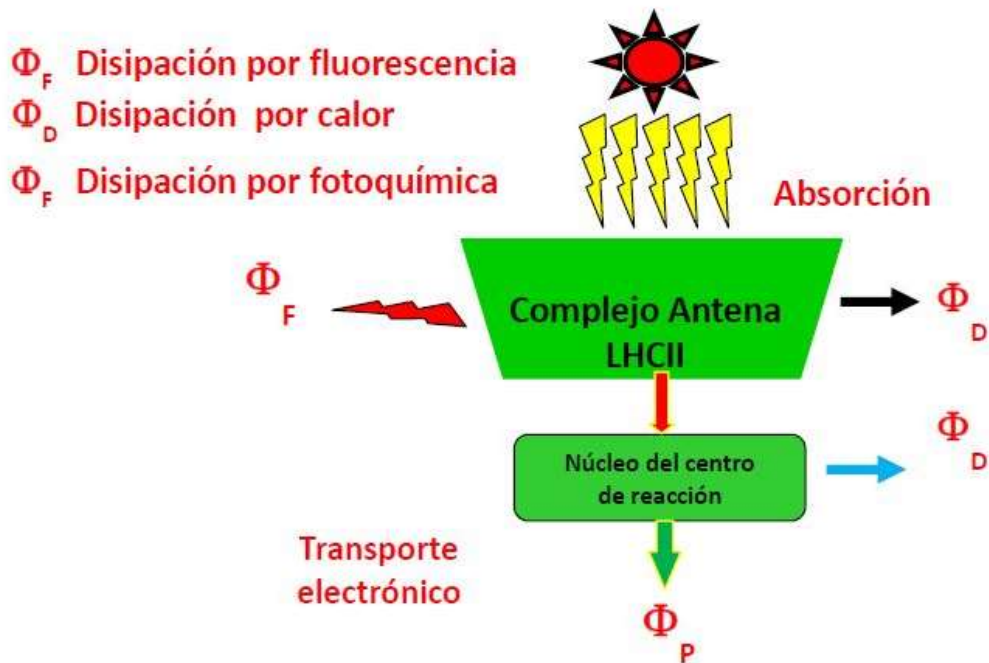
primaria ocurre en ambos fotosistemas tanto en el PSI como en el PSII, con la participación del núcleo de reacción de P700 y P680, respectivamente.

Las cargas positivas producidas por el PSII oxidan el agua a través de  $Y_z$  (tirosina-161 en la proteína D1), liberando  $O_2$  molecular en el complejo liberador de oxígeno (OEC). La carga negativa (el electrón) se encuentra primero en la molécula feofitina (Feo) y se pasa luego a la quinona primaria ( $Q_A$ ), y luego a la quinona secundaria ( $Q_B$ ), la cual es un aceptor de dos electrones; la  $Q_B$  reducida después se protona para convertirse en plastoquinol ( $PQH_2$ ).

El análisis de la cinética de fluorescencia ofrece información sobre la cinética de transferencia de energía de excitación en los complejos antena y la fase de óxido-reducción en los PSI y PSII. La fotosíntesis oxigénica implica dos reacciones de luz que operan simultáneamente en centros de reacción PSII y PSI. La energía absorbida por los dos fotosistemas se convierte en flujos de electroquímica (energía libre de Gibbs) esta se utiliza para oxidar el agua en oxígeno, reducir el  $NADP^+$ , y producir ATP. La mayor parte de la fluorescencia de la clorofila *a* se origina en los complejos antena del PSII.

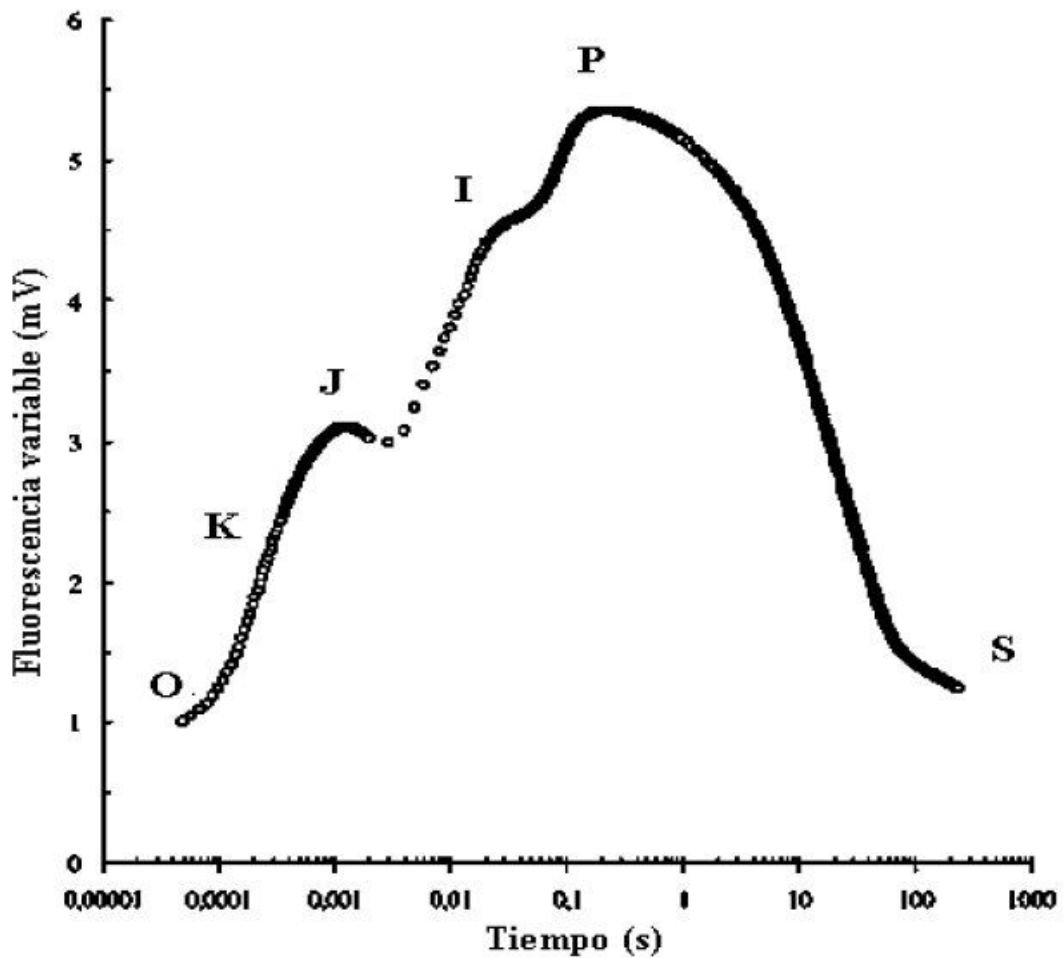
La energía fotónica absorbida por las moléculas de la clorofila puede liberarse en una de tres rutas (Fig. 15): (1) esta puede ser utilizada para llevar a cabo el trabajo fotosintético (fotoquímica), (2) puede ser disipado como calor o (3) este puede ser reemitido como energía luminosa de menor energía (fluorescencia de la clorofila). Estos tres procesos ocurren en competitividad, por lo que un incremento en la

eficiencia de uno se reflejara en la disminución de los otros dos. (Maxwell y Johnson, 2000).



