



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



Caracterización del crecimiento y la actividad
fotosintética de *Tetrademus incrassatulus*
expuesta a azitromicina.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

Berenice Pérez Cerón

Laboratorio de Bioquímica
Unidad de Morfología y Función

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo de México, 2023



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.

DEDICATORIA

A mi mamá, nunca habrá palabras que puedan expresar el amor que te tengo y lo agradecida que estoy por tenerte conmigo. Te doy gracias a ti por apoyarme siempre y por guiarme, sé que tuviste que sacrificar muchas cosas para sacarnos adelante y también sé que yo no estaría aquí hoy de no ser por ti. Nunca nada que yo haga será suficiente para compensar todo lo que tu hiciste por mí, te quiero mucho.

A mi papá por quererme y hacer de mi niñez uno de los recuerdos más cálidos que tengo, pienso mucho en ti y en los momentos que compartimos, siempre con mucho cariño y cada vez con un poco menos de tristeza. Te quiero mucho.

A mi tía Alicia, por todo lo que has hecho por nosotros, admiro mucho la forma en la que siempre has cuidado a la gente que quieres, siempre fuiste un ejemplo para mí. A mi tía Alejandra, por tus consejos y tu apoyo, admiro mucho tu perseverancia y tu disposición para ayudar a quienes te rodean. A Daniela y a Luis, pudimos crecer juntos y me alegra ver que ahora somos adultos buscando lograr nuestros sueños, espero que en muchos años podamos recordar con cariño estos tiempos y saber que logramos encontrar nuestro lugar en el mundo.

A Adrián, gracias por estar conmigo estos años, por tu amor y tu paciencia. Nunca había conocido a nadie como tú, la forma en la que vivo y veo la vida es diferente gracias a ti. Me hace muy feliz verte cumpliendo tus sueños y ver como logras cada cosa que te propones. Espero que nos queden muchos años más para estar juntos, pintaste amaneceres.

A mis mascotas Palomita y Huevito, con ustedes dos comprendí que uno puede querer a alguien un segundo después de conocerlo, llegaron a mí y se convirtieron en mi razón para continuar día tras día. Ustedes me salvaron a mí, gracias por ser mi compañía.

A mis compañeros de universidad, por los tiempos de risa, los tiempos de estudio y los tiempos de crisis que sobrevivimos juntos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Virgilio Perales Vela por su inconmensurable apoyo a lo largo de estos años, por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir sus conocimientos conmigo. Gracias por la paciencia, por creer en mí y por escucharme cuando lo necesitaba. En la vida a veces uno se cruza con personas que de verdad aman lo que hacen y lo comparten los demás, y si querer te contagian y te hacen cambiar de perspectiva, usted fue esa persona para mí y le estaré agradecida siempre.

Al comité de revisión de este trabajo: al Dr. Hugo, la Dra. Martha Salcedo, la Dra. Nandini Sarma, la M. en C. Gloria Garduño, la Dra. Elvia Lucía Pavón Meza por su disposición y el tiempo brindado para corregir este trabajo, por sus esfuerzos incondicionales para que quienes nos cruzamos en su camino nos volvamos mejores estudiantes.

A la Dra. Martha Ofelia, la Dra. Teresa Ortiz, M. en C. LLaraí Gaviria, Dra. Josefina, M. en C. Jimena García, Dr. Mandujano, M. en C. Nallely Álvarez y a todos los profesores con los que tuve la oportunidad de coincidir durante mis estudios y después de ellos. Gracias por su apoyo y sus consejos invaluable, por toda la experiencia compartida y las oportunidades de aprender que recibí de ustedes, pero sobre todo gracias por creer en mí y por enseñarme a creer en mí misma. El camino es largo, pero soy una persona diferente gracias para haberlos conocido.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica, por compartir sus conocimientos y habilidades conmigo y por hacer las horas en el laboratorio más amenas.

Al laboratorio de Biomoléculas y Estructura y Función Celular de la FES Iztacala, por su apoyo durante el procesamiento de muestras.

“La gata empujó al último de sus cachorros dentro de la cueva. Desde ahí vio cómo el mar retrocedía, vio a esa nube negra comerse a los árboles. Miró la incandescencia de la montaña, bufó con las orejas hacia atrás, anteponiéndose a sus crías. Entonces la Tierra tembló de nuevo, y ella no supo a cuál de ellos tomar del cuello primero, a dónde debía trepar o dónde debía meterles...

Pero el estruendo cesó.

No iba a moverse, no hasta que su cuerpo le indicara que era seguro hacerlo de nuevo, como cuando cazaba a la liebre o al pájaro.

Esperó

Aunque muy pálido, el sol surgió de nuevo entre la grisura del cielo. Entonces sus crías se arremolinaron bajo su vientre y comenzaron a mamar.”

GABRIELA DAMIÁN MIRAVETE
La canción detrás de todas las cosas

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

NÚMERO	PIE DE FIGURA O TABLA	PÁGINA
Fig. 1	Sitio de unión de los macrólidos en el canal de salida de la subunidad grande del ribosoma 50S bacteriano	7
Fig. 2	Estructura de la eritromicina.	8
Fig. 3	Modificaciones en la estructura química de azitromicina con respecto a eritromicina.	9
Tabla 1	Parámetros cinéticos de la emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (Prueba OJIP)	26
Tabla 2	Parámetros para el análisis del decaimiento de la fluorescencia	28
Fig. 4	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el crecimiento	29
Fig. 5	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de crecimiento (μ)	30
Fig. 6	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el tiempo de duplicación (h)	31
Tabla 3	Efecto de la concentración de azitromicina sobre el contenido volumétrico de clorofilas totales y carotenoides	32
Tabla 4	Efecto de la concentración de azitromicina sobre el contenido de clorofilas totales y carotenoides por gramo de peso seco	32
Fig. 7	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis)	33
Fig. 8	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de consumo de oxígeno (respiración)	34
Fig. 9	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el Producto cuántico máximo operacional para la fotoquímica primaria (Φ PSIIop)	35
Fig. 10	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el transporte electrónico aparente (ETRap)	36
Fig. 11	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la disipación no fotoquímica (qNP)	37
Fig. 12	Cinética de fluorescencia variable (U.R)	38
Fig. 13	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la fluorescencia variable relativa (V_t)	39
Fig. 14	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la fluorescencia variable relativa (ΔV_t)	40
Fig. 15	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el Producto cuántico máximo potencial para la fotoquímica primaria en PSII (ΦP_o)	41
Fig. 16	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la Eficiencia para que un fotón atrapado mueva un electrón más allá de Q_A (Ψ_o)	42
Fig. 17	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el Producto cuántico para el transporte electrónico desde Q_B hasta el complejo del citocromo b_6f (ΦE_o)	43
Fig. 18	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el Producto cuántico máximo para la reducción de los aceptores terminales de PSI (ΦE_{total})	44
Fig. 19	Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la reducción de los aceptores terminales de PSI (δR_o)	44

LISTA DE ABREVIATURAS

LEYENDA	ABREVIATURA
Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal	PFCPS
Concentración Efectiva Media	EC50
Azitromicina	AZM
Centro peptidil transferasa	PTC
Fotosistema I	PSI
Fotosistema II	PSII
Complejo del citocromo b ₆ f	Cit b ₆ f
Feofitina	Pheo
Clorofila total	Chlo a
Quinona A	Q _A
Quinona B	Q _B
Fluorescencia mínima	F _o
Fluorescencia máxima	F _m
Fluorescencia Variable	F _v
Complejo liberador de oxígeno	CLO
Producto cuántico máximo potencial	ΦPSII
Producto cuántico máximo operacional	ΦPSII _{op}
Producto cuántico para el transporte electrónico	ΦE _o
Decaimiento No fotoquímico	NPQ, qNP
Organización Mundial de la Salud	OMS
Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico	OECD
Tasa de crecimiento relativo	μ
Tiempo de duplicación celular	td
Carotenoides totales	Cars
Producto cuántico máximo para mover un electrón después de Q _A	ψ _o
Tasa de transporte electrónico aparente	ETRap
Ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa	RuBisCO
Fluorescencia variable relativa	V _t
Reducción de los aceptores terminales de PSI	δR _o

ÍNDICE	Página
➤ Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Contaminantes emergentes y su presencia en el medio acuático	2
1.2 Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCs) como contaminantes emergentes	3
1.3 Toxicidad en el medio ambiente de los productos farmacéuticos: El caso de los antibióticos	5
1.4 Macrólidos	6
1.5 Azitromicina	9
2. Antecedentes	11
2.1 Efecto tóxico de los antibióticos en las microalgas	11
2.2 La fluorescencia de la clorofila a como herramienta para medir el efecto de contaminantes sobre la fotosíntesis	13
2.3 Problemática en México	16
2.4 Biología General: Familia Scenedesmaceae	18
3. Justificación	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Materiales y Métodos	22
6.1 Organismo	22
6.2 Medio de Cultivo	22
6.3 Protocolo experimental	23
6.4 Variable de respuesta	23
6.4.1. Crecimiento	22
6.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos: Clorofila y carotenoides	24
6.4.3. Determinación de la actividad fotosintética y respiratoria por oximetría	24
6.4.4. Determinación de la actividad fotosintética por emisión de fluorescencia, cinética rápida de fluorescencia: Prueba OJIP	25
6.4.5. Análisis de la fase lenta (Decaimiento) de la fluorescencia: Método de pulsos saturantes	27
6.4.6. Análisis Estadístico	29
7. Resultados	29
7.1 Crecimiento	28
7.2 Pigmentos fotosintéticos	31
7.3 Actividad fotosintética y respiratoria	33
7.4 Transporte electrónico y decaimiento no fotoquímico	34
7.5 Análisis de la cinética y los parámetros de la emisión polifásica de la fluorescencia	37
7.6 Parámetros de la prueba OJIP	40
8. Discusión	45
9. Conclusiones	54
10. Referencias	56
11. Apéndice	63

RESUMEN

Los antibióticos son compuestos usados en la medicina humana y animal, por su capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de los organismos que son sensibles a estos. Una vez administrados por vía oral o inyectados, muchos de estos antibióticos pueden ser eliminados en las excretas y orina, por lo que son vertidos a las aguas residuales y llegan a los ecosistemas acuáticos con o sin modificación de su estructura original y algunos de estos son resistentes a la degradación fisicoquímica y biológica por lo que permanecen por largo tiempo. Los macrólidos, son una de las familias de antibióticos más consumida en la medicina humana y veterinaria, como resultado de esto, han sido detectados en aguas superficiales y subterráneas, así como en aguas destinadas para el consumo humano. El mecanismo de acción de los macrólidos consiste en bloquear la síntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos 70S, por lo que se considera que pueden actuar sobre los ribosomas 70S de cloroplastos y mitocondrias, afectando el crecimiento del fitoplancton en los ambientes acuáticos. Debido a esto, actualmente son considerados como contaminantes emergentes. En esta investigación se caracterizó el efecto del macrólido azitromicina en el crecimiento y metabolismo celular del alga verde *Tetrademus incrassatus*. Para ello, el alga se cultivó en lote en el medio mineral PCG utilizando células en fase exponencial, las cuales se mantuvieron en aireación, a temperatura e iluminación constantes. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de azitromicina: 0 (testigo), 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante 72 h. Se determinó el crecimiento, el contenido de clorofilas y carotenoides, la actividad fotosintética y respiratoria por oximetría y la actividad fotoquímica por la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (PSII). Los resultados muestran una disminución del crecimiento (g.L^{-1}) y la velocidad de crecimiento relativo (μ), así como un aumento en el tiempo de duplicación (*td*). Se encontró que conforme aumenta la concentración del antibiótico, la actividad fotosintética y respiratoria disminuyen, sin embargo, el contenido específico de clorofila y carotenoides totales por biomasa aumenta, quizás como un mecanismo de compensación ante la reducción metabólica provocada por el antibiótico. El análisis de la cinética polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II, indica que la exposición a azitromicina provoca una inhibición del complejo liberador de oxígeno, afectando así el transporte de electrones del lado donador del fotosistema II. Por otro lado, la reducción del transporte en el fotosistema II, está asociado a un aumento en el transporte del fotosistema I, particularmente en su lado aceptor, lo cual se manifiesta en un incremento en la fase I-P de la cinética, probablemente debido a un incremento en el flujo cíclico en el fotosistema I. Esto demuestra que bajas concentraciones de azitromicina son capaces de reducir el crecimiento y la actividad metabólica de *T. incrassatus* aun cuando es expuesta por un periodo de tiempo corto. La introducción de antibióticos como la azitromicina en el medio acuático podría afectar el crecimiento de los productores primarios y por tanto la dinámica de todo el ecosistema. Por lo anterior, es importante la realizar investigaciones que permitan generar conocimiento sobre los efectos negativos de estos compuestos en el ambiente y así enfatizar sobre la importancia de incluirlos dentro del marco regulatorio, así como de implementar estrategias para la correcta disposición de estas sustancias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminantes emergentes y su presencia en el medio acuático.

Alrededor del mundo, el avance científico y tecnológico ha propiciado el descubrimiento de nuevas sustancias que son incluidas en el mercado, muchas de estas sustancias tienen como fin satisfacer las necesidades básicas de la sociedad, por lo que son utilizados de manera constante por el ser humano y, como resultado de esto, son vertidas al ambiente de manera constante, teniendo el potencial de acarrear un impacto ecológico o de provocar daños en la salud.

Muchas de estas sustancias han sido consideradas como contaminantes emergentes, puesto que el conocimiento de su presencia en el ambiente es reciente y, por lo tanto, no suelen estar sometidos a una normatividad que regule su manejo y tratamiento (Castro-Pastrana *et al.*, 2015). En su mayoría se trata de compuestos nuevos, aunque también se puede tratar de compuestos cuyo uso data de más tiempo, pero su presencia e impacto en el ambiente y en la salud se desconocían hasta ahora, ya que existen ciertas limitaciones analíticas que no permiten el monitoreo de todas las especies químicas presentes en el medio (Sauvé y Desrosiers, 2014, citado por Flores, 2019).

Otra característica que tienen estos compuestos en común es que a pesar de sus altas tasas de transformación/remoción, su introducción constante hacia el ambiente provoca que actúen como agentes persistentes (Barreto, 2017). Una vez en el ambiente, estos pueden estar presentes en forma de compuestos parentales, metabolitos o productos de degradación, siendo en el medio acuático en donde se han detectado las concentraciones más altas, aunque también pueden estar presentes en sedimentos o sólidos suspendidos (Wilkinson *et al.*, 2017).

Dentro de la lista de contaminantes emergentes se incluyen una amplia gama de productos de uso doméstico e industrial, entre los cuales se encuentran los pesticidas, herbicidas, aditivos industriales, nanomateriales, plastificantes, surfactantes, así como productos farmacéuticos (incluyendo hormonas) y productos de cuidado personal (Rubio *et al.*, 2013; Mandaric *et al.*, 2016). Actualmente la red NORMAN, un proyecto financiado por la Unión Europea, se encarga de identificar la presencia de contaminantes emergentes y sus impactos en el ambiente y ha clasificado al menos 700 compuestos como contaminantes emergentes en Europa (Brack *et al.*, 2012, citado por Flores, 2019).

1.2. Los Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal (PFCEPs) como contaminantes emergentes.

Dentro de los Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal (PFCEPs) se encuentran compuestos de diferente clase química, los cuales se utilizan principalmente con el fin de mejorar la calidad de vida de los seres vivos, ya sea tratando enfermedades (Productos Farmacéuticos), o atendiendo las necesidades de cuidado personal e higiene de los seres vivos (Productos de Cuidado Personal) (Boxall *et al.*, 2012).

Los productos farmacéuticos son compuestos biológicamente activos esenciales para la prevención y el tratamiento de enfermedades, así como la protección de la salud pública, dentro de esta clasificación se incluyen también los medicamentos de uso veterinario (Anekwe *et al.*, 2017). El desarrollo de los productos farmacéuticos ha cambiado la manera en la que son abordados los problemas de salud, permitiendo controlar enfermedades que hasta entonces habían sido las causas principales de morbilidad y mortandad en el mundo (Aminov, 2010).

El desarrollo de la industria farmacéutica ha modificado las condiciones de vida, transformando los entornos sociales y económicos. Sin embargo, la facilidad con la que se puede acceder a este tipo de compuestos, sumado a la cantidad de

productos nuevos que son agregados a la ya larga lista de diferentes fármacos en el mercado también ha significado la contaminación del ambiente, por lo que han sido reconocidos como contaminantes emergentes importantes.

En 2012, el consumo global del sector farmacéutico fue de 1,043 millones de pesos siendo China (25.9%), Estados Unidos (18.2%), Japón (10.1%), Francia (4.7%) y Bélgica (4.2%) los principales consumidores, mientras que América Latina registró un porcentaje de 4.7% (secretaría de Economía de México, 2013). Actualmente se sabe que existen más de 4000 ingredientes farmacéuticos activos que son consumidos en el mundo; sin embargo, con la expansión de la población y los cambios demográficos, así como el aumento del poder adquisitivo de los países emergentes, se espera que incremente la demanda de atención sanitaria y con ello el uso de los productos farmacéuticos (Bernot *et al.*, 2016).

Los productos farmacéuticos son ingeridos o aplicados vía tópica, no obstante, solamente alrededor de un 10-90% es utilizado por el organismo, el resto es liberado ya sea como el compuesto original o en forma de metabolitos vía orina o por las heces fecales, llegando directamente a las aguas residuales (Hirsch *et al.*, 1999).

Existen otras vías de liberación de productos farmacéuticos al ambiente, por ejemplo, la aplicación de biosólidos o estiércol como fertilizantes para el suelo y la liberación accidental en los sitios de manufacturación de estas sustancias. La industria acuícola también representa una fuente importante de contaminación ya que la disposición de estos contaminantes en el agua ocurre directamente cuando los fármacos son aplicados en el agua o indirectamente cuando son suministrados a través del alimento de las especies acuáticas las cuales los metabolizan y los liberan en sus excretas. (Boxall *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2017).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen como propósito manejar los desechos que generamos como sociedad. Durante el proceso de tratamiento del agua residual, los compuestos orgánicos son degradados y removidos en las

primeras etapas, donde los flujos residuales son tratados con microorganismos, que actúan degradando los contaminantes y convirtiéndolos en biomasa, posteriormente esta biomasa (o lodo secundario) es sedimentada y separada del agua (Daughton y Ternes, 1999).

Sin embargo, en el caso de los residuos farmacéuticos, la mayoría de estos resisten la degradación microbiana, incluso, las concentraciones de algunos pueden ser más bajas que los límites inferiores para alcanzar la afinidad de las enzimas con el sustrato. En 1998, Ternes reporta que, para la mayoría de los fármacos polares, las tasas de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales son del 60 al 90%. Como resultado de esto, muchos compuestos farmacéuticos han sido detectados en los sistemas acuáticos en concentraciones que van desde $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Daughton y Ternes, 1999).

El primer reporte de la existencia de productos farmacéuticos en el ambiente se llevó a cabo en Kansas City, USA en 1976, donde fue detectada la presencia de ácido clofíbrico en concentraciones de 0.8 a $2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Garrison *et al.*, 1976), Posteriormente, un estudio realizado en el río Lee, el cual suministra agua potable en el Norte de Londres, encontró la presencia de 25 tipos de fármacos en concentraciones arriba de $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Richardson y Bowron 1985).

