



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Caracterización de la respuesta fisiológica de *Chlorella vulgaris* expuesta a estreptomycin”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Luz Elena Jiménez Vázquez

Director de tesis: Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Tlalnepantla, Estado de México.



2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Familia

A mis padres que no sólo me permitieron nacer, sino que se esforzaron por inculcarme sabiduría para la vida, que me enseñaron que hay que conservar sencillez, solidaridad y esfuerzo. Por enseñarme que la perseverancia da frutos por sobre todo obstáculo y que el amor logra tanto metas como recompensas inesperadas.

En específico a mi padre, por dedicarse a proveernos por sobre sus necesidades.

Especialmente a mi mamá, por ser prueba de que los años no disminuyen el ahínco y determinación. Que se puede ser madre, esposa, empleada, estudiante, deportista, hermana, hija y mujer.

A mi hermana Sofía, que siempre fue tan comprensiva en este proceso, que me alentó en los momentos más difíciles ofreciéndome consuelo y me ha enseñado a ser humana y maternal.

A mi hermano Raúl, que siempre me ofreció un consejo práctico y que me apoyó centrándome de manera objetiva; además me mostró que es posible divertirse y no sólo estudiar.

A la señora Yolanda, al señor Leonardo, a Nazul y a Nicté, por formar parte de mi familia, por apoyarme y ofrecerme un lugar en sus vidas.

A mi abuelo Eduardo, por no conformarse con los conocimientos de su carrera y explorar otras áreas; lo que me enseñó la pasión por saber y me permitió reconocer la aventura que representa salir del confort para conocer más allá.

A mi abuela María Elena, que me enseñó a tener disciplina y compromiso, que siempre me expresa el orgullo y amor que siente por mí. Que me inspira a traerle más triunfos para que ambas disfrutemos.

A mi abuela María de la Luz, que me enseñó a ser decidida y conseguir mis objetivos, a reconocer mis limitaciones y errores.

Amistades

A Christopher, el maestro de vida más revolucionario, me enseñaste otro lado de la vida al simplificarla y complicarla en distintos aspectos. Gracias por decidir acompañarme en la vida y ser siempre mi mejor amigo.

A Vero, la vida sin tu humor, comprensión y consejos no es tan grata; sigue inspirando las ganas de lograr el éxito.

A Diana, que vino a ampliar mi universo y me adoptó como hermana menor, que así siga.

A mis amigos entrañables de la Prepa 9, por las mejores aventuras de la juventud.

A Jazmín, una amistad muy cercana que me acompaña en el vaivén de la vida.

Academia

Agradezco a la M. en C. Reyna Lara Martínez por su apoyo técnico durante el procesamiento de las muestras, ultramicrotomía y registro imágenes en el microscopio electrónico de Transmisión y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por permitirme hacer uso de la infraestructura del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Agradezco al Dr. Roberto Velasco García, por su apoyo en la realización de la inmunodetección de la proteína D1 y el procesamiento de las imágenes; con equipo del Laboratorio de Osmorregulación de la Unida de Morfofisiología, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Agradezco al profesor Sergio González Moreno y a la profesora Martha Ofelia Salcedo Álvarez, que me permitieron asistir de oyente a su clase de biomoléculas; ya que bastó con escuchar unos minutos su pasión al impartir, para decidir estudiar Biología.

Agradezco inmensamente al profesor Hugo por recibirme como alumna, considerarme para apoyarme en la impartición de un curso y acompañarme en todo momento para la realización de mi tesis; además de ser un ejemplo de esfuerzo y mejora continua.

Agradezco especialmente a todos los profesores, que compartieron sus conocimientos conmigo durante toda la carrera, llevaré sus enseñanzas el resto de mi vida esperando enorgullecerlos.

Finalmente, dedico este trabajo de tesis:

A LA SOCIEDAD MEXICANA, A QUIEN ME DEBO COMO BIÓLOGA Y A QUIEN AGRADEZCO POR CREER EN LA EDUCACIÓN.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, QUE ME ACEPTÓ COMO UNA ESTUDIANTE VALIOSA; ME DEDICÓ RECURSOS ECONÓMICOS, UN LUGAR DE ESTUDIO Y TIEMPO PARA MI FORMACIÓN.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Pág.

Agradecimientos	1
Índice de contenido	3
Índice de tablas y figuras	6
Lista de abreviaturas	8
Resumen	9
Introducción	10
Diversidad de contaminantes en las aguas	10
Los fármacos	10
Toxicidad de los fármacos en los organismos	11
Fuentes de emisión y contaminación.....	11
Tipos de fármacos utilizados	11
Persistencia y problemática de los fármacos en el ambiente acuático.....	11
Estreptomicina.....	12
Descripción.....	12
Actividad biológica	12
Usos	12
Producción mundial de productos farmacéuticos.....	13
Regulación de fármacos en México	13
<i>Chlorella vulgaris</i>	14
Taxonomía.....	14
Características morfológicas.....	14
Antecedentes	15
Justificación	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Material y métodos	17
Organismo	17
Medio de cultivo.....	17
Protocolo experimental.....	17
Variables experimentales de respuesta.....	17
Crecimiento	17
Determinación de pigmentos fotosintéticos.....	18
Consumo de nitratos	18
Consumo de fosfatos	18

Actividad fotosintética y respiratoria por oximetría	19
Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.....	19
Ultraestructura celular	21
Cantidad relativa de proteína D1	22
Análisis estadístico	22
Resultados y discusión	23
I. Crecimiento	23
Crecimiento en peso seco (PS)	24
Tasa de crecimiento relativo.....	25
Tiempo de duplicación	25
II. Consumo de fosfatos y nitratos	26
Consumo de fosfatos	26
Consumo de nitratos	27
III. Ultraestructura celular	28
Tamaño y forma celular, gránulos de almidón	28
Núcleo.....	29
Pared celular	30
Cloroplasto y pirenoide	32
Membranas tilacoidales	32
IV. Pigmentos fotosintéticos	34
Concentración de clorofila total por biomasa.....	35
Concentración de clorofila total volumétrica	35
Concentración de carotenoides total volumétrica.....	36
Concentración de carotenoides total por biomasa	37
V. Actividad fotosintética y respiratoria	39
Producción fotosintética de oxígeno.....	39
Consumo de oxígeno por respiración	40
VI. Transporte electrónico	41
Tasa de transporte electrónico (ETR).....	42
Capacidad fotosintética máxima (P _{máx}).....	42
Rendimiento cuántico máximo (α).....	42
Decaimiento no fotoquímico (NPQ).....	42
Relajamiento no fotoquímico (NPQ).....	45
VII. Fotoquímica	46
Fluorescencia variable relativa	48
Rendimientos cuánticos máximos para la fotoquímica primaria en PSII.....	48
VIII. Cantidad relativa de proteína D1	52

Cantidad de proteína D1 del PSII	52
Conclusiones	55
Bibliografía	57
Apéndice	66
I.1 Crecimiento poblacional	66
I.2 Tasa de crecimiento relativo	66
I.3 Producción fotosintética de oxígeno	67
I.4 Consumo de oxígeno por respiración.....	67
I.5 Concentración de pigmentos.....	68
I.6 Consumo de fosfatos.....	69
I.7 Consumo de nitratos.....	69
I.8 Fotoquímica OKJIP.....	70
I.9 Rendimientos cuánticos	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Pág.

Figura 1. Fórmula química del sulfato de estreptomicina	13
Tabla 1. Mercado farmacéutico global total de 2003-2011.	13
Tabla 2. Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP.	20
Figura 2. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el crecimiento	24
Figura 3. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la tasa crecimiento (μ)	25
Figura 4. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el tiempo de duplicación.	25
Figura 5. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el consumo de fosfatos	26
Figura 6. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el consumo de nitratos	27
Figura 7. Efecto de la exposición a estreptomicina durante 72 h en el tamaño celular y la estructura del cloroplasto	28
Tabla 3. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el área de las células de <i>C. vulgaris</i>	28
Figura 8. Efecto de la exposición a estreptomicina durante 72 h en la estructura de la pared celular	31
Figura 9. Efecto de la exposición a estreptomicina durante 72 h en la estructura de las membranas tilacoidales.....	33
Figura 10. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el contenido volumétrico de clorofila total (a+b)	35
Figura 11. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el contenido específico de clorofila total (a+b)	35
Figura 12. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el contenido volumétrico de carotenoides totales	37
Figura 13. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el contenido específico de carotenoides totales	37
Figura 14. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la liberación de oxígeno fotosintético.....	39
Figura 15. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el consumo de oxígeno por respiración	40
Figura 16. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la tasa de transporte electrónico fotosintético (ETR)	42

Figura 17. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la capacidad fotosintética máxima ($P_{m\acute{a}x}$).....	43
Figura 18. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el rendimiento cuántico máximo (α).....	43
Figura 19. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el decaimiento no fotoquímico (NPQ).....	44
Figura 20. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el relajamiento no fotoquímico (NPQ).....	45
Figura 21. Cinética de emisión de fluorescencia del fotosistema II en muestras preacondicionadas a la oscuridad.....	47
Figura 22. Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP.....	47
Figura 23. Efecto de las concentraciones de la estreptomicina sobre la fluorescencia variable relativa.....	48
Tabla 4. Efecto de la estreptomicina en el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII (ϕP_0), la eficiencia con la que un fotón atrapado mueve un electrón después de Q_A^- (Ψ_0), el rendimiento cuántico para el transporte electrónico en PSII (ϕE_0) y el índice de rendimiento (PI_{ABS}).....	49
Figura 24. Análisis cuantitativo de la cantidad de proteína D1.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Energía absorbida
ABS/RC	Absorción por RC
Cit _{b6/f}	Citocromo b/f
CLO	Complejo liberador de oxígeno
Dlo/RC	Disipación a tiempo 0 por RC
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETo/RC	Transporte electrónico a tiempo 0 por RC
Feo	Feofitina
FM	Fluorescencia máxima
FO	Fluorescencia a 50 μ s
FV	Fluorescencia variable
LDS	Dodecilsulfato de litio
MDA	Malondialdehído
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPQ	Decaimiento no fotoquímico
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PI/ABS	Índice de performance
P _{máx}	Tasa fotosintética máxima
PQ	Plastoquinona
PS	Peso seco
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PVDF	Difluoruro polivinilideno
P680	Fotosistema II
Q _A -	Quinona A
Q _B	Quinona B
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
RC	Centros de reacción
RuBisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa
TR ₀	Energía atrapada
TR ₀ /RC	Atrapamiento a tiempo 0 por RC
V _j	Fluorescencia variable a 2 ms
ϕ Do	Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica
ϕ Eo	Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII
ϕ Po	Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria
ψ o	Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q _A -
Φ PSII	Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En este estudio se expuso el alga *Chlorella vulgaris* a un antibiótico de amplio uso, la estreptomina. Las células se expusieron durante 72 h a las siguientes concentraciones de sulfato de estreptomina (Sigma ®): 0 (testigo), 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 y 2.4 mg•L⁻¹. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, iluminación, fotoperíodo y flujo de aire. Encontramos una disminución de 40% del crecimiento poblacional por peso seco y un aumento del tamaño celular hasta 322 % respecto del testigo, según incrementaba la dosis de antibiótico. A la vez, se determinó que la tasa de crecimiento poblacional disminuyó 24% y en concordancia, el tiempo de duplicación se extendió 32%.

Se registraron modificaciones que principalmente alteraron al cloroplasto; las granas de los tilacoides se desagregaron, aunque el pirenoide se conservó. Sin embargo, las estructuras superficiales de la pared celular también sufrieron un alargamiento y los gránulos de almidón desaparecieron con la máxima concentración de estreptomina. La cantidad de clorofila total volumétrica y por biomasa, se redujo 60 y 56 % respectivamente; asimismo, la cantidad de carotenoides totales volumétrica y por biomasa, se redujo 58 y 29 % respectivamente. La producción de oxígeno fotosintético disminuyó 64% y la respiración resultó hasta 67 % menor que en el control. La tasa de transporte electrónico (ETR), disminuyó ante el incremento del antibiótico. La pendiente inicial de la fotosíntesis, la capacidad fotosintética máxima (P_{máx}), también decreció porcentualmente.

Se observó un menor rendimiento cuántico máximo (α) de hasta 39 %, si aumentaba la concentración de estreptomina. Se registró mayor relajamiento no fotoquímico (NPQ) en forma de calor, 98% para la dosis más alta. Los rendimientos cuánticos máximos para la fotoquímica primaria en el PSII, indicaron que la relación con que los electrones absorbidos fueron transportados y los atrapados también lo fueron, decreció si era mayor la dosis. Las fallas de los centros de reacción, se relacionaron con la pérdida de la cantidad de proteína D1 del PSII, que presentó hasta 66% de disminución.

Introducción

Diversidad de contaminantes en las aguas

El avance científico y tecnológico, ha propiciado el surgimiento de un universo de compuestos químicos tóxicos potenciales que repercuten en diversos aspectos. Los productos químicos presentes en el agua, abarcan un amplio espectro de compuestos antropogénicos sintetizados o indirectamente producidos por las actividades humanas. Estos contaminantes se han dispersado ampliamente en el ambiente y están emergiendo en las aguas superficiales y subterráneas; como resultado de emisiones industriales, la ineficiente disposición de residuos sólidos, los derrames accidentales y las actividades de consumo (Becerril, 2009).

Hasta este año, más de 92 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas han sido indexadas en “The American Chemical Society”, en su registro CAS. Solamente 312, 000 de estos compuestos está regulado a nivel mundial (CAS, 2015).

Para tener una idea del número de entidades químicas orgánicas distintas, que se podría hipotéticamente sintetizar e incluir, si se considera el cálculo propuesto por Bohacek *et al.* en 1996, estaría sobre 10^{60} estructuras distintas, que son posibles con un total de simplemente 30 átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, esto sin considerar el espectro posible si incluimos a los halógenos y el fósforo. Claramente se observa que no hay límites para los diversos tipos de productos químicos orgánicos (Becerril, 2009).

Los fármacos

Los compuestos diseñados para producir efectos biológicos específicos en la práctica médica pueden entrar en el sistema de aguas negras por la excreción o residuos y metabolitos en la orina y de la disposición intencional. Esto es considerado como práctica aceptable debido a la dilución dentro del sistema de alcantarillado. Se ha visto que del 30-90 % de antibióticos administrados a la gente y animales es excretado en formas activas en la orina (Thornton, *et al.* 2001).

Los productos farmacéuticos, son moléculas diseñadas para producir un efecto terapéutico sobre el organismo. Por lo general, son activos en concentraciones muy bajas, pueden pasar por membranas biológicas y persistir en el organismo mucho tiempo (Bottoni, *et al.*, 2010). Estos microagentes contaminadores ambientales, han llamado cada vez más la atención en los últimos años; debido al conocimiento creciente de su impacto sobre cuerpos de agua (Halling-Sorensen *et al.* 1998).

Los estudios de evaluación de riesgo para las especies acuáticas están en curso, ya que se ha probado un riesgo de exposición más alto que para el ser humano. Algunas sustancias están presentes en el agua a un nivel de riesgo que puede ser significativa para la biota (Christensen 1998; Stuer-Lauridsen *et al.* 2000 y Jones *et al.*, 2002).

Toxicidad de los fármacos en los organismos

Existe evidencia que muchos de estos productos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo impactos en los organismos acuáticos no destinatarios, en muchas formas que incluye la mortalidad, errores en la muda o eclosión, deformidades anatómicas, cambios subletales en el crecimiento de las plantas, cambios en la proporción sexual poblacional de organismos superiores, modificaciones en los ciclos biogeoquímicos, etc. Muchas de estas sustancias son encontradas en concentraciones de $\mu\text{g/L}^{-1}$ y ng/L^{-1} en desagües domésticos, en aguas superficiales y en el subsuelo (Bila y Dezotti, 2003).

Fuentes de emisión y contaminación

La fuente primaria de liberación de productos farmacéuticos, en el entorno acuático, está representada por aguas domésticas y la disposición de aguas residuales de hospitales; debido al empleo extendido de medicinas para el tratamiento de enfermedades humanas. La mayor parte de productos farmacéuticos, son sólo parcialmente transformados o conservados en el cuerpo y ellos son excretados por la orina como metabolitos; sobre todo activos de los compuestos, que pueden permanecer inalterados o ser conjugados a moléculas polares (Reddersen, *et al.*, 2002).

Tipos de fármacos utilizados

Entre los fármacos más prescritos en la medicina humana, destacan los analgésicos, antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los β -bloqueantes como el metoprolol (Hernando *et al.*, 2006). Fármacos con diferentes estructuras, funciones y actividades se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos. Incluyen analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, reguladores de lípidos, hormonas, anestésicos, antihipertensivos, antiulcerosos, antilipémicos, cardiovasculares, antidepresivos, anticonceptivos orales, esteroides, tranquilizantes, entre otros. (Hernando *et al.*, 2006; Bila y Dezotti, 2003).

Persistencia y problemática de los fármacos en el ambiente acuático

Las concentraciones a las que se han encontrado fármacos en aguas superficiales, como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas o en aguas subterráneas, se sitúan normalmente en el rango de ng/L o $\mu\text{g/L}$ que pueden inducir efectos tóxicos (Hernando *et al.*, 2006). El uso desenfrenado de medicamentos debido a su aporte continuo y persistencia, inclusive sus productos de degradación ocasionan muchos efectos no deseados en el ambiente acuático (Bila y Dezotti, 2003).

Aunque los fármacos puedan ser degradados en el entorno por proceso biótico y abiótico (Andreozzi *et al.*, 2002), se ha postulado que los productos farmacéuticos podrían actuar como compuestos persistentes. Debido a su infusión continua en medios acuáticos o vía

efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, pueden representar una exposición multigeneracional para los organismos residentes (Daughton y Ternes, 1999).

Estreptomicina

Descripción

Desde el descubrimiento de la estreptomicina (un aminoglucósido ciclitol obtenido por fermentación), la producción y aplicación clínica de este antibiótico ha tenido un gran alcance. *Streptomyces griseus* el organismo productor de estreptomicina, la primera vez que fue aislada fue en septiembre de 1943. Este antibiótico probó ser un tipo de quinona, con una fórmula molecular aproximada de $C_{41}H_{56}N_8O_{11}$. La estreptomicina es activa contra un gran número de bacterias gram positivas, con menor grado sobre organismos gram negativos, tiene relativa actividad contra bacterias anaeróbicas, hongos, protozoos y virus. La actividad de la estreptomicina, contra organismos sensibles, se ve influenciada por la presencia de ciertos compuestos químicos; como la glucosa, que reduce su actividad apreciablemente la hidroxilamina, tioglicolato y cisteína la inactivan ampliamente (Waksman, 1952).

Actividad biológica

El mecanismo de acción de la estreptomicina se debe a la inhibición de la síntesis proteica, los aminoglucósidos se unen a un lugar próximo al sitio catalítico del centro de decodificación, y originan un cambio de conformación de éste en virtud del cual aumenta su afinidad por moléculas de ARNt, cuyos anticodones no son las parejas apropiadas de los codones del ARNm. El resultado es una traducción errónea que posibilita la incorporación de aminoácidos equivocados. El efecto final es análogo, el lugar de unión de la estreptomicina difiere del ocupado por los aminoglucósidos que contienen el aminociclitol 2-desoxiestreptamina (gentamicina, tobramicina, netilmicina, ampicacina). Este hecho explica la ausencia de resistencia cruzada entre estreptomicina y ampicacina en organismos como *Mycobacterium tuberculosis*, cuyo mecanismo de resistencia se debe a mutaciones que afectan los lugares específicos de unión al ribosoma (Martínez y Sánchez, 2007).

Usos

La estreptomicina fue el primer agente antituberculoso con el que se contó. Actualmente sigue formando parte de los esquemas antituberculosos, si bien se emplea como fármaco de segunda línea; ha sido desplazada por medicamentos que se administran por vía oral. También se emplea, en combinación con penicilina G, en el tratamiento de la endocarditis bacteriana (Rodríguez-Álvarez, 2002). Usualmente es empleada como fungicida, alguicida, en tratamiento veterinario; también es utilizada para controlar bacterias y hongos en frutas, vegetales, hojas, cultivos ornamentales. Su uso agrícola primario como pesticida es en cultivos de manzana, pera, plantas ornamentales, tomate, pimiento y papa (McManus, 1999).

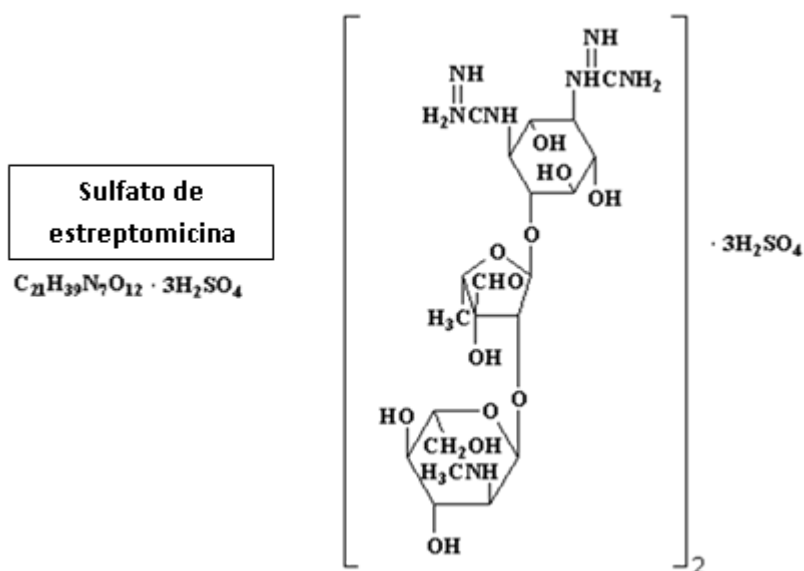


Figura 1. Fórmula química del sulfato de estreptomicina. Fuente: Answers TM.