**Figura 15.** Modelo de absorción y disipación de energía fotónica a través del complejo cosechador de luz (LHCII) y el centro de reacción (RC).

Cuando se mide la emisión de fluorescencia de la clorofila del fotosistema II en organismos fotosintéticos adaptados unos minutos a la oscuridad, se obtiene una curva de inducción de fluorescencia denominada curva de Kautsky en la que se observan diferentes fases denominadas O-K-J-I-P (Fig. 16).



**Figura 16.** Modelo de cinética de fluorescencia variable (curva de Kautsky) graficado en tiempo logarítmico (O-K-J-I-P).

En donde O, (1) es el valor mínimo de la fluorescencia ( $F_0$ ). Aparece alrededor de los 20-50  $\mu$ s, en ese momento todos los centros de reacción están oxidados. En esta fase de la fluorescencia, todos los centros de reacción están “abiertos”, lo que quiere decir que la primera quinona aceptora de electrones del PSII (QA) esta oxidada y el centro de reacción en PSII no ha perdido su electrón.

La fase K, (2) emerge aproximadamente a los 300  $\mu$ s después de la inducción, está relacionada con el complejo liberador de oxígeno (CLO) y solo puede ser observada cuando el transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$  está parcialmente bloqueado o cuando la actividad de lado donador del fotosistema II esta disminuida (Strasser, 1997).

La fase J, (3) se desarrolla alrededor de los 2 ms ( $F_J = F_{2ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de  $Q_A$ ; y se incrementa cuando existe un bloqueo del transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ .

La fase I, (4) se desarrolla a los 20 ms ( $F_I = F_{20ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de  $Q_A$  y  $Q_B$ .

La última fase de la cinética polifásica es la fase P, (5) y es cuando se alcanza el valor máximo de la fluorescencia ( $F_M$ ). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental, aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza en alrededor de 300 a 500 ms. En este momento todos los centros de reacción han perdido su electrón y todas las moléculas de  $Q_A$  se encuentran reducidos, estos centros se denominan centros de reacción "cerrados" (Gonzalez *et al.*, 2008).

La cinética entre I y P está relacionada con la reducción total de la plastocianina, así como la reducción de los aceptores finales del lado donador del PSI (Fd y NADH), por lo cual la pendiente entre estas fases implica la velocidad en como ocurren estos procesos (Gonzales *et al.*, 2008).

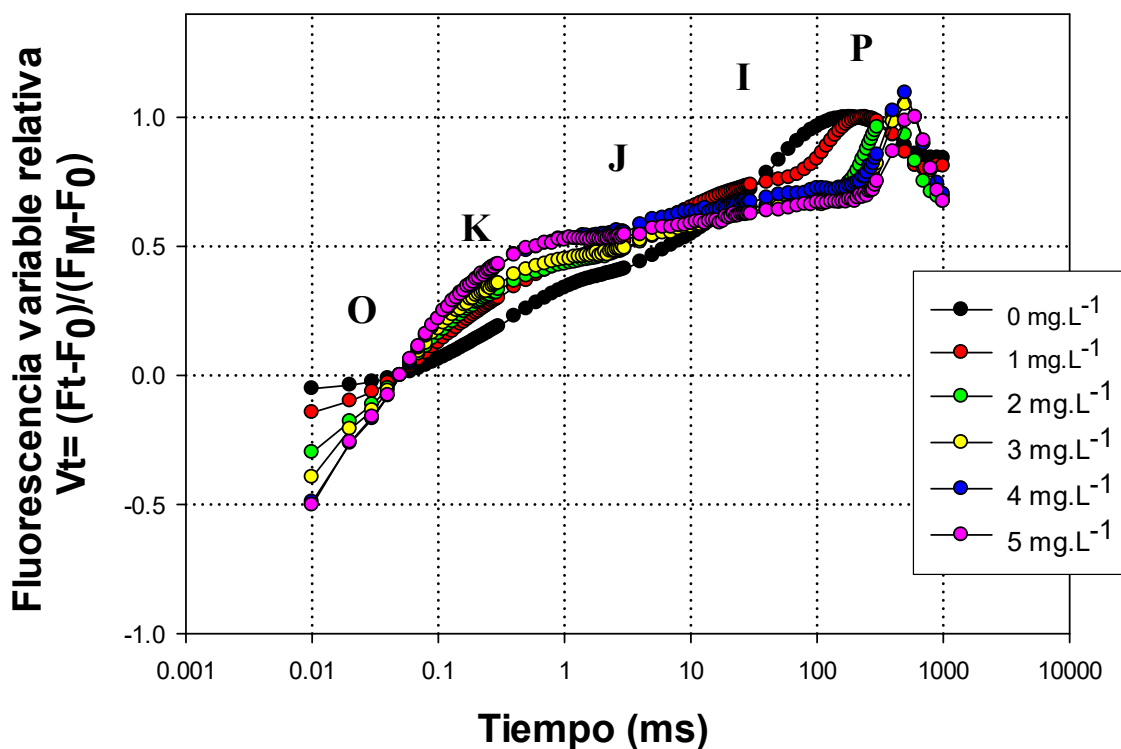
La prueba O-K-J-I-P considera cada una de las inflexiones de la curva, los valores extremos ( $F_0$  y  $F_M$ ), así como la pendiente inicial de la emisión de la fluorescencia

de la clorofila a en el PSII ( $M_0$ ). Utilizando estos valores se pueden calcular los parámetros descritos en la tabla 1 (van Heerden *et al.*, 2003).

Cuando el PSII absorbe energía fotónica y  $Q_A$  ha aceptado un electrón, no es capaz de aceptar otro hasta que el primero ha pasado al siguiente acarreador de electrones, la quinona B ( $Q_B$ ). Durante este periodo, el centro de reacción está (cerrado) porque está totalmente reducido. En cualquier punto en el tiempo, la presencia de una proporción de centros de reacción reducidos (cerrados), conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica, con un correspondiente incremento en la fluorescencia (Maxwell y Johnson, 2000). Por lo tanto, la determinación del rendimiento de fluorescencia de la clorofila dará información sobre los cambios en la eficiencia de la actividad fotoquímica, la disipación de calor del PSII y del "llenado" de la poza de plastoquinona (PQ) (Gonzales *et al.*, 2008).