1.3. Toxicidad en el ambiente de los productos farmacéuticos: El caso de los antibióticos.

La presencia de estos compuestos en el ambiente es preocupante ya que existe muy poca información sobre qué ocurre con estos compuestos una vez que llegan al ambiente. En ese sentido, los productos farmacéuticos son compuestos biológicamente activos que actúan en pequeñas dosis sobre ciertos mecanismos enzimáticos, vías metabólicas o de señalización celular en organismos particulares (denominados organismos objetivo) (Wilkinson *et al.*, 2017). No obstante, muchos de estos mecanismos celulares han sido conservados por otros organismos a través

de la evolución por lo que estos se vuelven un blanco no objetivo sobre el cual puede actuar el fármaco cuando este se encuentra en el ambiente (Anekwe *et al.*, 2017).

En plantas como *Phaseolus vulgaris* L (Frijol común), *Glycine max* (Soya), *Medicago sativa* (Alfalfa) y *Zea mays* (Maíz) se encontró que su crecimiento y desarrollo se vio afectado por la presencia de antibióticos en el suelo (Jjemba 2002). De la misma manera, el crecimiento de avena, arroz y pepino se ve afectado por la presencia de antibióticos como sulfametoxazol, sulfametazina trimetoprima (Liu *et al.*, 2009).

Por otro lado, Robinson *et al.*, 2004 reportan que, la exposición a antibióticos de la familia de las Fluoroquinolonas tuvo un efecto en la mortalidad de diferentes organismos acuáticos, siendo que para *Daphnia magna* y *Pimephales promelas* no se observó un efecto significativo en concentraciones por debajo de los 10 mg·L⁻¹ para ninguno de los antibióticos, lo cual contrasta con lo reportado por *Microcystis aeruginosa* y *Lemna minor*, ambos organismos fotosintéticos, cuyas EC50s fueron de 7.9 a 1960 µg·L⁻¹ y 53 a 2470 µg·L⁻¹ respectivamente.

1.4. Macrólidos

Una de las familias más importantes de antibióticos orales es la de los macrólidos; en su estructura se caracterizan por presentar un anillo de lactona macrocíclico de 12, 14 o 16 átomos al que se une uno o varios azúcares neutros o básicos mediante enlaces glucosídicos (Figura 1). De manera general, los macrólidos son activos contra microorganismos Gram positivos como (*Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Listeria*, *Rhodococcus equi*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) algunos Gram negativos (*Moraxella spp.*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Gardnerella vaginalis*) y algunos protozoos son moderadamente sensibles (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium*).

Los macrólidos cumplen con su actividad antimicrobiana uniéndose de manera reversible a la subunidad 50s del ribosoma procarionte (Figura 1), específicamente en el túnel de salida del péptido naciente, cerca del centro catalítico del ribosoma (ARNr peptidil transferasa), lo que impide que continúe la elongación y provoca la liberación prematura del peptidil-tRNA (Dinos *et al.*, 2001).

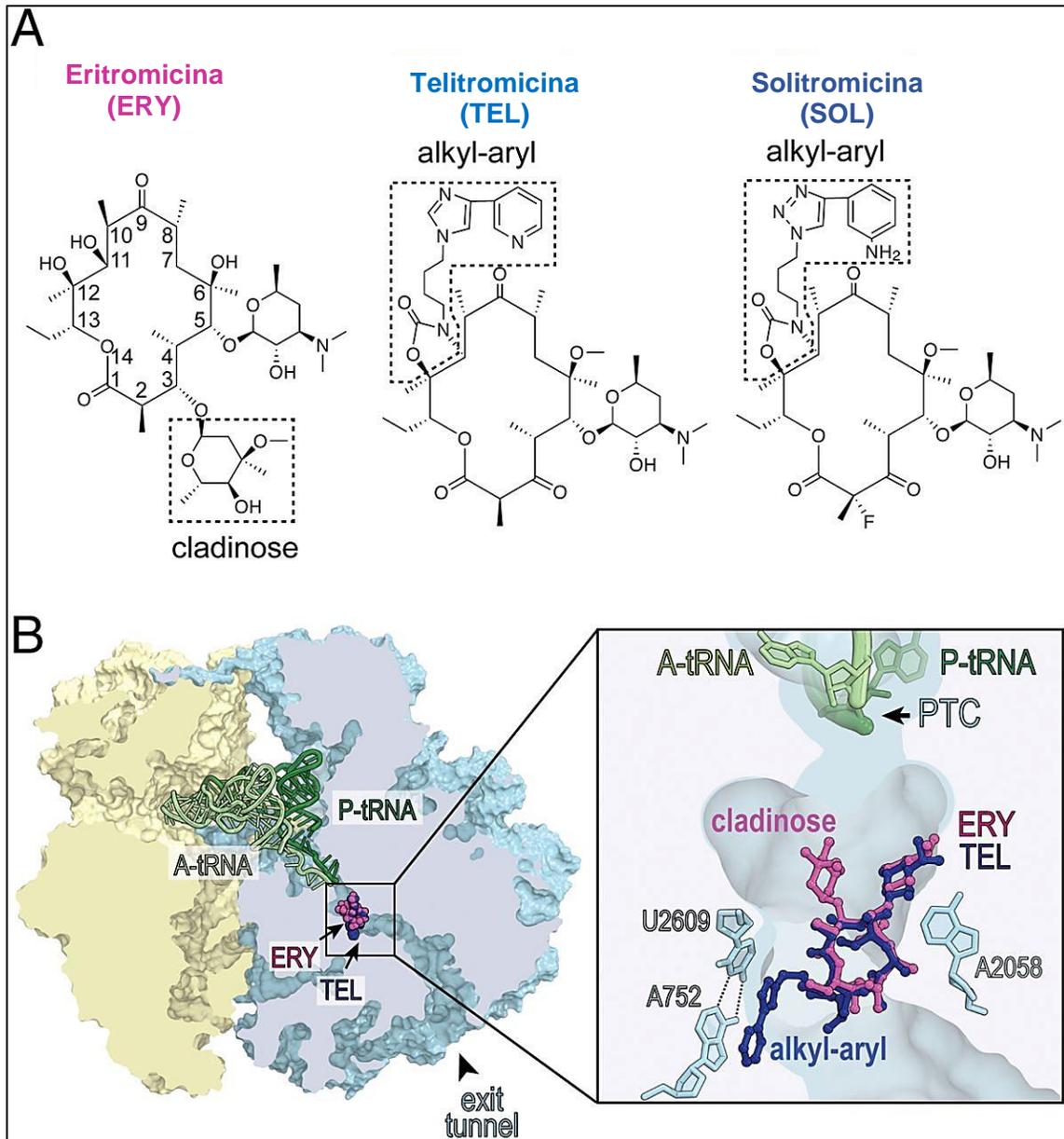


Figura 1. Sitio de unión de los macrólidos en el canal de salida de la subunidad grande del ribosoma 50S bacteriano (Tomado de Svetlov *et al.*, 2017). La Eritromicina interactúa principalmente con la base A2058 del rRNA 23S mediante puentes de hidrógeno.

El primer macrólido descubierto se obtuvo a partir de la cepa de *Streptomyces erythre* y se le denominó eritromicina A (Figura 2), a partir de este surgieron otros macrólidos como la claritromicina, fluritromicina, diritromicina y azitromicina (Flores, 2019).

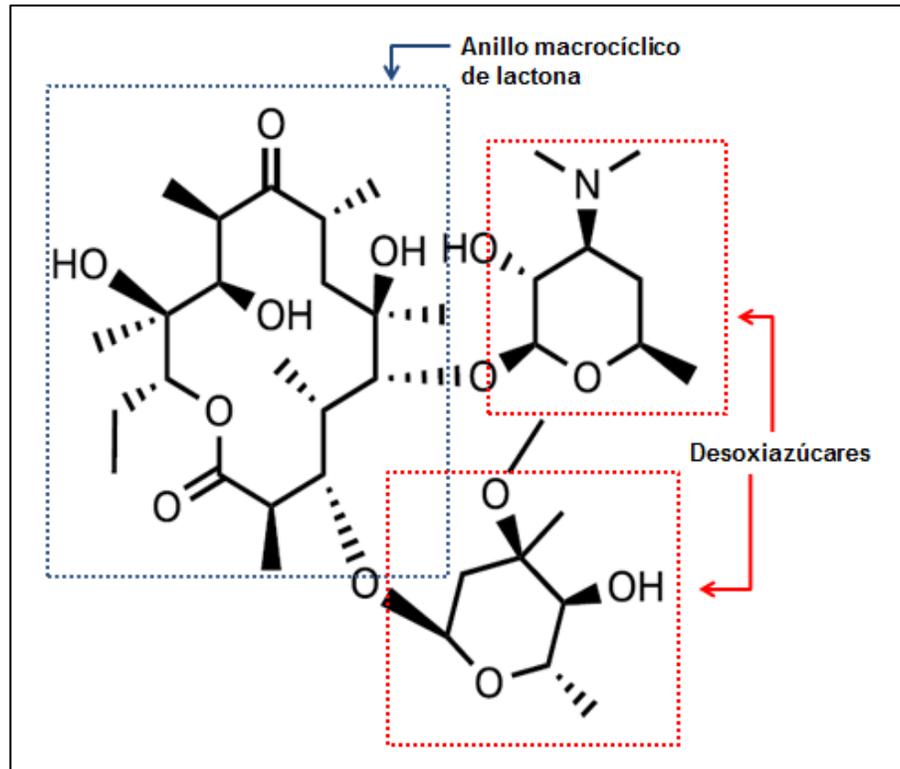


Figura 2 Estructura de la eritromicina.

En particular, eritromicina, claritromicina y azitromicina son los macrólidos más prescritos: la eritromicina es utilizada en pacientes alérgicos a la penicilina, ya que su espectro antimicrobiano es similar. La claritromicina es utilizada en infecciones respiratorias y de la piel, así como en el tratamiento contra *Helicobacter pylori* mientras que la azitromicina es más potente que la eritromicina contra ciertas especies de bacterias, principalmente Gram negativas (Salimi *et al.*, 2015).

1.5. Azitromicina

La azitromicina (AZM) es un antibiótico de amplio espectro antibacteriano, sintetizado en 1980 como un derivado semisintético de la eritromicina (Kobrehel *et al.*, 1982; Retsema *et al.*, 1987;) cuya estructura solo difiere en la incorporación de un radical metilo con un átomo de nitrógeno en el carbono 9 del anillo de lactona (Figura 3), el resultado de esta sustitución es una estructura de 15 átomos de carbono conocida como azálido (Parnham *et al.*, 2014).

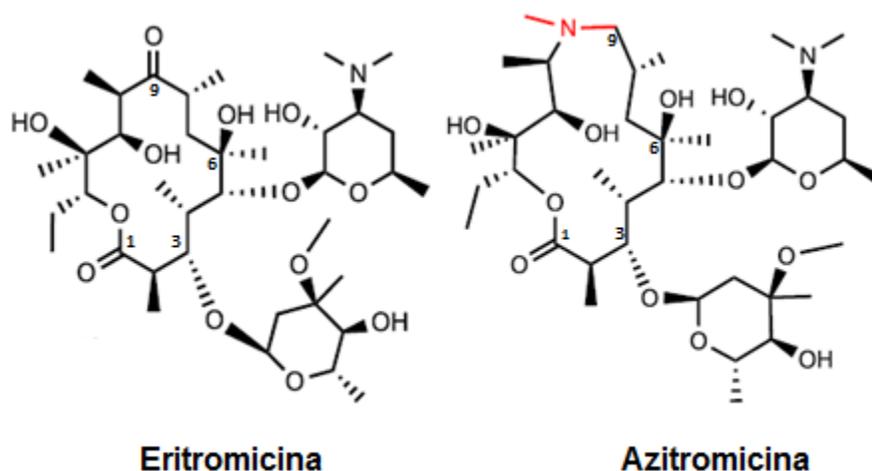


Figura 3. Modificaciones en la estructura química de azitromicina con respecto a eritromicina.

La azitromicina es un antibiótico bacteriostático, aunque también puede actuar como bactericida en concentraciones elevadas, comparte el mismo mecanismo de acción que otros macrólidos, inhibiendo la síntesis de proteínas uniéndose al canal de salida del polipéptido, cerca del Centro Peptidil Transferasa (PTC) en el RNA ribosomal 23S de la subunidad ribosomal 50S. Sin embargo, las modificaciones estructurales con respecto a la eritromicina (Figura 3) incrementan su basicidad, permitiendo que la penetración de la membrana sea más rápida y por tanto sea más efectiva la acumulación del fármaco en la bacteria, mejorando así su actividad contra bacterias Gram Negativas (Dinos *et al.*, 2001).

Es indicada para tratar enfermedades respiratorias, urogenitales, dérmicas y otras infecciones bacterianas, por lo que actualmente es considerado el antibiótico de amplio espectro más consumido en Norte América (Parnham *et al.*, 2014) así como uno de los antibióticos más prescritos en Estados Unidos junto con el ciprofloxacino y sulfametoxazol (Bhandari *et al.*, 2008) siendo que su producción es de 1500 toneladas anualmente en todo el mundo (Martens y Demain, 2017).

También es considerado como un contaminante emergente de importancia para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Vermillion y Tjeerdema, 2017). Una vez que se metaboliza en el cuerpo, alrededor del 85% es excretado en su forma bioactiva (Singer *et al.*, 2014), por lo cual su presencia en cuerpos de agua ha sido detectable. Comber *et al.*, (2018) cuantifican la concentración de ingredientes farmacéuticos activos en los efluentes e influentes de 40 Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el Reino Unido, en este estudio, azitromicina resultó ser uno de los antibióticos con menor eficiencia de remoción durante el proceso de tratamiento, además de que la concentración calculada en los efluentes del 80% de las Plantas de Tratamiento resultó ser más alta que la establecida en el marco regulatorio.

Existe poca información sobre la presencia de este compuesto como contaminante alrededor del mundo. En Barcelona, España, el análisis de aguas subterráneas demostró la presencia de azitromicina y otros 72 fármacos, encontrado que los antibióticos fueron los compuestos encontrados con mayor frecuencia y dentro de estos, la concentración de azitromicina fue de las más altas ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (López-Serna *et al.*, 2013). Otro estudio realizado demuestra la presencia de antibióticos en muestras de agua de un sistema canales internos en la rocas en Suiza entre los cuales se encontró azitromicina cuya concentración estaba en el orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (Morasch *et al.*, 2010).

Estimaciones sobre la vida media de la azitromicina se han realizado utilizando mezclas de biosólidos de aguas residuales con suelo calculando un aproximado de

entre 71 a 951 días (Gottschall *et al.*, 2012). Mientras que, de acuerdo con Vermillion y Tjeerdema (2017), la vida media de azitromicina utilizando un ambiente aeróbico simulado fue de 82.52 ± 56.54 días. Por otro lado, Gravicova *et al.*, 2014 examinaron la bioacumulación de 17 compuestos farmacéuticos en 2 organismos bentónicos, *Hydropsyche sp.* y *Erpobdella octoculata* colectados en el río Zivny en la Republica Checa, reportando que azitromicina fue el compuesto encontrado en mayor concentración (85-40 ng-g⁻¹ de peso seco) en las muestras de tejido homogenizado de *Hydropsyche sp.*

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto tóxico de los antibióticos en las microalgas.

Las algas y las cianobacterias son parte vital en la cadena trófica de los sistemas acuáticos, por lo que modificaciones en su población pueden resultar en un desbalance en el ecosistema. En este sentido, es importante evaluar el impacto que los antibióticos presentes en el medio pueden tener sobre las poblaciones de estos organismos. Muchos estudios se han realizado con ese propósito, encontrado que precisamente las algas y cianobacterias son organismos altamente sensibles (Välitalo *et al.*, 2017).

De acuerdo con la bibliografía, las microalgas y cianobacterias son sensibles a antibióticos como quinolonas, sulfonamidas, macrólidos, penicilinas y tetraciclinas, Robinson *et al.* (2005) probaron el efecto de 5 antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas en la mortalidad de 5 organismos acuáticos: *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalga), *Microcystis aeruginosa* (cianobacteria), *Lemna minor* (Lenteja de agua), *Daphnia magna* (pulga de agua) y *Pimephales promelas* (Carpita cabezona), encontrando que para *Daphnia magna* y *Pimephales promelas* no se observó un efecto significativo en concentraciones por debajo de los 10 mg·L⁻¹ para ninguno de los antibióticos, lo cual contrasta con lo reportado para *Microcystis*

aeruginosa y *Lemna minor*, ambos organismos fotosintéticos, cuyas EC₅₀s fueron de 7.9 a 1960 µg·L⁻¹ y 53 a 2470 µg·L⁻¹ respectivamente.

De la misma manera, Halling-Sorensen (2000) estudió el efecto de 9 antibióticos, entre ellos algunos inhibidores de la síntesis de proteínas como: Espiramicina y Tilosina (macrólidos), Clortetraciclina y Tetraciclina (tetraciclinas) y Estreptomina (aminoglucósido), en el crecimiento y el contenido de clorofila de *Microcystis aeruginosa* y *Selenastrum capricornutum*. De ellas, los valores de EC₅₀ para la mayoría de los antibióticos fueron de 2 a 3 veces más pequeños para la cianobacteria en comparación a la especie de microalga *S. capricornutum*.

Las mitocondrias y los cloroplastos son estructuras intracelulares que han evolucionado a partir de un procarionte aeróbico y un procarionte fotosintético respectivamente, los cuales formaron una relación simbiótica con un organismo eucarionte. Aunque estos organelos han experimentado modificaciones, ambos mantienen su material genético y su maquinaria de transcripción y traducción, los cuales aún poseen las características procariontes. En ese sentido, el origen de estos organelos y las características procariontes, que han sido conservadas a lo largo de la evolución, convierte a los organismos fotosintéticos objetivos potenciales de ciertos antibióticos, como los inhibidores de la síntesis de proteínas (Välitalo et al., 2017).

Se ha demostrado que los inhibidores de la síntesis de proteínas interfieren en las vías metabólicas que ocurren en los cloroplastos de las microalgas (Liu et al., 2011), tal como lo reportado para *Pseudokirchneriella subcapitata*, en la que se probaron varios tipos de antibióticos, encontrando que la eritromicina era altamente tóxica para esta especie, con una EC₅₀ de 0.35 mg·L⁻¹. Al igual que la claritromicina y su metabolito 14-hidroxi(R)-claritromicina, los cuales afectan el crecimiento de *Desmodesmus subspicatus* con valores de EC₁₀ de 23-28 mg·L⁻¹ (Baumann et al., 2015).

De igual manera, Liu *et al.*, 2011 encontraron que la eritromicina tiene mayor efecto tóxico sobre el aparato fotosintético que ciprofloxacino y sulfametoxazol en *Selenastrum capricornutum* mencionando que el efecto puede ocurrir en la traducción de genes en los cloroplastos, afectando la síntesis de ciertas proteínas presentes en las membranas tilacoidales como el centro de reacción del Fotosistema II (PSII) y el complejo del citocromo b₆f (Cit b₆f).

2.2 La fluorescencia de la clorofila a como herramienta para medir el efecto de contaminantes sobre la fotosíntesis.

Durante la fotosíntesis, la luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos de los complejos antena es transferida hacia las clorofilas del núcleo de los centros de reacción de los fotosistemas I y II (PSI y PSII), en donde es utilizada para llevar a cabo el trabajo químico. Cuando la energía de los pigmentos en los complejos antena es transferida a las clorofilas de los centros de reacción de PSII, un electrón de estas moléculas pasa de un estado basal a un estado de mayor energía, quedando así las moléculas de clorofila en estado excitado, con tendencia a perder su electrón antes de regresar a su estado basal. La molécula de clorofila excitada cede su electrón a un aceptor intermediario, la feofitina (Pheo), de esta manera, la clorofila queda en un estado oxidado (Chlo⁺ a) y la feofitina en un estado reducido (Pheo⁻), a esto se le conoce como separación de cargas y es el evento fotoquímico primario (Maxwell y Johnson, 2000).