Producción mundial de productos farmacéuticos

De acuerdo al Instituto Mundial de Salud (IMS), en México durante 2010, el mercado farmacéutico creció un 2% en dólares, alcanzando los 12, 076 millones y representó el 18.5% del mercado farmacéutico latinoamericano. En 2012, la venta global de antibióticos fue de 38.8 billones de dólares, colocándose en el lugar número 7 de ventas, las cifras de los años anteriores están en la tabla 1 (IMS México, 2013).

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Total de billones de dólares del mercado mundial	\$503	\$565	\$611	\$658	\$729	\$800	\$833	\$881	\$956

Tabla 1. Mercado farmacéutico global total de 2003-2011. Fuente: Instituto Mundial de Salud (IMS, 2012).

Regulación de fármacos en México

Al revisar la legislación mexicana, en el caso particular de la NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos; donde no se considera a los medicamentos, lo cual representa una limitación para la regulación de la contaminación acuática que ocasionan y sus impactos en el ambiente. Por este motivo el uso de los bioensayos son extremadamente importantes para determinar los efectos de los fármacos (Park y Choi, 2008). Por medio de estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática,

los que posteriormente, se usan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Burton y Nordstrom, 2004).

Chlorella vulgaris

El género es un ensamble heterogéneo de especies, con base en los datos bioquímicos y moleculares, consiste de sólo cinco verdaderas especies de *Chlorella*: *Chlorella vulgaris* BEIJERINK, *C. lobophora* ANDREYEVA, *C. sorokiniana* SHIHIRA y KRAUSS, *C. heliozoae* PRÖSCHOLD y DARIENKO y *C. variabilis* SHIHIRA y KRAUSS (Bock *et al.*, 2011). La especie tipo *C. vulgaris* ha sido considerada como la típica *Chlorella*: pequeña, verde y más o menos esférica. *Chlorella* es uno de los más famosos géneros microalgales en el mundo. Aunque los miembros de este género sufren de una escasez de características morfológicas, más de 100 especies de *Chlorella* han sido nombradas desde la descripción de la especie tipo *Chlorella vulgaris* BEIJERINK en 1890. Este taxa ha sido descrito en hábitats dulceacuícolas, marinos y edáficos o como endosimbiontes.

Taxonomía

Clasificación taxonómica (NCBI, 2012).

División	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Trebouxiophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>

Características morfológicas

C. vulgaris es una microalga unicelular, de forma esférica, presentan una pared celular lisa y con un cloroplasto que presenta forma de copa. Su reproducción se da mediante la formación de autosporas (Fanés, 2008) y forman grupos irregulares o colonias. Esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluso en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos (Aguirre *et al.*, 2003). Son células esféricas de tres a siete μm . de diámetro, pared celular delgada, cloroplasto asimétrico en forma de copa o en banda, ocupando la mitad a tres cuartos de la periferia celular con un pirenoide usualmente situado en la parte central (Khaybullina *et al.*, 2010).

Las células de *C. vulgaris* presentan una pared celular celulósica rígida. La glucosamina es una característica común de este taxa como componente dominante de la pared celular y la presencia de un doble pirenoide bisegmentando la matriz del cloroplasto (Huss *et al.*, 1999). La pared celular de *C. vulgaris* consiste en una delgada capa electrodensa de 17 a 20 nm que se sintetiza en la superficie externa de la membrana plasmática en la fase temprana de crecimiento celular (Yamamoto *et al.*, 2005). El taxón está ampliamente distribuido en suelos, cortezas de árboles, superficies de rocas húmedas y hábitats subaéreos, esta alga es considerada como cosmopolita (Andreyeva, 1998) y se encuentra principalmente en cuerpos dulceacuícolas (Barhoumi y Dewez, 2013).

Antecedentes

Se ha encontrado que el sulfato de estreptomina evita el crecimiento de *Scenedesmus obliquus*, *Anabaena cylindrica*, *Ankistrodesmus* sp., *C. vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* y *Chlamydomonas reinhardtii* a concentraciones de 0.09 a 0.86 mg/L⁻¹. El crecimiento de algas en las concentraciones subletales se retrasó (Harrass, *et al.* 1985). Con una concentración de 20.08 mg L⁻¹ de estreptomina se inhibió 80% del crecimiento poblacional de *C. vulgaris* y la concentración de clorofila disminuye de 47 a 54%; y los niveles de transcripción de las proteínas del cloroplasto *psaB*, *psbA* y *rbcL* decrecieron 14.5%, 32.2% y 9.3% respectivamente (Qian, *et al.* 2010).

Existe un estudio donde la mezcla de penicilina, estreptomina, kanamicina y tetraciclina (50, 50, 30, 5 µg.mL⁻¹ respectivamente), disminuye el crecimiento 1x10⁴ UFC.mL⁻¹ del dinoflagelado *Alexandrium minutum* (Maas *et al.*, 2007). La neomicina, un aminoglucósido obtenido por fermentación como la estreptomina, mostró efecto tóxico sobre *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* y *Oryzias latipes* (Park y Choi, 2008). Otro fármaco probado sobre *C. vulgaris*, la carbamazepina, impidió su proliferación reduciéndola desde un 60-80% del valor del control, la reducción fue mayor mientras el tiempo transcurría (Jos *et al.*, 2003). El levofloxacino y el norfloxacino sobre *Pseudokirchneriella subcapitata*, provocaron una inhibición del 30% de su crecimiento aproximadamente dependiendo del incremento en la dosis (González-Pleiter *et al.*, 2013).

En el estudio de Andrieu *et al.*, en 2015, *Chlorella* sp. resultó más sensible al ciprofloxacino (EC₅₀=23 400 µg/L⁻¹) que al enrofloxacino (EC₅₀=111 000 µg/L⁻¹). Halling-Sorensen *et al.*, en 2000 encontraron la EC₅₀ para *Microcystis* expuesta a ciprofloxacino fue 0.005 mg/L⁻¹ y 112 mg/L⁻¹ con trimetoprima. La EPA en 1992, declaró que la estreptomina es tóxica para las algas.

Cultivos de algas con crecimiento más rápido acumularon estreptomina con mayor velocidad y aún más en las concentraciones más altas del antibiótico (Kvíděrová y Henley, 2005). En otro estudio, se reportó la reducción de la cantidad de *Chlamydomonas* con dosis de estreptomina menores a 20 ppm, los autores señalaron que existe mayor absorción del antibiótico si el tiempo de exposición era mayor (Swartzman *et al.*, en 1989). En 1985, Monroy y Schwartzbach, demostraron que la estreptomina inhibió la acumulación de proteínas reguladas por su transcripción, de la síntesis de clorofila y los inducidos por los productos de la fijación fotosintética en *Euglena gracilis*; pero ninguna dependiente de los productos de transcripción citoplásmica.

Justificación

El alto potencial en la proliferación continua de fármacos y productos de uso personal, medicamentos veterinarios, y de otros productos químicos antropogénicos, plantea desafíos substanciales. Se sabe muy poco sobre el destino de estos compuestos en el ambiente y el impacto potencial a largo plazo (Thornton, *et al.* 2001).

Como hasta ahora, el modo de acción de los productos farmacéuticos es poco entendido, no se pueden hacer declaraciones generales sobre efectos potenciales ambientales causados por estas sustancias. Por lo que, el objeto de este estudio, es apoyar en la creación de una base desconocimiento más amplia para la evaluación de la importancia ecotoxicológica de la estreptomycinina por su efecto en la fisiología de *C. vulgaris*.

Objetivo general

Caracterización morfofisiológica de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de estreptomycinina.

Objetivos específicos

- Analizar el cambio en el crecimiento poblacional (μ y tiempo de duplicación) de *Chlorella vulgaris* causado por la exposición a estreptomycinina.
- Caracterizar el efecto en la actividad metabólica de *Chlorella vulgaris* causado por la exposición a estreptomycinina.
- Evaluar el efecto en el consumo de nitrógeno (NO_3) y fosfatos (PO_4) de *Chlorella vulgaris* causado por la exposición a estreptomycinina y caracterizar la actividad respiratoria.
- Determinar el cambio morfológico y ultraestructural en *Chlorella vulgaris* causado por la exposición a estreptomycinina.

Material y métodos

1. Organismo

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

2. Medio de cultivo

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

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

3. Protocolo experimental

El efecto de la estreptomycin en el metabolismo se estudió de acuerdo a los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias (OECD, 2011).

Las unidades experimentales se inocularon con $4 \cdot 10^5$ células $\cdot\text{L}^{-1}$, aproximadamente 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de peso seco o 0.050 a 0.055 de absorbancia a 750 nm. En las condiciones de cultivo antes mencionadas las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de sulfato de estreptomycin (Sigma ®): 0 (testigo), 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 y 2.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los cultivos se expusieron al producto farmacéutico por 72 h de acuerdo al protocolo de la OECD, para después determinar el peso seco (PS), el contenido de pigmentos fotosintéticos y la actividad metabólica.

4. Variables experimentales de respuesta.

a. Crecimiento

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

b. Pigmentos fotosintéticos

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

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

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

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

c. Consumo de nitratos

El consumo de nitratos se determinó tomando 2 ml de cultivo de cada tratamiento (n=3) al final del experimento. Las muestras se filtraron al vacío en membranas de nitrocelulosa de 8.0 μm de poro (Millipore ®). La concentración de nitrato residual en el medio de cultivo se cuantificó del filtrado libre de células por el método de brucina-ácido sulfámico (APHA, AWWA, WPCF. 1992). Cada muestra se comparó con una curva patrón previamente realizada. Primero se diluyeron los 2 ml filtrados a una proporción 1:40 y se tomaron 3 ml de la dilución a la cual se le añadió 0.6 ml de sol. de NaCl al 30%, 0.15 ml de reactivo de Brucina-ácido sulfámico y finalmente 3 ml de sol. de ácido sulfúrico 1:1.25. Se incubaron a 95°C en baño maría 20 min. se enfriaron a temperatura ambiente y se tomó lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm.

d. Consumo de fosfatos

El consumo de fosfatos se determinó tomando 2 ml de cultivo de cada tratamiento (n=3), cada 24 h. Las muestras se filtraron al vacío en membranas de nitrocelulosa de 8.0 μm de poro (Millipore ®). La concentración residual de fosfatos en el medio de cultivo se cuantificó del filtrado libre de células por el método de Taussky y Shorr, modificado por González y Peñaloza (2000). Cada muestra se comparó con una curva patrón previamente realizada. Primero se diluyeron los 2 ml filtrados a una proporción 1:40 y se tomó 1 ml de la dilución a la cual se le añadieron 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.5 N y 1ml de reactivo de color. Se tomó lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 660 nm.

e. Actividad fotosintética y respiratoria por oximetría.

Transcurrido el tiempo de exposición a la estreptomycin, se tomaron por triplicado de cada lote experimental, lo equivalente en volumen a $50\mu\text{g/ml}$ de clorofila total, aproximadamente 15 ml. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 1min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de una solución de K_2HPO_4 100 mM pH 7.0. La tasa fotosintética se midió como liberación de oxígeno y la respiratoria como consumo de oxígeno. Las mediciones se realizaron en un oxímetro (Oxygraph, Hansatech®, U.K.) a 30°C por medio de un baño de agua circulante. La tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis) se obtuvo iluminando la muestra con luz blanca actínica (400-700nm) y un flujo fotónico de $400\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Inmediatamente después de apagada la luz, se registró la velocidad de consumo de oxígeno (respiración) durante dos minutos.

f. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad, se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK). Se tomaron muestras de 2 ml de cada tratamiento ($n=5$) y fueron incubadas a la oscuridad por 20 min. a temperatura ambiente (25°C), para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante ($3000\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm.

Los valores de la fluorescencia mínima, F_0 a los 50 μs , la fluorescencia máxima, F_M a los 200 ms y la fluorescencia variable ($F_v = F_M - F_0$) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, U.K.) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Los parámetros medidos (tabla 2) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (Van Heerden *et al.*, 2004).

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	F₀	
Fluorescencia máxima	F_M	
Fluorescencia variable	F_v	= F _M -F ₀
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	M₀	=(F _{300μs} -F ₀)/(F _M -F ₀)
Fluorescencia variable a 2 ms	V_j	=(F _{2ms} -F ₀)/(F _M -F ₀)
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	=(M ₀ /V _j)/(1-F ₀ /F _M)
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TR₀/RC	= M ₀ /V _j = (ABS/RC) ϕ P ₀
Disipación a tiempo 0 por RC	DI₀/RC	=(ABS/RC) - (TR ₀ /RC)
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ET₀/RC	=(TR ₀ /RC) ψ ₀
Productos o relaciones de flujo		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕP₀	= TR ₀ /ABS = (F _M -F ₀)/F _M =
Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica	ϕD₀	= DI ₀ /ABS = 1- ϕ P ₀ = F ₀ /F _M
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q _A -	ψ₀	= ET ₀ /TR ₀ = 1-V _j
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	ϕE₀	= ϕ P ₀ . Ψ ₀ = (TR ₀ /ABS)/(ET ₀ /TR ₀) = ET ₀ /ABS = (1-F ₀ /F _M)(1-V _j)
Índices vitales		
Índice de performance	PI_{ABS}	=[RC/ABS][ϕ P ₀ /(1- ϕ P ₀)] [Ψ ₀ /1- Ψ ₀]

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

El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico se realizó por medio de la técnica de pulso saturante utilizando un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). La eficiencia cuántica para el transporte electrónico (Φ PSII), se realizó determinando la emisión de fluorescencia en tapetes celulares. Los tapetes celulares se obtuvieron filtrando 15 ml o su equivalente en densidad óptica de cada tratamiento en membranas de nitrocelulosa de 5 μ m. La emisión de fluorescencia se realizó colocando el tapete celular en las pinzas de hojas y manteniéndolo cerca de la fibra óptica. La hidratación del tapete celular se mantuvo utilizando una porción de papel filtro saturado con agua destilada, colocado por debajo del filtro de nitrocelulosa. El valor de F₀ a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad (0.1 μ moles \cdot m⁻² \cdot s⁻¹), y después de 10 segundos se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de 10,000 μ moles \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ por 0.8 s, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia en estado estacionario F_M' y el estacionario F_S'. Utilizando estos valores se calculó la eficiencia cuántica de operación para el fotosistema II (Φ PSII) según la siguiente fórmula reportada por Maxwell y Johnson, (2000): Φ PSII = F_M'-F_S'/F_M'

El decaimiento fotoquímico (NPQ) se determinó incubando las muestras en la oscuridad por 20 minutos. El valor de F_0 a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ($0.1 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), y después de 10 segundos se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia F_M en oscuridad. Inmediatamente después del pulso saturante se irradiaron muestras con una luz actínica blanca no saturante de $500 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por cinco minutos hasta alcanzar un estado estacionario para después sobreponer un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s y obtener el valor de F_M' . La eficiencia cuántica para la disipación no fotoquímica (NPQ) se calculó utilizando la fórmula reportada por Maxwell y Johnson, (2000): $\text{NPQ} = F_M - F_M' / F_M'$

La determinación de la tasa fotosintética máxima ($P_{\text{máx}}$) y el rendimiento cuántico para el transporte electrónico (α), se determinaron variando la intensidad lumínica de 0 a $900 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Liu *et al.*, 2009) y cuantificando la tasa de transporte electrónico aparente: $\text{ETR} = (\Phi\text{PSII}) \cdot (0.5) \cdot (\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$.

g. Ultraestructura celular

Los cambios en la ultraestructura celular se determinaron por microscopía electrónica de transmisión. Las muestras fueron procesadas en la unidad de microscopía electrónica del de la Facultad de Ciencias de la UNAM, según el siguiente protocolo:

1. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en búfer de fosfatos por 2 h.
2. Se centrifugaron a 4000 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 ml, hasta formar un paquete.
3. El paquete se lavó 3 veces cambiando el medio de fosfatos cada 15 minutos.
4. Se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en búfer de fosfatos por 2 horas.
5. Las muestras se lavaron 3 veces cambiando el medio cada 15 minutos.
6. Las muestras lavadas se deshidrataron durante 15 min. c/u a 4°C con etanol-agua v/v a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% de etanol.
7. Se realizaron 2 cambios más con etanol al 100% de 15 min. c/u.
8. Se efectuaron 2 cambios con óxido de propileno al 100% de 15 min. c/u.
9. La muestra se dejaron en óxido de propileno-resina epon (1:1) por 48 h en un desecador a temperatura ambiente.
10. Se llevó a cabo un cambio por resina epon al 100% en rotación por 4 h.
11. Se permitió la polimerización de la resina durante 48 h a 60°C .
12. Se hicieron cortes de 90 nm en un ultramicrotomo Reichert-Jung.
13. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 2% durante 30 minutos y posteriormente con citrato de plomo al 2% durante 10 min.
14. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200CXII a diferentes aumentos y se obtuvieron fotografías.

h. Cantidad relativa de proteína D1

Se colectó una cantidad igual de células de cada tratamiento (ajustado por absorbancia) por medio de centrifugación a 8500 rpm durante 10 minutos. La pastilla fue resuspendida en un búfer de extracción desnaturizante con una base de 140 mM Tris, 105 mM TRis-HCl, 0.5 mM de ácido etilendiamintetraacético (EDTA), 2% de dodecilsulfato de litio (LDS) y 10% de glicerol.

Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y maceradas usando morteros fríos, fueron almacenadas a -20°C para después ser sonicadas a una intensidad de 60 W durante 20 segundos (Branson Sonifer 250). Para evitar el sobrecalentamiento, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en nitrógeno líquido. Después de la aplicación de tres ciclos de enfriamiento, se descongelaron por sonicación para tener la máxima extracción de proteínas. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 8500 g, para quitar el material insoluble y células rotas (Brown *et al.*, 2008).

El contenido total de clorofila, se determinó diluyendo una submuestra en acetona al 80% y midiendo la absorbancia a 653 nm, el resultado fue multiplicado por 27.8 para obtener la cantidad total de clorofila (mg. L⁻¹) (Hipkings y Baker, 1986). Las muestras en búfer de extracción desnaturizante, fueron llevadas a una concentración final de 50 mM en ditioneitol (DTT). Los extractos celulares obtenidos, fueron calentados después a 70 ° C por 5 min. La electroforesis fue realizada en un gel de poliacrilamida 12% de separación y 4% concentrador.

Se colocó material de cada tratamiento en cada carril de la electroforesis considerando que correspondiera a cantidades iguales de clorofila total (35mg). Las proteínas celulares totales separadas en la electroforesis, se electrotransfirieron a membranas de difluoruro polivinilideno (PVDF) y se inmunodetectaron por un método quimio-luminiscente mejorado (Biorad). El anticuerpo principal, fue anti-D1 de conejo policlonal contra un péptido N-terminal de proteína conservada (Agrisera, Sweden). Las imágenes fueron grabadas con un escáner blot (C-Digit. LI-COR) y analizado usando el programa Gel Analyzer 2010.

i. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un ANOVA unifactorial, para verificar que las medias de los tratamientos fueran diferentes y se aplicó una prueba de LSD o Tukey; para conocer las diferencias significativas entre los tratamientos, con hoja de cálculo y el programa SAAS.

Resultados y discusión

Este estudio aporta al conocimiento la respuesta fisiológica de *C. vulgaris* expuesta a concentraciones de estreptomycin. Se encontró una disminución del peso seco (PS) de los cultivos según aumentaba la concentración del antibiótico, la velocidad de crecimiento tendió a ser menor y el tiempo de duplicación se alargó a medida que se incrementaba la concentración de estreptomycin.

De la medición del consumo de fosfatos y nitratos, observamos incrementos con el aumento de las concentraciones de antibiótico. En la ultraestructura, se identificó la pared celular, membrana plasmática, cloroplasto en forma de copa, membranas tilacoidales, granas, pirenoide, gránulos de almidón y núcleo; las membranas tilacoidales del cloroplasto mostraron las mayores modificaciones. Las células en los cultivos de la concentración 1.2 mg.L⁻¹ fueron de mayor tamaño que las células control (las más pequeñas) y las células de la concentración 2.4 mg.L⁻¹ fueron las más grandes de todas.

Encontramos ciertas alteraciones para la conformación del cloroplasto, donde según aumentaba la concentración del antibiótico su tamaño también lo hizo. Las granas desaparecieron conforme la dosis del antibiótico fue aumentando, además, se prolongaron y adelgazaron las estructuras exteriores que la pared celular tiene.

El pirenoide, estuvo visible en las células del control y en las células expuestas al antibiótico, sin embargo, el almidón que circunda al pirenoide desaparece en las células expuestas a 2.4 mg.L⁻¹ de estreptomycin.

I. CRECIMIENTO

El crecimiento de *C. vulgaris*, medido por PS, disminuyó 40% del valor del control al valor de las células expuestas a la mayor concentración de estreptomycin (Figura 2); lo que permite inferir que al aumentar la concentración se puede eliminar la población.

Se encontraron diferencias significativas entre las medias de PS para los tratamientos con las concentraciones de 0.0, 0.6, 1.2 y 2.4 mg.L⁻¹. La exposición a la estreptomycin, representó una perturbación a la densidad poblacional de los cultivos, dando como resultado que los valores graficados tuvieron una pendiente negativa (Figura 2).