Con el propósito de visualizar el efecto de la azitromicina en las diferentes etapas del transporte electrónico los valores de fluorescencia fueron graficados como los cambios de fluorescencia variable en el tiempo  $V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ , este grafico permite visualizar el efecto del antibiótico en la reducción de toda la cadena de electrones desde  $F_0$  hasta  $F_m$ , lo cual está relacionado con el aumento de la fluorescencia en el tiempo ( $V_t$ ) (Fig. 17). En la figura se puede observar un aumento de la velocidad del cierre de los centros de reacción en el incremento de la pendiente inicial ( $M_0$ ), ( $F_0 \rightarrow F_K$ ), lo que nos indica un efecto sobre los complejos liberadores de oxígeno. Por otro, se puede ver una reducción de la fluorescencia entre las fases

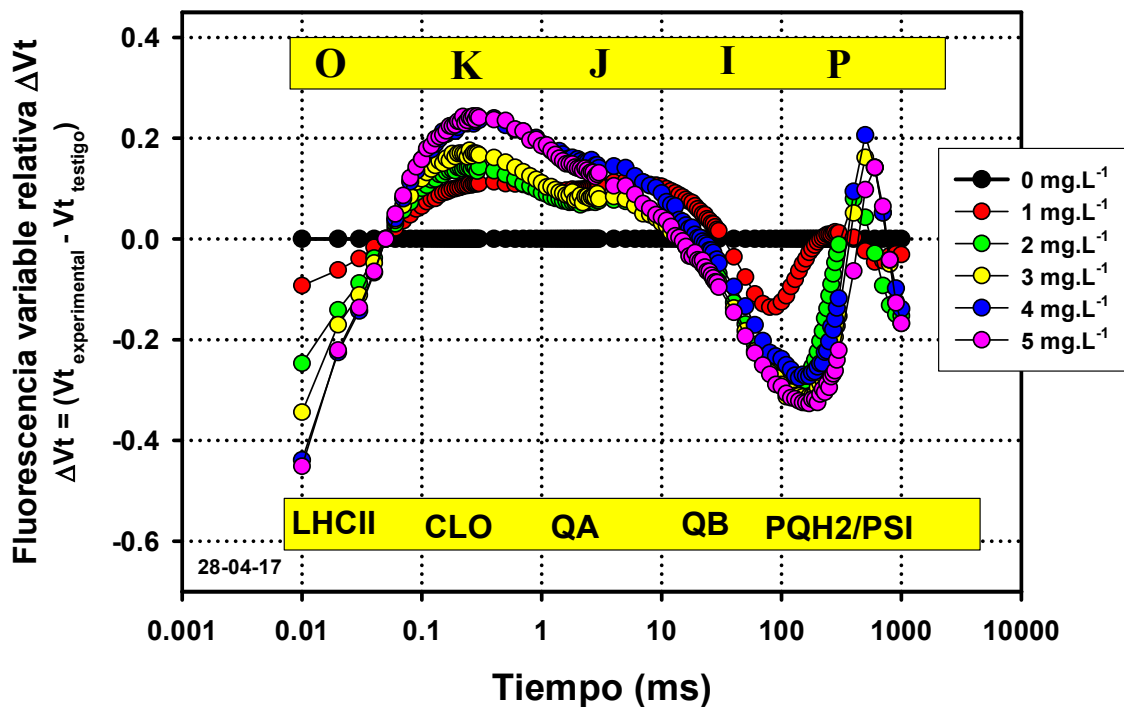
I a P, con respecto al control, lo que indica una posible estimulación del flujo electrónico entre el lado donador hacia el aceptor del fotosistema I



**Figura 17.** Fluorescencia variable relativa de *C. vulgaris* expuesta a distintas concentraciones de azitromicina durante 72 horas (esta expresión permite observar la reducción de  $Q_A$ ).

Utilizando los valores de fluorescencia variable en el tiempo, se construyó los cambios de la fluorescencia variable relativa con respecto al control ( $\Delta V_t$ ), esto con el propósito de visualizar el efecto de la azitromicina en las diferentes etapas del transporte electrónico (Fig. 18).

Se puede observar en la figura 18 que a medida que aumenta la concentración de azitromicina en el medio de cultivo, se incrementa la inflexión en la fase K, lo cual indica una inhibición en el complejo liberador de oxígeno. Se puede también observar un incremento de la inflexión entre las fases J e I, lo que indica una inhibición del transporte electrónico entre los aceptores  $Q_A$  y  $Q_B$ . Por otro lado, se observa una disminución de entre la fase I a P, lo cual es indicativo de una estimulación en la reducción de la plastoquinona o el acarreo electrónico en el lado aceptor del fotosistema I.



**Figura 18.** Efecto de las concentraciones de la azitromicina sobre la fluorescencia variable relativa ( $\Delta Vt$ ) en *C. vulgaris*.  $n=5$

Resultados similares fueron reportados por Gómez en 2012 y Morales en 2014 quienes trabajaron con estreptomicina y claritromicina respectivamente. Morales, atribuye el efecto entre las fases J e I a la disminución del aporte de electrones desde el complejo liberador de oxígeno y a la estimulación del transporte electrónico en los aceptores finales del PSI el cual provocaría una rápida oxidación de  $Q_A$  por  $Q_B$ , estimulando el flujo entre las fases J e I, promoviendo la caída a valores negativos.

Por último, de los datos entre la fase I-P adquieren valores negativos, lo que es indicativo de una estimulación en la oxidación de los aceptores de electrones del PSI, sobre la plastoquinona (PQ). Por otra parte en el acarreo electrónico del lado aceptor del PSI, probablemente relacionado al aumento del flujo cíclico del fotosistema I, donde la ferredoxina (Fd) puede donar sus electrones a la plastoquinona (PQ) por medio del complejo citocromo en la subunidad 559, cuando esto sucede, se establece un transporte cíclico de electrones; dicho efecto genera un gradiente de  $H^+$  para producir ATP, lo cual puede explicar el incremento en el transporte de electrones y el incremento de la tasa de liberación y consumo de oxígeno en la concentración más elevada de azitromicina.

