

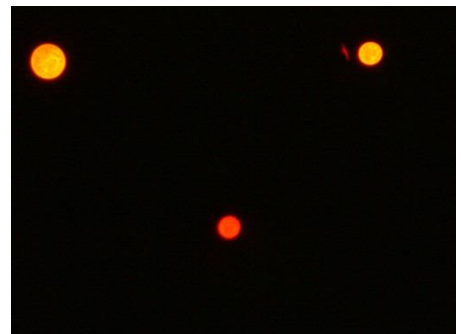
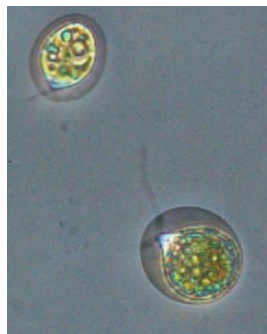
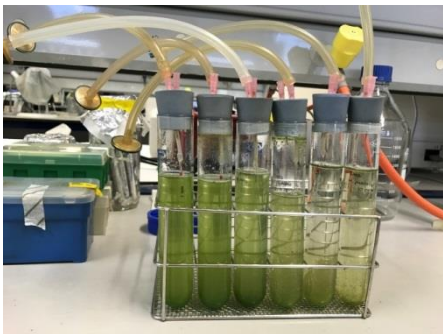
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Microbiología

Toxicidad ejercida por el antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* Flotow

Toxicidade exercida polo antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emerxente, sobre a microalga doceacuícola *Haematococcus pluvialis* Flotow

Toxicity of antibiotic oxytetracycline, an emerging aquatic micropollutant, on the freshwater microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow



Inès María Blériot Rial

Trabajo de Fin de Grado

Junio 2017

Dirigido por Carmen Rioboo Blanco y Marta Esperanza Llera



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Área de Microbiología

Trabajo de Fin de Grado

Dña. Carmen Rioboo Blanco y Dña. Marta Esperanza Llera autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Toxicidad ejercida por el antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* Flotow” presentado por Inès María Blériot Rial para su defensa ante el Tribunal Calificador.

En A Coruña, 20 Junio 2017

Fdo. Carmen Rioboo

Fdo. Marta Esperanza

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen/abstract | 4 |
| 1. Introducción | 7 |
| 2. Objetivo..... | 8 |
| 3. Material y métodos | 8 |
| 3.1. Descripción de la especie | 8 |
| 3.2. Cultivo microalgal | 10 |
| 3.3. Oxitetraciclina..... | 10 |
| 3.4. Diseño experimental..... | 11 |
| 3.5. Determinación de la densidad celular | 11 |
| 3.6. Análisis de viabilidad celular. | 11 |
| 3.7. Cálculo de la Concentración Inhibitoria media (IC ₅₀)..... | 12 |
| 3.8. Determinación espectrofotométrica de la clorofila <i>a</i> | 13 |
| 3.9. Determinación espectrofotométrica de astaxantina | 13 |
| 3.10. Determinación de células palmeloides..... | 13 |
| 3.11. Determinación de células palmeloides ricas en lípidos neutros. | 14 |
| 3.12. Análisis estadístico. | 15 |
| 4. Resultados y discusión | 15 |
| 4.1. Tasa de crecimiento..... | 15 |
| 4.2. Viabilidad celular | 17 |
| 4.3. Contenido celular en clorofila <i>a</i> | 18 |
| 4.4. Contenido celular en astaxantina | 19 |
| 4.5. Porcentaje de células palmeloides..... | 21 |
| 4.6. Porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros | 23 |
| 5. Conclusiones/ Conclusions..... | 24 |
| 6. Bibliografía..... | 27 |
| 7. Abreviaturas..... | 30 |
| 8. Índice de figuras. | 31 |
| 9. Índice de tablas..... | 31 |