A intensidades bajas de irradiación, del total de la energía absorbida por los complejos antena, alrededor de un 70% es utilizada para llevar a cabo trabajo fotoquímico útil, otra pequeña parte de la energía es disipada como calor (25%) y otra aún más pequeña es reemitida como energía luminosa de menor energía llamada fluorescencia (5%). Estos 3 procesos ocurren simultáneamente, por lo que la energía se reparte entre estos al mismo tiempo, de manera que, si la eficiencia de un proceso aumentara, la eficiencia en los otros dos disminuirá (González-Moreno *et al.*, 2008; Maxwell y Johnson, 2000).

Si la separación de cargas no ocurre, las moléculas de clorofila liberan el exceso de energía como calor (95-97%) y como fluorescencia (2.5-5.0%). La emisión de fluorescencia a temperatura ambiente es un evento exclusivo de la clorofila *a* y ocurre en mayor parte por PSII (a temperatura ambiente, PSI contribuye en un porcentaje muy bajo al total de la fluorescencia por lo que no es considerado en los modelos de la fotoquímica primaria). La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* cambia constantemente en función de factores ambientales como, la intensidad de irradiación, la temperatura, niveles hídricos, la salinidad, deficiencias nutricionales o presencia de contaminantes ya que estos pueden afectar la función del PSII principalmente. De esta manera, el análisis de la emisión de fluorescencia por la clorofila *a*, puede ser utilizado para obtener información acerca de la respuesta de los organismos fotosintéticos a eventos de estrés (González-Moreno *et al.*, 2008).

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* es una técnica no invasiva y altamente sensible que se puede realizar en un periodo corto de tiempo (Acosta, 2016). El cambio en la emisión de la fluorescencia en el tiempo ha sido denominado efecto de Kautsky, el cual consiste en una fase rápida de incremento de la fluorescencia (dura menos de un segundo) y una fase lenta de decaimiento. La fase de incremento rápida ocurre cuando una muestra adaptada a la oscuridad es expuesta a un pulso de luz de saturante de manera continua, en este momento, la fluorescencia aumenta rápidamente desde el mínimo (O) al máximo (P) nivel. Seguido de esto ocurre la fase de decaimiento lenta, donde la fluorescencia disminuye hasta alcanzar el estado T (Maxwell y Johnson, 2000; González-Moreno *et al.*, 2008).

La fase de incremento rápida ocurre en alrededor de 100 ms y al graficarla en tiempo logarítmico pueden observarse 4 fases o inflexiones denominadas OJIP, las cuales han sido explicadas en términos del transporte electrónico (Strasser y Strasser, 1995) y están relacionadas con el estado redox del primer aceptor, Q_A , y de los acarreadores de electrones en PSII y PSI. La primera fase, denominada O, ocurre a los 50 μ s y corresponde a la fluorescencia mínima (F_o) en la que todos los centros

de reacción se encuentran abiertos, ya que el primer aceptor se encuentra en estado oxidado. La fase (J) se presenta a los 2 ms y ocurre por la reducción del primer aceptor de electrones Q_A . La fase I ocurre a los 20 ms y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . La fase P se presenta cuando la fluorescencia alcanza su punto máximo, se denomina F_M , y cuando el pulso de luz es saturante, se considera que se alcanza en un tiempo cuando todos los acarreadores de la cadena transportadora de electrones fotosintética se encuentran reducidos. Adicionalmente entre las inflexiones O y J puede presentarse una inflexión denominada K, la cual está relacionada con la actividad del complejo liberador de oxígeno (CLO), en el fotosistema II. Esta fase se encuentra “cubierta” por la fase de O-J, y se observa bajo condiciones de estrés que afecten el fotosistema II (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008).

Seguida de la fase rápida de aumento de la fluorescencia, ocurre la fase de decaimiento, el decaimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* en PSII se relaciona con la actividad fotoquímica (decaimiento fotoquímico) y ocurre principalmente por la reoxidación de Q_A^- y, por tanto, la apertura de los centros de reacción que disminuyen su emisión de fluorescencia. Sin embargo, otros eventos no fotoquímicos pueden también estar relacionados con el decaimiento de la fluorescencia (decaimiento no fotoquímico). De esta manera, para evaluar la actividad fotoquímica de PSII es necesario distinguir la participación de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos en el decaimiento de la fluorescencia (Strasser y Strasser, 1995; Maxwell y Johnson, 2000; González-Moreno *et al.*, 2008).

Perales-Vela *et al.* (2016) utilizan la fluorescencia de la clorofila *a* para evaluar el estado del transporte electrónico durante la fotosíntesis en células de *Chlorella vulgaris* expuestas a estreptomycin en concentraciones de 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4 mg·L⁻¹, encontrando que la presencia de este compuesto en el medio disminuye el rendimiento cuántico potencial para llevar a cabo la fotoquímica primaria en células adaptadas a la oscuridad (Φ_{PSII}), el rendimiento cuántico operacional en células adaptadas a la luz (Φ_{PSIIop}) la probabilidad de que un

electrón sea transportado después de $Q_A^-(\psi_0)$ y el rendimiento cuántico para el transporte electrónico (Φ_{Eo}). De igual manera, encuentran que altas concentraciones del antibiótico, inducen una disminución en la disipación de energía mediante procesos no fotoquímicos.

Por otro lado, Deng *et al.* (2014) evalúan el efecto de eritromicina en la actividad fotoquímica de PSI y PSII en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, encontrando que la presencia del antibiótico en el medio ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) provoca una disminución del 55% en el producto cuántico para llevar a cabo la fotoquímica del PSII (Φ_{PSIIop}) el cual va acompañado por un aumento (18%) en la fracción de energía que se disipa como calor o como fluorescencia (NPQ). De igual manera, el producto cuántico efectivo de PSI (Φ_{PSI}) disminuye en presencia del compuesto, sin embargo, esta disminución está asociada a que el transporte de electrones del lado donador de PSI se encuentra limitado.

2.3 Problemática en México.

El uso racional de los medicamentos ha sido promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde la década de los ochenta. Sin embargo, es hasta los 2000 que se empiezan a crear políticas y estrategias para prevenir el uso irracional de medicamentos. En 2006, la Asamblea mundial de la Salud (2006) recomienda a los países miembros a invertir recursos para abordar esta problemática (Dreser *et al.*, 2008)

Los antimicrobianos se encuentran entre los productos farmacéuticos que más se venden y más se consumen en México, principalmente los que están relacionados con el tratamiento de infecciones respiratorias agudas (IRAS) e infecciones gastrointestinales/diarreicas agudas (EDAS). Actualmente, la venta de medicamentos se encuentra regulada en la ley general de la Salud la cual señala necesaria la prescripción médica en la venta de medicamentos del grupo IV, entre los cuales se encuentran los antibióticos (Dreser *et al.*, 2008).

Sin embargo, la autoatención y automedicación son formas comunes de tratar los problemas de salud en la población mexicana lo que lleva muchas veces a la eliminación incorrecta de los productos farmacéuticos no consumidos (Jáuregui-Medina, 2015). El manejo ambiental de los residuos generados por la industria farmacéutica se encuentra previsto en la Legislación Mexicana. En el Reglamento de la ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos y la Ley General para la prevención y Gestión Integral de los Residuos, señalan que los residuos provenientes de la industria farmacéutica deben tener un manejo ambientalmente responsable por parte de los fabricantes.

Al mismo tiempo, los procesos de saneamiento de las aguas residuales en México no responden a las necesidades de la población, ya que solamente el 5% de las plantas de tratamiento existentes operan de manera satisfactoria, siendo que la mayoría de las plantas de tratamiento no eliminan ni disminuyen la concentración de muchos compuestos tóxicos. Además de que se calcula que alrededor del 47% del agua residual en México no recibe ningún tratamiento (Robledo *et al.*, 2017).

Como resultado de esto, se ha registrado la presencia de productos farmacéuticos en diferentes cuerpos de agua en la República Mexicana. Gibson *et al.* (2007), por ejemplo, detectan la presencia de ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco como contaminantes persistentes en aguas tratadas que eran reusadas para la irrigación en el Valle de Tula. Mientras que Siemens *et al.* (2008) registran la presencia de 11 productos farmacéuticos dentro de los cuales destacan naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco en el Valle de Mezquital. También se ha encontrado la presencia de ácido salicílico, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno y gemfibrozil en aguas superficiales y subterráneas de la Ciudad de México (Félix-Cañedo *et al.*, 2013). Un estudio más reciente realizado en aguas residuales de un hospital en la ciudad de Toluca, México reportó la presencia de fármacos como glibenclamida y metformina (Antidiabéticos), penicilina G y penicilina V (betalactámicos) diclofenaco,

ibuprofeno y naproxeno (antiinflamatorios no esteroidales) en concentraciones de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Pérez-Alvarez *et al.*, 2018).

No obstante, solo la Unión Europea ha reconocido a los macrólidos como contaminantes emergentes. En México, por el contrario, la situación es muy diferente pues ninguna de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en materia ambiental reconocen a los antibióticos como contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas nacionales (NOM-001-SEMARNAT-2021), en las descargas de aguas residuales en los sistemas de alcantarillado (NOM-002-SEMARNAT-1996) y en las aguas residuales destinadas a reúso (NOM-003-SEMARNAT-1997).

Sin embargo, aún es poca la información con la que se cuenta en México sobre la presencia de estos contaminantes en el ambiente lo cual dificulta el establecimiento de un marco regulatorio que vigile específicamente los riesgos ambientales de los fármacos, o que incluya estudios de monitoreo ambiental como un requerimiento para el registro de nuevos compuestos.

2.4 Biología General: Familia Scenedesmaceae

La familia Scenedesmaceae es un grupo de clorófitas ampliamente distribuido a nivel mundial, y se reporta en diferentes ambientes en las aguas continentales mexicanas (Ortega, 1984). Es uno de los grupos de algas de agua dulce más comunes; sin embargo, las morfologías extremadamente diversas que se encuentran dentro de las especies dificultan la identificación. Pueden existir como unicélulas; también se encuentran con frecuencia en cenobios de cuatro u ocho, incluyen patrones lineales, costulatoideos, irregulares, alternos o dactilococos. La formación del cenobio depende de varios factores. En ciertas circunstancias, a razón de las condiciones de deficiencia de nitrógeno, pueden formar zooides, los cuales pueden fusionarse y llevar a cabo fusión gamética (Edwar, 1989).

Se han encontrado una mayor proporción de organismos unicelulares a altas intensidades de luz y altas temperaturas. Por el contrario, la formación de cenobios grandes con células de mayor tamaño ha sido observada como una estrategia para evitar el pastoreo por el zooplancton (Lüring, 2003) El crecimiento y la división exitosos de las algas se basan en un equilibrio entre mantener la flotabilidad en la zona eufótica (que contiene luz y condiciones nutricionales ideales) y evitar el pastoreo de depredadores. Las colonias más grandes tienen una menor proporción de superficie a volumen, lo que limita la absorción de nutrientes y la recolección de luz, y la gran masa promueve el hundimiento. Sin embargo, en presencia de herbívoros, como *Daphnia*, que amenazan con consumir algas unicelulares, las colonias más grandes brindan una seguridad significativa. Esta amenaza puede ser tan importante que las células se fusionarán en estas colonias de 8 células incluso en condiciones de crecimiento muy limitadas para reducir la vulnerabilidad al pastoreo o en condiciones de agotamiento de nutrientes (Trainor, 1998; Flores, 1999).

La familia Scenedesmaceae ha sido usada en investigaciones de fisiología de plantas (Van Den Hoek, 1995), en estudios de genética y en el análisis de las respuestas de sus células a sustancias químicas (Flores, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de productos farmacéuticos, así como la introducción al mercado de nuevos fármacos es una práctica creciente y constante que surge de la necesidad de mejorar la calidad de vida de la sociedad. Esta demanda ha supuesto la introducción constante y poco controlada de estas sustancias al ambiente durante muchos años, sin considerar el riesgo que estas especies químicas suponen para los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos.

En México, la situación no es diferente, ya que dentro del marco que regula la disposición de contaminantes (NOM-001-SEMARNAT-2021), no se considera la

evaluación de los fármacos. Debido a esto, es importante la realización de investigaciones que permitan generar conocimiento sobre los efectos negativos de estos compuestos en el ambiente y así enfatizar sobre la importancia de incluirlos dentro del marco regulatorio, así como de implementar estrategias para la correcta disposición de estas sustancias.

4. HIPÓTESIS

La exposición a azitromicina afectará la síntesis de proteínas cloroplásticas de *Tetrademus incrassatulus*, reduciendo el proceso fotosintético, lo cual se verá reflejado en la disminución del crecimiento.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- a) Caracterizar la respuesta fisiológica de *Tetrademus incrassatulus* creciendo en presencia de azitromicina.

5.2. Objetivos particulares

- a) Evaluar diferencialmente el crecimiento de *Tetrademus incrassatulus* expuesta a diferentes concentraciones de azitromicina.
- b) Analizar comparativamente el contenido específico de pigmentos fotosintéticos de *Tetrademus incrassatulus* expuesta a diferentes concentraciones de azitromicina.
- c) Determinar comparativamente la actividad fotosintética y respiratoria por liberación y consumo de oxígeno de *Tetrademus incrassatulus* expuesta a azitromicina.
- d) Determinar la actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de *Tetrademus incrassatulus* expuesta a azitromicina

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Organismo

Se utilizó el alga verde *Tetrademus incrassatulus* (Phylum Chlorophyta, Orden Sphaeropleales, Familia Scenedesmaceae) donada por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

El género *Tetrademus incrassatulus* fue descrito Tsarenko (2001). Este nombre se considera actualmente como sinónimo de *Tetrademus incrassatulus* (Bohlin) Wynne (2016). La clasificación del organismo utilizado en esta investigación es la siguiente:

Tetrademus incrassatulus (Hegewald) Tsarenko, 2001

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrarreino	Chlorophyta infrarreino
Filo	Chlorophyta
Subfilo	Chlorophytina
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Género	<i>Tetrademus</i>

6.2 Medio de cultivo

Los cultivos semilla y los tratamientos experimentales fueron cultivados autotróficamente en el medio de cultivo PCG. Los experimentos se realizaron utilizando cultivos axénicos de la microalga *Tetradismus incrassatulus*. Las células se crecieron en cultivos discontinuos en lote utilizando el medio mineral PCG, que contenía por litro: 250 mg de NaNO₃; 30 mg de Ca(NO₃).4H₂O; 40 mg de K₂HPO₄; 30 mg de MgCl₄.7H₂O; 4,98 mg de FeSO₄.7H₂O, 25 mg de NaCl; 0,309 mg de H₃BO₃; 0,118 mg de MnSO₄.4H₂O; 0,143,7 mg de ZnSO₄.7H₂O, 0,0204 mg; Na₂MoO₄.2H₂O; 0.156 mg CuSO₄.5H₂O, 0.1404 mg Co(NO₃)₂.6H₂O, pH 6.5 (Perales-Vela *et al.*, 2016), bajo las siguientes condiciones de: temperatura (20-25°C), iluminación (200 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), fotoperiodo (12/12 luz/oscuridad) y flujo de aire (200 ml·m⁻¹).

6.3 Protocolo experimental

La evaluación del efecto de azitromicina (Macrozit, Laboratorios Liomont S.A. de C.V ®) en el metabolismo de *T. incrassatulus* se realizó 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 cianobacterias (OECD, 2004). Para esto se consideró como unidad experimental a botellas de vidrio cuadradas de 500 ml (Schott-Duran ®) inoculadas con células de *T. incrassatulus* (sincronizadas en la mitad de la fase exponencial, con 72 h de cultivo aproximadamente) ajustadas a un volumen total de 250 ml con Medio PCG (Perales-Vela *et al.*, 2007), todas las unidades experimentales estaban ajustadas a 0.1 unidades de absorbancia a 750nm.

Bajo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de azitromicina: 0 (testigo), 40, 80, 120,

160, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante 72 h según lo indicado en el protocolo de la OECD (1984), para después determinar las siguientes variables de respuesta:

6.4 Variables de respuesta

6.4.1. Crecimiento

El crecimiento se determinó por peso seco, se tomaron alícuotas de 50 ml de cada muestra experimental ($n=3$) y se filtraron por vacío en membranas de nitrocelulosa de $5.0\mu\text{m}$ de diámetro de poro (Millipore $\text{\textcircled{R}}$). Previamente, las membranas se llevaron a peso constante manteniéndolas a 70°C por 24 h. Una vez filtradas las muestras se secaron en horno a 70°C por 48 h, para después determinar el peso seco utilizando una balanza analítica. Se determinó la tasa de crecimiento relativo (μ) y el tiempo de duplicación celular (td) de acuerdo con las siguientes fórmulas (Organización Internacional de Normalización [ISO], 2012)

$$\mu = \frac{\ln \text{peso final} - \ln \text{peso inicial}}{\text{tiempo inicial} - \text{tiempo final}}$$

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

6.4.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos: clorofilas y carotenoides

El contenido específico de pigmentos fotosintéticos por biomasa seca se cuantificó tomando muestras de 2 ml por cada tratamiento ($n=4$), las cuales se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Las pastillas obtenidas fueron resuspendidas cada una en 3 ml de metanol al 100% y posteriormente fueron agitadas vigorosamente durante 1 min con ayuda de un vortex. La muestra se incubó a 60°C por 10 min y después se centrifugó nuevamente a 3500 rpm por 5 min. Se recuperó el sobrenadante de cada muestra y se ajustó el volumen de cada una a 3 ml con metanol al 100% para después obtener las absorbancias (666, 653 y 470nm de longitud de onda) con ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS marca Perkin Elmer, modelo Lambda25. La concentración de clorofila *a* (*Chlo a*), clorofila *b* (*Chlo b*) y carotenoides totales (*Cars*) se determinó según las siguientes fórmulas reportadas por Wellburn (1994).

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

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

$$\text{Cars}(\mu\text{g/ml}) = \frac{(1000 * \text{ABS}_{470}) - (2.86 * [\text{Clorofila a}]) - (129.2 * [\text{Clorofila b}])}{221}$$

6.4.3. Determinación de la actividad fotosintética y respiratoria por oximetría

Para determinar la actividad fotosintética y respiratoria por oximetría se tomaron cuatro muestras de cada tratamiento, lo equivalente a una absorbancia de 0.6 (750nm). Las muestras se centrifugaron durante un minuto a 3000 rpm y la pastilla obtenida fue suspendida en 1 ml de medio de cultivo fresco PCG, saturado de oxígeno y a una temperatura de 30°C (Perales- Vela *et al.*, 2007).

La tasa de liberación y consumo de oxígeno de cada muestra se determinó utilizando un oxímetro (Oxygraph, Hansatech ®, U.K.) manteniendo la temperatura de la cámara a 30°C con ayuda en un baño de agua circulante. Para determinar la tasa de liberación de oxígeno fotosintético, se iluminó la muestra con una luz roja (600nm), y un flujo fotónico de $230\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 1 minuto. Posteriormente se apagó la luz y se registró la velocidad de consumo de oxígeno respiratorio por 1 minuto.

Se obtuvieron los valores de las velocidades de consumo y liberación de oxígeno de cada registro y se graficaron en relación con el contenido de clorofila total en el volumen de muestra tomado. De esta manera la tasa fotosintética y respiratoria se expresaron como los nanomoles de O₂ por mg de clorofila total liberados o consumidos por minuto (nmoles O₂/mg Chl total·min) (Perales-Vela *et al.*, 2016).