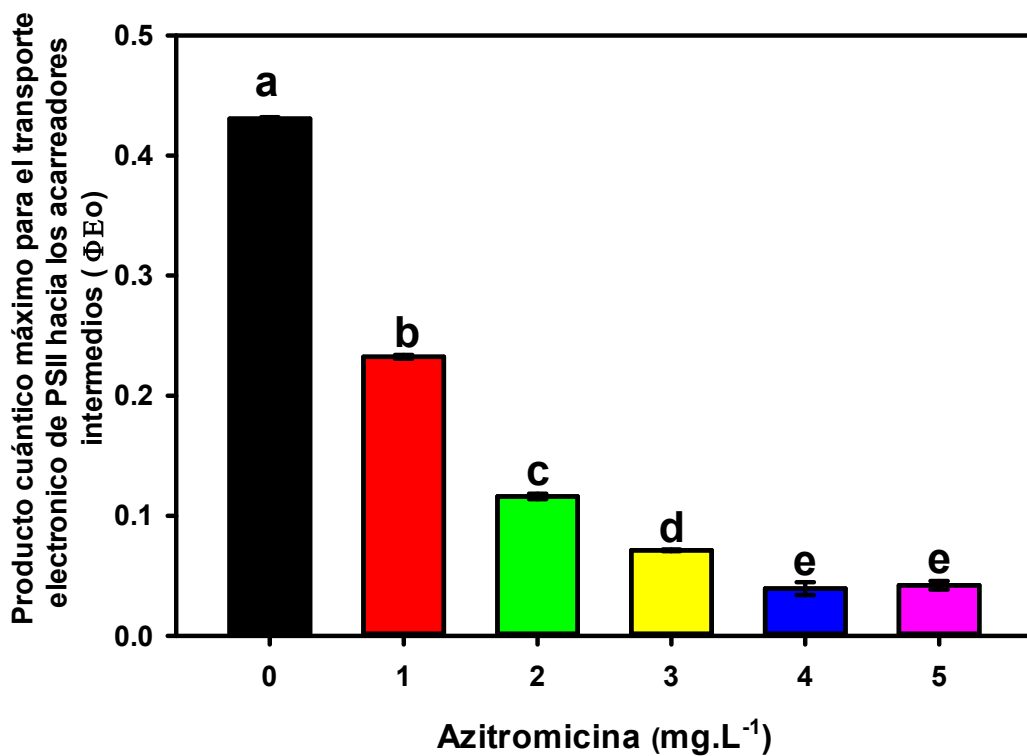
Dichos resultados son comparados por Gómez (2012) con trabajos en los que las plantas son sometidas a estrés de temperatura o salina muy altas; interpretando como evidencia de un desacoplamiento del complejo liberador de oxígeno (CLO) y las reacciones del transporte electrónico entre la feofitina y el aceptor primario de electrones ( $Q_A$ ).



### E. Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II

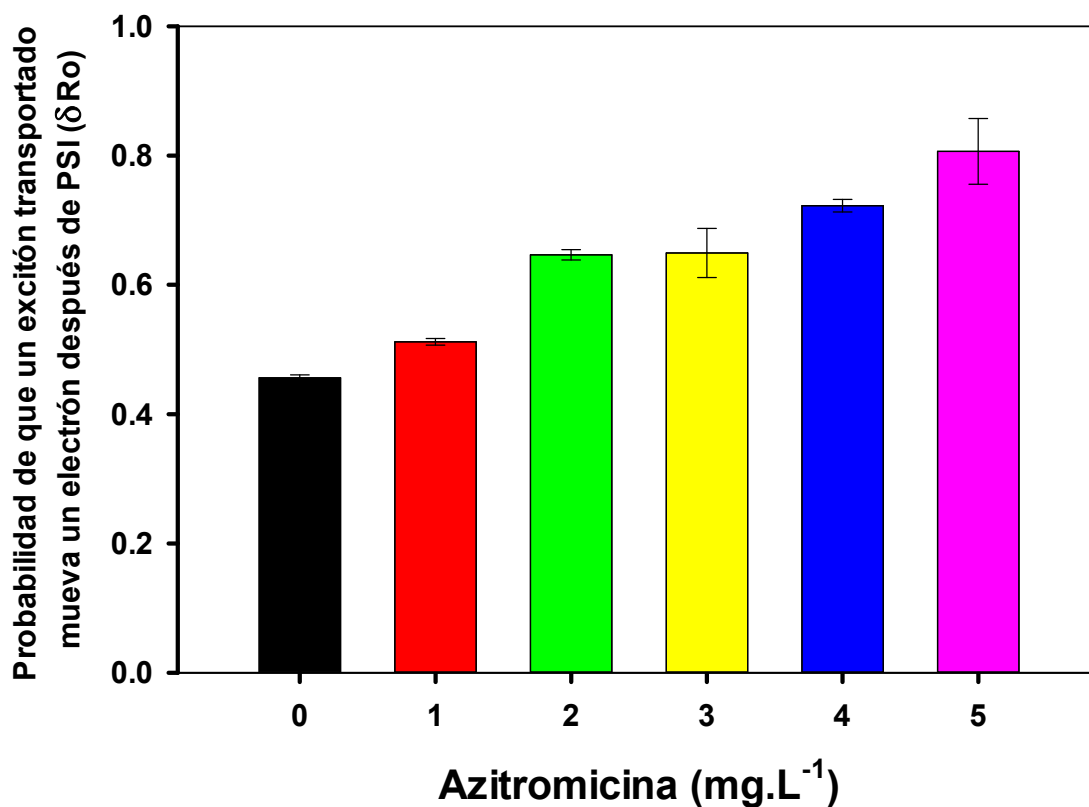
La azitromicina a la máxima concentración reduce 89.73% el rendimiento cuántico para el transporte electrónico ( $\phi_{Eo}$ ) entre el fotosistema II y los acarreadores intermedios y finales del fotosistema I (Figura 19). Se puede notar que a medida que aumenta la concentración del antibiótico en el medio de cultivo, la energía que fue atrapada por el centro de reacción y utilizada para realizar transporte electrónico disminuyó de forma significativa ( $P < 0.05$ ). El rendimiento cuántico para el transporte electrónico ( $\phi_{Eo} = ET_0/ABS$ ), es el producto entre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ( $\phi_{Po}$ ) y la probabilidad que un electrón atrapado en el centro de reacción se mueva más allá de  $Q_A^-$  ( $\Psi_{Eo}$ ). El análisis de la cinética de la fluorescencia polifásica nos permite ver que el lado donador del PSII, es decir:  $CLO \rightarrow P680 \rightarrow Feo \rightarrow Q_A$ , es más sensible al efecto del antibiótico, que el lado aceptor, es decir,  $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow Cit_{b6/f}$ . Lo anterior concuerda con la disminución en la liberación del oxígeno y el valor de la fluorescencia máxima, ya que la capacidad de absorber y atrapar energía de excitación para el transporte electrónico es realmente afectado comparado con el testigo a la concentración de 4 y 5  $mg.L^{-1}$ . Los resultados anteriores muestran que la capacidad de mover electrones disminuye significativamente (Figura 19). En estas condiciones de sobre excitación y reducción del PSII, uno de los mecanismos que podría ser utilizado para reducir esta presión es aumentar el flujo de electrones a nivel del PSI de modo que los electrones acumulados en PSII son rápidamente drenados hacia el PSI (Figura 20) (Takahashi *et al.*, 2009).

Este flujo cíclico a su vez podría estar ligado a un cambio de estado del complejo antena, ya que comúnmente en estado 2, parte de los complejos antena del PSII migran y se unen al PSI, liberando el exceso de energía en este sistema, balanceando la excitación y el flujo de electrones entre los dos fotosistemas al aumentar la actividad del fotosistema I (Nelson y Cox, 2009).



**Figura 19.** *Producto cuántico máximo para el transporte electrónico de PSII hacia los acarreadores intermedios. Las letras sobre cada barra indican las diferencias significativas según la prueba LSD. n=15*

Este aumento se puede observar con una disminución de la fluorescencia entre las fases I a P de la figura 18 y un aumento de la probabilidad que un excitón transportado mueva un electrón hacia el fotosistema I ( $\delta R_o$ ) (Figura 20).