Resumen/abstract

La presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático, como los antibióticos, suponen un grave problema, ya que puede dañar organismos no diana como las microalgas, responsables de la producción primaria en estos ecosistemas. En la actualidad, el antibiótico oxitetraciclina es uno de los fármacos más utilizados en múltiples sectores como la medicina, veterinaria, ganadería o piscicultura, debido a su alto rendimiento, teniendo actividad frente a una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas y por su bajo coste. En el presente trabajo se estudió el posible efecto tóxico del microcontaminante emergente oxitetraciclina (OTC) sobre la microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis*. Con este fin, se expusieron los cultivos a diferentes concentraciones de oxitetraciclina (0,5, 1, 2,5, 5 y 10 mg l⁻¹) durante 96 horas. Además se llevaron a cabo cultivos control a los que no se les adicionó el antibiótico estudiado. Del mismo modo, para estudiar el potencial efecto de la temperatura sobre la toxicidad de este contaminante en el marco del calentamiento global, los ensayos se llevaron a cabo a dos temperatura diferentes: 18°C y 24°C. Transcurrido ese tiempo se analizaron los parámetros de crecimiento, viabilidad celular y contenido en clorofila *a*. Además, también se estudió el posible efecto de la exposición a OTC sobre la producción del carotenoide astaxantina, mediante el análisis de su contenido celular. Por último, se procedió al estudio de células vegetativas flageladas frente al porcentaje de células en estado palmeloide así como la acumulación de lípidos neutros en dichas células. En los cultivos mantenidos a 18°C, la exposición al antibiótico provocó una inhibición significativa del crecimiento, de la viabilidad celular y del contenido en clorofila *a* en los cultivos de *Haematococcus pluvialis*, frente a cultivos control sin contaminante (p-valor<0,05). Dicha inhibición fue dependiente de concentración, para todos los parámetros analizados. Por otra parte, la exposición al antibiótico en los cultivos de *H. pluvialis* expuestos a 18°C provocó de manera no significativa la acumulación celular del pigmento astaxantina (p-valor>0,05), incrementándose también el porcentaje de células palmeloides (p-valor<0,05) y el porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros (p-valor<0,05). La observación al microscopio óptico de estos cultivos mostró la presencia de cambios morfológicos en las células de *H. pluvialis* expuestas a OTC ya descritos previamente en esta especie como respuesta a diferentes situaciones de estrés. Dicha respuesta se caracteriza por una disminución del contenido en clorofila *a*, debido a que se inhibe la fotosíntesis provocando la formación del pigmento astaxantina, disminuyendo por tanto, la presencia de células vegetativas en estado móvil flagelado, y aumentando el porcentaje de células en estado inmóvil y no flageladas de resistencia con acumulación de astaxantina y lípidos neutros. Paralelamente a estos ensayos, se evaluó también la existencia de una posible interacción entre un factor ambiental (la

temperatura) y la exposición a la oxitetraciclina con cultivos de *H. pluvialis* mantenidos a 24°C. Tras 96 h de exposición se observó que existe una interacción entre ambas variables para la viabilidad celular, el contenido en clorofila *a*, el contenido en astaxantina y el porcentaje de células palmeloides (p -valor $<0,05$), en la cual el incremento de temperatura reduce el efecto tóxico del antibiótico sobre los parámetros estudiados.

Palabras claves: *Haematococcus pluvialis*, oxitetraciclina, astaxantina, microalga, temperatura, contaminante emergente.

The presence of emerging pollutants in the aquatic environment, such as antibiotics, pose a serious problem, as it can damage non-target organisms such as microalgae, which are responsible for primary production in these ecosystems. Actually, the antibiotic oxytetracycline is one of the drugs most used in many sectors such as medicine, veterinary, livestock or fish farming, due to its high performance, having activity against a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria and for its low cost. In the present work the possible toxic effect of the emergent microcontaminant oxytetracycline (OTC) on the freshwater microalga *Haematococcus pluvialis* was studied. For this purpose, the cultures were exposed to different concentrations of oxytetracycline (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg l⁻¹) for 96 hours. In addition, control cultures were carried out without antibiotic. Likewise, in order to study the potential effect of temperature on the toxicity of this contaminant in the context of global warming, the tests were carried out at two different temperatures: 18°C and 24°C. After that time the parameters of growth, cell viability and chlorophyll *a* content were analyzed. In addition, the possible effect of exposure to OTC on astaxanthin carotenoid production was also studied by analyzing its cellular content. Finally, the presence of flagellated vegetative cells against the percentage of cells in palmeloid state was studied. In cultures maintained at 18°C, exposure to the antibiotic resulted in significant inhibition of growth, cell viability and chlorophyll *a* content in *Haematococcus pluvialis* cultures versus control cultures without contaminant (p -value <0.05). This inhibition was concentration dependent, for all parameters analyzed. On the other hand, exposure to the antibiotic in cultures of *H. pluvialis* treated with 18°C caused not significant cellular accumulation of the astaxanthin pigment (p -value >0.05) and an increase in the percentage of palmeloid cells (p -value <0.05) as well as in the percentage of cells rich in neutral lipids (p -value <0.05). Optical microscope observation of these cultures showed the presence of morphological changes in *H. pluvialis* cells exposed to OTC previously described in this species in response to different stress situations. This response is characterized by a decrease in the chlorophyll *a* content due to the inhibition of photosynthesis leading to the formation of the pigment astaxanthin, thus reducing the presence of vegetative cells in a flagellated motile state and increasing the percentage of cells in stationary and non-flagellated resistance with accumulation of

astaxanthin and neutral lipids. In parallel to these tests, the existence of a possible interaction between an environmental factor (temperature) and exposure to oxytetracycline with *H. pluvialis* cultures maintained at 24°C was also evaluated. After 96 h of exposure, there was an interaction between both variables for cell viability, chlorophyll *a* content, astaxanthin content and percentage of palmeloid cells (p-value <0.05), indicating that the temperature increase reduced the toxic effect of the antibiotic.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, oxytetracycline, astaxanthin, microalga, temperature, emerging pollutant.