6.4.4. Determinación de la actividad fotosintética por emisión de fluorescencia

Cinética rápida de la fluorescencia: Prueba OJIP

Para medir la actividad fotosintética por emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila *a* en el Fotosistema II (PSII), se tomaron 15 muestras de 2 ml de cada tratamiento (n=15) ajustadas a 0.6 unidades de absorbancia (750nm) las cuales fueron acondicionadas a la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

Se utilizó un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK) con el cual se irradió cada muestra acoplada a la oscuridad con una luz roja saturante (λ 600 nm, $3000\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm presente en el fluorómetro permitió registrar la fluorescencia emitida a 750nm por la clorofila *a* del centro de reacción de PSII de manera que los valores de: Fluorescencia mínima ($F_0=50\mu\text{s}$), Fluorescencia máxima ($F_m=200\mu\text{s}$) y, Fluorescencia Variable ($F_v= F_m-F_0$) fueron registrados directamente del equipo.

Para interpretar los datos y obtener otros parámetros se utilizó el programa Handy-PEA desarrollado por la misma compañía (Hansatech, UK) y Bolizer-HP3 el cual fue diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra. Suiza. La interpretación de los datos se realizó según el análisis OJIP (Van Heerden *et al*, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (Prueba OJIP) (Van Herenden *et al.*, 2004)

PARAMETROS PARA EL ANÁLISIS DE LA FASE RÁPIDA DE LA FLUORESCENCIA	
Señales registradas durante la fase rápida de la fluorescencia	
F_0	Fluorescencia mínima (50 μ s)
F_K	Fluorescencia en la inflexión K (300 μ s)
F_J	Fluorescencia en la inflexión J (2ms)
F_I	Fluorescencia en la inflexión I (20ms)
F_M	Fluorescencia máxima
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescencia variable
$V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$	Fluorescencia variable a los 2ms
$M_0 = (F_K - F_0) / (F_M - F_0)$	Pendiente desde el origen de la fluorescencia
Flujos específicos expresados por centro de reacción RC	
$ABS/RC = (M_0 / V_J) / (1 - F_0 / F_M)$	Absorción por RC
$TR_0/RC = M_0 / V_J = (ABS/RC) \phi_{P_0}$	Atrapamiento al tiempo 0 por RC
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Disipación al tiempo 0 por RC
$ET_0/RC = (TR_0/RC) \psi_0$	Transporte electrónico al tiempo 0 por RC
Eficiencias cuánticas	
$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = (F_M - F_0) / F_M$	Producto cuántico máximo potencial para llevar a cabo la fotoquímica primaria
$\phi_{D_0} = DI_0/ABS = 1 - \phi_{P_0} = F_0 - F_M$	Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica (Relajación térmica)
$\psi_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A
$\phi_{E_0} = \phi_{P_0} \cdot \psi_0 = (TR_0/ABS)(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_M)(1 - V_J)$	Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII
Índices vitales	
PI_{ABS}	Índice de rendimiento para la conservación de energía para la reducción de los acarreadores electrónicos

6.4.5. Análisis de la fase lenta (Decaimiento) de la fluorescencia: Método de pulsos de amplitud modulada (PAM)

Para determinar la eficiencia cuántica para llevar a cabo el transporte de electrones, así como el decaimiento no fotoquímico, se utilizaron tapetes celulares, los cuales se obtuvieron filtrando un volumen de células a través de membranas de nitrocelulosa (5µm de poro), las cuales tenían la misma densidad óptica de 0.6. Cada tapete celular se colocó en una pinza en la cual se ajustó la fibra óptica. Las muestras se mantuvieron a la oscuridad durante 5 min a temperatura antes de la determinación de la actividad fotosintética.

Las determinaciones se realizaron en un equipo de fluorescencia (FMS-Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K.). Para inducir la fluorescencia se aplicó primeramente un pulso de luz modulada ($0.1 \mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^2$) con el fin de obtener la fluorescencia mínima (F_0), posteriormente se aplicó un pulso de luz saturante ($10,000 \mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^2$) por 0.7 seg, para inducir la fluorescencia máxima (F_M), se permitió la relajación por 5 minutos después del pulso saturante y en seguida se encendió a luz actínica ($215 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) por 240s, para después tomar el valor de la fluorescencia en el estado estacionario (F_S), se aplicó nuevamente un pulso de luz saturante para obtener el valor de la fluorescencia máxima en células adaptadas a la luz (F_M'), posteriormente se apagó la luz actínica y se encendió la luz infrarroja para así obtener el valor de fluorescencia mínima en muestras adaptadas a la luz (F_0').

En la tabla 2 se describen las fórmulas utilizadas por Maxwell y Johnson (2000) para calcular los parámetros para el análisis del decaimiento de la fluorescencia. Una vez obtenidos los valores de F_0 , F_M , F_S , F_M' y F_0' se calculó el rendimiento cuántico operacional de PSII (Φ_{PSII}) así como la tasa de transporte electrónico aparente (ETR) y el decaimiento no fotoquímico (qNP).

Tabla 2. Parámetros para el análisis del decaimiento de la fluorescencia (Maxwell y Johnson 2000)

PARAMETROS PARA EL ANALISIS DEL DECAIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA	
Señales registradas durante la fase de decaimiento	
F_0	Fluorescencia mínima en muestras adaptadas a la oscuridad
F_M	Fluorescencia máxima en muestras adaptadas a la oscuridad
F_S	Fluorescencia en el estado estacionario
F_M'	Fluorescencia máxima en muestras adaptadas a la luz(20ms)
F_0'	Fluorescencia mínima en muestras adaptadas a la luz
Parámetros calculados	
$\Phi_{PSII_{op}} = F_M - F_S / F_M'$	Rendimiento cuántico operacional de PSII en muestras adaptadas a la luz
$ETR = (\Phi_{PSII}) (PAR)$	Tasa de transporte electrónico aparente
$qNP = (F_M - F_M') / (F_M - F_0)$	Decaimiento no fotoquímico

6.4.6. Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos fueron procesadas utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA), de un factor, así como la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS (SAS program, USA, ver. 9).

7. RESULTADOS

7.1. Crecimiento

La presencia de azitromicina en el medio de cultivo afecta significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de *T. incrassatulus*, lo cual se ve reflejado en la reducción de la biomasa a las 72 horas de haber aplicado el tratamiento y ocurre conforme aumenta la concentración del antibiótico en el medio de cultivo. En la concentración más elevada de azitromicina ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) la biomasa disminuye un 66.3% comparada con el control sin antibiótico (Figura 4).

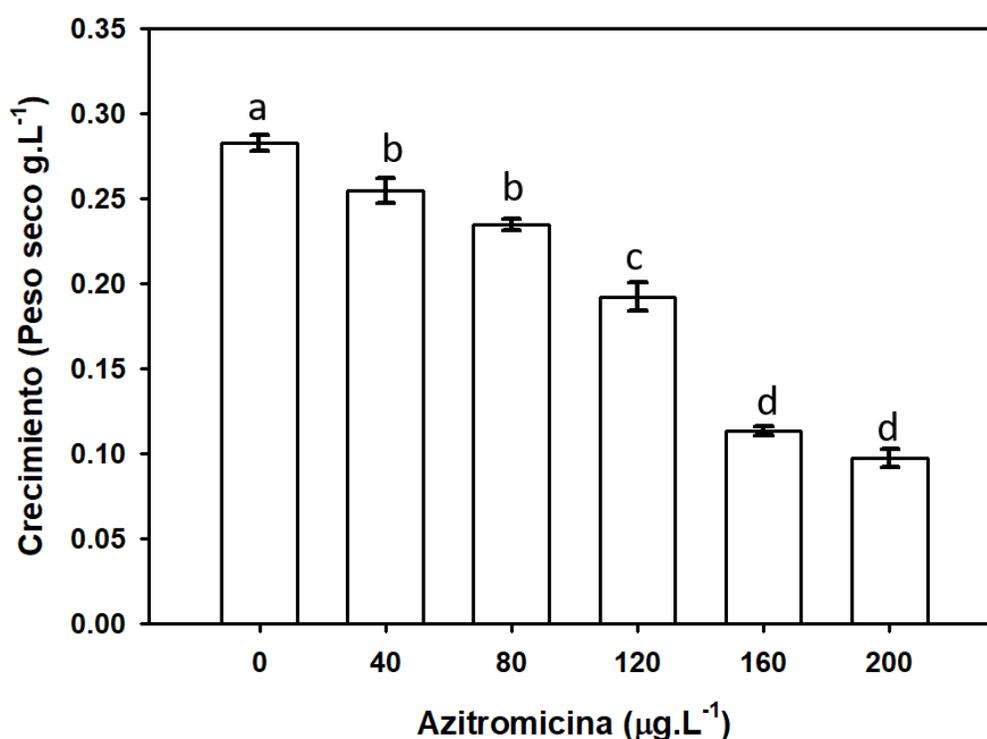


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el crecimiento de *T. incrassatulus* expresado en peso seco 72 h después de la aplicación del compuesto (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

El mismo patrón se observa en la tasa de crecimiento calculada por día (μ), la cual disminuye significativamente ($p < 0.05$) conforme aumenta la concentración del compuesto, siendo que la concentración más alta provoca que se reduzca un 44% en comparación al control. Por otro lado, la tasa de crecimiento obtenida para las concentraciones más bajas ($40 \mu\text{g.L}^{-1}$) y ($80 \mu\text{g.L}^{-1}$) no difieren significativamente con respecto al control (Figura 5).

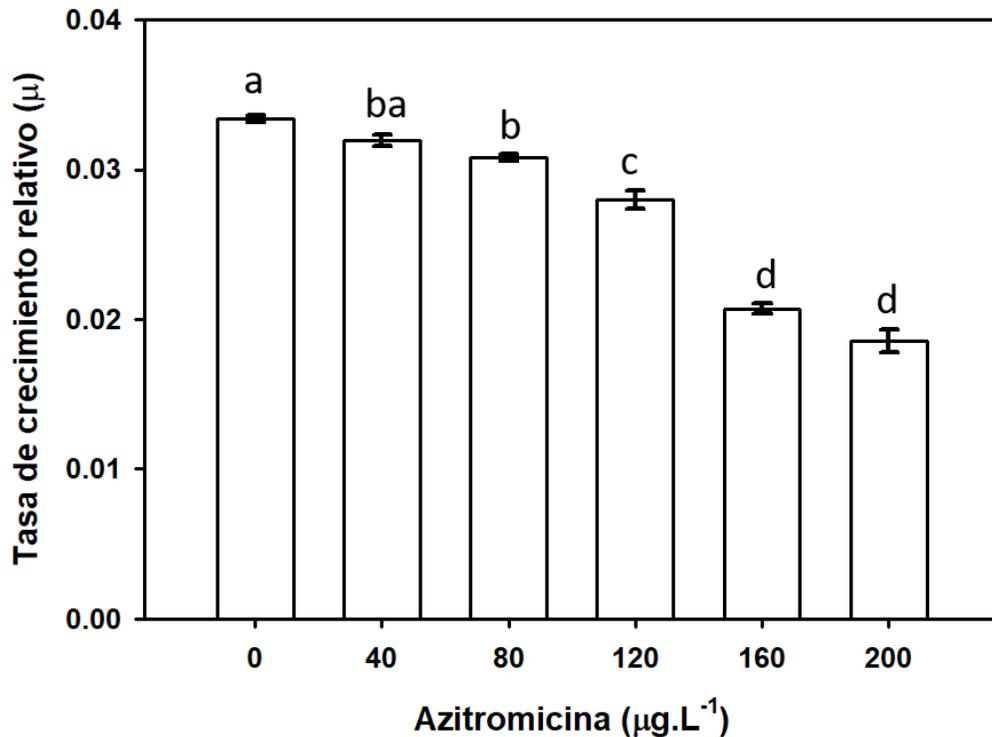


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de crecimiento (μ) de *T. incrustatus* expuesta al compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

El tiempo de duplicación se refiere al tiempo (expresado en horas) que requieren las células para dividirse y duplicar el tamaño de su población, de tal manera que un aumento en el tiempo de duplicación significaría un retraso en el crecimiento poblacional. En este estudio se encontró que el tiempo de duplicación aumenta significativamente ($p < 0.05$) conforme aumenta la concentración de azitromicina en el medio. Bajo la concentración más alta del antibiótico probada ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) el tiempo de duplicación es de 37.5h, mientras que para el control el tiempo de

duplicación es de 20.8h, lo cual significa que la población tarda 16.7h más en duplicar su tamaño, en términos porcentuales se podría decir que la población tarda un 80.3% más, en duplicar el número de células (Figura 6).

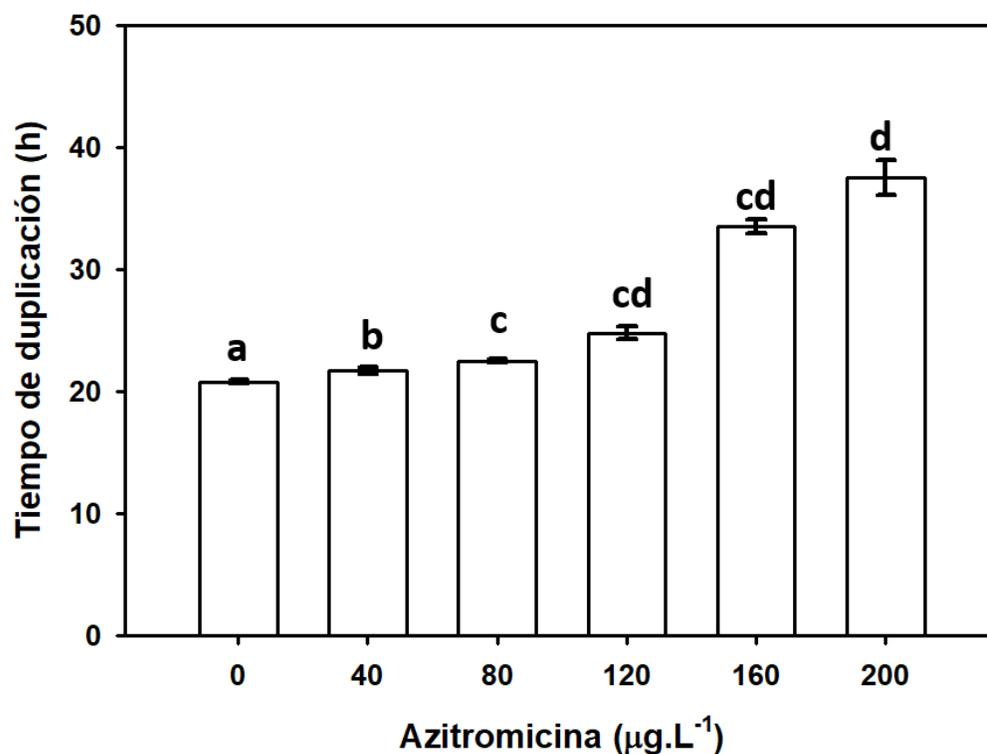


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el tiempo de duplicación (h) de *T. incrassatus* expuesta al compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

7.2. Pigmentos fotosintéticos

El contenido volumétrico clorofilas y carotenoides de *T. incrassatus* disminuye significativamente ($p < 0.05$) al incrementar la dosis de azitromicina. Siendo que, la concentración más alta del antibiótico provoca una disminución, del 65.6% y del 33% con respecto al control en el contenido por volumen de clorofilas totales y carotenoides respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la concentración de azitromicina sobre el contenido volumétrico de clorofilas totales y carotenoides de *T. incrassatulus* después de 72 h de exposición al compuesto. (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Azitromicina ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Clorofilas totales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0	20.06 \pm 0.56 a	1.40 \pm 0.057 a
40	16.61 \pm 1.93 a	1.15 \pm 0.155 ab
80	9.933 \pm 0.68 b	0.93 \pm 0.060 bc
120	6.770 \pm 0.50 bc	0.61 \pm 0.038 cd
160	5.879 \pm 0.18 bc	0.51 \pm 0.005 d
200	6.908 \pm 0.46 c	0.50 \pm 0.029 d

Sin embargo, al relacionar el contenido de los pigmentos con la biomasa celular obtenida (g) se obtuvo que el contenido de clorofilas totales y carotenoides por gramo de peso seco es más alto conforme la concentración del antibiótico en el medio aumenta. En la concentración de azitromicina más elevada ocurre un aumento del 51.8% y del 59.5% en el contenido de clorofilas totales y carotenoides por peso seco (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la concentración de azitromicina sobre el contenido de clorofilas totales y carotenoides por gramo de peso seco en *T. incrassatulus* después de 72 h de exposición al compuesto. (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Azitromicina ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Clorofilas totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	51.70 \pm 2.89 b	3.61 \pm 0.294 c
40	66.46 \pm 13.39 ba	4.63 \pm 1.519 bc
80	68.98 \pm 9.5 ba	6.48 \pm 0.838 a
120	76.94 \pm 11.46 a	7.00 \pm 0.875 a
160	72.00 \pm 7.52 ba	6.56 \pm 0.132 a
200	78.50 \pm 9.22 a	5.76 \pm 0.824 ba

7.3. Actividad fotosintética y respiratoria

La tasa fotosintética disminuye conforme aumenta la concentración de azitromicina, siendo que, bajo la concentración más alta de antibiótico probada, la tasa de liberación de oxígeno disminuye significativamente ($p < 0.05$) un 79.3% con respecto al tratamiento control. Sin embargo, los tratamientos $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 7).

Por otro lado, la tasa respiratoria decrece conforme la concentración del antibiótico en el medio es mayor, siendo que la concentración más alta provoca una disminución en la respiración del 66.29% en contraste con el tratamiento control. De igual manera, no se presentaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno bajo las siguientes concentraciones de azitromicina probadas: $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 8).