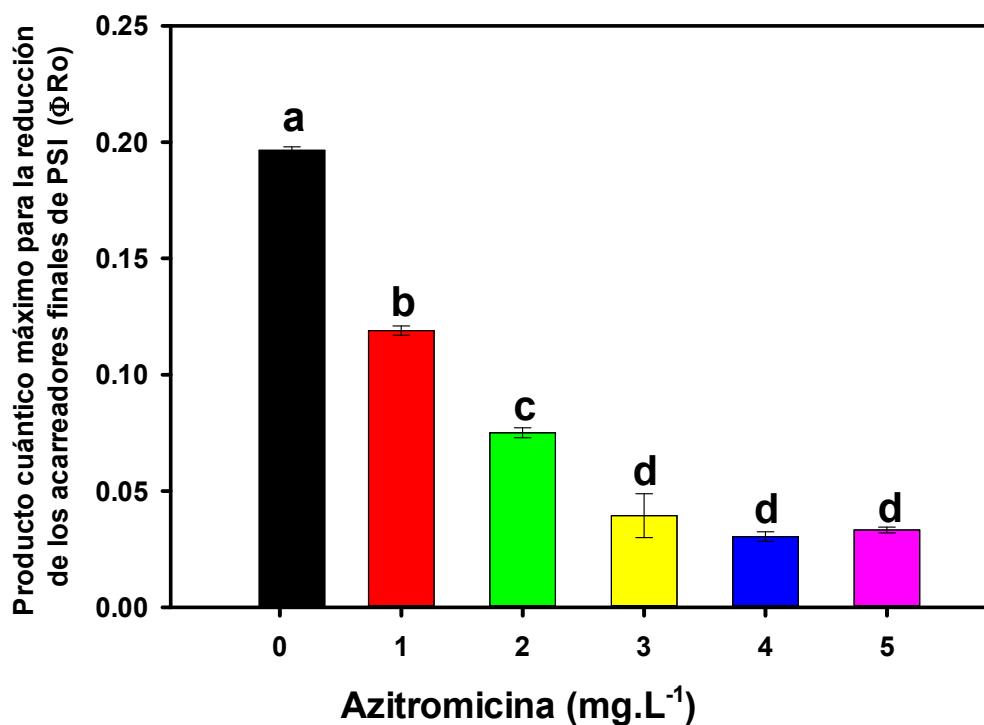


**Figura 20.** Probabilidad de que un excitón transportado mueva un electrón después de PSI ( $\delta R_o$ )  $n=15$

En la figura 21 puede observarse que a medida que aumentó la concentración del antibiótico, la eficiencia cuántica con la que se redujeron los últimos aceptores del lado reductor del PSI disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ).

La eficiencia cuántica para la reducción de los últimos aceptores del PSI ( $\phi R_o$ ), es el resultado del producto de la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $\phi P_o$ ), la probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A^-(\Psi E_o)$

y la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor de PSI ( $\delta R_o$ ).



**Figura 21.** Producto cuántico máximo para la reducción de los acarreadores finales del Fotosistema I, las letras sobre cada barra demuestran las diferencias significativas con prueba LSD.  $n=15$

En resultados similares a los encontrados en esta investigación, Gómez en 2012 demostró que la estreptomycina provoca un mayor flujo de electrones por parte de los acarreadores intermedios para reducir los aceptores finales del PSI. Este resultado corrobora que antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas provocan un aumento entre las fases I-P, el cual se relaciona con el aumento en la reducción

del PSI, activando el mecanismo de drenado de los electrones atascados en la parte donadora del PSII hacia el PSI.

Morales en 2014 obtiene resultados que indican que a causa de una reducción en la cooperatividad entre los centros de reacción del PSII, así como el número centros activos de los mismos, la energía de excitación fue canalizada a los centros de reacción activos por lo cual se encontró mayor absorción y atrapamiento de energía de excitación por centro de reacción, esto pudiera causar daño de los centros de reacción. Los cuales, al no poder canalizar dicha energía al centro de reacción, funcionan como disipadores de calor aumentando la energía liberada por rutas no fotoquímicas (NPQ).

Esta presión sobre el transporte electrónico pudiera producirse por un incremento en la formación de ROS, así como de las enzimas responsables de degradarlas (reacción de Mehler). Para balancear la energía en el aparato fotosintético, se encontró un incremento en la reducción de los últimos aceptores del PSI, posiblemente por un aumento en el flujo cíclico o un aumento del flujo electrónico hacia rutas alternativas.

En resumen, después de la exposición de *Chlorella vulgaris* a 5 mg.L<sup>-1</sup> de azitromicina durante 72 horas se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El crecimiento se redujo significativamente 46.49%
2. La tasa de crecimiento se disminuyó un 39.6%
3. El tiempo de duplicación aumento de 23.73 h a 39.5 h, es decir un retraso de 15.7 horas

4. La clorofila total volumétrica disminuye significativamente un 36.31%, sin embargo, el contenido específico de clorofila total por biomasa no se modifica
5. El contenido de carotenoides totales aumenta significativamente un 310% tanto en términos de volumen y peso seco.
6. La liberación fotosintética de oxígeno disminuyó hasta en un 62.49% con respecto al control
7. El consumo de oxígeno por la respiración disminuye un 33.35%
8. La velocidad de transporte electrónico (ET<sub>Rap</sub>) disminuyó 70.87%
9. El producto cuántico máximo para la fotoquímica primaria del PSII disminuye un 87.42%
10. La energía de excitación liberada a través de procesos no fotoquímicos aumento hasta un 74.59%
11. El análisis de la cinética de fluorescencia indica que la inflexión en la fase K, aumentó lo que indica una inhibición en el complejo liberador de oxígeno. La fase J a I aumento lo que indica una inhibición del transporte electrónico entre los aceptores Q<sub>A</sub> y Q<sub>B</sub>, lo cual se relaciona con una disminución en el rendimiento cuántico para el transporte electrónico ( $\phi E_o$ ) entre el fotosistema II, los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del fotosistema I hasta de una 89.73%
12. Se encontró un aumento en la velocidad de reducción de los transportadores finales del fotosistema I, es decir un incremento entre la fase I y P, lo cual pudiera estar relacionado con un aumento del transporte cíclico, un cambio de estado, o la suma de ambos.

## IX. CONCLUSIONES

Los diversos compuestos farmacéuticos descargados en el ambiente acuático causan una serie de disturbios entre los organismos que habitan ese ambiente, pudiendo así afectar a aquellos que se encuentran en niveles tróficos superiores, así como a sus dinámicas poblacionales.

En el presente estudio se demostró la capacidad que posee la azitromicina, para reducir la tasa de crecimiento y alterar el metabolismo fotosintético de *Chlorella vulgaris*. Lo anterior probablemente se deba a una inhibición en la síntesis de complejos proteicos necesarios para la actividad fotoquímica de *C. vulgaris*.

Estos efectos negativos sobre los organismos fotosintéticos, base de las redes tróficas, causan la urgente necesidad de regular la manera en que los productos farmacéuticos son descargados a los cuerpos de agua, así como elaborar planes para la correcta eliminación de los mismos y la generación de una norma pertinente.