El peso seco disminuyó, como se observa en la figura 3, la tasa de crecimiento celular por día (μ) también decrece significativamente, cuando comparamos el testigo y los valores del cultivo con la dosis de antibiótico más alta. El resto de las concentraciones tuvo una velocidad de crecimiento celular similar, pese a que presenta una tendencia a la reducción con la que pierde 24% de la velocidad al tardar más tiempo en crecer.

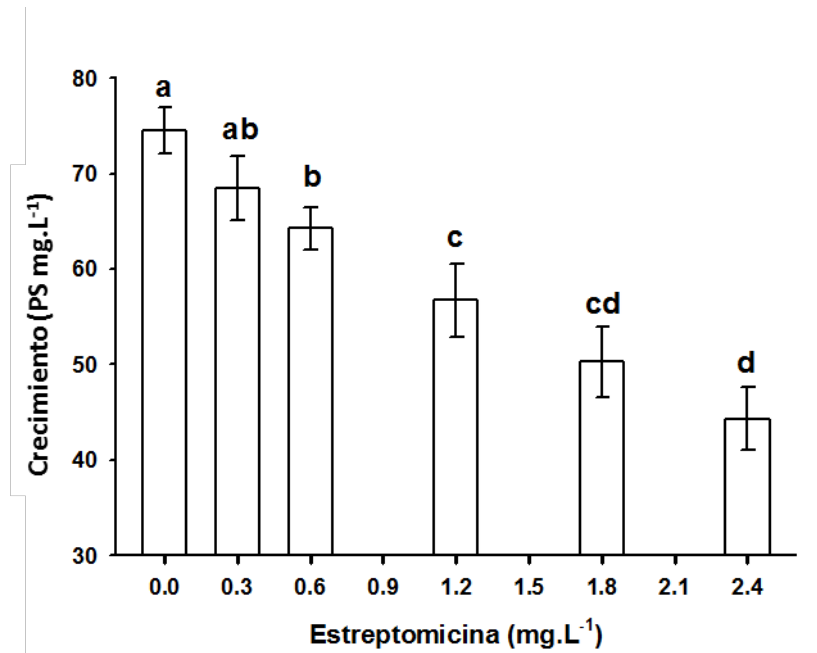


Figura 2. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el crecimiento de *C. vulgaris* traducido en peso seco al término del tratamiento (72 h.), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Campa-Córdova *et al.*, en 2006, publicaron que el número de células por mililitro del alga *Tetraselmis chuii*, expuestas a concentraciones de florfenicol (0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 y 24 mg/L⁻¹), disminuyó hasta 90% de su valor inicial en 96 h. Ante 3.6, 5.3, 8.0 12.0 y 18.0 mg/L⁻¹ de oxitetraciclina, se disminuyó aproximadamente 75% del valor inicial durante el mismo tiempo (Gonçalves *et al.*, 2007). También se ha reducido el número de células en los cultivos de *Isochrysis galbana* 16.5% y de *Chaetoceros gracilis* 89%, por la exposición a eritromicina.

Lai *et al.*, en 2009, colocaron cloranfenicol, tiamfenicol y también florfenicol en cultivos de algas tanto marinas como dulceacuícolas (entre ellas *C. vulgaris*); provocando disminuciones en las poblaciones mayores al 75% y algunas aproximándose al 100%. Pese a que estos estudios se reportan por el número de células y aquí empleamos el peso seco, nuestros datos, permiten confirmar que los inhibidores de síntesis de proteínas como la estreptomicina ocasionan disminución en los cultivos de algas.

Cabe mencionar que *Microcystis aeruginosa*, reduce su población ante la mínima concentración de cefradina que inhibe la síntesis de proteína, en el caso de *Scenedesmus obliquus* su población resiste (Chen y Guo en 2012).

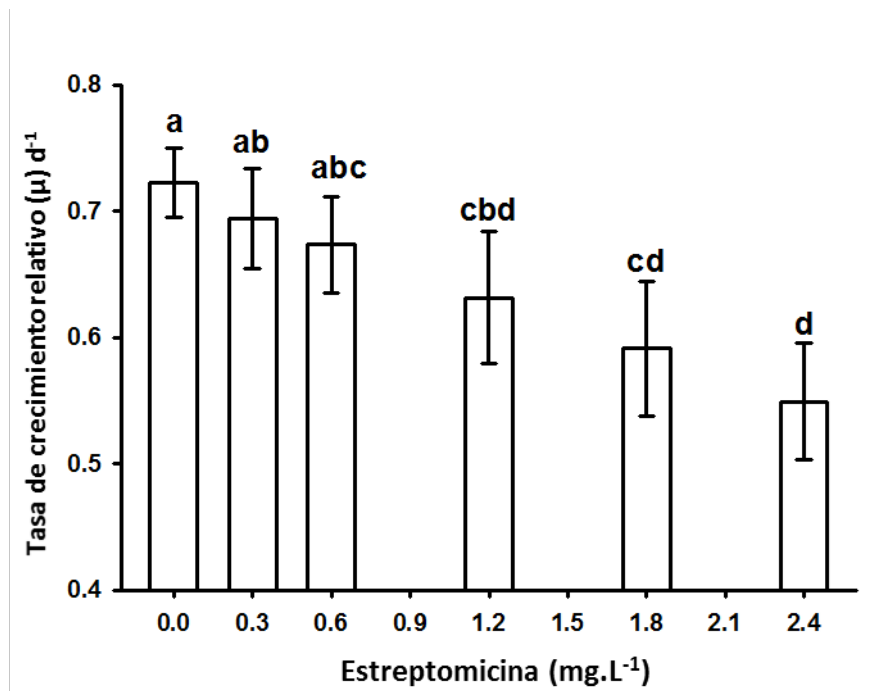


Figura 3. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la tasa de crecimiento (μ) de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h.), promedio de $n=3$ con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

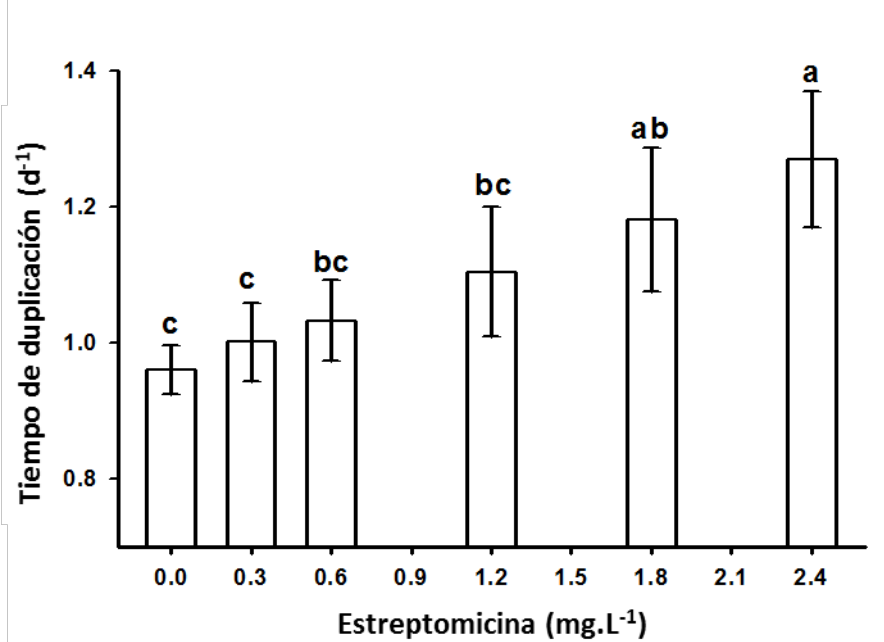


Figura 4. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el tiempo de duplicación de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h.), promedio de $n=3$ con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

El peso seco y la tasa de crecimiento relativo disminuyeron con la exposición al antibiótico, el tiempo necesario para la duplicación aumentó 32%, contrastando el valor del control con el del tratamiento con la mayor concentración (Figura 4). Las células no se reprodujeron tan fácilmente al estar expuestas a estreptomicina, retardaron su duplicación y con esto la velocidad del crecimiento poblacional.

II. CONSUMO DE FOSFATOS Y NITRATOS

El consumo de fosfatos y nitratos aumentó conforme lo hizo la concentración de estreptomicina. Para fosfatos, todos los consumos resultaron con diferencias significativas, para nitratos, sólo los cultivos con las dos concentraciones más altas del antibiótico (1.8 y 2.4 mg.L⁻¹) se distinguieron del resto.

El consumo de fosfatos máximo en el nuestro estudio, se dio bajo el tratamiento más concentrado, el incremento en el consumo fue de 48% sobre el valor obtenido del testigo (Figura 5). Ante un aumento en el consumo de nutrientes, ya sea fosfatos o nitratos se esperaría que se emplearan en la construcción de moléculas que sirven para el crecimiento celular y como consecuencia favorecieran el crecimiento poblacional.

No obstante, el crecimiento poblacional se redujo; lo que significa que la asimilación de dichos nutrientes no fue suficiente para que las células mantuvieran el crecimiento en peso seco, tasa relativa de crecimiento y el tiempo de duplicación celular como el cultivo control. El aumento en el consumo de los fosfatos no implicó un crecimiento, por lo que, para futuros estudios se recomienda investigar el papel del fosfato en la fisiología del alga expuesta a estreptomicina.

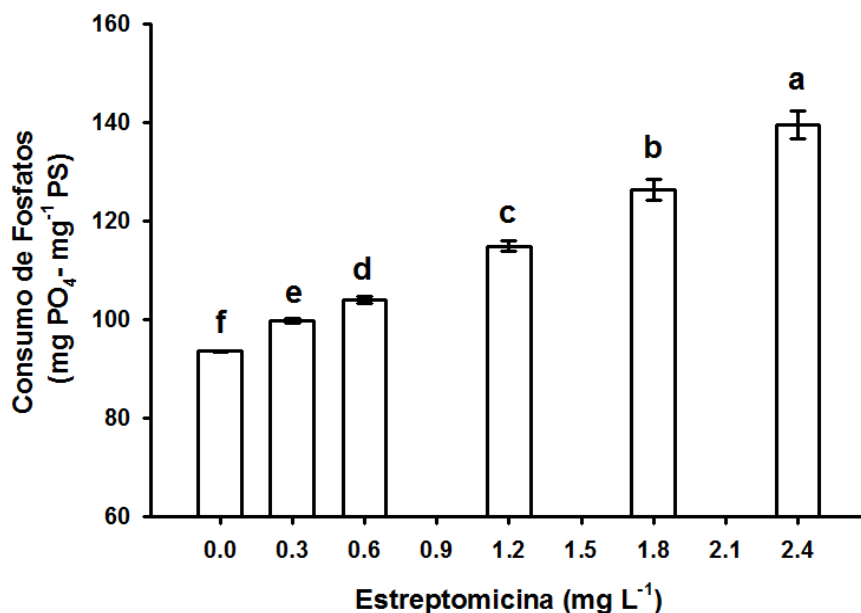


Figura 5. Efecto de las concentraciones de la estreptomicina sobre el consumo de fosfatos (mg PO₄⁻) por mg.L⁻¹ de PS de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Si bien el consumo de nitratos, aumentó significativamente ante las dos concentraciones más altas de estreptomicina; la diferencia entre el consumo del testigo con el de las algas expuestas a 2.4 mg.L⁻¹ del antibiótico es de 221% (Figura 6). A diferencia de nuestros resultados, Swartzman *et al.* en 1989, encontró que el consumo de fosfatos y nitratos fue menor para *Chlamydomonas* en presencia de estreptomicina que en el control.

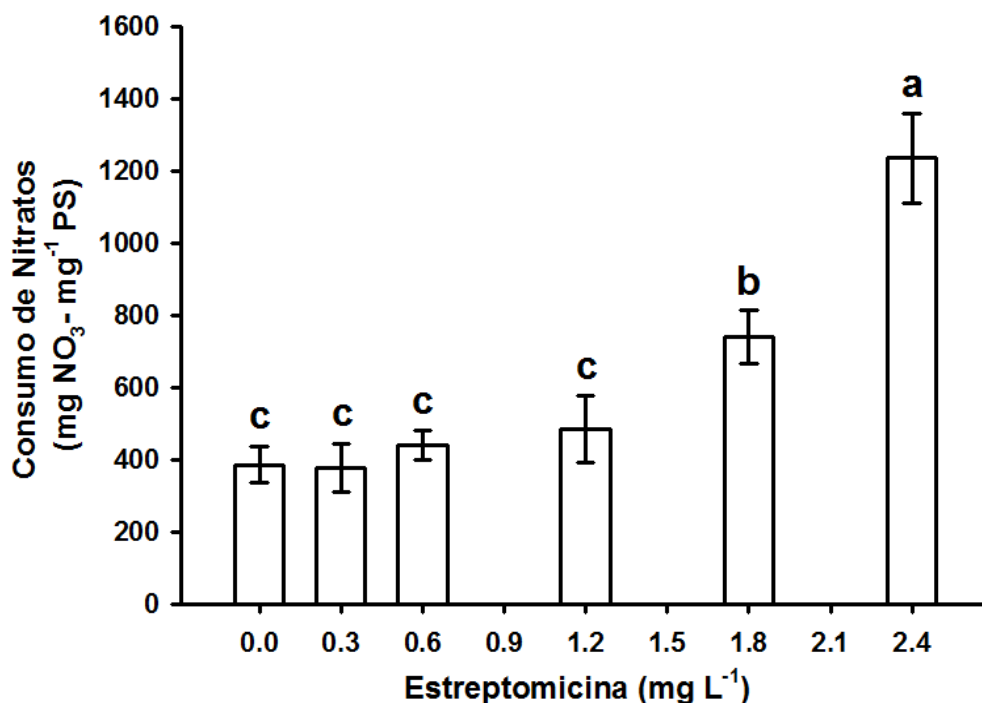


Figura 6. Efecto de las concentraciones de la estreptomicina sobre el consumo de nitratos (mg NO₃⁻) por mg.L⁻¹ de PS de *C. vulgaris*. al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Gómez, en 2007, encontró que las sales minerales de *C. vulgaris* corresponde al 10% de su peso y que la relación N amínico/N total presenta un valor superior al 40%. Los fosfatos y nitratos pudieron formar parte de la mezcla de aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (Huss *et al.*, 1999).

Si bien, *C. vulgaris* es usada para tratamiento terciario de aguas residuales y especialmente para compuestos de nitrógeno y fósforo (De-Bashan *et al.*, 2002); como demostramos, hubo un incremento en el consumo pero no se tiene la certeza de cómo se aprovecharon los nutrientes.

No obstante, la falta de estudios que midan el consumo de nutrientes para caracterizar la respuesta fisiológica de algas bajo estrés, hace difícil la comparación de nuestros resultados, dejando el campo abierto para siguientes investigaciones. Por esa razón, es que se incentiva a estudiar si los nitratos y fosfatos pudieron emplearse para hacer proteínas y otras moléculas, que forman parte de las membranas tilacoidales y los fotosistemas.

III. ULTRAESTRUCTURA CELULAR

El tamaño de las células fue mayor con el aumento de la dosis del antibiótico, las células pasaron de una forma elíptica a esférica, las estructuras externas de la pared celular se alargaron y adelgazaron, el cloroplasto incrementó su tamaño pero conservó la forma de copa, las membranas tilacoidales se alargaron, las granas y los gránulos de almidón tienden a desaparecer (Figuras 8, 9 y 10).

Las células testigo, como la de la figura 7 A, presentaron forma elíptica y un tamaño menor a las células expuestas a 1.2 mg.L⁻¹ de la figura 7 B, que a su vez es de menor tamaño que la expuesta a 2.4 mg.L⁻¹ de la figura 7 C. En la tabla 3, se facilita la observación de las modificaciones por el antibiótico (únicamente el control, la concentración media y la máxima empleada) al comparar el promedio de las áreas calculadas en células de ciertos tratamientos. Con el tratamiento 1.2 mg.L⁻¹ las células incrementaron su área 48 % e incrementó 322 % respecto del testigo con la concentración 2.4 mg.L⁻¹.

Beijerinck en 1890, identificó que el diámetro del género *Chlorella* varía entre 2 y 10 μm, en el presente estudio, el diámetro de la célula aumentó de 2 a 5 μm conforme aumentó el antibiótico en el medio de cultivo. El incremento de diámetro, se reflejó en un aumento en área total por célula, la cual aumentó de la misma manera con el incremento de la estreptomycinina (Tabla 3).

Concentración (mg.L ⁻¹)	Área promedio (μm ²)	Desviación estándar (μm ²)
0	5.4774	± 0.3974
1.2	8.1163	± 1.5565
2.4	23.1021	± 6.4987

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de la estreptomycinina sobre el área de las células de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar.

Las células expuestas a la concentración máxima son células grandes, que no se reproducen tan rápido como las células testigo; a diferencia de los cultivos sin estreptomycinina que tienen muchas células pequeñas que se duplican más rápido. En el estudio de Ogami *et al.*, en 2012, encontraron que intensidades lumínicas elevadas, modifican la estructura celular en cepas de algas y cianobacterias, tal y como se observó en nuestro estudio al perder la forma elíptica de las células control del alga.

La RuBisCO (Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa), juega un papel vital para el crecimiento del alga. En las figuras 8 A, B y C, vemos que aunque incrementó la concentración de estreptomycinina se conservó el pirenoide (estructura que contiene la RuBisCO). Freyssinet *et al.*, en 1984, mencionaron que el pirenoide recibe el sustrato para la fijación de carbono en azúcares, por lo que es posible que también se conservara la capacidad de realizar su función.

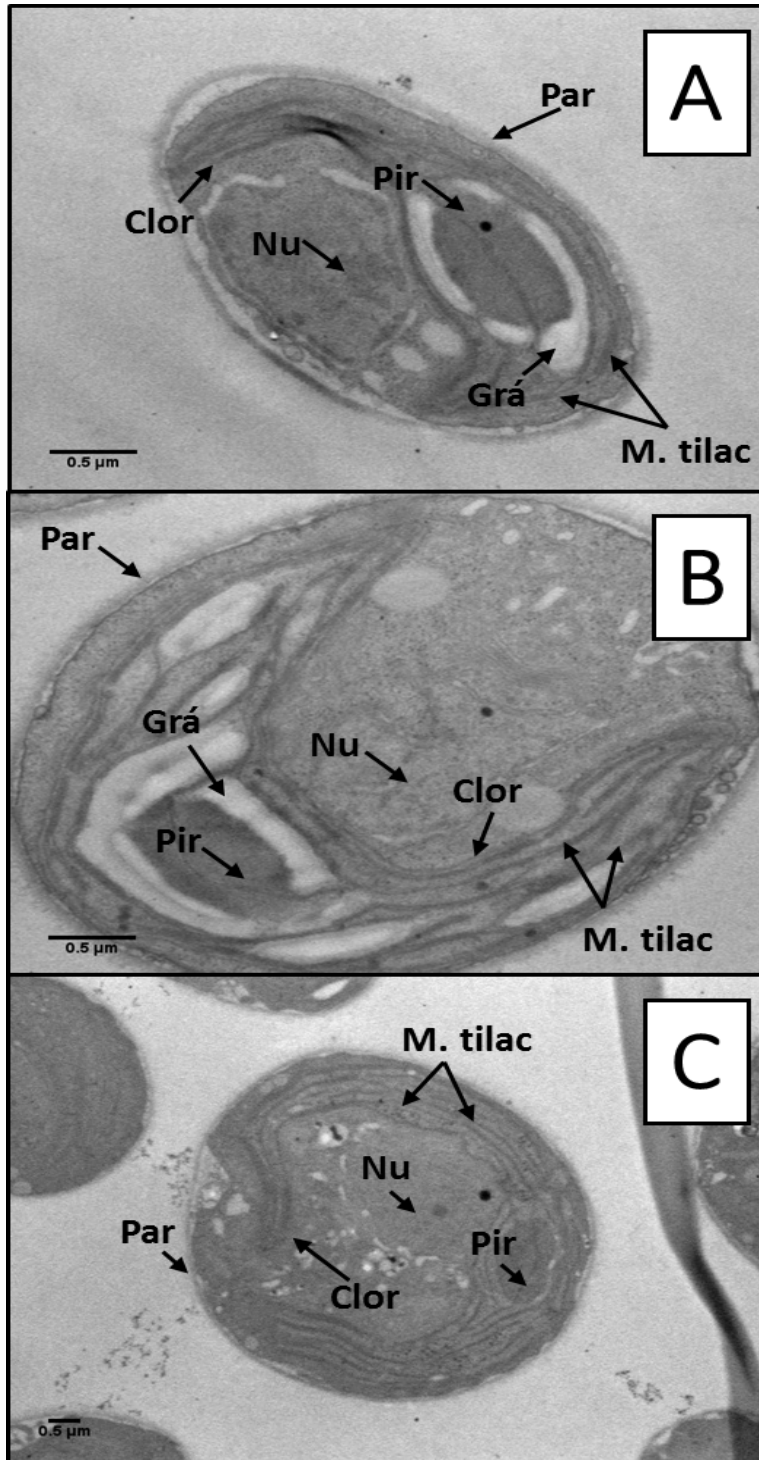


Figura 7. Disminución del tamaño celular y la estructura del cloroplasto de *C. vulgaris* por la exposición a estreptomicina durante 72 h. (A) Testigo. (B) 1.2 mg.L^{-1} (C) 2.4 mg.L^{-1} . Núcleo (Nu); Pirenoide (Pir); Pared (Par), Cloroplasto (Clor); Gránulo de almidón (Grá); Membranas tilacoidales (M. tilac).