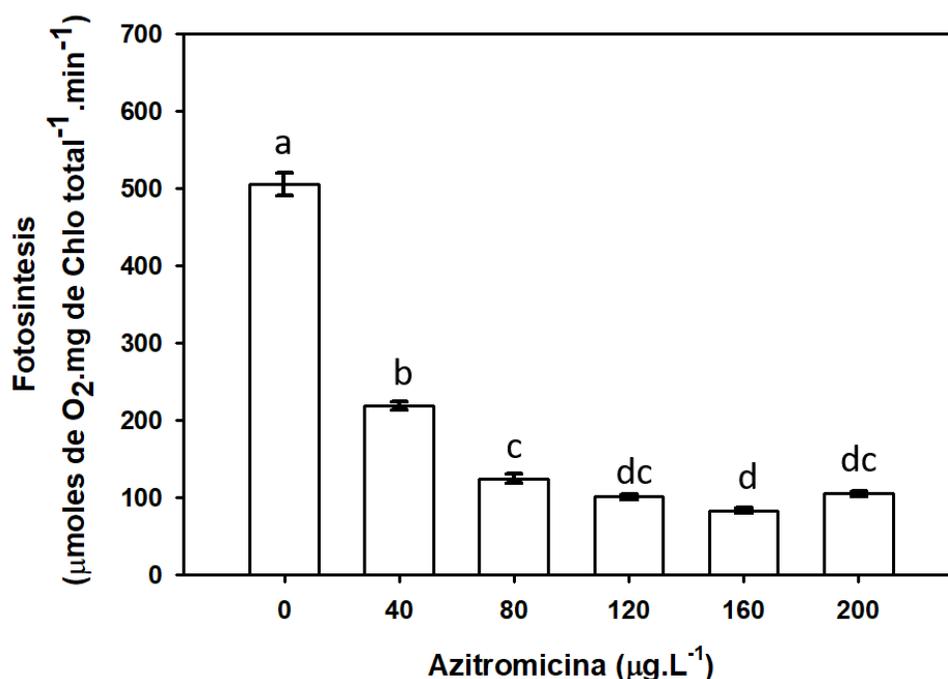


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis) en células de *T. incrassatus* expuestas al compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

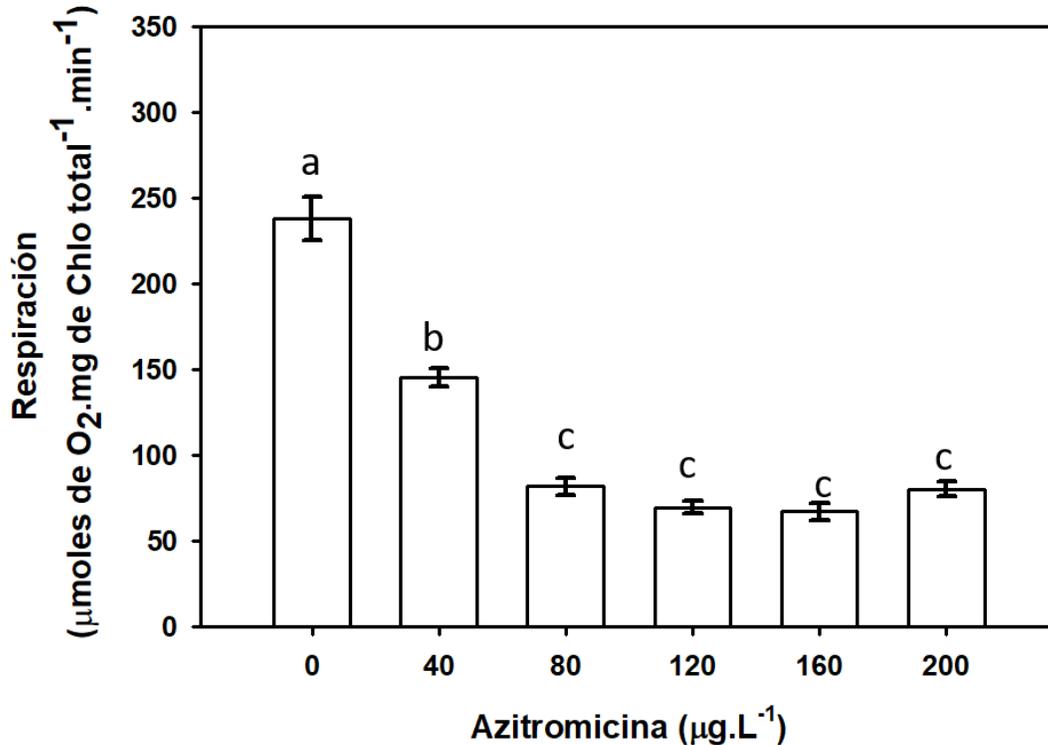


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la tasa de consumo de oxígeno (respiración) en células de *T. incrassatus* expuestas al compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

7.4. Transporte electrónico y decaimiento no fotoquímico

Como ya se mencionó anteriormente, una forma de monitorear la actividad fotosintética es mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila *a*. De esta manera, al irradiar las muestras a una intensidad lumínica constante de luz blanca ($215 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) se obtuvieron los valores del producto cuántico máximo operacional para el fotosistema II (ΦPSII_{op}). De acuerdo con este análisis se encontró que este parámetro disminuye en presencia de azitromicina (Figura 9).

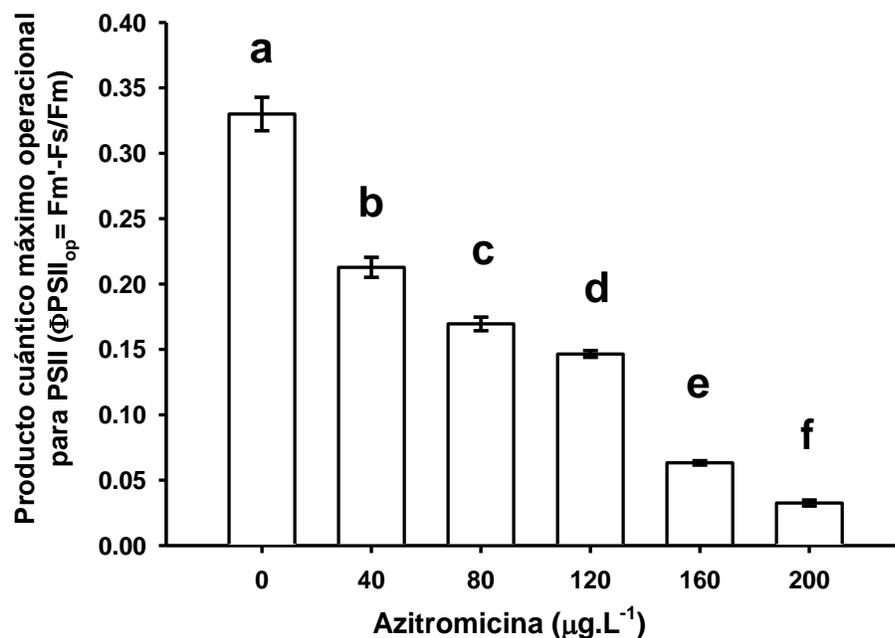


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el producto cuántico máximo operacional para la fotoquímica primaria ($\Phi\text{PSII}_{\text{op}}$) de *T. incrassatus* creciendo en presencia del compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Al multiplicar el valor de $\Phi\text{PSII}_{\text{op}}$ por la densidad de flujo fotónico (DFF), se obtiene la tasa aparente del transporte electrónico (ETR) (Figura 10) la cual disminuye significativamente ($p < 0.05$) en presencia de azitromicina. En la máxima concentración probada del antibiótico, la reducción en la tasa de transporte fue 90.1% con respecto al control sin el antibiótico ($p < 0.05$).

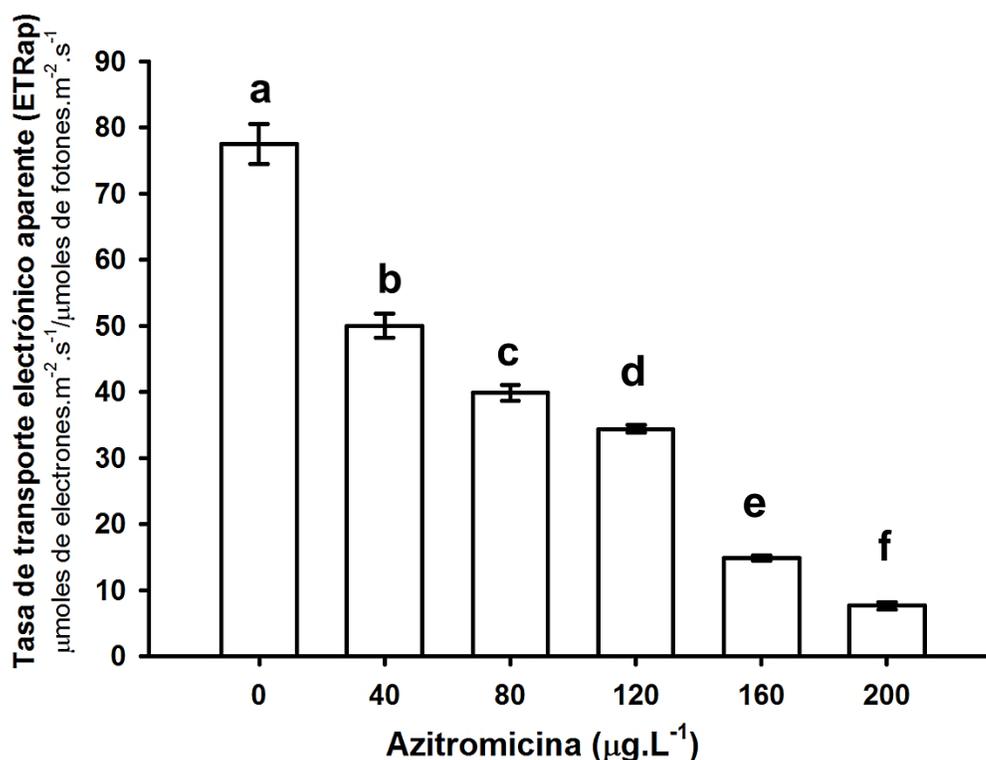


Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en el transporte electrónico aparente (ETRap) de *T. incrustatus* creciendo en presencia del compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

El decaimiento no fotoquímico (qNP), representa la liberación de la energía de excitación en forma de calor, en este trabajo se encontró que (qNP) aumenta en las células bajo la exposición a azitromicina (Figura 11). La máxima disipación de energía en forma de calor se alcanza cuando la concentración de azitromicina en el medio de cultivo fue de $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo esta 53% superior a tratamiento control sin antibiótico ($p < 0.05$), sin embargo, a $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, la disipación solo fue del 39% superior.

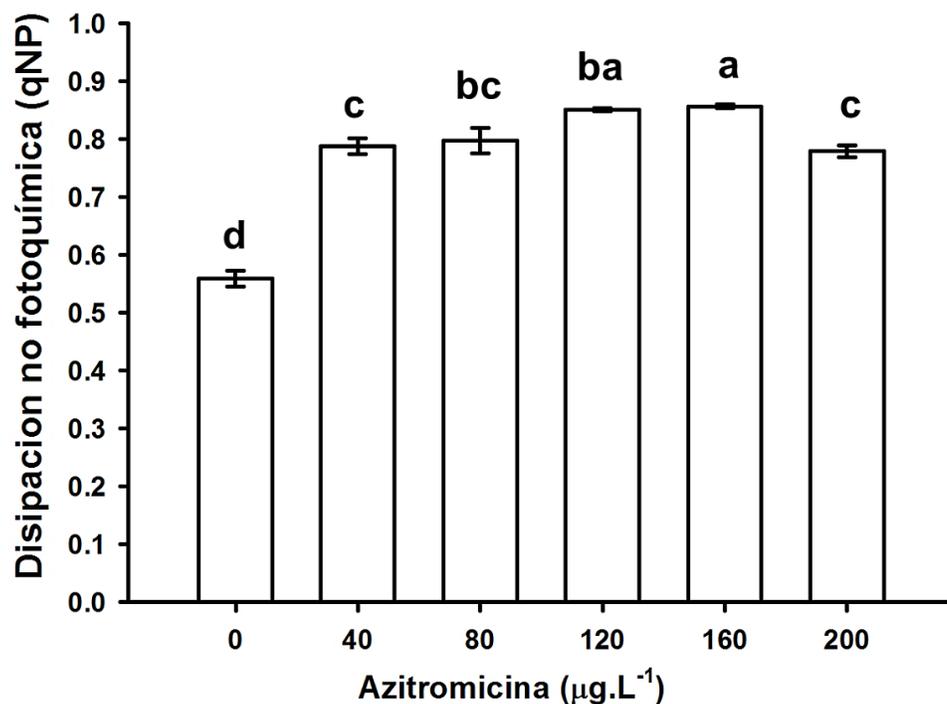


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina en la disipación no fotoquímica (qNP) de *T. incrassatulus* creciendo en presencia del compuesto durante 72 h (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$)

7.5. Análisis de la cinética y los parámetros de la emisión polifásica de la fluorescencia.

El análisis de fluorescencia por pulsos modulados (PAM) permite obtener información acerca del transporte electrónico y de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos que influyen en el relajamiento del aparato fotosintético. Por otro lado, mediante la prueba OJIP podemos obtener información acerca de los eventos de absorción, atrapamiento y transporte de la energía durante la actividad fotoquímica. Como se mencionó anteriormente, la prueba OJIP se realiza con muestras adaptadas a la oscuridad, las cuales son irradiadas con un pulso de luz saturante, que permita el llenado de la cadena.

La figura 12 muestra la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila en PSII en células de *T. incrasatulus*, la cinética mostró un aumento en el valor de la fluorescencia mínima (F_o) en respuesta al aumento en la concentración de azitromicina. El valor de F_o incrementa en mayor proporción que el valor de fluorescencia máxima (F_M) conforme la dosis de antibiótico aumenta. Debido a esto, el valor de fluorescencia variable (F_v), el cual se calcula como la diferencia entre F_M y F_o ($F_v = F_M - F_o$), decrece conforme aumenta la concentración del compuesto.

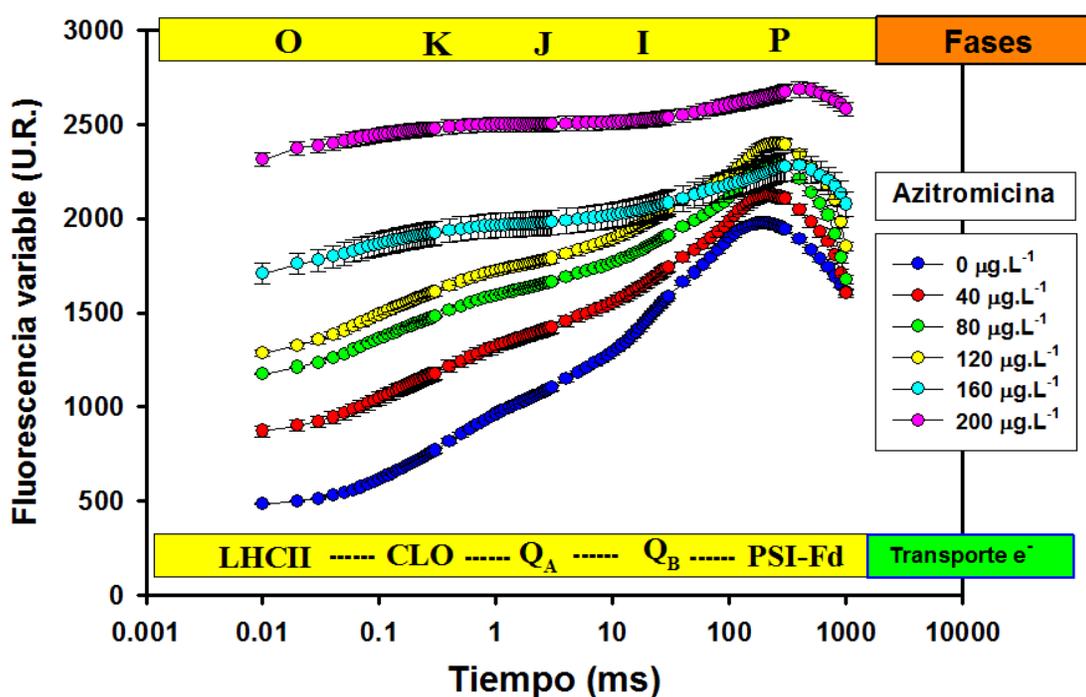


Figura 12. Cinética de fluorescencia variable (U.R) de *T. incrasatulus* después de 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AZM (LHCII: Complejo cosechador de luz del fotosistema II, CLO: Complejo liberador de oxígeno, Q_A : Quinona A, Q_B : Quinona B, PSI-Fd: Fotosistema I-Ferredoxina)

Con el objetivo de visualizar el efecto de azitromicina en cada una de las fases de la curva de inducción de la fluorescencia: O-J, J-I y I-P, los valores de fluorescencia fueron expresados como fluorescencia variable relativa (V_t) (Figura 13) en cualquier tiempo (F_t) de acuerdo con la siguiente fórmula $V_t = (F_t / F_o) / (F_M - F_o)$. Esta expresión

hace referencia a la fracción de Q_A que se encuentra en estado reducido (Q_{A^-}) en un momento dado, de manera que permite observar la acumulación de Q_{A^-} en el tiempo y, por lo tanto, el aumento en el número de centros de reacción cerrados en una muestra fotosintética cuando es expuesta a la luz (Srivastava *et al.*, 1997). Además de las inflexiones que le dan nombre a la prueba (O, J, I y P), la exposición al antibiótico induce la aparición de una inflexión entre la fase O y J, la cual se conoce como fase K (Figura 13) Seguido de la fase K, la cinética muestra una disminución en la emisión de fluorescencia entre las siguientes dos fases (J e I) en los tratamientos con azitromicina.

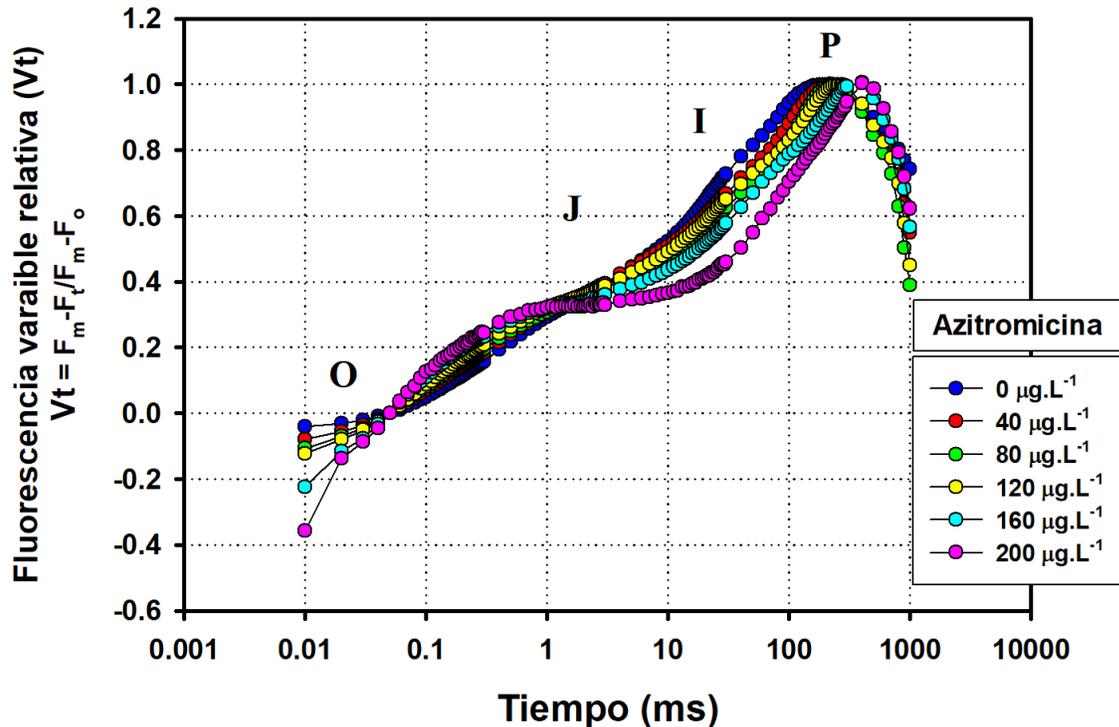


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en la fluorescencia variable relativa (V_t) de *T. incrustatus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

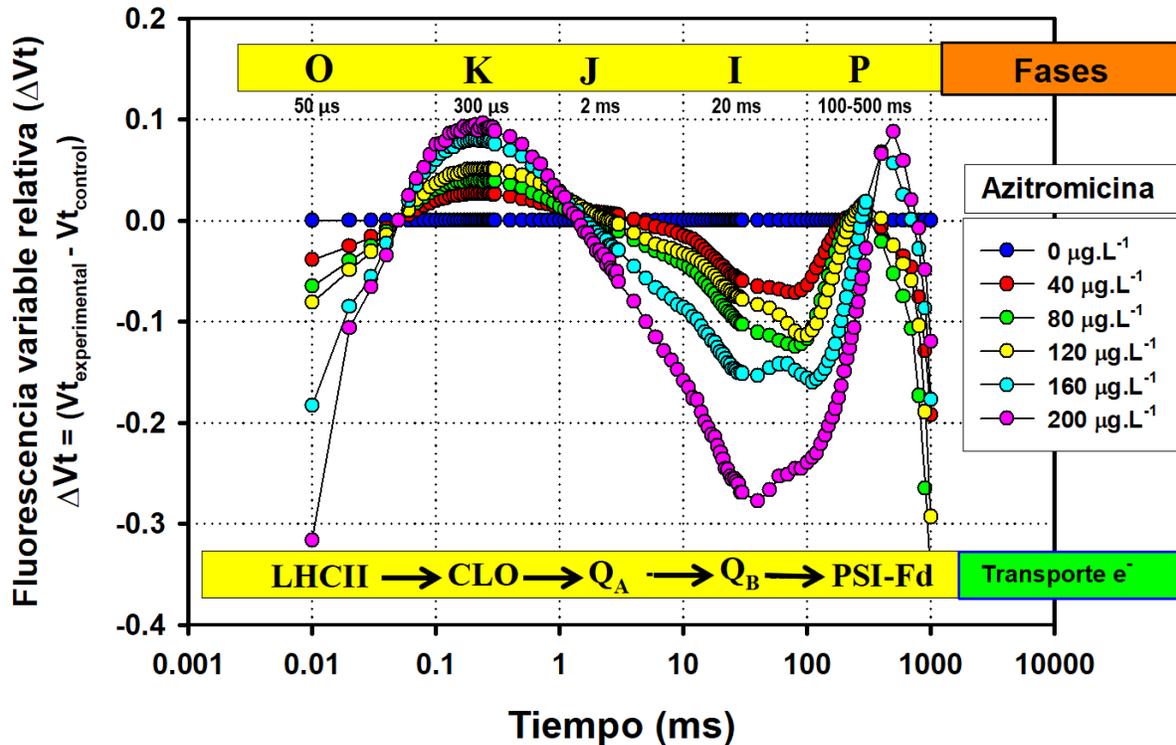


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en la fluorescencia variable relativa (ΔVt) de *T. incrassatus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

7.6. Parámetros de la prueba OJIP.

Los resultados durante la fase rápida de la emisión de la fluorescencia fueron analizados cuantitativamente mediante la prueba OJIP, la cual establece una serie de parámetros que definen cada flujo de energía que sucede desde la absorción de luz en PSII hasta el transporte electrónico. Estos flujos de energía fueron definidos como: Flujo absorbido (ABS), flujo de atrapamiento (TR), flujo de transporte electrónico (ET) y flujo de disipación de la energía (DI) y pueden ser expresados por centro de reacción (RC) (Tsimilli-Michael y Strasser 2008).