El efecto de los contaminantes emergentes en el ecosistema debe considerarse como problemática de suma importancia ya que estos interactúan con la cadena primaria, además, recientemente se han detectado la presencia de antibióticos, entre los cuales se encuentran el grupo de los macrólidos, los cuales por su complejidad química los macrólidos son difíciles de degradarse rápida y naturalmente.

La azitromicina es un antibiótico tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de manera reversible a la subunidad ribosómica 50S de las células procariotas. Sin embargo, estudios recientes pueden demostrar que también puede unirse a los

ribosomas cloroplásticos y mitocondriales de las microalgas y con los resultados de la actividad fotosintética, del presente trabajo, se demuestra que el antibiótico reduce significativamente el flujo de energía entre los complejos antena y los centros de reacción del PSII, el número de centros de reacción activos del PSII, así como la liberación de oxígeno fotosintético. Esto provocó una disminución del aporte de electrones del lado donador del PSII, un retraso en la reoxidación de QA, debido a que disminuye el producto cuántico para el transporte electrónico en toda la cadena fotosintética.

Por otro lado, la disminución de la reoxidación del lado aceptor del fotosistema II, así como probablemente una reducción de la fijación de CO<sub>2</sub>, provocó una estimulación del flujo electrónico en el lado aceptor del PSI, probablemente por el aumento del flujo electrónico cíclico, esto con el fin de balancear la relación NADPH/ATP. Además, la estimulación del flujo electrónico en el lado aceptor del fotosistema I (PSI) también pudiera estar relacionado con la activación de las rutas alternativas para el transporte electrónico, esto con el propósito de que aun cuando el transporte electrónico se encuentre disminuido, éste no se detenga completamente por falta de un aceptor oxidado al final de la cadena transportadora.

Debido al aumento de centros de reacción inactivos en PSII, la energía de excitación absorbida por los complejos antena en PSII (LHCII), es distribuida hacia los centros de reacción activos, lo cual produce un aumento en la absorción y atrapamiento de energía de excitación por centro de reacción, sin embargo, debido a que el transporte electrónico también se redujo, la energía de excitación no es utilizada



para el transporte electrónico y por tanto aumentó la relajación de los centros de reacción por vías no fotoquímicas (NPQ) en forma de calor.

Los resultados anteriores muestran que bajas concentraciones de azitromicina alteran de forma negativa el metabolismo de *Chlorella vulgaris*, un organismo fotoautótrofo base de la cadena trófica. Queda claro entonces que se requieren estudios más profundos sobre la toxicología de estos compuestos en el ambiente acuático para establecer la concentración límite para éste y otros compuestos farmacéuticos, a fin constituir una legislación nacional que regule las concentraciones en las aguas residuales que se desechan al medio ambiente.

## X. Bibliografía

- Álvarez-Elcoro, S. y Enzler, M.J. 1999. The macrolides: erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Mayo Clin Proc* 74: 613-634.
- Arellano, J.B., De Las Rivas, J. 2006. Plantas y cambio climáticos. *Investigación y Ciencia*. 254:42-49.
- Becerril Bravo, J., E. 2009. Contaminantes emergentes en agua. *Revista Digital Universitaria*, 10 (8), 2-7.
- Bielen, A., Simatovic, A., Kosic-Vuksic, J., Senta, I., Ahel, M., Babic, S., Jurina, T., Plaza, G. J., Milakovic, M. y Udikovic-Kolic, N. 2017. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Research* 126:79-87.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka L.J. 1988. *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press. New York.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294–306.
- Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K. y Echániz, G. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Publica Mex*, 50 (4), 480-487.
- Fu L., Huang T., Wang S., Wang X., Su L., Li C. y Zhao Y. 2017. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere* 168: 217-222.
- Garza, M.T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredó, J. 2010. Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella sp.* Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*: 13(2), 174-177.

- Gómez Juárez, E. 2012. "Caracterización de la actividad fotosintética en *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de estreptomycin". Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Gómez Luna, L. M. 2007 Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química* 19; (2): 3-20.
- González, M.S., Perales, V.H.V., Salcedo, A.M.O. 2008. La Fluorescencia de la Clorofila a Como Herramienta en la Investigación de Efectos Tóxicos en el Aparato Fotosintético de Plantas y Algas. *REB.* 27 (4): 119-129.
- González-Piñera, J. G., Barrieto, P. J., Rodríguez, R. M. A., Pino, A. P. P. y Lim, A. N. 1998 Macrólidos. *Acta Medica*, 1998; 8 (1), 71-4.
- Gonzalez-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E. y Fernández-Piñas, F. 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water research*, 47: 2050-2064.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Flórez, J., Barrios, F. y Zapata, C. 2012. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3 (2): 159-164.
- Janet, G. M., Mariana, S. A., Iván U.J. y Darío G.O. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción Limpia*, 2 (2) 52-73.
- Jiménez, L., E. 2015. Caracterización de la respuesta fisiológica de *Chlorella vulgaris* expuesta a estreptomycin". Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM. México

- Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C. Prásil, O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J Phycol*, 38: 429-441.
- Lalak, N. y Morris, D. 1993 Azithromycin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 25(5): 370-374.
- Ling Fu, Tao Huang, Shuo Wang, Xiaohong Wang, Limin Su, Chao Lia y Yuanhui Zhao. (2016). Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere*, 168, 217–222. 10-03-2017.
- Liu, B.Y., Nie, X.P., Liu, W.Q., Snoeijs, P., Guan Chao, T.M.T.K. 2011. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornatum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier. 74: 1027-1035.
- Lode, H. 1991 The pharmacokinetics of azithromycin and their clínica significance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Oct; 10:807-812.
- Lu, C., Qiu, N., Lu, Q., Wang, B., Kuang, T. 2003. PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xantophyll cycle in *Kalanchoë daigremontiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiol plantarum*, 118: 173-182.
- Lucas, M. F., Mestorino, M. & Errecalde, J.O. (2007). macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Veterinaria*, 27, pp. 36-45.
- Marín, N., Morales, F., Tamigneaux, E. y Lodeiros, C. 1998. Effects of nitrate concentrations on the growth and pigment synthesis of a wild strain of *Dunaliella salina* preadapted to different salinities and cultivated under low illumination. *J. Appl. Phycol*. 10: 405-411.