La figura 8, muestra los cambios en la estructura de la pared celular, producto de la exposición a estreptomycin durante 72 h. Se puede observar, que la pared de las células testigos es aserrada; sin embargo, en las células expuestas a estreptomycin, estas “sierras” se modifican alargándose y adelgazándose (Figura 7 y 8). La medida promedio de estas prolongaciones en las células control fue de 0.0151 μm , para 1.2 fue de 0.0508 μm y en 2.4 mg/L^{-1} de estreptomycin fue de 0.0771 μm ; por lo que el aumento porcentual comparando las dos concentraciones (1.2 y 2.4 mg/L^{-1}) con el testigo hay un aumento de 336% a 510.6% respectivamente. Se desconoce el origen de dichas estructuras, es necesario realizar una caracterización química de la pared para indagar más sobre los efectos de la estreptomycin.

No existen reportes del efecto de la estreptomycin sobre la constitución de la pared celular de *C. vulgaris*; sin embargo, es probable que se modifique la constitución de la pared, aun cuando esta ha sido reportada con alta resistencia mecánica por Fawley y Fawley en 2004. Por otro lado, Gómez en 2007, menciona que la pared posee una elevada rigidez; no obstante, se observa que la estructura se alteró con el incremento de la dosis de estreptomycin.

La rigidez de la pared celular que Gómez menciona en 2007, se ve alterada por la exposición a la estreptomycin, la cual provoca una expansión, como vemos en las enormes células del cultivo de 2.4 mg/L^{-1} del fármaco (Figura 7 C)

Otra discrepancia con la caracterización de la forma celular de *C. vulgaris*, es que en los otros estudios reportan para el alga una forma esférica; que aunque es ligera la diferencia, es notable que las células control son elípticas como reportó Beijerinck en la primer descripción y conforme incrementa la concentración del fármaco (Figura 7) se tornan esféricas.

Es claro que para modificar la forma de la pared celular, hay que hacer moldeable su constitución, y según las mediciones hechas sobre las fotografías microscópicas que resultaron en 0.1774, 0.1451 y 0.2096 μm (concentración 0, 1.2 y 2.4 mg/L^{-1} respectivamente). Encontramos una similitud en su grosor, por lo que es evidente que no hubo adelgazamiento o engrosamiento; por el contrario, permanece según las medidas de 150 a 200 nm reportadas por Yamamoto *et al.* en 2005. Ya que en apariencia, según la similitud en la tonalidad de la fotos, su densidad no cambio; podemos inferir que la constitución química de la misma no se modificó.

El efecto de la estreptomycin, pudo haber incrementado la permeabilidad de la membrana, como mencionaron Magnet y Blanchard en 2005; lo que puede explicar que las células expuestas a 2.4 mg/L^{-1} del antibiótico, tengan un volumen mayor al valor del resto de las células de los tratamientos. Las macro-células, pudieron haber adquirido material a través de la membrana con una discriminación distinta a las condiciones libres de estreptomycin y acumularse dejando un alga muy turgente.

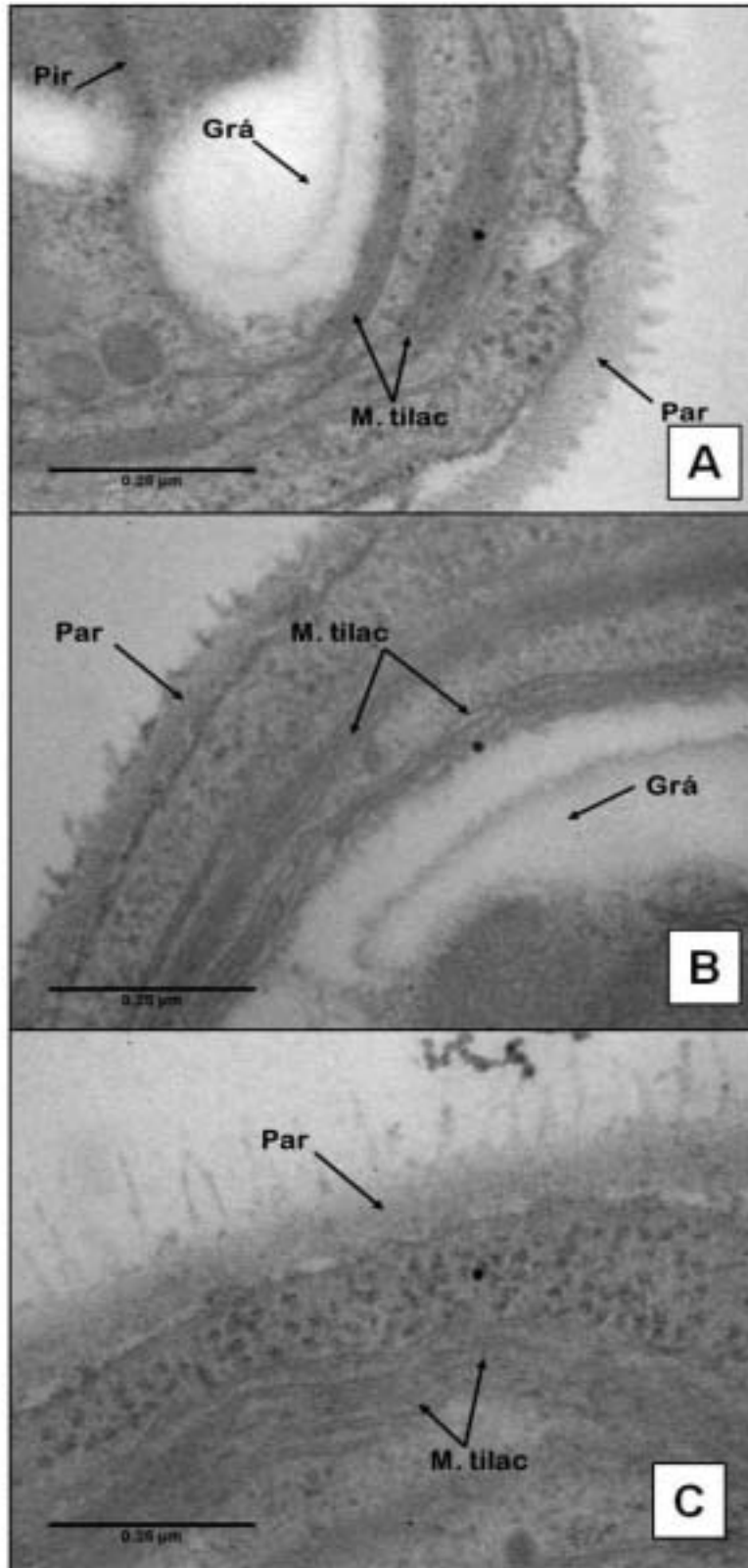


Figura 8. Efecto de la exposición a estreptomicina durante 72 h en la estructura de la pared celular de *C. vulgaris*. (A) Testigo. (B) 1.2 mg.L⁻¹ (C) 2.4 mg.L⁻¹. Pared (Par); Membranas tilacoidales (M. tilac); Gránulo de almidón (Grá).

Las prolongaciones filamentosas, que comienzan en la pared celular están compuestas probablemente de cadenas de polisacáridos; ya que la pared celular de este grupo, a diferencia de otros grupos y las plantas superiores, está compuesta de polímeros de glucosamina, como quitina y quitosan. Así pues, ya no hay tal pared lisa como Fânes en 2008 reportó, y hace falta investigar más acerca de la interacción de la estreptomycinina con la glucosamina característica de la pared de este taxa; según menciona Huss *et al.* en 1999.

El cloroplasto, es de suma importancia, ya que es el encargado de fijar dióxido de carbono; para producir carbohidratos a partir energía lumínica a través del proceso fotosintético. Khaybullina *et al.* en 2010, refieren que *C. vulgaris* posee un cloroplasto asimétrico en forma de copa, que en las células de nuestras fotografías ocupan de la mitad a tres cuartos de la periferia celular; con un pirenoide usualmente situado en la parte central (Figura 7 y 8).

Sin embargo, con la dosis más alta del antibiótico, este se alarga cubriendo la periferia en su totalidad como vemos en las figuras (Figura 7). Esto puede asociarse a que las granas de los tilacoides, se separan según el incremento del fármaco y eso rompe la agregación, permitiendo que se estiren libremente las membranas tilacoidales (Figura 9). La formación de granas está directamente asociada al correcto ensamblado del fotosistema II, debido a que la estreptomycinina inhibe la síntesis de varias proteínas del fotosistema II, como consecuencia se inhibe la formación de granas.

Dentro del cloroplasto se localiza el pirenoide, que en *C. vulgaris* es bisegmentado refieren Huss *et al.* en 1999, se localizó en la parte central del cloroplasto, cuando fue visible. El pirenoide, es una estructura protéica formada de la enzima fijadora de CO₂, la RuBisCO.

El pirenoide, normalmente como se observa en la figura 7, se rodea de una “corona” de almidón. Esta corona, también es visible en las células expuestas a 1.2 mg.L⁻¹ del antibiótico; sin embargo, el pirenoide en las células tratadas a la máxima concentración (2.4 mg.L⁻¹), no presentaron acumulación de almidón ni gránulos a lo largo del cloroplasto, que se puede observar en los tratamientos testigo y 1.2 mg.L⁻¹ (Figura8).

Como lo hemos mencionado ya, la síntesis de proteínas citoplasmática no es afectada por estreptomycinina, ya que el antibiótico se une principalmente a ribosomas cloroplásticos y mínimamente a los citoplasmáticos (Freysinet, 1975).

Lo anterior fue demostrado en *Euglena*, la cual fue incapaz de fijar CO₂ en presencia de estreptomycinina; ya que aun cuando las células contienen una concentración normal de enzimas del Ciclo de Calvin, sintetizadas citoplasmáticamente, no pueden fijar CO₂, debido a la inhibición de las síntesis de proteínas cloroplásticas que participan en este proceso (Horrum y Schawartzbach, 1981). En estudios con cloroplastos purificados e intactos de *Euglena*, la exposición a una concentración de 2.0 mg/mL⁻¹, inhibe la fijación de CO₂ e inhibe la síntesis de proteínas en un 85% (Gómez-Silva y Schiff, 1985).

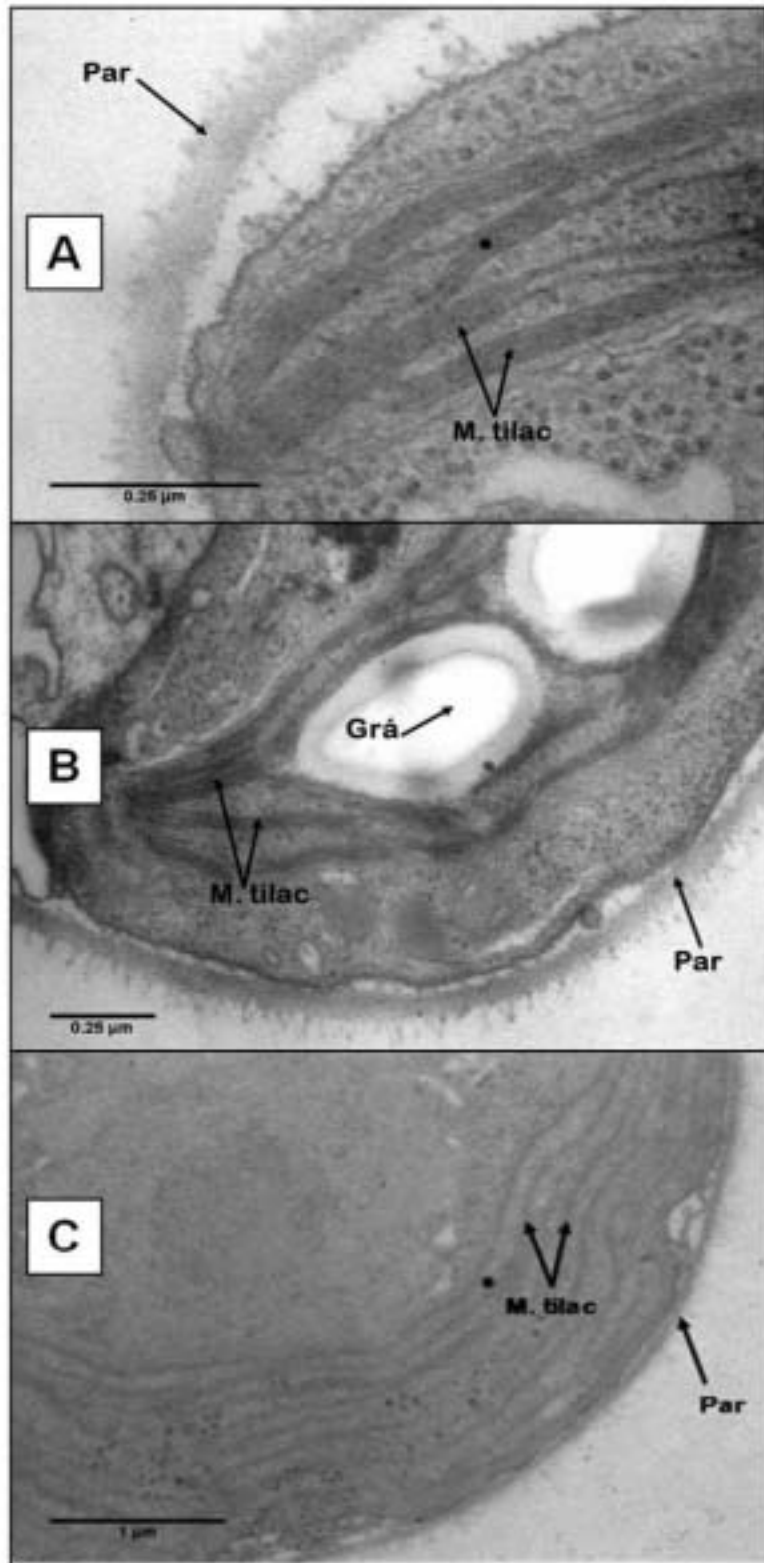


Figura 9. Efecto de la exposición a estreptomicina durante 72 h en la estructura de las membranas tilacoidales de *C. vulgaris*. (A) Testigo. (B) 1.2 mg.L^{-1} (C) 2.4 mg.L^{-1} . Pared (Par); Membranas tilacoidales (M. tilac); Gránulo de almidón (Grá).

Los cambios estructurales y morfológicos en la ultraestructura celular, hay que relacionarlos a la vez con las alteraciones en el consumo y producción de oxígeno. A pesar de que se incrementó hasta seis veces el tamaño celular, la producción de oxígeno y la eficiencia electrónica para producir la energía para la fijación de CO₂ se reducen; lo cual es intrigante, ya que la célula aumenta sustancialmente su tamaño con respecto al testigo (tabla 3).

El crecimiento poblacional, disminuyó al contrario del celular que sí incrementó, seguramente por la reducida cantidad de carbohidratos que resultan del aprovechamiento de la energía fotónica en la fotosíntesis.

Existe la duda del cómo responden las estructuras de las células ante las concentraciones 0.3, 0.6 y 1.8 mg.L⁻¹ de estreptomycin. Se sugiere contemplar fotografías que permitan observar el abanico completo de las respuestas, para evidenciar si existen cambios continuos o súbitos entre tratamientos y si corresponden a las evidencias encontradas para las concentraciones empleadas en este estudio.

IV. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

El contenido volumétrico y específico de clorofila total (Figura 10 y 11), disminuyó por la exposición a la estreptomycin de manera significativa, al menos en un par de medias ($p < 0.05$). La reducción en el contenido volumétrico de pigmentos, no se desarrolla de forma lineal, posiblemente debido a una diferencia en la inhibición de la síntesis, ensamblaje y degradación de los mismos. A la máxima concentración probada (2.4 mg.L⁻¹), la concentración específica de clorofila total por peso seco, se reduce en 56 % y la cantidad volumétrica 60% con respecto al control.

May *et al.*, en 1969, reportaron blanqueamiento celular como consecuencia de la exposición a estreptomycin para plantas superiores, asociado con la pérdida de clorofila. Resultados similares fueron encontrados por Freyssinet *et al.* en 1984, donde la estreptomycin provocó una disminución de clorofila del 15.4 % en *Euglena gracilis*.

En el estudio realizado con *Zea mays*, Zhu *et al.* en 2011, reportaron una disminución de clorofilas y carotenoides al exponer la planta a cloranfenicol (inhibidor de síntesis de proteínas); lo que indica que la síntesis de estos pigmentos en vegetales y algas depende de la síntesis de proteínas cloroplástica y nuclear.

En el estudio de Yaronskaya *et al.* en 2007, encontraron que plantas de cebada reducen su concentración de clorofila con la exposición a 5 g/L⁻¹ de estreptomycin. Sin embargo, Brain *et al.*, en 2004, expusieron la planta *Lemna gibba* ante 0, 10, 30, 100, 300, y 1,000 µg/L⁻¹ de estreptomycin por 7 días y no encontraron fitotoxicidad, ni diferencias significativas en la cantidad de pigmentos. Por lo cual, además de que cada especie reacciona diferente bajo la estreptomycin, la dosis parece representar un factor determinante de la magnitud de los daños.

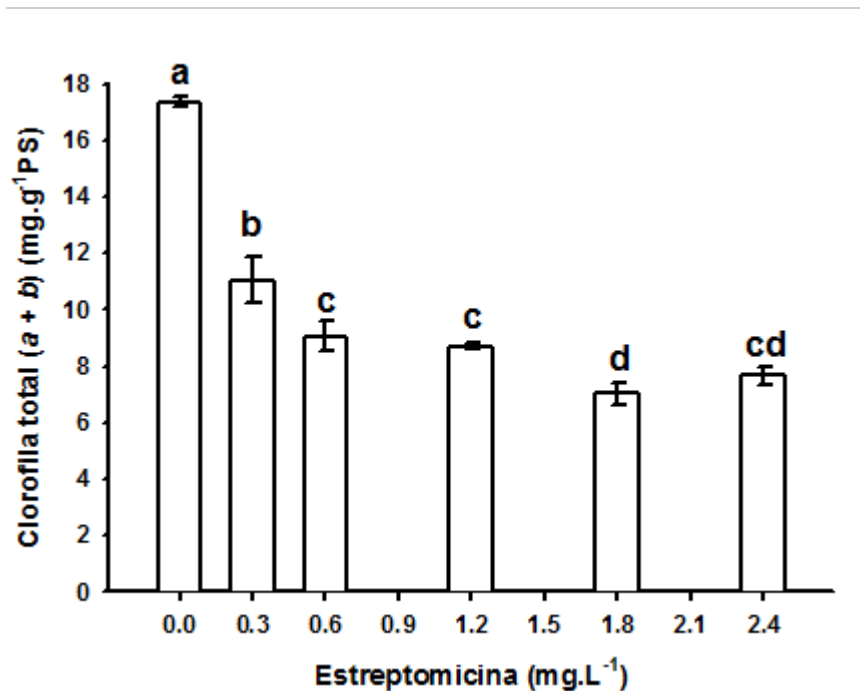


Figura 10. Efecto de las concentraciones de estreptomycin sobre el contenido volumétrico de clorofila total (a+b) de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD p<0.05).

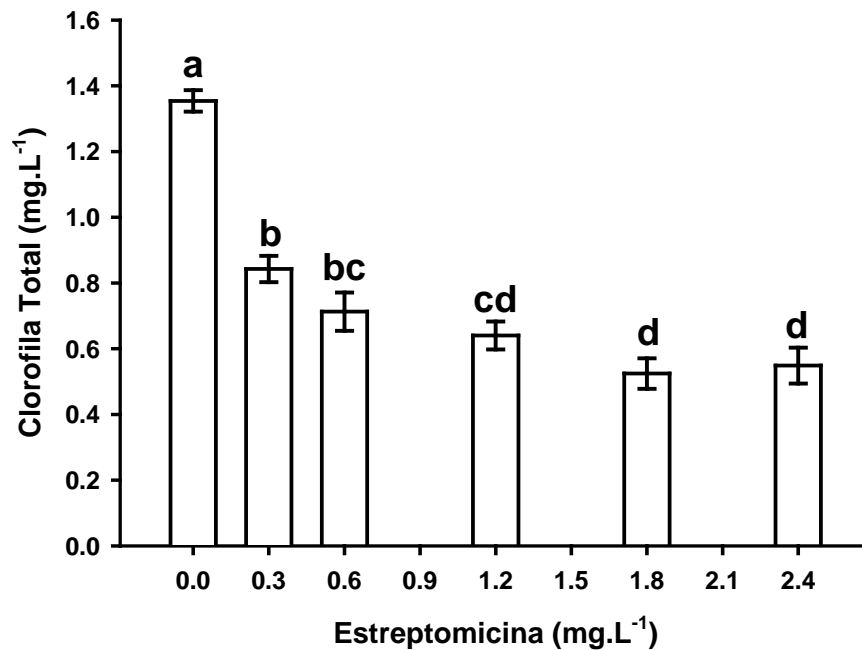


Figura 11. Efecto de las concentraciones de estreptomycin sobre el contenido específico de clorofila total (a+b) de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD p<0.05).

En el estudio de Chen y Guo en 2012, donde la tasa de incremento de clorofila a en *M. aeruginosa* y *S. obliquus*, expuestas a cefradina (0.5, 1.0, 3.0, 5.0 y 10.0 mg/L⁻¹), disminuye para el primer organismo y aún más con las tres concentraciones mayores según pasó el tiempo.