En esta investigación se encontró que el producto cuántico máximo potencial para llevar a cabo la fotoquímica primaria (ϕPo) disminuye significativamente ($p < 0.05$) en presencia de azitromicina en el medio, siendo que bajo la concentración más alta se obtuvo una reducción en este parámetro del 85.97% con respecto al control (Figura 15).

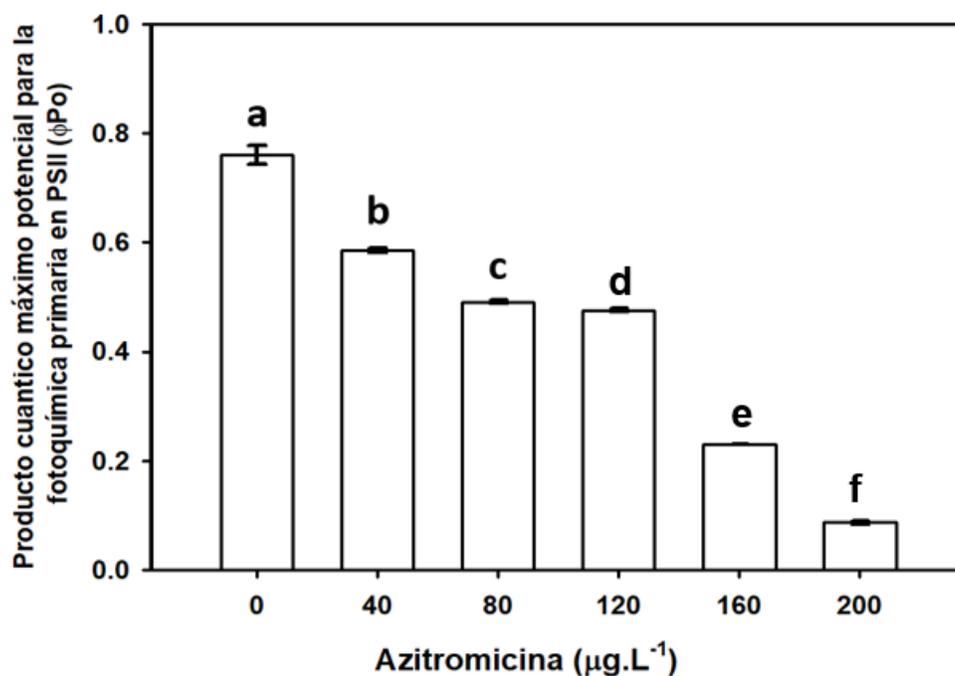


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en el Producto cuántico máximo potencial para la fotoquímica en PSII (ΦPo) de *T. incrasatulus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $p < 0.05$).

En cuanto a la eficiencia con la que un excitón puede mover un electrón después de Q_A^- (Ψ_0) no se encontró una disminución considerable al aumentar la concentración de azitromicina, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 80, 120, 160 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 16).

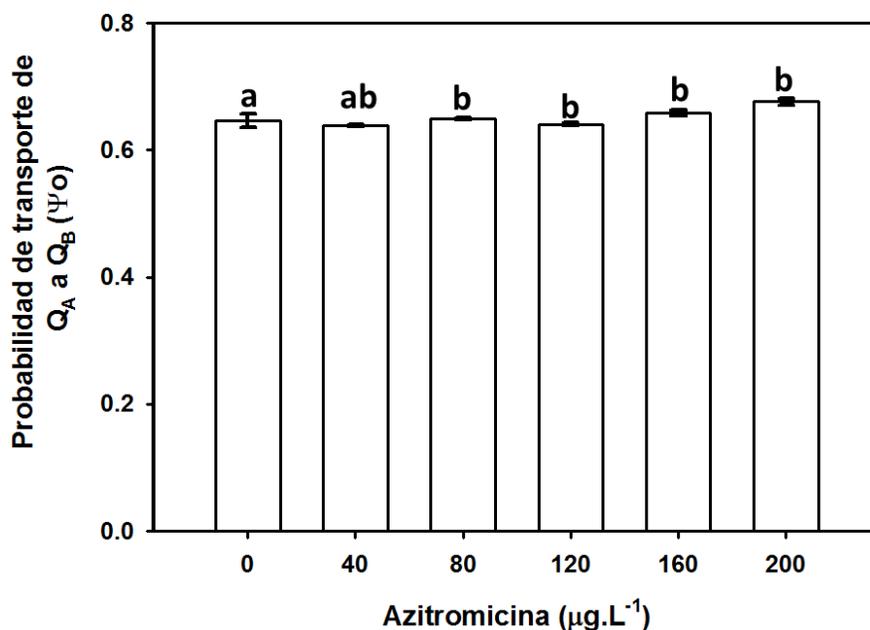


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en la Eficiencia para que un fotón atrapado mueva un electrón más allá de Q_A (Ψ_o) en *T. incrassatulus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)).

Por otro lado, la concentración de azitromicina provoca una disminución significativa ($p < 0.05$) en el producto cuántico para el transporte electrónico (ΦE_o) siendo que bajo la concentración más alta se observó una reducción del 85% en este parámetro (Figura 17)

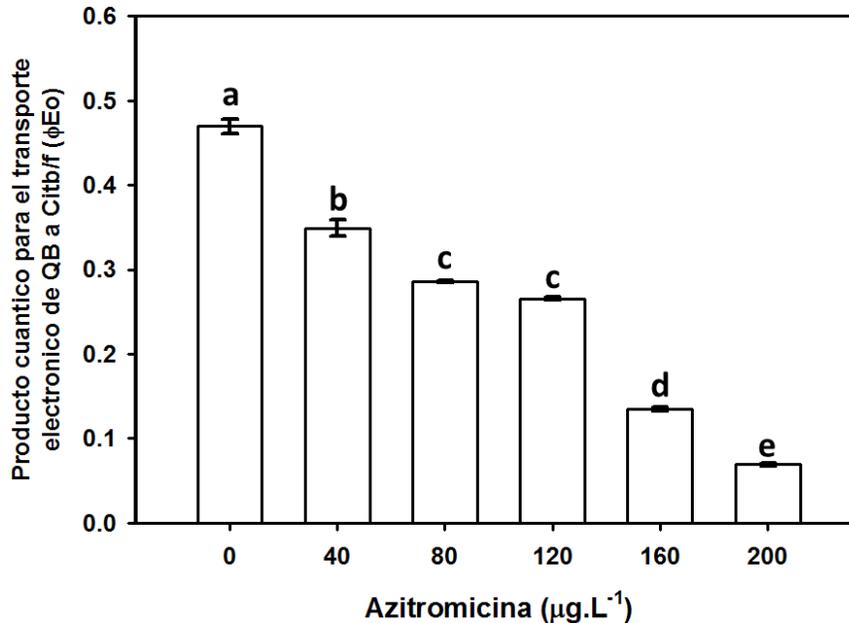


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en el Producto cuántico para el transporte electrónico desde Q_B hasta el complejo cit b6f (Φ_{Eo}) en *T. incrassatus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)).

El producto cuántico para la reducción de los aceptores finales en PSI (Φ_{Etotal}) el cual es considerado como el transporte electrónico hasta el final de la cadena fotosintética, también se vio afectado significativamente ($p < 0.05$) en respuesta al aumento en la dosis de azitromicina, bajo la máxima concentración se obtuvo una disminución del 74.13% en comparación con el control. (Figura 18).

Por otro lado, la probabilidad de que ocurra el transporte electrónico desde los acarreadores intermedios hasta los acarreadores del lado aceptor de PSI (δR_o) (Figura 19) aumenta significativamente conforme aumenta la concentración del compuesto ($p < 0.05$).

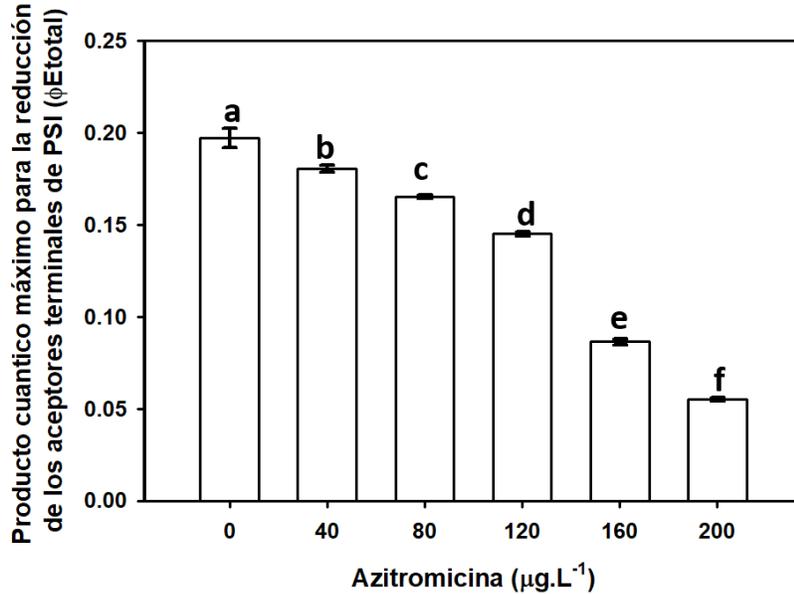


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en el Producto cuántico máximo para la reducción de los aceptores terminales de PSI (Φ_{Etotal}) en *T. incrustatus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)).

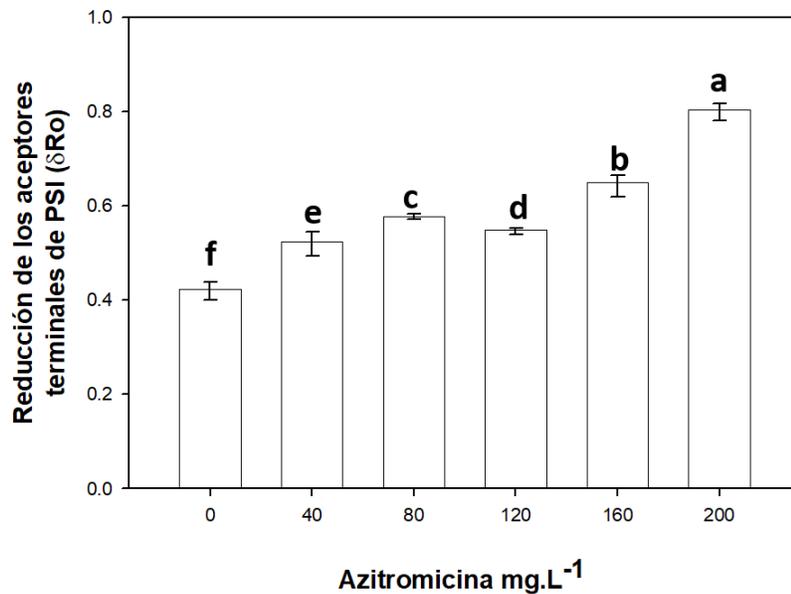


Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de AZM en la reducción de los aceptores terminales de PSI (δRo) en *T. incrustatus* después de 72 h de exposición al antibiótico (Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)).

8. DISCUSIÓN

Diferentes especies de algas tienen diferentes grados de sensibilidad a los antibióticos. En este estudio se encontró que la exposición a azitromicina promueve la disminución del crecimiento en *Tetradismus incrassatulus*, siendo la EC₅₀ de 152.2 µg.L⁻¹. Esto corresponde a lo observado anteriormente en organismos fotosintéticos expuestos a otros macrólidos, tal es el caso de Liu *et al.* (2011a), quienes reportan que una concentración de eritromicina de 0.06 mg.L⁻¹ inhibe el crecimiento de *Selenastrum capricornutum* en un 65.9%, otros antibióticos como el ciprofloxacino y sulfametoxazol obtuvieron el mismo efecto inhibitorio en dosis más altas de 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹ respectivamente. De manera similar, Isidori *et al.* (2005) reportaron que la EC₅₀ de crecimiento en *Pseudokirchneriella subcapitata* fue de 20 µg.L⁻¹ para eritromicina y 2 µg.L⁻¹ para claritromicina, mientras que para otros antibióticos la EC₅₀ fue de 170 µg.L⁻¹ para oxitetraciclina y 520 µg.L⁻¹ para sulfametoxazol.

El efecto de azitromicina ha sido evaluado anteriormente en *Chlorella vulgaris*, reportando que la presencia de este antibiótico en el medio (5 mg.L⁻¹) provoca una disminución de crecimiento de 53% (Barcenas, 2019), esta concentración es alrededor de 30 veces mayor que la EC₅₀ encontrada para *T. incrassatulus*. Estudios realizados con cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas citoplasmática, reportan que en pruebas de toxicidad aguda y crónica el efecto tóxico de cloranfenicol es mayor en *Scenedesmus obliquus* que en *Chlorella pyrenoidosa* (Zhang *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, es necesario evaluar el efecto de otros contaminantes, entre ellos antibióticos, en *T. incrassatulus* y compararlo con otras especies de microalgas y determinar si existen diferencias en la sensibilidad entre diferentes organismos.

El efecto de azitromicina como inhibidor de la síntesis de proteínas en *T. incrassatulus* puede estar relacionado con la inhibición de procesos celulares que ocurren en el cloroplasto y que están involucrados en el metabolismo fotosintético, lo cual disminuye el rendimiento de la fotosíntesis y en consecuencia el crecimiento

celular. Anteriormente se ha reportado que la exposición a estreptomycinina provoca una disminución de la fijación de CO₂ lo cual repercute en el crecimiento en *C. pyrenoidosa* (Tomisek *et al.*, 1957).

En ese sentido, la enzima Ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO) cataliza el primer paso de la asimilación de carbono inorgánico en forma de CO₂, la síntesis de las subunidades proteicas que constituyen esta enzima es llevada a cabo en el cloroplasto y el núcleo, de tal manera puede verse afectada por la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. De acuerdo con esto, Freyssinet *et al.* (1957), mencionan que estreptomycinina puede tener un efecto inhibitorio en la acumulación y la actividad de la enzima Ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO) en células de *Euglena gracilis*, afectando así la fijación de CO₂ y el crecimiento. mientras que Liu *et al.* (2011b) concluyeron que la exposición a eritromycinina disminuye la síntesis de ocho de las subunidades que constituyen a la enzima RuBisCO.

Por otro lado, las clorofilas juegan un papel importante en las células vegetales, ya que participan en la conversión de energía solar en energía química, siendo moléculas clave para llevar a cabo las reacciones fotosintéticas (Wang *et al.*, 2019) por lo cual ha sido importante el estudio del efecto de diversos contaminantes sobre estos pigmentos. La biosíntesis de clorofilas es un proceso en el que participan 16 enzimas las cuales son codificadas por más de 20 genes nucleares, por lo que un macrólido como la azitromycinina no debería tener un efecto en la inhibición de la traducción de estos genes y por tanto el contenido de clorofilas no se debería ver afectado por la presencia de estos fármacos. Sin embargo, se ha reportado que la expresión de los genes nucleares relacionados con la biosíntesis de clorofilas puede verse afectada en una serie de vías de señalización, cuando la expresión del genoma del cloroplasto es inhibida por efecto de la lincomycinina (Koussevitzky *et al.*, 2007).

En este estudio se encontró que, en *T. incrassatulus*, la presencia de azitromycinina provoca un aumento en la cantidad de clorofila en relación con la biomasa, lo cual

contrasta con estudios anteriores. Wan *et al.* (2015), por ejemplo, evalúa el efecto de eritromicina en el metabolismo de *Microcystis flos-aquae*, encontrando que la presencia de este antibiótico en el medio provoca una disminución en el contenido de clorofilas. Eritromicina también induce un efecto negativo en el contenido de clorofilas *a* y *b* en *S. capricornutum*, en respuesta a concentraciones de eritromicina en el orden de µg/L en el medio (Liu *et al.*, 2011).

Sin embargo, estudios concuerdan con lo encontrado en este estudio. En células de *C. vulgaris* se ha reportado una disminución en el contenido de clorofila (mg·g⁻¹) cuando estas son expuestas a diferentes concentraciones de claritromicina (Flores, 2019).). Es probable que cuando estos organismos son expuestos a contaminantes como claritromicina y azitromicina, de los cuales se ha reportado que tienen altas tasas de acumulación de diferentes tipos celulares (Aubakirova *et al.*, 2017) el tamaño de las células se vea aumentado y probablemente también el contenido de clorofilas en cada célula sea mayor cuando se expone al fármaco.

En relación con esto, Machado y Soares (2019) mencionan que en *P. subcapitata* un aumento en el tamaño de las células ocurre con la adición de eritromicina al medio. Resultados similares han sido reportados en *C. vulgaris*, donde las células presentaron un aumento en su tamaño en función del incremento en la dosis de estreptomina (Jiménez, 2015). Sin embargo, esta hipótesis debe ser probada en futuras investigaciones donde se cuantifique el número de células y además se evalúe si hay un efecto de azitromicina en el tamaño celular de *T. incrassatulus*.

Al igual que las clorofilas, los carotenoides tienen un papel importante como pigmentos accesorios en los complejos antena de PSII y PSI los cuales le permiten al organismo ampliar el rango de longitudes de onda en las que pueden absorber la energía electromagnética (Latowski *et al.*, 2014) Además de eso, los carotenoides intervienen en los mecanismos que protegen del daño oxidativo a los componentes de la cadena fotosintética, ya que participan en la relajación de átomos de oxígeno

en estado energético singulete y atrapan especies reactivas de oxígeno como los radicales peroxilo (Carranco *et al.*, 2011).