- Maxwell, K., Johnson, G., N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *J Exp Bot*, 51(345): 659-668.
- Melis, A., Chen, H.C. 2005. Chloroplast sulfate transport in green algae: genes, proteins and effects. *Photosynthesis Research*. 86(3):299-307.
- Mohapatra, P. K., Khillar, R., Hansdah, B., Mohanty, R. C. 2010. Photosynthetic and fluorescence responses of *Solanum melangena* L. to field application of dimethoate. *Ecotox Environ Safe*, 73:78–83.
- Molina López J. 2015. DROGAS ANTIBACTERIANAS. 20/08/18, de Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: <https://bit.ly/1yNsxaW>
- Morales R. F. J. 2014. “Análisis de la actividad fotoquímica de *Chlorella vulgaris* expuesta a claritromicina”. Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM. México.
- Morejón, G. M. & Salup, D. R. 2007. Actualización en macrólidos. 29/08/18, de Red Salud de Cuba Sitio web: <https://bit.ly/2HJM3EU>
- Moreno-Ortiz, V. C., Martínez – Núñez J. M., Kravzov – Jinich, J., Pérez – Hernández, L. A., Moreno – Bonnet, C. y Altagracia – Martínez, M. 2013. Los Medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco; División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Dep. de Sistemas Biológicos., *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Méx.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2009. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 5ta ed. Editorial Omega. p. 1296.

- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD/OCDE). 2006. Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Protocol 201.
- Paredes, F. y Roca, J. J. 2004. Acción de los Antibióticos – Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Ámbito Farmacéutico – Farmacología*, 23 (3) 116-124.
- Perales-Vela, H.V., Velasco, R., Gómez-Juárez, E. A., Salcedo-Álvarez, M. y Cañozares-Villanueva, R. O. 2016. Streptomycin affects the growth and photochemical activity of the alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 132: 311-317.
- PETROVIC, M., HERNANDO, D., DÍAZ-CRUZ, S. Y BARCELÓ, D. 2005 Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples. A review of *Journal of Chromatography A*, 1067: 1-14.
- Prósperi C. 2000. Uso de algas como indicadores de contaminación acuática. *Revista Agua* N° 128. Año XXV. Tecnología y Tratamiento. Saneamiento Ambiental.
- RAMOS, A. C. 2009 Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. *Rev. Cubana Hig Epidemiol.*47(2):1561-3003.
- Rocha, C. Reynolds, N.D. y Simons, M.P. 2015. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*;32(1):139-45.
- Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, y M. R.Tredici, 2009. Lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (1): 100-112

- Romero, Y., Lodeiros, C., Esclapés, M., Marín, N., Guevara, M. & Morales, E. 2001. Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia*, 27(3), 104-109.
- Seoane, M., M. 2018 Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad. Tesis de Doctorado. Universidad de Coruña. Coruña, España.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. y Cid, A. 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kütz.) Butch. Universidad de Coruña. *Marine Environmental Research*. 101:1-7.
- Steinberg-Yfrach, G., Rigaud, J.L., Durantini, E.N., Moore, A.L., Gust, D., Thomas A. Moore. 1998. Light-driven production of ATP catalysed by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane. *Nature*. 392(6675):479-482.
- Stirbert, A. G. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier. 104:236-257.
- Strasser, B. J. 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transient. *Photosynth Res*, 52: 147–155.
- Takahashi, S., Milward, S.E., Fa, D.Y., Chow, W.S., Badger, M.R. 2009. How Does Cyclic Electron Flow Alleviate Photoinhibition in Arabidopsis? *Plant Physiol*, 149: 1560-1567.
- Tilló Barrufet Teresa, 2010. Los Medicamentos y su influencia en el Medio ambiente, Universidad de Barcelona, Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales y de la Matemática.

- Van Heerden, P. D. R., Strasser, R. J. y Krüger, G. H. J. 2004. Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicate by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiol Plantarum*, 12: 239-249.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 144: 307-313.
- Zuckerman J.M., Kaye K.M. 1995. The newer macrolides. Azitromycin and Clatithromycin. *Infect Dis NA*. 9(3):731-745.



## XI. Apéndice

**Tabla 3. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para Crecimiento Peso seco mg. L<sup>-1</sup>**


The ANOVA Procedure  
t Tests (LSD) for Y  
NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.000096
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.0174

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	T
	A	0.228000	3	1
	B	0.195333	3	2
	C	0.134667	3	3
	C			
D	C	0.118000	3	4
D	C			
D	C	0.117333	3	5
D				
D		0.106000	3	6

**Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) Crecimiento Peso seco mg. L<sup>-1</sup>**

Dependent Variable: 

The ANOVA Procedure

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.03720378	0.00744076	77.51	<.0001
Error	12	0.00115200	0.00009600		
Corrected Total	17	0.03835578			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.969965	6.536815	0.009798	0.149889

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.03720378	0.00744076	77.51	<.0001

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

**Tabla 5. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para la tasa de crecimiento ( $\mu\text{-d}^{-1}$ )**

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	1.206E-7
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.0006

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.0292000	3	1
B	0.0267667	3	2
C	0.0222000	3	3
D	0.0191333	3	4
E	0.0181333	3	5
E	0.0175333	3	6

**Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) para la tasa de crecimiento ( $\mu\text{-d}^{-1}$ )**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.00035270	0.00007054	585.12	<.0001
Error	12	0.00000145	0.00000012		
Corrected Total	17	0.00035414			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.995915	1.566759	0.000347	0.022161

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.00035270	0.00007054	585.12	<.0001

**Tabla 7. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para tiempo de duplicación ( $td.h^{-1}$ )**

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.25824
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.904

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	39.5043	3	6
B	38.2548	3	5
C	36.2285	3	4
D	31.2385	3	3
E	25.8926	3	2
F	23.7342	3	1

**Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) para tiempo de duplicación ( $td.h^{-1}$ )**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	654.4873682	130.8974736	506.88	<.0001
Error	12	3.0988784	0.2582399		
Corrected Total	17	657.5862466			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.995287	1.564790	0.508173	32.47549

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	654.4873682	130.8974736	506.88	<.0001

**Tabla 9. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para clorofila total (mg. L<sup>-1</sup>)**

**The ANOVA Procedure**  
**t Tests (LSD) for Y**

**NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	2.813172
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	2.6265
Harmonic Mean of Cell Sizes	3.6

**NOTE: Cell sizes are not equal.**

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping		Mean	N	T
	A	11.268	4	1
B	A	9.606	2	2
B	C	7.038	6	3
D	C	5.811	4	4
D	C	5.148	4	6
D		4.092	4	5

**Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila total (mg. L<sup>-1</sup>)**

**The ANOVA Procedure**

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	139.5797702	27.9159540	9.92	0.0001
Error	18	50.6371031	2.8131724		
Corrected Total	23	190.2168733			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.733793	24.14484	1.677251	6.946625

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	139.5797702	27.9159540	9.92	0.0001

**Tabla 11. Prueba minia diferencia significativa (LSD) para clorofila total (mg.mg<sup>-1</sup>P.S.)**

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	1.103445
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	1.5605

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
â	8.2971	4	2
â	8.2371	4	1
â	8.2082	4	4
â	8.0946	4	6
â	6.9799	4	3
â	6.8698	4	5

**Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila total (mg.mg<sup>-1</sup>P.S.)**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	8.90916751	1.78183350	1.61	0.2067
Error	18	19.86201121	1.10344507		
Corrected Total	23	28.77117871			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.309656	13.50005	1.050450	7.781083

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	8.90916751	1.78183350	1.61	0.2067