Contrario a nuestro experimento, la cantidad de clorofila total reportada en el estudio de Yoshida *et al.* en 1998, presenta una disminución de 50 y 90 % según la cepa de *Oriza sativa* L.; al exponerse a 100 µg/mL⁻¹ de estreptomycin y 100 µg/mL⁻¹ de kanamicina, en cuyo caso fue mayor al 90 % en las dos cepas.

El crecimiento de las algas, depende del correcto balance entre la energía electromagnética absorbida y su conversión en energía química para fijación de dióxido de carbono. Los organismos fotosintéticos como las algas, absorben la energía electromagnética y la convierten en energía química a través de los pigmentos fotosintéticos. El contenido correcto y la localización precisa son fundamentales para garantizar el proceso de reacciones fotoquímicas.

Un gran número de las enzimas necesarias para la síntesis de clorofila, son codificadas por genes nucleares, así que la estreptomycin, no debería tener efectos inhibitorios directos en el proceso de síntesis de estas enzimas codificadas en el cloroplasto.

Sin embargo, muchos complejos proteínicos importantes para el ensamble de las clorofilas en los complejos antena y centros de reacción, son codificados por el cloroplasto y los genes nucleares, y la expresión correspondiente entre dos genomas es indispensable para la biosíntesis y ensamble de la clorofila. Entonces, la estreptomycin, eritromycin, la claritromycin y otros antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas cloroplástica; podrían interferir con la biosíntesis de clorofila, a través de la inhibición de genes del cloroplasto y luego afectar de manera indirecta la expresión de genes nucleares (Liu *et al.*, 2011).

Liu *et al.*, en 2011, encontraron que el ácido δ-aminolevulínico, el porfobilinógeno, el uroporfirinógeno III, el coproporfirinógeno III, la protoporfirina IX y la protoclorofilina; precursores de la biosíntesis de la clorofila en *Selenastrum capricornutum*, se redujeron significativamente después de la exposición a eritromycin. Esto demostró que los inhibidores de la síntesis de proteínas en el cloroplasto como la eritromycin, tiene la capacidad de inhibir la biosíntesis de clorofila a concentraciones muy bajas (0.06 mg.L⁻¹).

El contenido de carotenoides (mg.L⁻¹), disminuyó significativamente (p<0.05) después de la exposición a estreptomycin durante 72 h. Como se puede observar en la figura 12, el contenido volumétrico de carotenoides totales disminuyó alrededor de un 25% en la primera concentración probada (0.3 mg.L⁻¹). La inhibición de carotenoides totales, fue de 58% a la máxima concentración probada (2.4 mg.L⁻¹), con respecto al control (Figura 12).

La cantidad de carotenoides por biomasa seca, también se redujo significativamente (p<0.05). A la máxima concentración probada (2.4 mg.L⁻¹), se redujo 29% con respecto al tratamiento testigo sin antibiótico (Figura 13). La diferencia entre la cantidad volumétrica y la específica, pudiera estar relacionada con el aumento de tamaño en el área de las células,

que sucedió conforme se incrementó la concentración del antibiótico en el medio de cultivo.

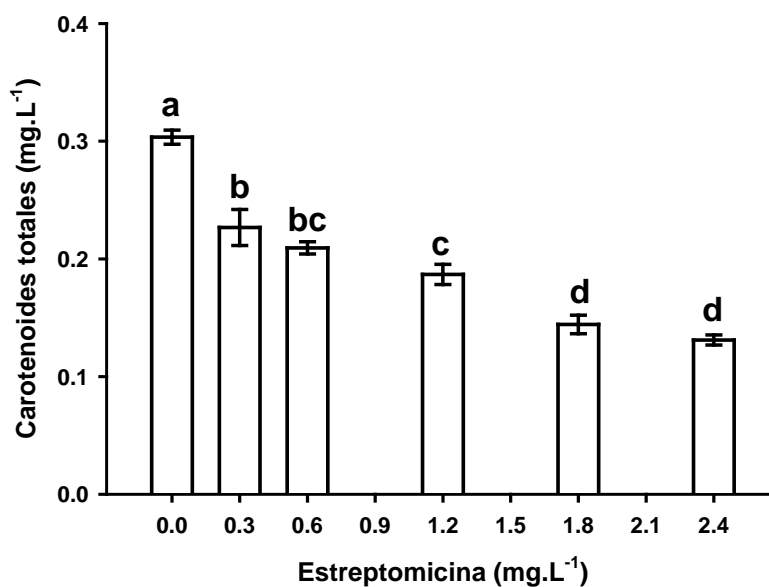


Figura 12. Efecto de las concentraciones de estreptomina sobre el contenido volumétrico de carotenoides totales de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD $p<0.05$).

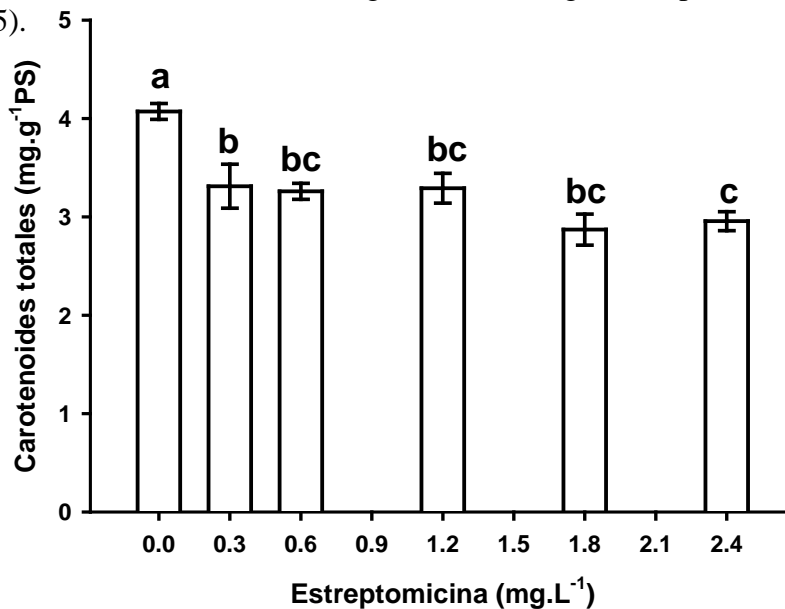


Figura 13. Efecto de las concentraciones de estreptomina sobre el contenido específico de carotenoides totales de *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD $p<0.05$).

Uno de los primeros reportes del efecto de la estreptomycin sobre los pigmentos fotosintéticos en plantas, fue hecho por Von Euler en 1947; el cual reportó que cuando semillas de cebada son germinadas en una solución con estreptomycin, no contenían clorofila ni carotenoides. Opris *et al.* (2013) usó eritromycin, otro antibiótico capaz de inhibir la síntesis protéica en los cloroplastos, y encontró que el contenido de las xantófilas y beta carotenos se reduce significativamente en plantas de trigo. Por otro lado, se ha demostrado que la eritromycin tiene la capacidad de inhibir el ciclo del glutatión-ascorbato y componentes en el ciclo de las xantófilas en *Pseudokirchneriella subcapitata*; particularmente sobre el estado de conversión de violaxantina a zeaxantina, este último decrece cuando aumenta la concentración de eritromycin (Nie *et al.*, 2013).

Los carotenoides son esenciales en el proceso fotosintético, ya que participan como pigmentos accesorios en las antenas ampliando el intervalo de absorción de la energía electromagnética. Estos pigmentos, participan activamente en la regulación de la energía de excitación en los complejos antena a través del ciclo de la xantófilas. Las xantofilas, modifican la eficiencia transferencia de excitones desde la antena hacia el núcleo de reacción, disipando la energía en exceso en forma de calor.

Los carotenoides, también participan en la relajación “segura” de átomos de oxígeno energizados ($^1\text{O}_2$) en estado de singulete. Por otro lado, los carotenoides participan como moléculas antioxidantes que eliminan especies reactivas de oxígeno ERO (Ye *et al.*, 2008). Por lo anterior, podemos entender que la reducción del crecimiento por exposición a estreptomycin en *C. vulgaris*, está relacionada con la reducción de los carotenoides y la disminución de todas las funciones en las cuales estas moléculas participan.

V. ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y RESPIRATORIA

La tasa de producción de oxígeno fotosintético, disminuyó en todos los tratamientos, y a la máxima concentración probada 2.4 mg.L⁻¹, la reducción con respecto al control fue de 64% (Figura 14). La tasa de consumo de oxígeno por respiración a la máxima concentración del antibiótico, disminuyó 67% con respecto al control (Figura 15).

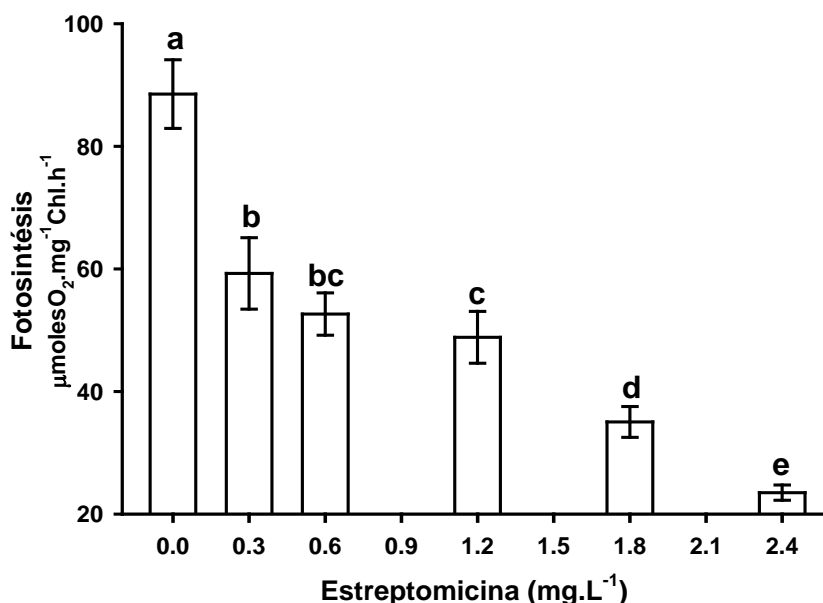


Figura 14. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la liberación de oxígeno fotosintético en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba de Tukey p<0.05).

Encontramos similitud con la reducción en la producción de oxígeno fotosintético, de igual forma Xiong en 2001, encontró para *Ankistrodesmus spiralis*, *Heterococcus brevicellularis*, *Scenedesmus* sp. y *Enallax coelastroides* (47, 40, 20 y 25% respectivamente); bajo exposición a estreptomicina.

Xiangliang *et al.*, en 2008, reportaron una inhibición de 80.5% en la concentración de O₂ producido por *Synechocystis* sp.; tratada con 150 mg/L⁻¹ del antibiótico amoxicilina.

La estreptomicina inhibe la síntesis de proteínas cloroplástica al unirse a los ribosomas de tipo 70s, se puede inferir que muchas de las proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto están siendo inhibidas, incluyendo la proteína D1 que disminuye su síntesis. Esto pudiera estar afectando la estructura y función del fotosistema II y el complejo liberador de oxígeno, dando como resultado una inhibición de la liberación fotosintética de oxígeno.

Por otra parte, la fotosíntesis requiere de proteínas con funciones importantes, como la psbS, en el complejo liberador de oxígeno. Existen por lo menos 14 genes de los eucariotas fotosintéticos, que son codificados en el genoma del cloroplasto y originan proteínas necesarias para la estructura y función fotosintética del cloroplasto (Wollman, *et al.* 1999).

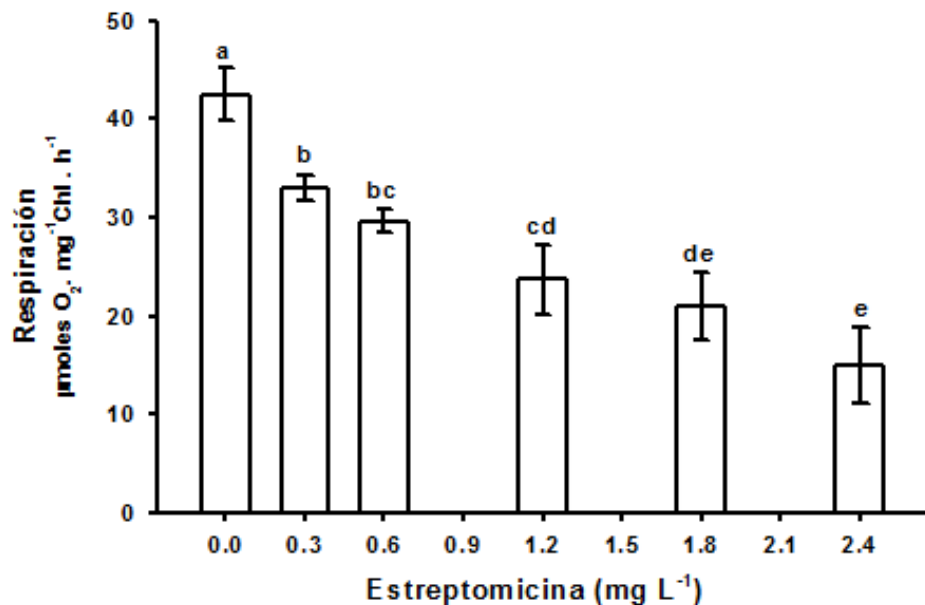


Figura 15. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el consumo de oxígeno por la respiración en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los errores en la proteína psbS, son de alto impacto al involucrar el complejo liberador de oxígeno. Esto limita la donación de electrones al fotosistema y Li *et al.* en 2000, le atribuyen una función esencial en la relajación del fotosistema II.

La causa de las alteraciones que encontramos, podrían centrarse en las proteínas psbB-psbH-petB-petD que son subunidades de proteína del citocromo *bf*, en conjunto con genes estructurales para el PSII (Wollman, *et al.* 1999).

La disminución en la tasa del consumo de oxígeno por respiración (Figura 15), alcanzó un 60% con la concentración más baja, que fue similar a la reducción final. Ésta actividad fisiológica, decayó con la mínima dosis de estreptomicina a diferencia de la producción de oxígeno fotosintético que mostró una pérdida progresiva.

La importancia de comparar la producción y el consumo de oxígeno, reside en la relación fotosíntesis/respiración, que determina el crecimiento de un organismo fotosintético. La fijación del carbono en estos organismos, depende del transporte electrónico.

VI. TRANSPORTE ELECTRÓNICO

La producción fotosintética de oxígeno, es un proceso que está directamente relacionado con la absorción de energía lumínica y el transporte electrónico en la membrana tilacoidal.

El transporte electrónico, puede ser registrado *in vivo*, a través de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II. La velocidad de transporte electrónico, medido por la emisión de fluorescencia, representa el producto fotoquímico operacional del PSII; es decir, la energía que de manera efectiva está siendo utilizada para llevar a cabo el trabajo del transporte electrónico (Gómez, 2012).

El transporte electrónico medido por fluorescencia (ETR por sus siglas en inglés), se relaciona con la eficiencia del PSII; cuando el flujo de electrones entre PSII y PSI está en equilibrio con la fijación de CO₂ y el resto de los procesos celulares del alga. Por lo anterior, cualquier evento que modifique el transporte o equilibrio de electrones en toda la cadena transportadora de electrones [H₂O → PSII → PSI → NADP⁺], modificará este parámetro de manera directa (Gómez, 2012).

La eficiencia cuántica operacional (Φ PSII), multiplicada por la densidad de flujo fotónico utilizado, da como resultado la tasa de transporte electrónico (ETR); la cual proporciona una imagen más exacta del funcionamiento del transporte electrónico, ya que esta refleja la capacidad fotosintética del sistema para mantener abiertos los centros de reacción a la luz (Gómez, 2012).

Se puede observar en la figura 16, que conforme se incrementa la densidad de flujo fotónico, el transporte electrónico se satura. Esto sucede para todos los tratamientos, pero se puede observar que el valor del punto de saturación del transporte electrónico (P_{máx}); para cada tratamiento, disminuye conforme aumentó el antibiótico en el medio de cultivo (Figura 16). Por otro lado, se puede observar que la pendiente inicial de cada curva disminuyó de la misma manera hasta 40%, al aumentar la estreptomycin en el medio de cultivo (Figura 17).

La disminución de ETR, nos indica que el incremento en la concentración del antibiótico en el medio de cultivo, produce un incremento en el cierre de los centros de reacción; y por lo tanto una disminución en el transporte electrónico fotosintético, lo cual afecta directamente la asimilación de CO₂.

La pendiente inicial de las curvas de saturación lumínica (Figura 16), corresponden a la rendimiento cuántico máximo para el transporte electrónico, parámetro denominado “alfa” (α). Este valor, refleja la cantidad de fotones necesarios para impulsar el transporte electrónico. Como se puede observar en la figura 18, conforme aumentó la concentración de estreptomycin en el medio de cultivo, el rendimiento cuántico máximo disminuyó 39% a la máxima concentración probada (2.4 mg.L⁻¹) con respecto al control sin antibiótico.

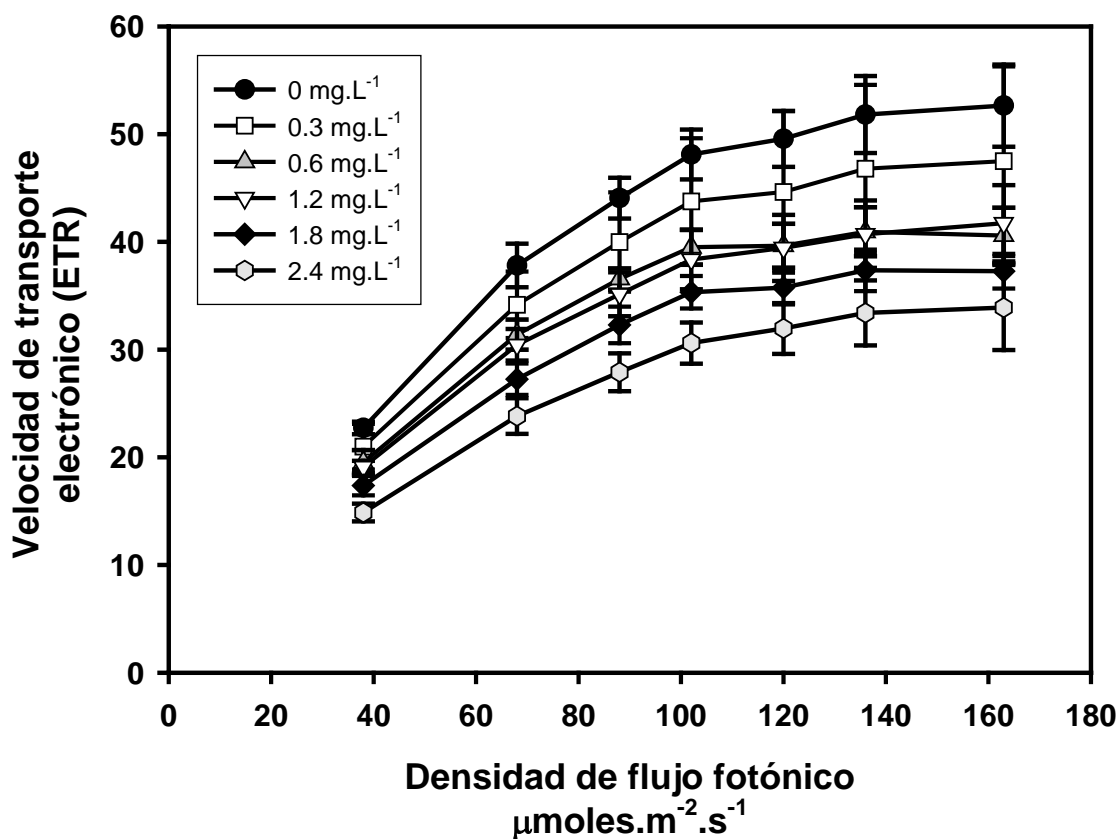


Figura 16. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la tasa de transporte electrónico fotosintético (ETR) expresada en unidades relativas, en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar.

La reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos (Figuras 11 y 13) y de la capacidad de liberación de oxígeno (Figura 14), producen una disminución en la capacidad de absorción de luz, la transferencia de energía hacia el centro de reacción y el aporte de electrones provenientes de la fotólisis del agua, lo que tiene como resultado la reducción en la capacidad máxima de la fotosíntesis ($P_{máx}$) (Figura 17) y el rendimiento cuántico máximo (α) (Figura 18). La liberación de la energía de excitación fotosintética, por cualquier vía que no involucre la del proceso fotoquímico se le denomina “relajación” o “disipación” No-fotoquímica (NPQ por sus siglas en inglés). El proceso de disipación NPQ, regula y protege el proceso fotosintético en ambientes o condiciones en las cuales la energía absorbida excede la capacidad de su utilización para llevar a cabo trabajo fotoquímico.