En este estudio se encontró que el contenido de carotenoides aumenta en respuesta a la presencia de azitromicina bajo las concentraciones de 40, 80 y 120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo el contenido de carotenoides un 93% más alto en esta última con respecto al control. Por otra parte, en los tratamientos con las dosis más altas de azitromicina (160 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ocurre una ligera disminución en la síntesis de estos pigmentos. Esto concuerda con lo reportado para *S. capricornutum* donde un aumento en la concentración de carotenoides ocurre en presencia de eritromicina, el cual puede estar relacionado a un aumento en la actividad antioxidante de las células en respuesta a una acumulación de radicales libres (Liu *et al.*, 2011a).

Anteriormente se había reportado un aumento en el contenido de carotenoides en *Raphidocelis subcapitata* cuando esta es expuesta a dosis bajas de claritromicina, lo cual permite a las células incrementar su resistencia a los efectos del antibiótico (Peng *et al.*, 2021). Por otro lado, Wan *et al.* (2015), reportan que la presencia de eritromicina en el medio induce un estrés oxidativo severo en *M. flos-aquae*, el cual se ve reflejado en el aumento de la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa.

Los resultados obtenidos en la medición de la tasa fotosintética por oximetría coinciden con lo reportado por Liu *et al.* (2011a) quienes demuestran que la tasa fotosintética neta de *S. capricornutum* es inhibida en presencia de eritromicina, siendo el efecto mucho mayor que el reportado para ciprofloxacino y sulfametoxazol en la misma investigación.

La disminución en la tasa fotosintética en esta investigación no se relaciona con un cambio en el contenido de pigmentos fotosintéticos por biomasa seca, sin embargo, pudiera estar relacionada a la síntesis de proteínas que sucede dentro del cloroplasto, entre ellas algunas de estas proteínas pudieran participar en el proceso

fotosintético las cuales podrían estar siendo afectadas por la exposición a macrólidos. De acuerdo con Wollman *et al.* (1999) en eucariotas fotosintéticos, como lo son las algas verdes, al menos 14 de los genes que se codifican en el genoma del cloroplasto dan origen a proteínas involucradas en la fotosíntesis. Para *Acutodesmus obliquus*, por ejemplo, el genoma de cloroplasto contiene los genes que codifican a las proteínas que participan en la fotosíntesis como las proteínas D1, D2 y CP47 del centro de reacción en PSII, así como de la subunidad grande de la enzima RuBP (De Cambiaire *et al.*, 2006).

Anteriormente ha sido reportado que la exposición a estreptomycinina provoca una disminución en el contenido de los transcritos de los genes que codifican para proteínas fotosintéticas como el gen *psaA* que codifica a la proteína D1, esto para la microalga *C. vulgaris* y la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Quian *et al.*, 2010). Posteriormente, Perales-Vela *et al.* (2016) reportaron que en *C. vulgaris* estreptomycinina tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de la proteína D1 lo cual puede afectar de manera directa la estructura y funcionalidad de PSII, también mencionan que esta respuesta puede ser similar para otras proteínas sintetizadas en el cloroplasto.

Al igual que los cloroplastos, las mitocondrias son organelos que contienen su propio material genético y su propia maquinaria de síntesis de proteínas los cuales son de tipo bacteriano. Estas características pueden convertir a las mitocondrias en organelos no objetivo de antibióticos como la azitromicina lo cual resulta importante si se considera que el genoma mitocondrial contiene la información para la síntesis subunidades proteicas de los complejos enzimáticos que participan en la respiración y la fosforilación oxidativa. En ese sentido, Salimi *et al.* (2016) reportan que antibióticos como azitromicina, claritromicina y eritromicina disminuyen la actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena respiratoria y aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cardiomiocitos.

En estudios en microalgas se ha reportado que eritromicina induce un incremento en la potencial transmembrana en mitocondrias de *Pseudokirchneriella subcapitata* lo cual sugiere una disfunción mitocondrial y ha sido relacionado con la inhibición del Complejo I en la cadena de transporte y cambios en la reducción de ATP (Machado y Soares 2019). En *C. vulgaris* la determinación del consumo de O₂ ha demostrado que este disminuye alrededor de 33% en células expuestas a azitromicina en una concentración de 5 mg·L⁻¹ (Barcenás, 2019) y un 44.6% cuando es expuesta a claritromicina en una dosis de 1.8 mg·L⁻¹ (Flores, 2019).

El genoma mitocondrial de *A. obliquus* contiene la información genética que codifica a 13 proteínas del Complejo I, III, IV y V de la cadena transportadora de electrones (Starkenbug *et al.*, 2017). De manera que se infiere que la síntesis de estas subunidades proteicas en las mitocondrias de *T. incrassatulus* está siendo inhibida por la adición de azitromicina, lo cual afecta la actividad de los complejos respiratorios y finalmente repercute a la disminución en la tasa respiratoria.

La determinación del producto cuántico operacional para PSII (PSIIΦ) y la tasa de transporte electrónico (ET_{rap}) nos permiten evaluar la capacidad de este fotosistema para atrapar la energía lumínica a través del complejo antena (LHCII) y transportarla hasta el centro de reacción en células acopladas a la luz., así como la eficiencia en PSII para mantener los centros de reacción abiertos cuando están expuestos a la luz, el incremento en los centros de reacción cerrados está relacionado con una disminución en el transporte electrónico. La presencia en azitromicina provoca una disminución en la capacidad que tiene el PSII para atrapar la energía lumínica y llevar a cabo el transporte electrónico

La disminución en el transporte electrónico está directamente relacionada con el aumento en el decaimiento no fotoquímico (qNP), el cual representa la liberación de la energía de excitación en forma de calor, cuando esta energía no puede ser utilizada para realizar transporte electrónico. Es decir que, conforme aumenta la concentración del antibiótico una menor cantidad de energía es utilizada para llevar

a cabo el trabajo fotoquímico, mientras que una mayor proporción de esta es liberada del sistema en forma de calor (Figura 10 y 11). Esta reducción pudiese indicar que los sistemas de disipación no fotoquímica también son afectados por el tratamiento con el antibiótico.

Investigaciones anteriores mencionaron que *C. vulgaris* presenta una disminución en la tasa de transporte electrónico ETR en presencia de estreptomicina la cual está acompañada de un aumento en la disipación de energía no fotoquímica (NPQ), sin embargo, bajo concentraciones más altas del antibiótico el decaimiento no fotoquímico disminuye casi al nivel del tratamiento control indicando que los procesos de disipación de energía no fotoquímicos también se ven afectados por la exposición a estreptomicina (Perales-Vela *et al.*, 2016). También para *C. vulgaris* se encontró que, en pruebas con azitromicina, las concentraciones más bajas probadas provocaron un aumento en la relajación no fotoquímica, sin embargo, conforme aumenta la concentración del antibiótico el efecto sobre NPQ disminuye (Barcenás, 2019).

Los parámetros cinéticos de la emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II, cuando las células son expuestas a la luz después de un período de oscuridad, nos permite visualizar el efecto del antibiótico en el llenado de la cadena transportadora de electrones fotosintética a través de la prueba OJIP (Strasser y Strasser, 1995). Los resultados muestran que conforme aumentó la concentración de antibiótico en el cultivo, también aumentó el valor de la fluorescencia mínima (F_0), lo cual puede ser explicado como una disminución en la transferencia de energía desde los complejos antena hacia los centros de reacción, que puede ser consecuencia de cambios en la estructura de los complejos antena y de los centros de reacción ocasionados por la presencia del antibiótico (Tsimilli-Michael y Strasser 2008). El análisis de la cinética de fluorescencia mediante la prueba OJIP mostraron que el efecto de azitromicina en la actividad fotosintética está relacionado principalmente con una disminución en el lado donador de PSII, que comprende la obtención de electrones a partir de la ruptura de moléculas de

agua en el complejo liberador de oxígeno (CLO), así como el acarreo de estos electrones de la clorofila P680 hasta Q_A (CLO→P680→Feo→ Q_A). Perales-Vela *et al.* (2016) mencionan que, en su investigación, la reducción en ($\phi_{Po} = F_v/F_m$) está relacionada con la disminución en la transferencia de energía entre el complejo antena y el centro de reacción de PSII, así como con la inactivación de los centros de reacción de PSII provocado por la disminución en el contenido de la proteína D1.

La fluorescencia variable relativa ($V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$) se determina mediante un ajuste de la cinética polifásica de la fluorescencia de PSII que nos permite visualizar la fracción de Q_A -en estado reducido en un tiempo específico y el trazo obtenido expresa la acumulación de Q_A - durante el tiempo de medición o lo que es equivalente al llenado total de la cadena fotosintética. La aparición de la fase K está relacionada con la inhibición en el complejo liberador de oxígeno (OEC), dando como resultado una disminución en la transferencia de electrones del lado donador de PSII. La aparición de la fase K ha sido reportada anteriormente en *Scenedesmus obliquus* sometida a temperaturas altas (44°C), la exposición a calor causa el desacoplamiento de OEC (por la liberación de iones manganeso en OEC) disminuyendo el transporte electrónico desde este hacia la feofitina y la plastoquinona Q_A (Srivastava 1997). Al igual que para *C. vulgaris*, donde la fase K aparece cuando las células fueron expuestas a estreptomycin, el incremento de la fluorescencia durante esta fase fue directamente proporcional a la concentración del antibiótico (Perales-Vela *et al.*, 2016), resultados similares se encontraron bajo la exposición de *C. vulgaris* a azitromicina, ya que a medida que incrementa la concentración del antibiótico, incrementa también la inflexión durante esta fase (Barcenás, 2019). Los resultados obtenidos explican la disminución en liberación de O_2 que se obtuvo al determinar la tasa fotosintética de *T. incrassatulus* expuesta a azitromicina.

La aparición de la fase K puede venir acompañada de una caída en el valor de fluorescencia, lo cual tiene que ver con un desequilibrio en el transporte electrónico donde la transferencia electrónica es mayor en el lado aceptor de PSII que en el

lado donador, como resultado de esto Q_A permanece en estado oxidado (Q_{A+}) lo cual conlleva a una disminución en el nivel de fluorescencia (Srivastava 1997). De la misma manera, la fluorescencia emitida entre las fases I-P disminuye conforme aumenta la concentración del antibiótico, esto es indicativo de la reducción de la plastoquinona (PQ) y la transferencia de electrones en PSI.

El producto cuántico máximo potencial para llevar a cabo la fotoquímica primaria (ϕP_o) está relacionado con la capacidad del fotosistema de absorber la energía lumínica y transportar electrones hasta el primer aceptor estable de la cadena (Q_A), por lo que la disminución de este valor nos indica que el número de centros de reacción en estado “abierto”, es decir disponibles para recibir un electrón y utilizarlo para llevar a cabo trabajo fotoquímico, es menor cuando las células son expuestas al antibiótico. Por otro lado, los datos obtenidos para la eficiencia con la que un electrón se mueve más allá de Q_A (ψ_o) no se ve afectada por la presencia del antibiótico

El producto cuántico para llevar a cabo el transporte electrónico desde Q_B hasta el complejo cit b₆f (ΦE_o) se calcula considerando los valores de ϕP_o , y de ψ_o . De acuerdo con esto, podemos decir que la disminución en (ΦE_o) se debe principalmente al efecto que tuvo el antibiótico en el lado donador de electrones (ϕP_o) más que al efecto que tuvo en el lado aceptor (ψ_o), en ese sentido, se puede ver que el lado donador de PSII es más sensible al efecto del antibiótico que el lado aceptor en PSII.

Por otro lado, el transporte de electrones desde los acarreadores intermedios hasta los aceptores finales de PSI es estimulado en presencia de azitromicina de acuerdo con los resultados obtenidos al determinar δR_o . Además de que el aumento del transporte electrónico entre las fases I-P refleja de igual manera una estimulación en la reducción del pool de plastoquinonas y el transporte electrónico en el lado aceptor de PSI (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008). Resultados similares en *C. vulgaris* fueron interpretados como un posible aumento en el flujo cíclico de

electrones en respuesta a azitromicina (Barcenas, 2019) mientras que, de acuerdo con Aristilde *et al.*, 2010, la exposición a eritromicina provoca un aumento en el producto cuántico para llevar a cabo el flujo cíclico alrededor de PSI, lo cual puede estar relacionado con la inhibición en el flujo lineal de electrones. El flujo cíclico es un mecanismo que permite que se genere un gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal (ΔpH) que contribuye a la síntesis de ATP y activa los procesos de decaimiento no fotoquímico durante condiciones de estrés (Joliot y Johnson, 2011).

CONCLUSIONES

En la presente investigación se demostró la capacidad que posee la azitromicina para reducir la tasa de crecimiento y aumentar el tiempo de duplicación de *Tetrademus incrassatulus* en un tiempo de exposición de 72 horas. La reducción de crecimiento está directamente relacionada con una reducción en el metabolismo celular fotosintético y respiratorio.

La reducción en metabolismo celular no está relacionada con el contenido de pigmentos, los cuales contrariamente a lo reportado tienen a incrementarse en la biomasa algal, lo cual pudiera estar relacionado a una respuesta fisiológica a fin de mantener la actividad metabólica.

Los resultados de la actividad fotoquímica indican que la azitromicina afecta el lado donador del fotosistema II, particularmente la actividad del complejo liberador de oxígeno, lo cual es evidente por la reducción de la tasa de liberación de oxígeno, así como la aparición de la banda K en los patrones de la cinética de fluorescencia de la clorofila a del PSII.

El transporte del lado donador hacia el lado aceptor del fotosistema II no sufre modificaciones, sin embargo, el flujo de electrones hacia los acarreadores

intermedios y los finales del fotosistema I se incrementa significativamente hasta casi un 30%, lo que pudiera estar relacionado con un aumento en el flujo cíclico en el fotosistema I (PSI).

Los resultados encontrados en esta investigación establecen que la presencia de contaminantes emergentes como los macrólidos pueden ser disruptores del balance ecológico de los sistemas acuáticos. Las algas no solo son importantes en los ecosistemas acuáticos porque liberan oxígeno, sino por ser los productores primarios del sistema. Los efectos negativos de los antibióticos como la azitromicina sobre los organismos fotosintéticos, base de las redes tróficas, son razón por la cual existe la urgente necesidad de regular la manera en que estos y otros productos farmacéuticos son descargados a los cuerpos de agua, así como elaborar planes para su correcta eliminación. Esto es principalmente importante en países como México, donde ninguna de las normas que regula la disposición de sustancias en aguas nacionales considera a los antibióticos como contaminantes.

8. REFERENCIAS

- Aminov I. R. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. 1(134):1-7.
- Anekwe J. E., Mohamed A. E. A. y Harrad S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*. 3: 1-16.
- Aristilde, L., Melis, A., and Sposit, G. (2010). Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environ. Sci. Technol.* 44: 1444–1450.
- Aubarkirova B. N., Beisenova R.R. y Zhamangara A.K. (2017). The effect of the pharmaceutical ingredients to the growth of algae. *Series of Biological and Medical*.4(322):5-11.
- Barcenas S. D. E. (2019). Determinación del crecimiento y la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* cultivada en presencia de azitromicina. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Barreto R. R. (2017). *Contaminantes emergentes*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Baumann M., Weiss K., Maletzki D., Schüssler W., Schüssler W., Schudoma D., Kopf W. y Kühmen U. (2015). Aquatic toxicity of the macrolide antibiotic clarithromycin and its metabolites. *Chemosphere*. 120: 192-198.
- Bernot M., Becker J. C., Doll J. C., Lauer T. E. (2016). A national reconnaissance of trace organic compounds (TOCs) in United States lotic ecosystems. *Science of The Total Environment*. 572: 422-433.
- Bhandari A., Close L. I., Kim W., Hunter R. P., Koch D. E. y Surampalli R. Y. (2008). Occurrence of Ciprofloxacin, Sulfamethoxazole and Azithromycin in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Practice Periodical of Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management*. 12: 275-281.
- Boxall A. B., M. A. Rudd, B. W. Brooks, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. Deleo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagne, J. P. Giesy, T. Guin, L. Hallstrom, M. V. Karlsson, D. G. Larsson, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. Mclaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O. Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetreault, V. L. Trudeau, G. Van der Kraak. (2012). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental Health Perspectives*. 120: 1221-1229.
- Brack, W., Dulio, V. y Slobodnik, J. (2012). The NORMAN Network and its activities on emerging environmental substances with a focus on effect directed analysis of complex environmental contamination. *Environmental Sciences Europe*. 24(1): 29
- Castro P. L., Baños M. M., López L. M., López L. M., Torres G. B. (2015). Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 46(3): 16-40.

- Comber S, Gardner M, Sörme P, Leverett D, Ellor B. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? *The Science of the Total Environment*. 2018 Feb;613-614:538-547. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.101.
- Daughton, C.G. and Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment; Agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives*, 107, 907-938. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>
- De Cambiaire J.C., Otis C., Lemieux C. y Turmel M. (2006). The complete chloroplast genome sequence of the chlorophycean green alga *Scenedesmus obliquus* reveals a compact gene organization and a biased distribution of genes on the two DNA strands. *BMC Evolutionary Biology*. 6:1-15.
- Deng C. N., Zhang D. Y. y Pan X. L. (2014). Toxic effects of erythromycin on photosystem I and II in *Microcystis aeruginosa*. *Photosynthetica*. 52(4): 574–580.
- Dinos G. P., Michelinaki M. y Kalpaxis D. L. (2001). Insights into the Mechanism of Azithromycin Interaction with an *Escherichia coli* Functional Ribosomal Complex. *Molecular Pharmacology*. 59: 1441-1445.
- Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., y Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*. 50(4): 480-487.
- Edwar, R. (1989) *Phycology*. 2. Cambridge University Press. New York. 271-281.
- Félix-Cañedo T. E., Durán-Álvarez J.C. y Jiménez-Cisneros B. (2013.) The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of The Total Environment*. 109-118.
- Flores V. T. (2019). Caracterización de la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de Claritromicina. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Flores, M. M., (1999) Estudio del género *Scenedesmus* Mayes 1892 en algunos cuerpos de agua del altiplano Mexicano y su posible uso como indicador de calidad del agua. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Freyssinet G., Eichholz R. L. Y Bluetow D.E. (1984). Kinetics of Accumulation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase during Greening in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*. 75(3): 858-861.
- Garrison A. W., Pope J. D. y Allen F. R. (1976). Analysis of organic compounds in domestic wastewaters. En Keith L. H, (Ed.). *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*, Ann Arbor, MI, U.S.A: 517-55.
- Gibson R., Becerril B. E., Silva C. V. y Jiménez B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1169: 31-3.
- González Moreno S., Perales Vela H. y Salcedo Álvarez 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. *Revista de Educación Bioquímica*. 27: 119-129.

- Gottschall N, Topp E, Metcalfe C, Edwards M, Payne M, Kleywegt S, Russell P, Lapen DR. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere*. 2012 Apr;87(2):194-203. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.018. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22300554.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cervený, D., Fedorova, G., y Randak, T. (2015). Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research*. 72: 145–153.
- Hegewald, Eberhard H. "Taxonomy and Phylogeny of Scenedesmus." *The Korean Journal of Phycology* 12.4 (1997): 235-46.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer K. y Kratz, K.-L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*. 225: 109-118.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L. y Parrella A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*. 346(1-3): 87-98.
- Jáuregui-Medina, Cecilia , Ramos-Ramírez, Lesset del Consuelo , Figueroa-Morales, Jorge Rafael , Medina-Carrillo, Raquel Enedina¹ , Rodríguez-Castañeda, Imelda¹ , Padilla-Noriega, Roberto. 2015. México hacia una cultura sobre la disposición final de medicamentos caducados. *Revista Fuente nueva* 20:24-31
- Jiménez V. L. E. (2015). Caracterización de la respuesta fisiológica de *Chlorella vulgaris* expuesta a estreptomycin. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Jjemba P. K. (2002). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems and environment*. 93(1-3): 267-278.
- Joliot P. y Johnson G. N. (2011). Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *PNAS*. 108(32):13317-13322.
- Kobrehel G, Tamburašev Z, Đokić S (1977) Erythromycin series IV. Thin-layer of erythromycin, erythromycin oxime, erythromycylamine and their acyl derivatives. *J Chromatography* 133: 415–419
- Lee W. Y. y Bird J.L. (en revisión). Puerto Rico ocean-dumped industrial wastes: Sublethal effects on feeding growth, and fecundity of a marine planktonic copepod (*Temora urninata*). En Kester D. R., Park P. K., Ketchum B. H. y Duedall I. W. (Eds.). *Wastes in the Ocean, Vol. 5 Deep-Sea Waste Disposal*. John Wiley, New York.
- Liu B., Liu W., Nie X., Guan C., Yang Y., Wang Z. y Liao W. (2011a). Growth response and toxic effects of three antibiotics on *Selenastrum capricornutum* evaluated by photosynthetic rate and chlorophyll biosynthesis. *Journal of Environmental Sciences*, 23(9): 1558-1563.
- Liu B., Nie X. P., Liu W. Q., Snoeijs P., Guan C. y Tsui M. T. K. (2011b). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4): 1027-1035.