**Tabla 13. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para carotenoides totales (mg. g P.S<sup>-1</sup>)**

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	69.05835
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	12.345

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	81.056	4	6
A			
A	69.795	4	4
B	57.435	4	5
B			
B	51.733	4	3
C	38.996	4	2
C			
C	27.489	4	1

**Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para carotenoides totales (mg. g P.S<sup>-1</sup>)**

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	7701.497227	1540.299445	22.30	<.0001
Error	18	1243.050275	69.058349		
Corrected Total	23	8944.547501			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.861027	15.27112	8.310135	54.41733	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	7701.497227	1540.299445	22.30	<.0001

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

**Tabla 15.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para fotosíntesis (nmoles O<sub>2</sub>.mg Chl total<sup>-1</sup>. Min<sup>-1</sup>)

The ANOVA Procedure  
t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	56
Error Mean Square	57524.97
Critical Value of t	2.00324
Least Significant Difference	216.91
Harmonic Mean of Cell Sizes	9.81279

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	1916.6	7	1
B	1454.3	10	3
B	1411.7	8	2
B	1410.0	13	4
C	701.7	12	6
C	639.3	12	5

**Tabla 16.** Análisis de varianza (ANOVA) para fotosíntesis (nmoles O<sub>2</sub>.mg Chl total<sup>-1</sup>. Min<sup>-1</sup>)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	11916013.16	2383202.63	41.43	<.0001
Error	56	3221398.40	57524.97		
Corrected Total	61	15137411.56			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.787190	20.18366	239.8436	1188.306

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	11916013.16	2383202.63	41.43	<.0001

**Tabla 17. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para respiración (nmoles O<sub>2</sub>.mg Chl total<sup>-1</sup>. Min<sup>-1</sup>)**

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	43
Error Mean Square	25163.02
Critical Value of t	2.01669
Least Significant Difference	164.26
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.586207

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	1535.92	6	1
A	1485.34	9	3
A	1410.26	11	4
B	1238.41	5	2
C	990.05	9	6
C	959.87	9	5

**Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) para fotosíntesis (nmoles O<sub>2</sub>.mg Chl total<sup>-1</sup>. Min<sup>-1</sup>)**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2630867.705	526173.541	20.91	<.0001
Error	43	1082009.825	25163.019		
Corrected Total	48	3712877.530			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.708579	12.56965	158.6286	1261.997

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	2630867.705	526173.541	20.91	<.0001



**Tabla 19. Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para la velocidad de transporte electrónico aparente ( $ETR_{ap}$ )**

Procedimiento ANOVA

t Tests (LSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error comparisonwise de tipo I, no el índice de error experimentwise.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	2.379484
Valor crítico de t	2.17881
Diferencia menos significativa	2.7442

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	T
A	35.806	3	1
B	24.863	3	2
C	21.958	3	3
D	19.019	3	4
E	11.758	3	6
E	11.263	3	5

**Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) para la velocidad de transporte electrónico aparente ( $ETR_{ap}$ )**

Procedimiento ANOVA					
Variable dependiente: Y					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1256.756137	251.351227	105.63	<.0001
Error	12	28.553802	2.379484		
Total correcto	17	1285.309939			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media	
	0.977785	7.424073	1.542557	20.77778	
Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1256.756137	251.351227	105.63	<.0001

**Tabla 21.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para el producto cuántico máximo potencial para la fotoquímica primaria en PSII( $\Phi$ PSII=FV/FM)

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.00014
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.0154

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.703440	5	1
B	0.452140	5	2
C	0.215160	5	3
D	0.121880	5	4
E	0.094480	5	5
E	0.088540	5	6

**Tabla 22.** Análisis de varianza (ANOVA) para el producto cuántico máximo potencial para la fotoquímica primaria en PSII( $\Phi$ PSII=FV/FM)

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1.54605603	0.30921121	2215.84	<.0001
Error	24	0.00334910	0.00013955		
Corrected Total	29	1.54940514			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.997838	4.229891	0.011813	0.279273	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	1.54605603	0.30921121	2215.84	<.0001

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* CULTIVADA EN PRESENCIA DE AZITROMICINA

**Tabla 23.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para la relajación no-fotoquímica en PSII (qNP)

The ANOVA Procedure  
t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.001981
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.0581

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.57040	5	6
A	0.54740	5	3
A	0.54520	5	5
A	0.54320	5	4
B	0.46340	5	2
C	0.31760	5	1

**Tabla 24.** Análisis de varianza (ANOVA) para la relajación no-fotoquímica en PSII (qNP)

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.22847107	0.04569421	23.07	<.0001
Error	24	0.04754640	0.00198110		
Corrected Total	29	0.27601747			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean
0.827741	8.940054	0.044510	0.497867

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.22847107	0.04569421	23.07	<.0001

**Tabla 25.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para el rendimiento cuántico operacional ( $\Phi$ PSII)

The ANOVA Procedure  
t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.000053
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.0129

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.168500	3	1
B	0.117000	3	2
C	0.103333	3	3
D	0.089500	3	4
E	0.055333	3	6
E	0.053000	3	5

**Tabla 26.** Análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento cuántico operacional ( $\Phi$ PSII)

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.02783128	0.00556626	105.63	<.0001
Error	12	0.00063233	0.00005269		
Corrected Total	17	0.02846361			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.977785	7.424073	0.007259	0.097778	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.02783128	0.00556626	105.63	<.0001

**Tabla 27.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para el producto cuántico máximo para el transporte electrónico de PSII hacia los acarreadores intermedios ( $\Phi E0$ )

The ANOVA Procedure  
t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.000043
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.0086

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.430580	5	1
B	0.232360	5	2
C	0.116040	5	3
D	0.071580	5	4
E	0.042100	5	6
E	0.039300	5	5

**Tabla 28.** Análisis de varianza (ANOVA) para el producto cuántico máximo para el transporte electrónico de PSII hacia los acarreadores intermedios ( $\Phi E0$ )

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.58268972	0.11653794	2685.46	<.0001
Error	24	0.00104150	0.00004340		
Corrected Total	29	0.58373122			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.998216	4.241095	0.006588	0.155327	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.58268972	0.11653794	2685.46	<.0001

**Tabla 29.** Prueba de mínima diferencia significativa (LSD) para el producto cuántico máximo para la reducción de los acarreadores finales de PSI ( $\Phi R_0$ )

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for Y

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.000088
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.0123

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	T
A	0.196420	5	1
B	0.118940	5	2
C	0.075060	5	3
D	0.039434	5	4
D	0.033240	5	6
D	0.030380	5	5

**Tabla 30.** Análisis de varianza (ANOVA) para el producto cuántico máximo para la reducción de los acarreadores finales de PSI ( $\Phi R_0$ )

The ANOVA Procedure					
Dependent Variable: Y					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.10679164	0.02135833	241.52	<.0001
Error	24	0.00212241	0.00008843		
Corrected Total	29	0.10891405			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Y Mean	
	0.980513	11.43394	0.009404	0.082246	
Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	5	0.10679164	0.02135833	241.52	<.0001