El decaimiento No-fotoquímico (NPQ), es uno de los más importantes mecanismos para la regulación rápida de la fotosíntesis en plantas superiores y algas (Demmig-Adams y Adams 2006). Los mecanismos que provocan el decaimiento No-fotoquímico, son diversos y se pueden facilitar por la acidificación del lumen de los tilacoides y la deepoxidación de

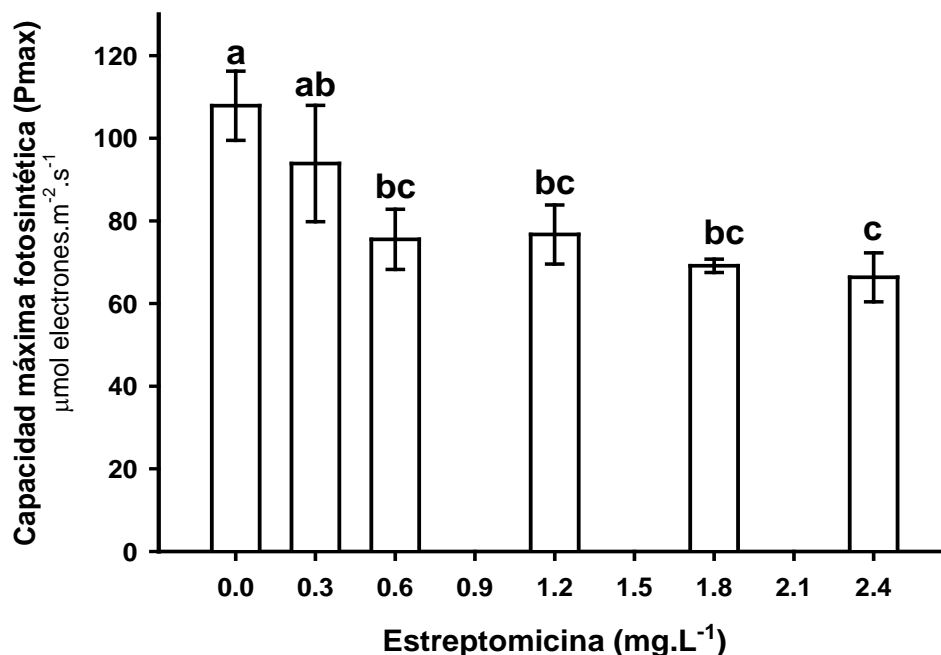


Figura 17. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre la capacidad fotosintética máxima (P_{\max}) en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de $n=3$ con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

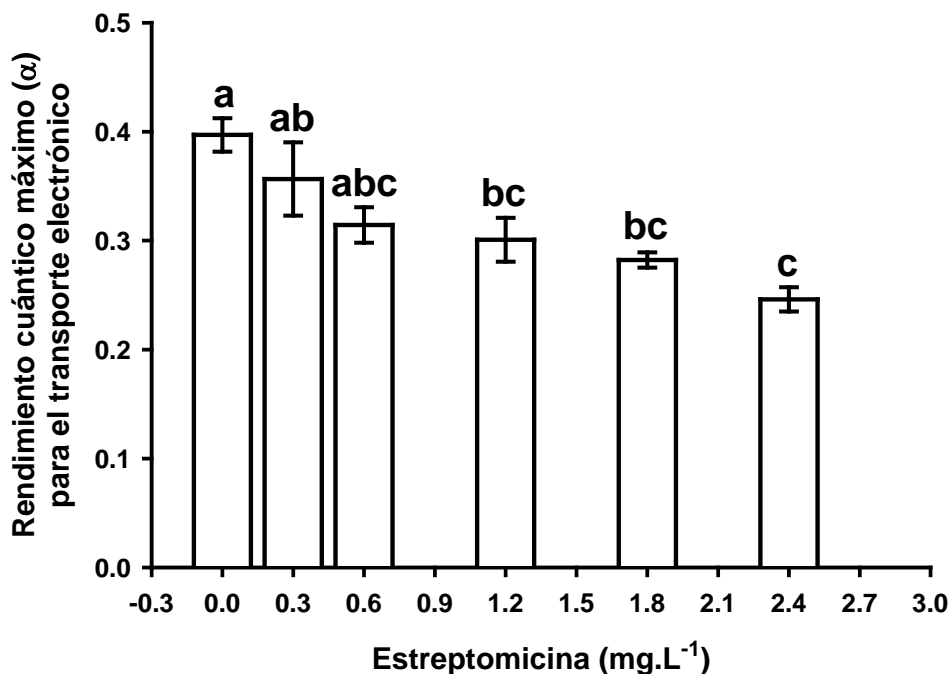


Figura 18. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el rendimiento cuántico máximo (α) expresado en unidades relativas, en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de $n=3$ con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

carotenoides xantófilas. Además, a partir de cambios conformacionales en el aparato fotosintético, componentes de los complejos PSII se asocian con los PSI traspasando energía a estos últimos (Kramer, 2011).

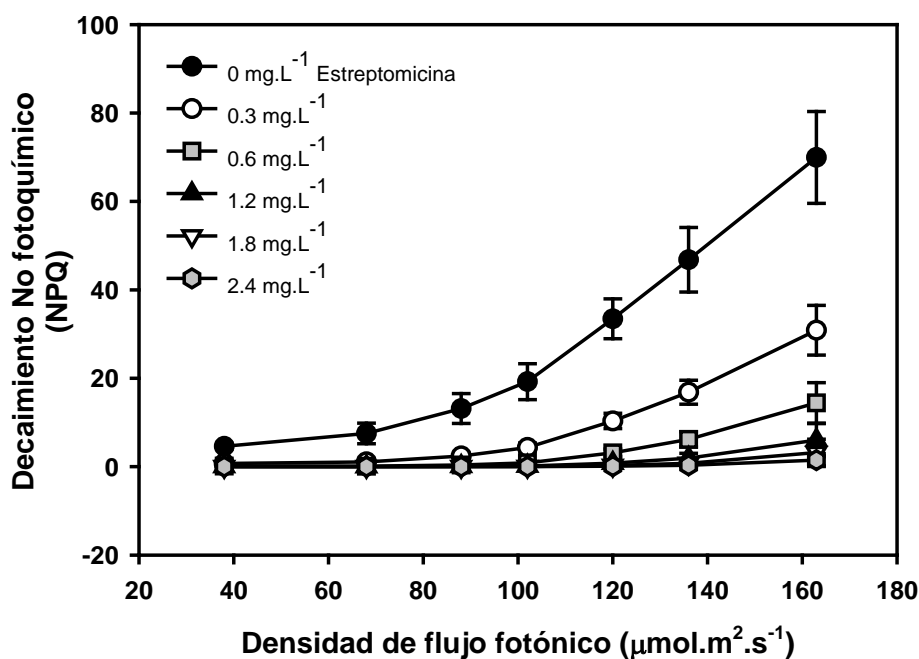


Figura 19. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el relajamiento no fotoquímico (NPQ) expresado en unidades relativas, en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h.), promedio de $n=3$ con su desviación estándar.

NPQ, también involucra la inactivación del fotosistema II por destrucción de la proteína D1 del centro de reacción del PSII. Los sistemas inactivados, se convierten en disipadores de energía en forma de calor; cuando las condiciones lumínicas son favorables, la proteína D1 es restituida, recuperándose la funcionalidad del fotosistema.

La figura 20, muestra la disipación No fotoquímica al incrementarse la densidad de flujo fotónico. Como se puede observar, para el caso del tratamiento sin antibiótico; conforme aumentó la densidad de flujo fotónico, la disipación térmica aumentó. Sin embargo, se puede observar claramente que la exposición al antibiótico, reduce la disipación no fotoquímica comparando con el control. La figura 20, muestra los valores de NPQ de la gráfica 19 cuando la irradiación fue de $160 \mu\text{moles de fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Como se puede observar, a la máxima concentración de antibiótico (2.4 mg.L^{-1}), la disipación no fotoquímica se reduce en 98%. En la mayoría de los estudios realizados, la reducción en la capacidad fotoquímica está relacionado con un aumento en la disipación no fotoquímica (NPQ), como se puede observar en el tratamiento control de la figura 19. Sin embargo, en el presente estudio, la exposición a estreptomicina en *C. vulgaris*, produce una disminución de la respuesta NPQ al incremento del flujo fotónico.

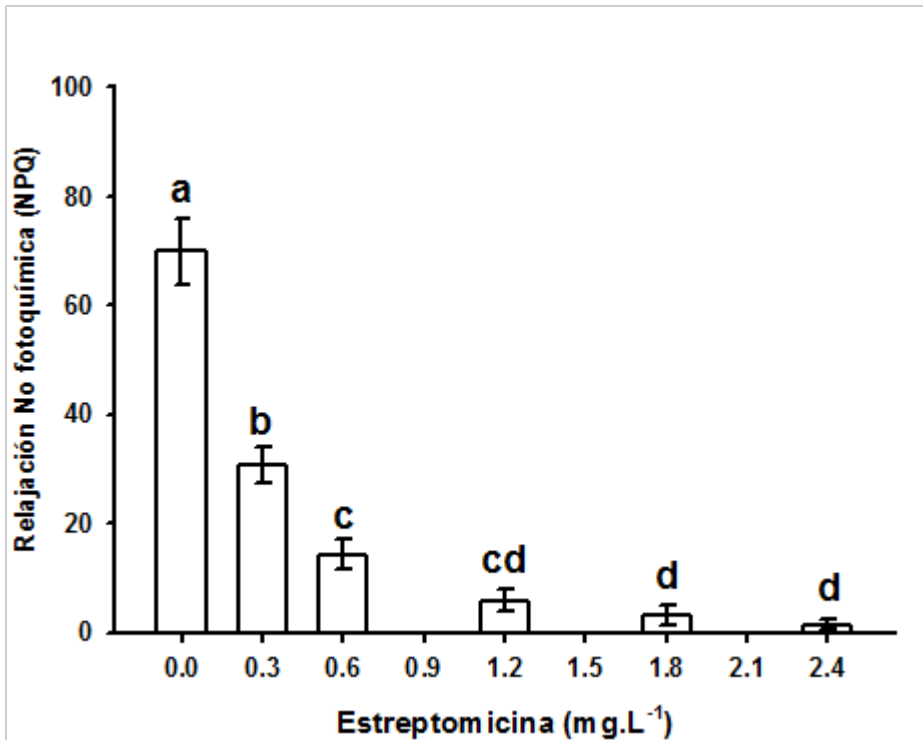


Figura 20. Efecto de las concentraciones de estreptomicina sobre el relajamiento no fotoquímico (NPQ) expresado en unidades relativas, en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar. La determinación de NPQ se realizó exponiendo las células a 160 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de LSD (<0.05)).

González-Moreno *et al.* en 1997, reportaron que la exposición a 150 mM de NaCl en *Euglena gracilis*, inhibe completamente la disipación térmica. Estos autores, atribuyeron esta reducción a una incapacidad de formar gradiente electroquímico en el lumen tilacoidal, el cual es importante para la activación de los mecanismos de disipación no fotoquímica. Es posible que el efecto de la exposición a la estreptomicina, haya causado una disminución del gradiente electroquímico o en la permeabilidad de la membrana tilacoidal; por lo cual, se deberán realizar estudios que confirmen esta hipótesis.

VII. FOTOQUÍMICA

Con el propósito de caracterizar el efecto de la estreptomycin en la absorción de la energía de excitación por los complejos antena, y la eficiencia de la misma para promover el transporte electrónico fotosintético. Se evaluó el cierre de los centros de reacción y el llenado de la poza de plastoquinonas; a través de la técnica de pulso saturante y la emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II, en muestras pre-acondicionadas a la oscuridad. La relación, entre la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II y el proceso fotosintético, es directa. La energía luminosa, absorbida por las moléculas de clorofila puede liberarse por tres vías: (1) Puede ser usada para impulsar el proceso fotosintético (fotoquímico). (2) Puede ser disipada como calor. (3) Puede ser remitida como energía luminosa (fluorescencia) de menor energía.

Estos tres procesos ocurren simultáneamente y por lo tanto “compiten” entre sí, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. La medición de la emisión de la clorofila *a*, provee información de la absorción, distribución y utilización de la energía electromagnética para llevar a cabo el proceso fotosintético (Perales *et al.*, 2007). Cuando se ilumina una muestra preacondicionada a la oscuridad, la fluorescencia de la clorofila *a* se incrementa rápidamente. Este incremento, es el reflejo del cierre (“reducción”) de los centros de reacción del PSII; y por lo tanto, provee información de la actividad fotoquímica del PSII, así como del llenado (“reducción”) de la poza de plastoquinonas y los acarreadores finales del fotosistema I (PSI).

La cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* (conocida como “cinética de Kautsky” en honor a su descriptor), tiene una figura compuesta de cuatro inflexiones nombradas OJIP (Figura 21):

- (1) O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los 50 μ s y en ese momento todos los centros de reacción están abiertos “oxidados”.
- (2) J, se desarrolla a los 2 ms (F_J), y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A^- .
- (3) I, se desarrolla a los 20 ms (F_I) y está relacionada con la reducción parcial de Q_A^- y Q_B^- .
- (4) P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_M). El tiempo en el que se alcanza, depende del protocolo experimental. En este momento, todos los centros de reacción están cerrados “reducidos”.

El análisis de la cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* del PSII, según la prueba OJIP (Strasser y Strasser, 1995); se puede modelar estableciendo el destino del flujo de energía luminosa en del PSII (Figura 22), obteniendo de esta manera los rendimientos cuánticos máximos para cada uno de los procesos:

- $\Rightarrow \phi_{Po} = (F_M - F_0) / F_M$: Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria
- $\Rightarrow \psi_0 = 1 - [(F_J - F_0) / (F_M - F_0)]$: Probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A^-
- $\Rightarrow \phi_{Eo} = (\phi_{Po}) \cdot (\psi_0)$: Probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^-
- $\Rightarrow \phi_{Dio} = (F_M / F_0)$: Producto cuántico máximo para la disipación por calor

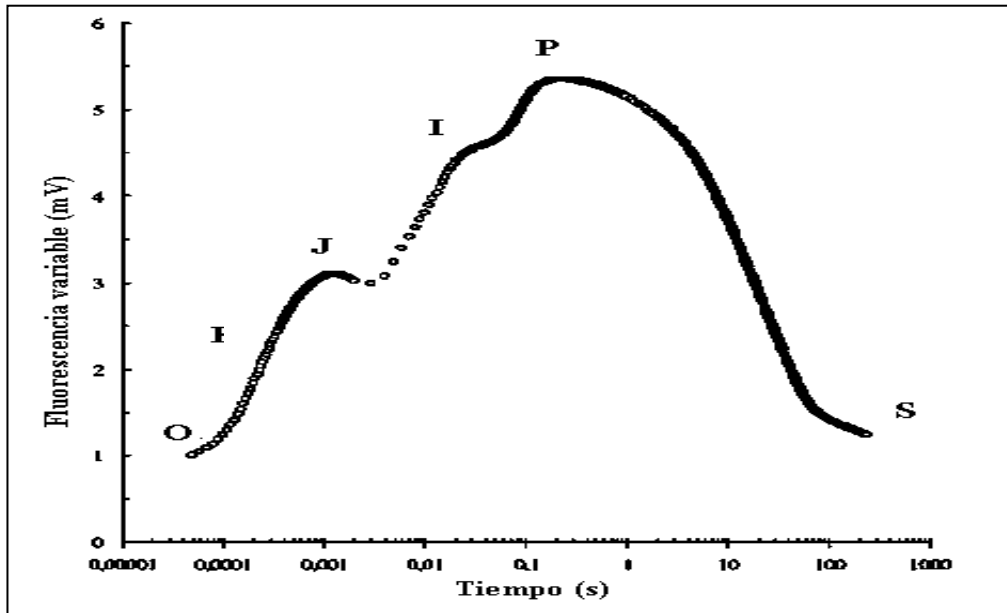


Figura 21. Cinética de emisión de fluorescencia del fotosistema II en muestras precondicionadas a la oscuridad.

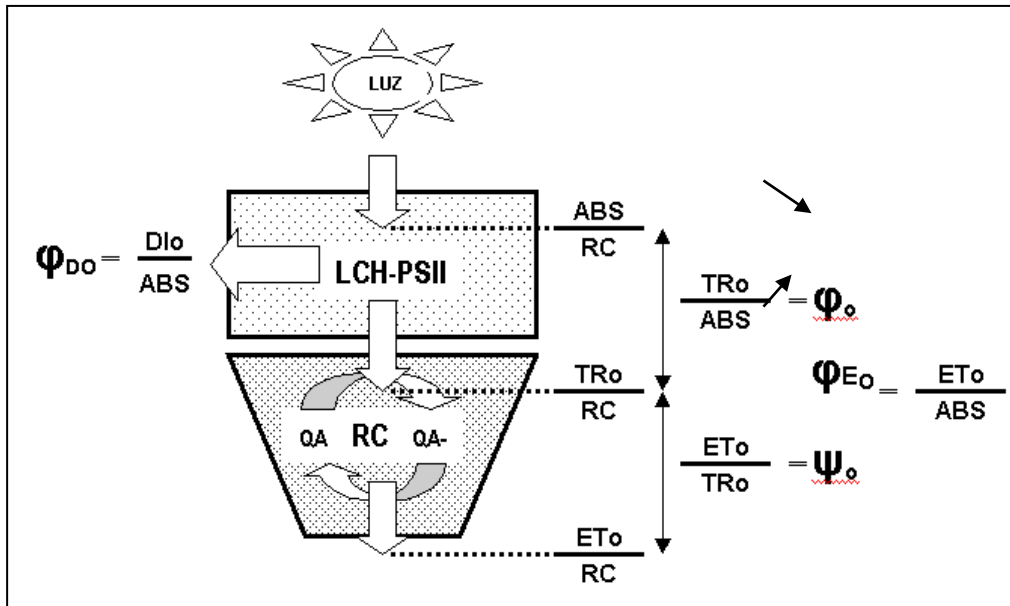


Figura 22. Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP (Strasser y Strasser, 1995).

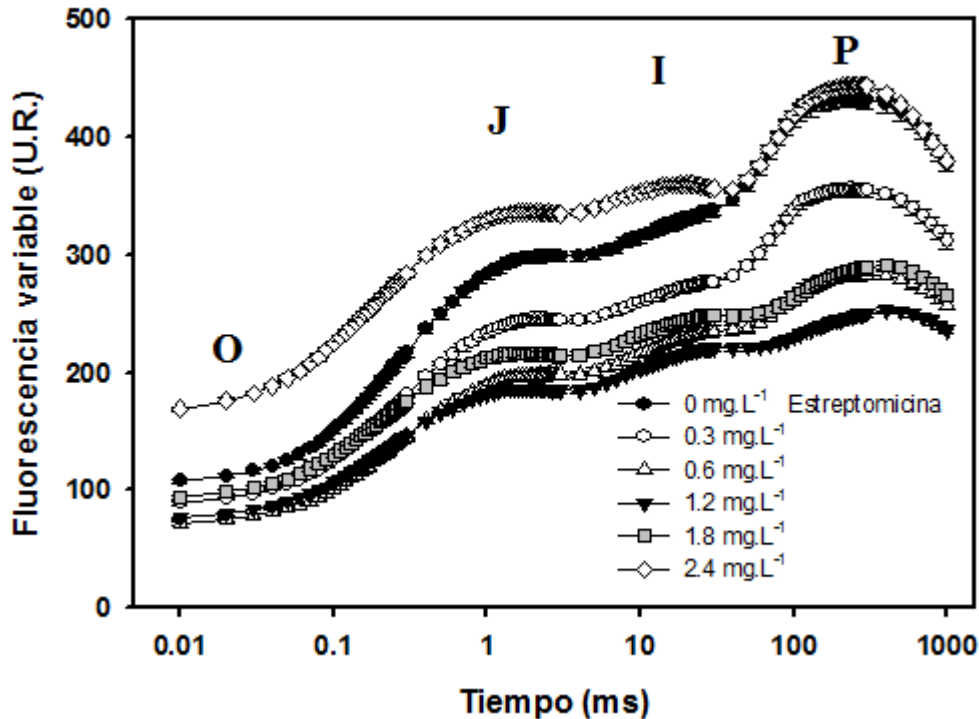


Figura 23. Efecto de las concentraciones de la estreptomicina sobre la fluorescencia variable relativa expresada en unidades relativas, en *C. vulgaris*, promedio de $n=3$ con su desviación estándar.

La figura 23 muestra el efecto de la exposición a estreptomicina en la cinética polifásica de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II. Utilizando los valores de la fluorescencia en las inflexiones O, J, I y P, se calculó la actividad fotoquímica del fotosistema II (Tabla 1); a partir de los parámetros cuya conformación se explica en la figura 22.

En la tabla 4, se puede apreciar que a medida que aumenta la concentración de la estreptomicina en el medio de cultivo, se reduce significativamente ($P < 0.05$) la eficiencia cuántica con la que la luz es atrapada por los centros de reacción y es utilizada para reducir a Q_A^- ($TR_0/ABS = F_v/F_M = \phi P_0$). En la concentración más elevada del antibiótico (2.4 mg.L^{-1}), la inhibición fue de 66.61 % con respecto al control sin antibiótico.

Analizando los resultados, se observó que la reducción del producto cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII [$\phi P_0 = F_M - F_0/F_M$], se debe a una disminución en la relación F_M/F_0 . La reducción de F_M , puede ser interpretada como cambio de la estructura del centro de reacción en PSII; lo cual pudiera provocar un incremento del número de centros de reacción cerrados, que no participan en el transporte electrónico (Zhu *et al.*, 2011).

Por otro lado, la reducción en F_M , también está relacionado a una disminución de la concentración de clorofila en los complejos antena o a una disminución de la actividad del complejo liberador de oxígeno (Strasser, 1997). La reducción del valor de la fluorescencia

máxima F_M (inflexión P), pudo deberse a la inactivación de los centros de reacción del PSII (Jiang *et al.*, 2008).