- Liu F., Ying G. G., Tao R., Zhao J. L., Yang J. F. y Zhao L.F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*.157: 1636-1642
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D. (2013). Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution*. 174: 305–315.
- Lüring, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie*, 39(2): 85-101.
- Machado M. D. y Soares E. V. (2019) Impact of erythromycin on non-target organism: Cellular effects on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*. 208: 179-186.
- Mandaric L., M. Celic, R. Marcé, M. Petrovic. (2016). Introduction on Emerging Contaminants in Rivers and Their Environmental Risk. En. Petrovic M., S. Sabater, A. Elosegi, D. Barceló. (Ed.), *Emerging Contaminants in River Ecosystems, Occurrence and Effects Under Multiple Stress Conditions* (pp. 3-78). Switzerland: Springer Industrial Publishing.
- Martens, E., Demain, A.L. . 2017 The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J. Antibiot.*, 70 (2017), pp. 520-526.
- Maxwell K. Johnson G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence. *A practical guide. Journal of Experimental Botany*. 51(345):659-668.
- Morasch B., Bovin F., Reiser H., Grandjean D., DeAlencastró L. P. (2010). Occurrence and fate of micropollutants in the vidy bay of lake Geneva, Switzerland, part II: micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environmental Toxicology Chemistry*. 29: 1658-1668.
- NOM-001-SEMARNAT-2021. (2021). Norma Oficial Mexicana que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, Diario Oficial/11-03-2022.
- NOM-002-SEMARNAT-1996. (1996). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, Diario Oficial/03-06-1998.
- NOM-003-SEMARNAT-1997. (1997). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se rehúsen en servicios al público. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, Diarios Oficial/21-09-1998.
- OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) (1984). Guidelines for the testing of chemicals No. 207: Earthworm, acute toxicity test. OECD Publishing, Paris.

- OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) (2004). Guidelines for the testing of chemicals No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria: Growth inhibition test. OECD Publishing, Paris.
- Organización Internacional de Normalización. (2012). ISO 8692. Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con algas verdes unicelulares.
- Ortega, M. (1984) Catálogo de algas continentales recientes de México. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., y Vos, R. (2014). Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology and Therapeutics*. 143(2): 225–245.
- Peng J., Guo J., Lei Y., Mo J., Sun H. & Song J. (2021). Integrative analyses of transcriptomics and metabolomics in *Raphidocelis subcapitata* treated with clarithromycin. *Chemosphere*. 266.
- Perales-Vela, H. V., García, R. V., Gómez- Juárez, E. A., Salcedo-Álvarez, M. O., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2016). Streptomycin affects the growth and photochemical activity of the alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 132: 311–317.
- Perales-Vela, H. V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. 67(11): 2274–2281.
- Pérez-Alvarez I., Islas Flores H., Gómez-Oliván L. M., Barceló D., López de Alda M., Pérez S. S., Sánchez-Aceves L., SanJuan-Reyes N., Galar-Martínez M. (2018). Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, México, and evaluation of their toxic impact. *Environmental Pollution*: 330-341.
- Retsema J., Girard A., Schelkly W., Manousos M., Anderson M., Bright G. y Mason, R. (1987). Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31(12): 1939–1947.
- Richardson M. L. y Bowron J. M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 37:1-12.
- Robinson A. A., Belden J. B. y Lydy M. J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(2): 423-30.
- Robledo Z. V. H., Velázquez M. M. A., Montañez S. J. L., Pimentel E. J.L. Vallejo C. M. D. y Venegas G. J. (2017). Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano-industriales de Morelia, Michoacán, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33(2): 221-235.
- Rubio C. A., Chica A. E. C. y Peñuela M. G. A. (2013). Procesos de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes. *An interdisciplinary Journal of Applied Science*. 8(3): 93-103.
- Salimi A., Eybagi S., Seydi E., Naserzadeh P., Pahini N K. y Pourahmad J. (2016). Toxicity of macrolide antibiotics on isolated heart mitochondria: a justification for their cardiotoxic adverse effect. *Xenobiotica* 46(1): 82-93.

- Sauv e, S., y Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central journal*. 8: 15.
- Siemens J., Huschek G., Siebe C. y Kaupenjohann M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Research*. 42: 2124-2134.
- Singer A. C., J rhult J. D., Grabic R., Khan, G. A., Lindber G. R. H., Fedorova G., Fick J., Bowes M. J., Olsen B. y Söderström H. (2014). Intra-and inter-pandemic variations of antibiotics and decongestants in wastewater treatment plants and receiving rivers. *PLOS One*. 9(9).
- Srivastava A., Guiss  B., Greppin H. y Strasser R. J. (1997). Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*.1330(1997): 95-106.
- Starkenburg S.R., Polle J. E. W., Hovde B., Daligault H.E., Davenport K. W., Huang A., Neofotis P. y McKie-Krisberg Z. (2017). Draft Nuclear Genome, Complete Chloroplast Genome, and Complete Mitochondrial Genome for the Biofuel Bioproduct Feedstock Species *Scenedesmus obliquus* Strain DO E0152z. *American Society for Microbiology*. 5(11).
- Svetlov MS, Vazquez-Laslop N, Mankin AS (2017) Kinetics of drug-ribosome interactions defines the cidality of macrolide antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13673–13678
- Tomisek A., Reid M. R., Short W. A. y Skipper H. E. (1957). Studies on the photosynthetic reaction. The effects of various inhibitors upon growth and carbonate- fixation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology*. (8520):7-10.
- Trainor, F.R. (1998) Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity. J.Cramer. Berlin
- Tsarenko, P.M. (2011). Sphaeropleales. In: *Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Volume 3: Chlorophyta*. (Tsarenko, P.M., Wasser, S.P. & Nevo, E. Eds), pp. 280-355. Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G.
- Tsimilli-Michael, M. y Strasser R. J. (2008). In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on *Host Plants*. *Mycorrhiza*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.679-703.
- Välitalo P., A. Kruglova, A. Mikola y R. Vahala. (2017). Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 220: 558-569.
- Van den Hoek, C., Mann, D. y Jahns, H.,M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press. New York. p 637.
- Van Heerden, P. D. R., Strasser, R. J., Kr ger, G. H. J. (2004). Reduction of dark chilling stress in N2-fixing soybean by nitrate as indicate by chlorophyll *a* fluorescence kinetics. *Physiologia Plantarum*. 12: 239-249.
- Vermillion MM. L. y Tjeerdema R. S. (2018). Azithromycin sorption and biodegradation in a simulated California river system. *Chemosphere*. 190: 471-480.

- Wan J., Guo P., Peng X. y Wen K. (2015). Effect of erythromycin exposure on the growth, antioxidant system and photosynthesis of *Microcystis flos-aquae* *Journal of Hazardous Materials*. 283:778-786.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Wilkinson J., Hooda P. S., Barker J., Barton S., Swinden J. (2017). Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*. 231(1): 954-970.
- Wynne, M.J. & Hallan, J.K. (2016 '2015'). Reinstatement of *Tetradesmus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium* 126: 83-86.
- Zhang W., Sun W., An S., Xiong B., Lin K., Cui X. y Guo M. (2013). Acute and Chronic Toxic Effects of Chloramphenicol on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Environment Research*. 85 (8): 725-732.

9. APENDICE

Análisis de varianza de un factor y Tukey ($p=0.05$) (Datos analizados previamente con prueba de distribución normal y homogeneidad de varianzas de Bartlett)

7.1 Crecimiento Figura 4

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Crecimiento (Peso seco g.L⁻¹)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.08716733	0.01743347	179.09	<.0001
Error	12	0.00116811	0.00009734		
Total correcto	17	0.08833544			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.986776	5.038926	0.009866	0.195800

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.08716733	0.01743347	179.09	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWZ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000097
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0271

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.282800	3	1
B	0.254667	3	2
B	0.234667	3	3
C	0.192000	3	4
D	0.113333	3	5
D	0.097333	3	6

7.1 Tasa de Crecimiento relativo (μ): Figura 5

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Tasa de crecimiento relativo ($\mu \text{ h}^{-1}$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.00057425	0.00011485	179.04	<.0001
Error	12	0.00000770	0.00000064		
Total correcto	17	0.00058195			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.986773	2.941931	0.000801	0.027224

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.00057425	0.00011485	179.04	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentalse de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	6.415E-7
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínias	0.0022

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.0333752	3	1
A			
B	0.0319320	3	2
B			
B	0.0308049	3	3
C	0.0279953	3	4
D	0.0206915	3	5
D			
D	0.0185452	3	6

7.1 Tiempo de duplicación (td): Figura 6

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Tiempo de duplicación (td h⁻¹)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	732.5453166	146.5090633	105.64	<.0001
Error	12	16.6428659	1.3869055		
Total correcta	17	749.1881825			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.977785	4.394897	1.177670	26.79629

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	732.5453166	146.5090633	105.64	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.386905
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	3.2298

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	37.4917	3	6
B	33.5166	3	5
C	24.7815	3	4
D	22.5033	3	3
D	21.7142	3	2
D	20.7704	3	1

7.2 Clorofilas totales (mg·L⁻¹): Tabla 3

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Clorofila total (mg·L⁻¹)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	665.1174504	133.0234901	56.99	<.0001
Error	16	37.3469524	2.3341845		
Total correcto	21	702.4644029			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.946834	13.99896	1.527804	10.91369

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	665.1174504	133.0234901	56.99	<.0001

7.2 Carotenoides totales a (mg·L⁻¹): Tabla 3

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Carotenoides total (mg·L⁻¹)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	2.56503628	0.51300726	20.52	<.0001
Error	16	0.39992392	0.02499525		
Total correcto	21	2.96496021			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.865117	18.43880	0.158099	0.857425

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	2.56503628	0.51300726	20.52	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	0.024995
Valor crítico del rango estudentizado	4.55681
Diferencia significativa mínima	0.3797
Media armónica de tamaño de celdas	3.6

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	1.4029	4	1
B A	1.1598	3	2
B B			
B C	0.9340	4	3
D C			
D C	0.6167	4	4
D			
D	0.5121	4	5
D			
D	0.5070	3	6

7.2 Clorofilas totales a (mg·g⁻¹PS): Tabla 4

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Clorofila total (mg·g⁻¹PS)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1774.511442	354.902288	4.07	0.0141
Error	16	1393.853298	87.115831		
Total correcto	21	3168.364740			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.560072	13.56765	9.333586	68.79297

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1774.511442	354.902288	4.07	0.0141

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	16
Error de cuadrado medio	87.11583
Valor crítico de t	2.11991
Diferencia menos significativa	14.748
Media armónica de tamaño de celdas	3.6

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

t Agrupamiento	Media	N	T
A	78.507	3	6
A			
A	76.941	4	4
A			
A	72.006	4	5
A			
A	68.981	4	3
A			
A	66.465	3	2
B	51.704	4	1

7.2 Carotenoides totales a (mg·g⁻¹PS): Tabla 4

Variable dependiente: Caratenoides total (mg·g⁻¹PS)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	33.06375662	6.61275132	9.89	0.0002
Error	16	10.69509590	0.66844349		
Total correcto	21	43.75885253			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.755590	14.28618	0.817584	5.722902

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	33.06375662	6.61275132	9.89	0.0002

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	0.668443
Valor crítico del rango estudentizado	4.55681
Diferencia significativa mínima	1.9635
Media armónica de tamaño de celdas	3.6

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
Á	7.0079	4	4
Á			
B Á	6.5657	4	5
B Á			
B Á	6.4860	4	3
B Á			
B Á	5.7615	3	6
B Á			
B C	4.6394	3	2
C			
C	3.6157	4	1

7.3 Fotosíntesis ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg Chlo total}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$): Figura 7

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Fotosíntesis ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg Chlo total}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1285838.791	257167.758	488.23	<.0001
Error	50	26336.552	526.731		
Total correcto	55	1312175.343			

R-cuadrado	Coef Var	Reiz MSE	Y Media
0.979929	11.82713	22.95062	194.0507

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1285838.791	257167.758	488.23	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGMQ.

Alfa	0.05
Error de cuadrado medio	526.731
Valor crítico del rango estudentizado	4.19040
Diferencia significativa mínima	31.519
Media armónica de tamaño de celdas	9.310345

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	505.58	10	1
B	218.98	9	2
C	124.56	10	3
D	104.62	9	6
D	100.65	9	4
D	83.01	9	5

7.3 Respiración ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg Chlo total}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$): Figura 8

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Respiración ($\mu\text{g O}_2 \cdot \text{mg Chlo total}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	221309.5015	44261.9003	96.62	<.0001
Error	50	22905.0068	458.1001		
Total correcto	55	244214.5083			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.906209	18.56587	21.40327	115.2829

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	221309.5015	44261.9003	96.62	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	50
Error de cuadrado medio	458.1001
Valor crítico del rango estudentizado	4.19040
Diferencia significativa mínima	29.394
Media armónica de tamaño de celdas	9.310345

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	238.201	10	1
B	145.141	9	2
C	81.702	10	3
C	80.284	9	6
C	69.521	9	4
C	66.922	9	5

7.4 Producto cuántico operacional (Φ PSII_{op}): Figura 9

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Producto cuántico operacional (Φ PSII_{op})

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.52807571	0.10561514	267.11	<.0001
Error	18	0.00711725	0.00039540		
Total correcto	23	0.53519296			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.986702	8.125893	0.019885	0.244708

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.52807571	0.10561514	267.11	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	18
Error de cuadrado medio	0.000395
Valor crítico del rango estudentizado	4.49442
Diferencia significativa mínima	0.0447

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.52625	4	1
B	0.31000	4	2
C	0.24075	4	3
C	0.20650	4	4
D	0.10975	4	5
D	0.07500	4	6

7.4 Tasa de Transporte electrónico aparente (ETRap): Figura 10

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Tasa de Transporte electrónico aparente (ETRap)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.52807571	0.10561514	267.11	<.0001
Error	18	0.00711725	0.00039540		
Total correcto	23	0.53519296			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.986702	8.125893	0.019885	0.244708

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.52807571	0.10561514	267.11	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentalse de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	18
Error de cuadrado medio	33196.74
Valor crítico del rango estudentizado	4.49442
Diferencia significativa mínima	409.44

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	2185.8	4	6
A	2176.5	4	5
B	1597.5	4	4
C B	1428.3	4	3
C B	1367.3	4	2
C	1154.5	4	1

7.4 Relajación No-Fotoquímica (qNP): Figura 11

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Decaimiento No Fotoquímico (qNP)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.23775288	0.04755058	71.84	<.0001
Error	18	0.01191375	0.00066188		
Total correcto	23	0.24966663			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.952281	3.333044	0.025727	0.771875

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.23775288	0.04755058	71.84	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	18
Error de cuadrado medio	0.000662
Valor crítico del rango estudentizado	4.49442
Diferencia significativa mínima	0.0578

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.85675	4	5
A			
B A	0.85050	4	4
B			
B C	0.79700	4	3
C			
C	0.78800	4	2
C			
C	0.77950	4	6
D	0.55950	4	1

7.6 Producto cuántico máximo fotoquímica potencial (Φ PSIIpot): Figura 15

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Producto cuántico máximo potencial PSII (Φ PSIIpot)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	3.84545252	0.76909050	1716.17	<.0001
Error	84	0.03764416	0.00044814		
Total correcto	89	3.88309668			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.990306	5.219645	0.021169	0.405572

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	3.84545252	0.76909050	1716.17	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	84
Error de cuadrado medio	0.000448
Valor crítico del rango estudentizado	4.12462
Diferencia significativa mínima	0.0225

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.725600	15	1
B	0.546613	15	2
C	0.440707	15	3
D	0.414307	15	4
E	0.204393	15	5
F	0.101813	15	6

7.6 Eficiencia movimiento electrones de Q_A a Q_B (Ψ_0): Figura 16

Praccedimienta ANOVA

Variable dependiente: Eficiencia de transporte entre QA y QB (Ψ_0)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.01494490	0.00298898	7.12	<.0001
Error	84	0.03526147	0.00041978		
Total correcto	89	0.05020637			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.297669	3.143193	0.020489	0.651838

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.01494490	0.00298898	7.12	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	84
Error de cuadrado medio	0.00042
Valor crítico del rango estudentizado	4.12462
Diferencia significativa mínima	0.0218

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.676747	15	6
A	0.658820	15	5
B	0.648947	15	3
B	0.647013	15	1
B	0.641027	15	4
B	0.638473	15	2

7.6 Producto cuántico para la reducción de los aceptores intermedios (ΦE_o): Figura 17

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Producto cuántico para la reducción de los aceptores inte (ΦE_{total})

Fuente	DF	suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.57159875	0.31431975	751.35	<.0001
Error	84	0.03514049	0.00041834		
Total correcta	89	1.60673923			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.978129	7.795147	0.020453	0.262386

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1.57159875	0.31431975	751.35	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentuise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	84
Error de cuadrado medio	0.000418
Valor crítico del rango estudentizado	4.12462
Diferencia significativa mínima	0.0218

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.469673	15	1
B	0.349260	15	2
C	0.286000	15	3
C	0.265627	15	4
D	0.134767	15	5
E	0.068987	15	6

7.6 Producto cuántico para la reducción de los aceptores finales en PSI (Φ_{Etotal}):
Figura 18

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Producto cuántico para la reducción de los aceptores finales en PSI (Φ_{Etotal})

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.23428677	0.04685735	512.09	<.0001
Error	84	0.00768614	0.00009150		
Total correcta	89	0.24197292			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.968236	6.919336	0.009566	0.138245

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.23428677	0.04685735	512.09	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGMQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	84
Error de cuadrado medio	0.000092
Valor crítico del rango estudentizado	4.12462
Diferencia significativa mínima	0.0102

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.197228	15	1
B	0.180469	15	2
C	0.165109	15	3
D	0.145050	15	4
E	0.086520	15	5
F	0.055095	15	6

7.6 Eficiencia para mover electrones de los acarreadores intermedios a los finales de PSI (δRo): Figura 19

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Eficiencia para el transporte de electrones de aceptores finales en PSI (δRo)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.24257757	0.24851551	769.74	<.0001
Error	84	0.02711998	0.00032286		
Total correcto	89	1.26969756			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.978641	3.078015	0.017968	0.583760

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1.24257757	0.24851551	769.74	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	84
Error de cuadrado medio	0.000323
Valor crítico del rango estudentizado	4.12462
Diferencia significativa mínima	0.0191

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.799658	15	6
B	0.641654	15	5
C	0.577319	15	3
D	0.546074	15	4
E	0.519129	15	2
F	0.418727	15	1