Estreptomicina (mg.L ⁻¹)	Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII ϕP_0	Eficiencia con la que un fotón atrapado mueve un electrón después de Q_A^- Ψ_0	Rendimiento cuántico para el transporte electrónico en PSII ϕE_0	Índice de rendimiento para la conservación de energía para la reducción de los acarreadores electrónicos PI_{ABS}
0	0.614 ± 0.011 a	0.429 ± 0.017 a	0.264 ± 0.014 a	2.94 ± 0.386 a
0.3	0.556 ± 0.017 b	0.343 ± 0.052 b	0.190 ± 0.028 b	1.42 ± 0.331 b
0.6	0.515 ± 0.031 c	0.312 ± 0.071 cb	0.161 ± 0.041 c	0.98 ± 0.492 c
1.2	0.424 ± 0.015 d	0.287 ± 0.051 cd	0.121 ± 0.021 d	0.42 ± 0.104 d
1.8	0.319 ± 0.036 e	0.316 ± 0.037 cb	0.097 ± 0.017 d	0.21 ± 0.092 de
2.4	0.205 ± 0.034 f	0.236 ± 0.050 d	0.051 ± 0.022 e	0.061 ± 0.051 e

Tabla 4. Efecto de la estreptomicina en el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII (ϕP_0), la eficiencia con la que un fotón atrapado mueve un electrón después de Q_A^- (Ψ_0), el rendimiento cuántico para el transporte electrónico en PSII (ϕE_0) y el índice de rendimiento (PI_{ABS}) en *C. vulgaris* al término del tratamiento (72 h), promedio de n=3 con su desviación estándar (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Gómez en 2012, demostró que la estreptomicina provoca un incremento en la fluorescencia mínima (F_0) de *C. vulgaris*, a medida que aumenta la concentración; asimismo, en los tratamientos de dosis más baja observó una reducción de F_M . Mientras que Liu *et al.*, (2011), observaron que la eritromicina provoca un descenso en los niveles de F_M en *S. capricornotum*.

Xiong en 2001, también encontró la misma tendencia de nuestros resultados pero en *Ankistrodesmus spiralis*, *Heterococcus brevicellularis*, *Scenedesmus* sp. y *Enallax coelastroides*, la relación F_v/F_M tuvo una reducción del 55, 40, 25 y 27.5% respectivamente; bajo exposición a estreptomicina y un incremento de luz UV-B, además de que se disminuyó el parámetro F_0 , como sucedió en nuestro estudio.

La reducción en la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria (ϕP_0) por efecto de la estreptomicina, ha sido reportada en hojas de trigo en condiciones de estrés hídrico. Estos autores, sugieren que la estreptomicina pudiera inhibir la maquinaria enzimática encargada de eliminar las ERO, lo cual provoca una destrucción de los centros de reacción (Zhao y Zou., 2002).

La disminución de la capacidad de reducir a Q_A , por parte del centro de reacción del fotosistema II, se encontró que también está asociada a una reducción de la capacidad de

mover electrones desde el lado donador del PSII ($ET_0/TR_0 = 1 - [(F_J - F_0)/F_M - F_0] = \psi_0$). La tabla 4, muestra que a medida que aumenta la concentración de estreptomycin en el medio de cultivo, hay una menor eficiencia para que un electrón se transporte después de Q_A^- (ψ_0); lo que nos indica que la re-oxidación de Q_A^- se inhibe, y por lo tanto el transporte del lado donador del PSII se bloquea conforme aumenta la concentración del antibiótico.

Un efecto similar, se ha observado en *C. vulgaris* en presencia de estreptomycin debido a un bloqueo parcial en el transporte electrónico, ya que causó un incremento en la producción de malondialdehído (MDA); el cual es un producto principal en la peroxidación lipídica, así como mayor fuga de electrolitos a medida que aumentó la concentración, lo cual indica serios daños en las membranas celulares (Quian *et al.*, 2010).

La disminución en la eficiencia cuántica, con la cual la energía absorbida (ABS) y atrapada (TR_0) por centro de reacción reducen Q_A^- , así como la disminución de la probabilidad con la que un electrón que ha reducido a Q_A^- se mueva hacia el lado aceptor de PSII; conllevan a una reducción en la eficiencia cuántica para el transporte de electrones desde el agua hasta los acarreadores intermedios y el lado donador del PSI (ϕE_0).

En la tabla 4, se puede observar que a medida que aumenta la concentración del antibiótico en el medio de cultivo; la energía para realizar transporte electrónico (ϕE_0), disminuyó de forma significativa ($P < 0.05$). A la máxima concentración del antibiótico (2.4 mg.L^{-1}), comparando con el tratamiento testigo, la reducción fue del 80%.

El rendimiento cuántico para el transporte electrónico ($\phi E_0 = ET_0/ABS$), es el producto entre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (ϕP_0), que involucra la actividad fotoquímica y el transporte electrónico del lado donador del fotosistema II; y la probabilidad de que un electrón atrapado en el centro de reacción se mueva más allá de Q_A^- (ψ_0), que involucra la actividad fotoquímica y el transporte electrónico del lado aceptor del fotosistema II.

El análisis de los valores ϕP_0 y ψ_0 , indica que la presencia de estreptomycin en el medio de cultivo, afecta ambas actividades fotoquímicas; sin embargo, a las concentraciones más elevadas del antibiótico, el efecto es mayor sobre la eficiencia cuántica máxima para el PSII (ϕP_0).

Lo anterior indica que el lado donador del PSII, es decir: $CLO \rightarrow P680 \rightarrow Fe_0 \rightarrow Q_A^-$, es más sensible al efecto del antibiótico, que el lado aceptor, es decir, $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow Cit_{b/f}$. Esto concuerda con la disminución en la liberación del oxígeno y el valor de la fluorescencia máxima; ya que la capacidad de absorber y atrapar energía de excitación para el transporte electrónico es afectada hasta en un 80%, comparado con el testigo.

El índice de rendimiento total, es un factor multiparamétrico, el cual nos permite evaluar de manera conjunta la actividad total de la cadena transportadora de electrones fotosintética.

Este índice está formado de tres expresiones independientes: la concentración de centros de reacción por clorofila [$ABS/RC/(1-ABS/RC)$], una expresión relacionada a la fotoquímica

primaria ($\phi P_o/(1-\phi P_o)$) y una expresión relacionada al transporte de electrones después de Q_{A^-} ($\Psi_o/(1-\Psi_o)$).

Por dicha conformación del índice de rendimiento, es sensible a los cambios en las propiedades de la antena, la eficiencia de atrapamiento y transporte electrónico después de Q_{A^-} (Oukarroum *et al.*, 2007; Yusuf *et al.*, 2010).

Como se muestra en la tabla 4, el índice de rendimiento para la conservación de energía para la reducción de los acarreadores electrónicos (PI_{ABS}), disminuyó conforme aumentó la concentración de estreptomycinina en el medio de cultivo. En la concentración más baja (0.3 mg.L⁻¹), la conservación de energía se reduce 50% y a la máxima concentración probada (2.4 mg.L⁻¹), el índice se reduce en 98%; lo que indica que el número de centros de reacción activos disminuyeron en mayor magnitud que el producto cuántico máxima y la eficiencia para mover electrones después de Q_{A^-} .

De igual manera, ocurrió una inhibición en la actividad fotosintética de *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Microcystis aeruginosa*; expuestas a estreptomycinina con una dosis letal media (EC_{50}) de 1.5 y 0.034 mg/L⁻¹ respectivamente (Van der Grinten *et al.*, 2010).

También en el estudio de Manisha en 2007, la estreptomycinina redujo progresivamente la fluorescencia de *C. vulgaris* comparando con el control y según transcurría el tiempo fue mayor la disminución. Aunque en el estudio de Kvíderová y Henley en 2005, se incrementó la eficiencia fotosintética entre 22 y 76 % en dos especies de algas; bajo una mezcla de estreptomycinina y ampicilina, lo cual indica que la interacción con otro antibiótico puede generar diferencias con respecto a nuestro experimento.

Asimismo, los valores de PI_{ABS} , ϕP_o , Ψ_o y ϕE_o , bajaron en *Synechocystis* sp con el aumento de concentración de amoxicilina de 25 a 50 mg/L⁻¹, en el estudio de Xiangliang *et al.* en 2008; indicando una mayor cantidad de centros de reacción cerrados y la disipación de energía en el fotosistema II.

En el experimento de Xiangliang *et al.* en 2009, la fluorescencia en *Synechocystis* sp., fue mayor al exponerse más tiempo a levofloxacin; menor cantidad de energía absorbida llegó a atraparse y menos energía atrapada logró transportarse, aunado a que la cantidad de centros de reacción abiertos disminuyó.

VIII. CANTIDAD DE PROTEÍNA D1

Los resultados de la cantidad relativa de proteína D1 del PSII, indicaron una disminución según incrementaba la concentración de fármaco. Si se observa la figura 24, podemos apreciar que visualmente hay una degradación en el tono y un grosor de la banda hasta 66% menor, indicando que la concentración de proteínas se hace menor.

El complejo fotosintético PSII, es especialmente propenso a daños fotooxidativos porque la reacción de disociación de agua catalizada por este complejo, inevitablemente conduce a la formación de especies de oxígeno reactivas que dañan el complejo. El PSII se daña constantemente y necesita ser reparado.

Un sistema de reparación muy eficiente, la subunidad D1 está predominantemente degradada y el complejo PSII dañado, se mueve de la grana a la región del estroma para la reparación (Nixon *et al.*, 2010). Un ejemplo, es el del estudio de Thiele *et al.* en 1996, los fotosistemas de *Anacardium excelsum* y *Spinacia oleracea* que con proteína D1 dañada parecen favorecer la disipación de energía.

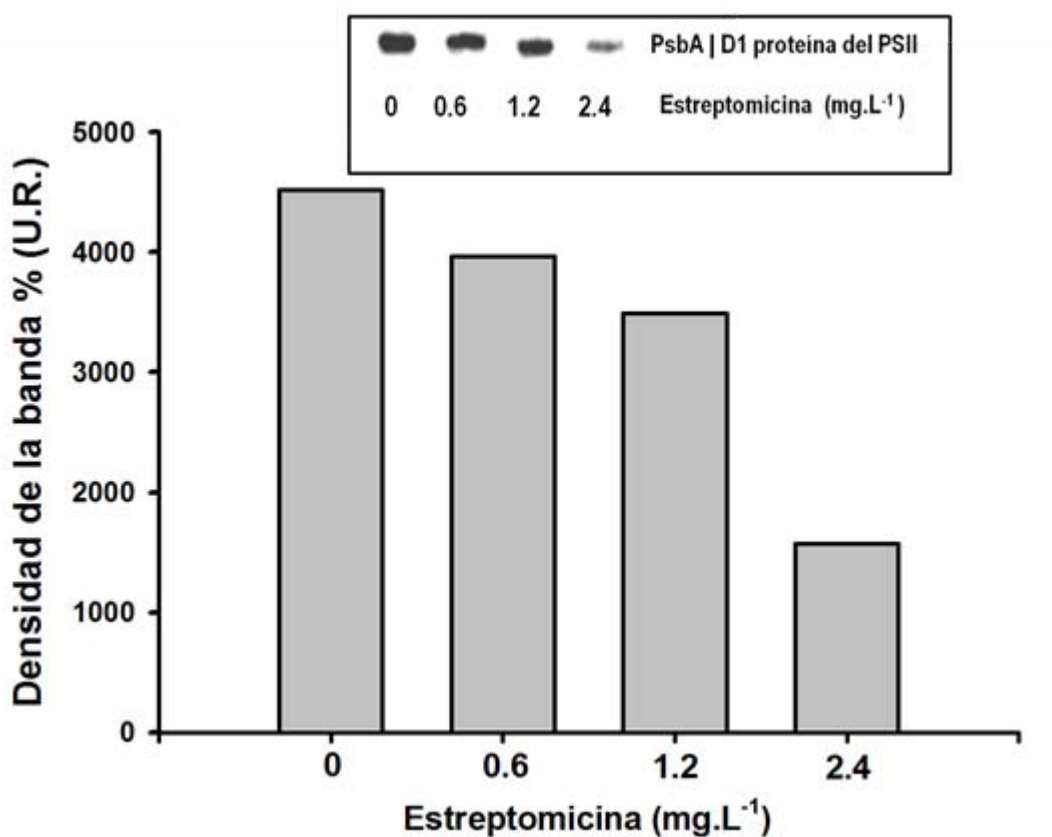


Figura 24. Análisis cuantitativo de la cantidad de proteína D1 en el alga *Chlorella vulgaris* al término de la exposición a estreptomicina por 72 h. El contenido de la proteína en la célula por mg de clorofila total, fue determinado por electroforesis SDS-PAGE para después realizar una inmunoblot. El inserto representa inmunoblots usando 70ng de clorofila por tratamiento.

El estudio de Wijk, Nilsson y Styring en 1994, encontró que con la existencia de una mayor cantidad de proteína D1 en las membranas tilacoidales de *Chlamydomonas reinhardtii*, se favorece la actividad fotosintética de la clorofila al estar expuesta a 400 $\mu\text{g}/\text{m}^{-1}$ de estreptomomicina y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ de lincomomicina; en tan solo cinco horas la actividad fotosintética se saturó.

Grabes *et al.* en 2002, publicaron que ante la presencia de la estreptomomicina, se degrada casi completamente la proteína D1 en *Arabidopsis thaliana*; además refieren que su papel en la fotosíntesis es estructural.

Thiele *et al.*, en 1997, concluyeron que la aclimatación de hojas de *Anacardium excelsum* a excesiva luz, estabiliza la proteína D1 pero en nuestro caso se disminuyó.

Los mismos autores también mencionaron, que la estabilización de la proteína podría ser alcanzada con el incremento de la actividad del ciclo de las xantófilas permitiendo la relajación térmica de la clorofila.

En otro estudio, Clarke *et al.* en 1993, expusieron a *Synechococcus* sp. a 250 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ de estreptomomicina, y por medio de inmunodetección, evidenciaron que con el aumento de la intensidad de luz desde 50 hasta 500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, la proteína D1 se degrada al transcurrir el tiempo y desaparece entre los 60 y 120 minutos (tardando más entre mayor era la intensidad lumínica). Además, May, Druett y Packman, encontraron en 1969 que se reduce la síntesis de proteínas en plantas superiores a una concentración de 50 mg/L^{-1} de estreptomomicina.

En este sentido, Hermann en 2007, refiere que el lugar de unión de la estreptomomicina es un sitio próximo al centro decodificante de la subunidad 16S del ribosoma por lo que se reduce la fidelidad translacional. Tiene a lugar un mecanismo complejo que podría envolver interferencia con la selección y la corrección inicial de tARN (Carter *et al.* 2000); que ocasiona problemas en la síntesis de proteínas, como la D1 del PSII.

Ogami *et al.*, en 2012, comentan otro posible factor, porque los procesos de desensamble y reensamble del PSII para insertar nuevamente la proteína D1, los de transcripción y traducción pueden ser distintos más allá de la especie. Además estos autores, apoyan la sugerencia de Nishiyama *et al.*, en 2012, al señalar que las ERO de oxígeno suprimen la nueva síntesis de proteínas, en particular la D1; así pues es otra vertiente susceptible de estudio.

Las alteraciones en la síntesis de proteínas del cloroplasto son un factor limitante en el proceso de reparación de la fotosíntesis; ya que este organelo, se conserva menos que la mitocondria (Eickmeier, 1982). Ya que la fotosíntesis se regula en múltiples niveles en el cloroplasto, las tasas de fotosíntesis se ajustan por la modificación de proteínas postraduccionales (Aro y Ohad, 2003); por la reorganización estructural de los complejos de proteínas de la fotosíntesis (Niyogi, 1999) y por la regulación metabólica del ciclo de Calvin (Paul y Pellny, 2003).

Además, la regulación de los cloroplastos al núcleo a través de señalización, modula la expresión de genes nucleares que codifican para las proteínas fotosintéticas (Leister, 2005). Las concentraciones de metabolitos de carbono (Rolland *et al.*, 2002), ERO de oxígeno (Apel y Hirt, 2004) y el estado redox de las membranas tilacoidales (Pfannschmidt, 2003) contribuyen a la señalización; por lo que en el futuro los estudios deben contemplar también éstos aspectos.

Los daños expuestos en las evidencias de este estudio, indican una posible relación con el efecto que tiene la estreptomycinina en las bacterias; ya que los aminoglucósidos les producen una acumulación de proteínas erróneas, lo que puede provocar una estructura y función incorrecta dentro de las actividades celulares.

Aunque existen algunos mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos que las bacterias utilizan; como la mutación del sitio objetivo de la estreptomycinina en la subunidad 16S del rARN (aunque es inusual) o la metilación del nucleótido (Magnet y Blanchard en 2005), *C. vulgaris* redujo su población y eficiencia fotosintética al exponerse a estreptomycinina.

Es preciso contemplar que se ha mencionado que la inhibición de la síntesis de proteína citoplasmática, no reduce significativamente la tasa máxima de fotosíntesis; en la recuperación fotosintética de *Sellaginella lepidophylla* (Eickmeier, 1982). Y debido a la disminución de la proteína D1 del PSII, parece ser que la fotosíntesis de nuestra alga depende mayormente de proteínas de origen cloroplástico; que fue el organelo más dañado en nuestro estudio.

Si bien, los daños por estrés en plantas y algas, se reciben principal y mayormente en el organelo fotosintético; podrían existir afecciones en las funciones relacionadas con el tRNA, proteínas ribosomales o complejos fotosintéticos. Un área de estudio interesante, sería revisar la capacidad de recuperación fotosintética, a pesar de todos los daños que provocó la estreptomycinina a *C. vulgaris*, se exhorta a las futuras investigaciones a explorar el potencial de esa línea. Puede ser de mucha ayuda un análisis del flujo transcripcional y de traducción genética, para obtener un panorama más completo; desde el inicio de los errores cerca del sitio decodificante.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvo información sobre la respuesta fisiológica de *C. vulgaris*, expuesta a diferentes concentraciones de estreptomina, se observó un decremento para la población que fue mayor según incrementaba la concentración del antibiótico. El tiempo que tardan las células para duplicarse se prolongó porque la velocidad de crecimiento disminuyó, reduciéndose su capacidad de proliferar.

La serie de pruebas de fluorescencia nos indicaron que la liberación de oxígeno, la velocidad de saturación del fotosistema y la intensidad límite para su saturación eran menores según sube la concentración del antibiótico. Por lo que la exposición a la estreptomina reduce las funciones de transporte electrónico y producción de oxígeno.

A partir de la prueba de fluorescencia polifásica, se determinó que el aparato fotosintético no se encuentra en condiciones aptas para realizar sus funciones con la misma eficiencia que si estuviera libre del antibiótico y que empeora si la cantidad de estreptomina es mayor.

Con las pruebas de fluorescencia modulada y calculando ciertos parámetros, se obtuvo información de que los complejos antenas, no recibieron ni atraparon los fotones con la misma eficiencia que lo hizo el control; asimismo se transportó menor cantidad de los fotones que se atraparon. Cuando hubo mayor cantidad de estreptomina, empeoró más el transporte.

Los pigmentos, son los responsables de recibir y transmitir la energía a la cadena transportadora. La disminución en su concentración, se tradujo en una disminución de la capacidad de los fotosistema para llevar a cabo transporte electrónico.

Para mantener sus funciones vitales, el alga, debe fijar carbono a través del proceso fotosintético; como fue menor con cada aumento de la concentración de estreptomina, le impidió sobrevivir. Pero, también debe consumir ciertos nutrientes, el consumo de fosfatos y nitratos se incrementó; como sucede ante situaciones de estrés en otros estudios. Aunque se incrementó el consumo, no ayudó en la supervivencia de la población, como demostró el peso seco medido. La diferencia entre los valores del consumo del control y la muestra con la concentración más letal, fue de dos y tres veces (para fosfatos y nitratos respectivamente).

Se encontró una baja producción fotosintética y consumo respiratorio de oxígeno, la tasa de liberación de O₂ fue hasta 64% menor que el control según incrementaba la dosis del tratamiento; y la fijación de CO₂ disminuyó su valor hasta 60% en comparación con el control. Lo anterior tuvo relación con la disminución de la cantidad de proteína D1 conforme aumentó la estreptomina; ya que la proteína es parte de la estructura del complejo liberador de oxígeno.

Por consiguiente, el crecimiento poblacional declinó; en su lugar hubo crecimiento del tamaño celular, pérdida de la forma elíptica, de la conformación de las granas y membranas tilacoidales; desaparecieron los gránulos de almidón (con 2.4 mg/L⁻¹ de estreptomina) y

las estructuras superficiales de la pared se alargaron si aumentaba la cantidad de estreptomycin. El daño fue evidente en las imágenes de microscopio siendo mayor en el cloroplasto.

La estreptomycin, es uno de tantos fármacos que existen en las aguas residuales generadas por nuestros centros urbanos, debido al uso irracional y excesivo de productos farmacéuticos y de cuidado personal. Su permanencia y concentración en las aguas residuales, que terminan en los cuerpos de agua, depende totalmente de la especie humana.

Cuidar los efectos que estas sustancias tienen sobre los ecosistemas, cuestiones de acumulación y magnificación en las redes tróficas; son problemas que se pueden resolver desde el origen del uso de la sustancia; pero de no ser capaces de moderarlo se puede recurrir al tratamiento terciario de nuestras aguas residuales, donde se pueden usar las algas.

Nuestro estudio, aportó información de las concentraciones de estreptomycin que se deben contemplar para evitar daños en las poblaciones algales.

Bibliografía

Aguirre, R. N. J., Palacio, B. J. A., Correa, O. I. C. y Hernández, A. E. (2007). Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones Nitrógeno:Fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Ingenierías*. (6):11 11-21.

Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G. y Pollio, A. (2002). Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*. (36): 2869–2877.

Andreyeva, V. M. (1998). Terrestrial and aerophilic green algae – Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales (Pochvennye i aerofil'nye zelenye vodorosli – Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosar-cinales). *Nauka Academic Journals*. 351 págs.

Andrieu, M., Rico, A., Minh, P. T., Thanh, H. D. T. Thanh, P. N. y Van den, B. P. J. 2015. Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to Pangasius catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Chemosphere*. (119): 407-424.

Answers™ Disponible en: <http://www.answers.com/topic/streptomycin> Fecha de consulta: 21/04/13.

Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. (55): 373–399.

APHA, AWWA, WPCF. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18ª edición. USA. 548 págs.

Barhoumi, L. y Dewez, D. 2013. Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Biomed Research International*. 11 págs.

Becerril, B. J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*. México. (10): 8.

Bila, D. M. y Dezotti, M. (2003). Fármacos no medio ambiente. *Química Nova*. (26): 523-530.

Bock, C., Krienitz, L. y Pröschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea Journal*. (11):2 293–312.

Bohacek, R. S., McMartin, C. y Guida, W. C. (1996). The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Medicinal Research Reviews*. (16): 1, 3-50.

Borowitzka, M. A. y Borowitzka L. J. (1988). New York. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. *Microalgal biotechnology*. 153–196.

Bottoni, P., Caroli, S. y Caracciolo, A. (2010). Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological and Environmental Chemistry*. (92): 3, 549-565.

Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K. y Solomon, K. R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*. (23): 2, 371-382.

Brown, C.M., MacKinnon, J.D., Cockshutt, A.M., Villareal, T.A., Campbell, D.A. (2008). Flux capacities and acclimation costs in *Trichodesmium* from the Gulf of Mexico. *Marine Biology*. (154), 413–422

Burton, G. A. y Nordstrom, J. E. (2004). An *in situ* toxicity identification evaluation method Part I: Laboratory validation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. (23): 2844-2850.

Campa-Córdova, A. I., Luna-González, A., Ascencio, F., Cortés-Jacinto y Cáceres-Martínez, C. J. (2006). Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* . *Aquaculture*. (260): 145-150.

Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. y Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. (407): 340-348.

CAS. 2015. Disponible en:

<http://www.cas.org/content/chemical-substances>

<http://www.cas.org/content/regulated-chemicals>

Chen, J, Q, y Guo, R. X. (2012). Access the toxic effect of the antibiotic cefradine and its UV light degradation products on two freshwater algae. *Journal of Hazardous Materials*. (209-210): 520-523.

Christensen, F.M. (1998). Pharmaceuticals in the environment: A human risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. (28): 212–21.

Clarke, A. K., Hurry, V. M., Gustafsson, P. y Öquist, G. (1993). Two functionally distinct forms of the photosystem II reaction-center protein D1 in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Biochemistry*. (90): 11985-11989.

Daughton, C. y Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*. (107): 907-938.

De-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K. y Bustillos, J. J. (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-

growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*. (48): 514–521.

Demmig-Adams, B. y Adams, W.W. (2006). Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol*, 172: 11-21.

EPA. 1992. Environmental Protection Assessment. Disponible en:
<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/factsheets/0169fact.pdf>

Fanés, I. (2008). Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. 324 págs.

Fawley, M. W. y Fawley, K. P. (2004). A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *Journal of Phycology*. (40): 223–225.

Freyssinet, G., Eicholz, R. L. y Buetow, D. E. (1984). Kinetics of Accumulation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase during Greening in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*. (75): 850-857.

Freyssinet, G. (1975). Changes in chloroplast ribosomal proteins in a streptomycin-resistant mutants of *Euglena gracilis*. *Plant science letters* 5:305-311.

Gómez, J. E. A. (2012). Caracterización de la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de estreptomicina. Tesis de Licenciatura. UNAM-FESI. 103 pág.

Gómez, L. L. M. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*. (9): 2, 3-20.

Gómez-Silva, B. y Schiff, J. A. (1985). The light requirement for protein synthesis and carbon dioxide fixation in highly purified intact *Euglena* chloroplasts. *Plant science*. (39):111-119.

González-Moreno, S., Gómez-Barrera, Perales, H., Moreno-Sánchez, R. (1997). Multiple effects of salinity on photosynthesis of the protist *Euglena gracilis*. *Physiologia plantarum* (101): 777-786

González, M.S. y Peñaloza, C.I. (2000). Biomoléculas, métodos de análisis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. México.

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomera, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltés, K., Marco, E. y Fernández-Piña, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water research*. (47): 2050-2064.

Grabes, T., Pesaresi, P. Schiavon, F., Varotto, C., Salamini, F., Jahns, P. y Leister, D. (2002). The role of Δ pH-dependent dissipation of excitation energy in protecting

photosystem II against light-induced damage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biochemistry*. (40): 41-49.

Halling-Sorensen, B., Holten, L. H. C., Andersen, H. R. y Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (46): S1, 53-58.

Halling-Sorensen, B. S., Nors, N. P.F., Lanzky, F. I., Holten, L. H. C. y Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. *Chemosphere*. (36): 357–93.

Harrass, M.C., Kindig, A.C. y Taub, F.B. (1985). Responses of blue-green and green algae to streptomycin in unialgal and paired culture. *Aquatic Toxicology*. (6): 1–11.

Hermann, T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs ad new therapeutic approaches *Cellular and Molecular Life Sciences*. (64): 1841-1852.

Herrera, A., Marín, O., Coronel, I., Urich, R. y Tezara, W. (2010). Asimilación de carbono, eficiencia de uso de agua y actividad fotoquímica en xerófitas de ecosistemas semiáridos de Venezuela. *Ecosistemas*. (19): 1, 67-78.

Horum, M. A. y Schwartzbach, S. D. (1981). Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena*. Induction of microbodies. *Plant Physiology*. (68): 430-434.

Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., Wenzeler, P. y Kessler, E. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (CHLOROPHYTA). *Journal of Phycology*. (35):3, 587–598.

IMS. 2012. Instituto Mundial de Salud

Disponible en:

http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Corporate/Press%20Room/Top-Line%20Market%20Data%20&%20Trends/2011%20Top-line%20Market%20Data/Global_Pharma_Market_by_Spending_2003-2011.pdf

Fecha de consulta: 19/05/13.

IMS México, 2013. Instituto Mundial de Salud

Disponible en:

<http://www.imshealth.com/portal/site/ims/menuitem.d248e29c86589c9c30e81c033208c22a/?vgnextoid=4cd39a26fa563310VgnVCM100000ed152ca2RCRD&vgnnextchannel=343879d7f269e210VgnVCM10000071812ca2RCRD> Fecha de consulta: 21/05/13

Jiang, H. X. Chen, L. S., Zheng, J. G., Han, S., Tang, N., Smith, B. R. (2008). Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*. (28):1863-1871.

Jones, O. A., N. Voulvoulis, y J. N. Lester. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research Journal*. (36): 5013–22.

Jos, A., Repetto, G., Rios, J. C., Hazen, M. J., Molero, M. L., Del Peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Pérez-Martín, P. y Cameán, A. (2003). Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro*. (17): 525–532.

Khaybullina, L. S., Gaysina, L. A., Johansen, J. R. y Krautová, M. (2010). Examination of the terrestrial algae of the Great Smoky Mountains National Park, USA. *Fottea Journal*. (10):2, 201-215.

Kramer, D.N. (2011). The Importance of Energy Balance in Improving Photosynthetic Productivity'. *Plant Physiology*. (155): 70-78.

Kvíděrová, J. y Henley, W. J. (2005). The effect of ampicillin plus streptomycin on growth and photosynthesis of two halotolerant chlorophyte algae. *Journal of applied phycology*. (17): 4 301-307.

Lai, H. T., Hou, J. H., Su, C. I. y Chen, C. L. (2009). Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (72): 329-334.

Leister, D. (2005). Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis. *Gene*. (354): 110–116.

Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S. y Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*. (403): 391-5.

Liu, B.Y., Nie, X.P., Liu, W.Q., Snoeijls, P., Guan, C. y Tsui, M. T. (2011). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornatum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier. 74: 1027-1035.

Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z. y Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal Applied Phycology*. (21): 239-246.

Maas, W. E., Latter, M. R., Thiele, J., Waite, M A. y Brooks, L. H. J. (2007). Effect of multiple antibiotic treatments on a paralytic shellfish toxin-producing culture of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Aquatic microbial ecology Journal*. (48): 255–260.

Magnet, S. y Blanchard, J. S. (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*. (105): 477-498.

Manisha, A. S. C. (2007). Growth, Survival and Reproduction in *Chlorella vulgaris* and *C. variegata* with Respect to Culture Age and under Different Chemical Factors. *Folia Microbiology*. (52): 4, 399-406.

Martínez, J. A. y Sánchez, F. (2007). Mecanismo de acción de los antibióticos. *JANO journal*. (1660): 28-34.

Maxwell, K. y Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll florescence- a practical guide. *Journal of experimental botany*. (51): 345, 659-668.

May, K. R., Druett, H. A. y Packman, L. P. (1969). Streptomycin inhibition of protein synthesis in peas reversed by divalent cations. *Nature*. (221):1147-1148.

McManus, S. P. (1999). Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. (19): 4, 192-6.

Monroy, A. F. y Schwartzbach, S. D. (1985). Influence of Photosynthesis and Chlorophyll Synthesis on Polypeptide Accumulation in Greening *Euglena*. *Plant Physiology*. (77): 811-816.

NCBI. 2012. National Center for Biotechnology Information

Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3077&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Fecha de consulta: 22/05/2013

Nie, X.P., Liu, B.Y., Yu H.J., Liu, W.Q., Yang, Y. F. (2013). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamthoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Pollution*. (172): 23-32.

Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. y Murata, N. (2012). Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Journal of Plant Physiology*. (142): 35-46.

Niyogi, K.K. (1999). Photoprotection revisited. Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. (50): 333-359.

Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M. y Komenda, J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany*. (106): 1-16.

OECD, 2011. Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the testing of chemicals. Última actualización: 28 de julio de 2011 Fecha de consulta: 24 de septiembre de 2011 Disponible en:

<http://www.oecd->

[ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9720101e.pdf?expires=1344228544&id=id&accname=freeContent&checksum=13B2425F286D4B4106D439533CFF3158](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9720101e.pdf?expires=1344228544&id=id&accname=freeContent&checksum=13B2425F286D4B4106D439533CFF3158)

Ogami, S., Boussac, A. y Sugiura, M. (2012). Deactivation processes in PsbA1-Photosystem II and PsbA3-Photosystem II under photoinhibitory conditions in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1817): 1322-1330.

Opris, O., Copaciu F., Soran, M.L., Ristoiu, D., Niinemets, U., Copolovici, L. (2013). Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: Leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (87):70–79

Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G., Strasser, R. J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. (60):438-446.

Park, S. y Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology journal*. (17): 526-538.

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): 2274-2281.

Paul, M.J., and Pellny, T.K. (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*. (54): 539–547.

Pfannschmidt, T. (2003). Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Science*. (8), 33–41.

Qian, H., Li, J., Pan, X., Sun, Z., Ye, C., Jin, G. y Z-Fu. (2010). Efectos de la estreptomycin sobre el crecimiento de las algas *Chlorella vulgaris* y *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology Journal*. (27): 3.

Reddersen, K., T. Heberer, y U. Dünbier. (2002). Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground and drinking water. *Chemosphere*. (49): 539-44.

Rodríguez-Álvarez, M. (2002). Aminoglucósidos. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. México. (22): 1, 20-30.

Rolland, F., Moore, B., y Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*. (14): 185–205.

Strasser, J.B., Strasser, R.J. (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En: *Photosynthesis: from light to biosphere*. Mathis P. (Eds) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp. 977-980.

Strasser, B.J. (1997). Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52: 147-155.

Stuer-Lauridsen, F., M. Birkved, L.P. Hansen, H.C.H. Lutzhoft, y B. Halling-Sorensen. (2000). Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere*. (40): 783-93.

Swartzman, G., Rose, K., Kindig, A. y Taub, F. (1989). Modeling the direct and indirect effects of streptomycin in aquatic microcosms. *Aquatic Toxicology*. (14): 109-130.

Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K. y Krause, G. H. (1996). Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Science*. (115): 237-250.

Thiele, A., Winter, K. y Krause, H. (1997). Low inactivation of D1 protein of Photosystem II in young canopy leaves of *Anacardium excelsum* under high-light stress. *Journal of Plant Physiology*. (151): 286-292.

Thornton, I., Butler, D., Docx, P., Hession, M., Makropoulos, C., McMullen, M., Nieuwenhuijse, M., Pitman, A., Rautiu, R., Sawyer, R., Smith, S., White, D., Wilderer, P., Paris, S., Marani, D., Braguglia, C. y Palerm, J. (2001). Pollutants in urban waste water and sewage sludge. *European Communities*. (99): 150 págs.

Van der Grinten, E., Pikkemaat, M. G., Van den Brandhof, E. J., Stroomberg, G. J. y Kraak, M. H. S. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. (80): 1-6.

Van Heerden, P.,D.,R., Strasser, R., J. y Krüger, G.H.J. (2004). Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Acta Physiologica Plantarum*. (12): 239-249.

Waksman, S. A. (1952). Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. Nobel lecture. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/waksman-lecture.pdf
Fecha de consulta: 29/04/13.

Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*. (144): 307-313.

Wijk, K. J. V., Nilsson, L. O. y Styring, S. (1994). Synthesis of Reaction Center Proteins and Reactivation of Redox Components during Repair of Photosystem II after Light-induced Inactivation. *The Journal of biological chemistry*. (269): 45, 28382-28392.

Wollman, F. A., Minai, L. y Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1411): 21-85.

- Xiangliang, P., Daoyong, Z., Xi, C., Guijin, M., Lanhai, L. y Anming, B. (2009). Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. *Chemosphere*. (77): 413-418.
- Xiangliang, P., Chunnua, D., Daoyong, Z., Jianlong, W., Guijin, M. y Ying, C. (2008). Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology*. (89): 207–213.
- Xiong, F. (2001). Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle in vivo. *Journal of Plant Physiology*. (158): 285-294.
- Yamamoto, M., Kurihara, I. y Kawano, S. (2005). Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorrellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta Journal*. (221):6, 766-775.
- Yaronskaya, E. B., Gtitskevich, E. R., Trukhanoyets, N. L y Averina, N. G. (2007). Effect of Kinetin on Early Stages of Chlorophyll Biosynthesis in Streptomycin-Treated Barley Seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*. (54): 3, 388–395.
- Ye, Zhi-Wei., Jiang, Jian-Guo., Wu, Guang-Hong. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*. (26): 352–360.
- Yoshida, R., Sato, T., Kanno, A. y Kameya, T. (1998). Streptomycin mimics the cool temperature response in rice plants. *Journal of Experimental Botany*. (49): 319, 221-227.
- Yusuf, M. A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, N. B. (2010). Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1797): 1428-1438.
- Zhao, H.J., Zou, Q. (2002). Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. *Photosynthetica*. (40):523-527
- Zhu, H., X. Chen, X. Pan and D. Zhang. (2011). Effects of chloramphenicol on pigmentation, proline accumulation and chlorophyll fluorescence of maize (*Zea mays*) seedlings. *International Journal of Agricultural and Biological*. (13): 677–682.

APÉNDICE

I. Estadísticos de ANOVA y prueba Tukey (t de student)

1. Crecimiento poblacional

Valor crítico del rango 4.3883

Valor experimental 56.89

Tukey Agrupamiento		Media
	A	74.535
	A	
B	A	68.471
B		
B		64.248
	C	56.316
	C	
D	C	50.444
D		
D		45.216

2. Tasa de crecimiento relativo

Valor crítico del rango 4.3726

Valor experimental 11.33

Tukey Agrupamiento		Media
	A	0.72279
	A	
B	A	0.69433
B	A	
B	A	0.67327
B	A	
B	D	0.63150
	D	
	D	0.59098
	D	
	D	0.54910

3. Producción fotosintética de oxígeno

Valor crítico del rango 4.4944

Valor experimental 116.21

Tukey	Agrupamiento	Media
	A	88.510
	B	59.248
	B	
C	B	52.628
C		
C		48.843
	D	35.028
	E	23.495

4. Consumo de oxígeno por respiración

Valor crítico del rango 4.4944

Valor experimental 46.45

Tukey	Agrupamiento	Media
	A	42.520
	B	32.964
	B	
C	B	29.643
C		
C	D	23.758
	D	
E	D	20.961
E		
E		14.985

5. Concentración de pigmentos (en azul, los valores sin diferencia significativa)
Clorofila a

Análisis de varianza de un factor					
F	4.9613		Valor crítico para F		2.3231
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0.0	5.1888	11.6267	12.6646	12.0113	15.6731
0.3	3.4037		4.4129	5.5515	8.0970
0.6			3.5286	7.0903	2.5130
1.2				2.0129	-0.1613
1.8					-1.3367
Valor crítico de t	1.7613				

Clorofila b

Análisis de varianza de un factor					
F	3.2708		Valor crítico para F		2.3231
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	-5.6767	-7.1540	-5.6263	-4.7849	-3.1913
0.3	3.1285		3.5093	4.7719	4.9307
0.6			1.6287	3.7407	0.9926
1.2				1.1399	-0.4400
1.8					-1.2262
Valor crítico de t	1.7613				

Carotenoides

Análisis de varianza de un factor					
F	2.5643		Valor crítico para F		2.3231
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	3.1712	6.2332	10.3601	5.9122	5.4587
0.3		1.2170	3.1839	3.6566	3.5306
0.6			2.6541	3.0727	2.1519
1.2				-0.1269	0.0904
1.8					0.2905
Valor crítico de t	1.7613				

6. Consumo de fosfatos

Valor crítico del rango 4.1508

Valor experimental 1511.7

Tukey Agrupamiento	Media
A	139.5147
B	126.3116
C	114.9610
D	104.0089
E	99.7579
F	93.5941

7. Consumo de nitratos

Valor crítico del rango 4.7501

Valor experimental 52.73

Tukey Agrupamiento	Media
A	1236.61
B	739.60
C	484.98
C	441.64
C	386.78
C	377.95

8. Fotoquímica

Fluorescencia O (a 50 μ s)

Análisis de varianza de un factor					
F	2867.7388		Valor crítico para F		2.6207
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	15.1047	37.5105	31.2513	39.0000	-83.6660
0.3		33.9567	28.9856	-4.0825	-92.4682
0.6			-6.8931	-25.5792	-107.2300
1.2				-19.8033	-179.7305
1.8					-142.6667
Valor crítico de t	2.1318				

Fluorescencia K

Análisis de varianza de un factor					
F	2041.2406		Valor crítico para F		2.6207
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	20.8085	105.2736	34.5164	32.2879	-33.4332
0.3		25.3917	35.8391	4.1903	-203.1763
0.6			-0.5505	-20.8642	-81.9559
1.2				-24.8794	-113.8786
1.8					-80.2084
Valor crítico de t	2.1318				

Fluorescencia J

Análisis de varianza de un factor					
F	1472.5124		Valor crítico para F		2.6207
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	21.7804	75.6582	41.9101	43.9709	-12.9047
0.3		28.3641	38.7003	15.3755	-113.5000
0.6			5.0679	-9.6728	-62.8702
1.2				-21.8571	-111.8034
1.8					-57.8495
Valor crítico de t	2.1318				

Fluorescencia I

Análisis de varianza de un factor					
F	1162.0959		Valor crítico para F		2.6207
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	20.3590	51.7899	33.3634	59.6010	-7.3181
0.3		16.8935	38.5114	12.5968	-107.7775
0.6			4.7068	-4.9749	-53.9689
1.2				-11.0312	-117.3133
1.8					-62.0570
Valor crítico de t	2.1318				

Fluorescencia P

Análisis de varianza de un factor					
F	1566.1730		Valor crítico para F		2.6207
LSD	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4
0	18.3339	80.7667	61.6422	60.2755	-3.5942
0.3		23.0062	59.1098	24.7898	-69.3879
0.6			16.0840	-2.5580	-67.2836
1.2				-24.0333	-241.0000
1.8					-111.1399
Valor crítico de t	2.1318				

9. Rendimientos cuánticos

Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII (ϕ_{Po})

Valor crítico del rango 4.3726

Valor experimental 4864.05

Tukey Agrupamiento

Media

A	0.625820
B	0.537960
C	0.481780
D	0.408540
E	0.288740
F	0.215120

Eficiencia con la que un electrón atrapado mueve un electrón después de $Q_A - (\Psi_0)$

Valor crítico del rango 4.1153

Valor experimental 28.96

Tukey Agrupamiento

Media

A	0.42969
B	0.34356
B	
C	0.31633
C	
C	0.31223
C	
C	
D	0.28782
D	
D	0.23676

Rendimiento cuántico para el transporte electrónico en PSII (Φ_{Eo})

Valor crítico del rango 4.1153

Valor experimental 134.62

Tukey Agrupamiento	Media
A	0.264372
B	0.190917
C	0.161683
D	0.121994
D	0.097444
D	0.051900
E	0.051900

Índice de rendimiento para la conservación de energía para la reducción de los acarreadores electrónicos PI_{ABS}

Valor crítico del rango 4.1153

Valor experimental 206.32

Tukey Agrupamiento	Media
A	2.9432
B	1.4222
C	0.9871
D	0.4277
D	0.2132
E	0.2132
E	0.0618
E	0.0618

Rendimiento cuántico para la liberación fotosintética de oxígeno (α)

Valor crítico del rango 4.7501

Valor experimental 27.86

Tukey Agrupamiento	Media
A	60.611
A	60.611
B	54.256
B	54.256
B	53.129
B	53.129
B	45.864
B	45.864
D	38.441
D	38.441
D	31.530