1. Introducción

El desarrollo de nuevas técnicas analíticas altamente sensibles ha revelado la presencia de una gran cantidad de compuestos químicos en el medio acuático, los cuales han sido denominados genéricamente como contaminantes emergentes (Naidu et al., 2016; Seoane et al., 2017). Los contaminantes emergentes se utilizan diariamente en grandes cantidades e incluyen una amplia variedad de compuestos tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado personales, desinfectantes, surfactantes y algunos pesticidas (Matamoros et al., 2016). Estos compuestos de distinto origen y naturaleza química y, de los cuales existe información limitada no se encuentran regulados por los reglamentos de calidad de aguas existentes actualmente, pudiendo ser amenazas potenciales para los ecosistemas y para la salud y seguridad humana (Farré et al., 2008).

Dentro de este grupo de contaminantes, existe una creciente preocupación por los potenciales efectos adversos de los antibióticos, fármacos ampliamente utilizados en medicina, agricultura industrial y acuicultura. En concreto, el rápido desarrollo de la piscicultura ha aumentado el uso de antibióticos para prevenir enfermedades bacterianas en las plantas de cultivo de peces. En la piscicultura, los antibióticos pueden administrarse directamente en las aguas o incorporarse a la dieta, siendo posteriormente excretados al medio en las heces y en la orina (Shao, 2001). Esta descarga continuada de antibióticos puede causar daños en los ecosistemas acuáticos y promover el desarrollo de resistencias bacterianas (Eguchi et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Santaefemia et al., 2016). Las tetraciclinas son unos antibióticos de amplio espectro, que exhiben actividad frente a una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Chopra y Roberts, 2001). Dentro de las tetraciclinas, la oxitetraciclina (OTC) es la más utilizada en todo el mundo por su alta eficacia y bajo coste (Ueno et al., 2004; Reed et al., 2006; Santaefemia et al., 2016).

La presencia de antibióticos en los medios dulceacuícolas supone un grave problema, ya que pueden dañar a organismos no diana como las microalgas. Estos microorganismos desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos, donde son productores primarios y cualquier efecto sobre ellos pueden afectar por tanto a los niveles tróficos superiores (Campella et al., 2001; Rioboo et al., 2007). Por eso, las microalgas se utilizan frecuentemente como organismos modelo en bioensayos de toxicidad *in vitro* (Seoane et al., 2017).

En el presente trabajo, la microalga empleada ha sido *Haematococcus pluvialis* Flotow. Esta alga unicelular dulceacuícola se caracteriza por poseer un ciclo celular complejo (Camacho et al., 2013). En condiciones vegetativas de crecimiento dicha microalga presenta una forma elíptica, siendo biflagelada y móvil con un alto contenido en clorofila. En condiciones de estrés como alta luminosidad y salinidad, altas temperaturas, o deficiencia de nitrógeno (Rioboo et al., 2011; Lei et al., 2012; Wang et al., 2012; Ambati et al., 2014; Zheng et al., 2016), *H. pluvialis* pierde sus flagelos y se convierte en una célula redondeada,

inmóvil que acumula abundante astaxantina en la región perinuclear del citoplasma de las aplanosporas (Santos y Mesquita, 1984).

La astaxantina (3,3'-dihidroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) es un carotenoide secundario, que tiene un amplio uso en la industria farmacéutica, cosmética (Camacho et al., 2013), y como suplemento para la dieta de salmónidos (Orosa et al., 2005). En los organismos fotosintéticos, los carotenoides, tienen funciones muy definidas en la propia fotosíntesis y en la protección de las estructuras fotosintéticas frente a la fotooxidación (Orosa, 2001). Algunos estudios sugieren que previenen ciertas enfermedades crónicas y cánceres (Römer y Fraser, 2005; Camacho et al., 2013) gracias a su función antioxidante, siendo *Haematococcus pluvialis* considerada la mejor fuente de astaxantina natural (Shah et al., 2016). En este trabajo se estudiará la potencial acumulación de astaxantina en las células *H. pluvialis* ante una condición de estrés antropogénica: la presencia del antibiótico oxitetraciclina.

Por último, hoy en día existe un consenso general sobre el desafío para la comunidad científica que supone el cambio climático (Schiedek et al., 2007). En particular, el incremento de temperatura de los ecosistemas acuáticos como consecuencia del calentamiento global del planeta puede dar lugar a complejas interacciones con la toxicidad de los contaminantes para los organismos que habitan en estos ambientes acuáticos (Patra et al., 2015). En base a esto, en el presente trabajo se ha estudiado también la posible interacción entre un incremento de la temperatura y la exposición a un contaminante emergente la oxitetraciclina, en la microalga *H. pluvialis*.

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es evaluar el posible efecto tóxico de un antibiótico la oxitetraciclina, sobre las células de la microalga dulceacuícola: *Haematococcus pluvialis*, mediante el análisis de parámetros ampliamente utilizados en estudios de toxicidad, como la tasa de crecimiento, la viabilidad celular y el contenido en clorofila *a*.

Además se estudiará el posible efecto del contaminante sobre la acumulación del carotenoide astaxantina y de lípidos neutros en las células expuestas y se procederá al estudio del porcentaje de células vegetativas y células en estado palmeloide.

Por último, también se evaluará, la existencia de una posible interacción entre un factor ambiental (temperatura) y la exposición a un antibiótico, la oxitetraciclina, sobre todos los parámetros citados anteriormente en *H. pluvialis*.

3. Material y métodos

3.1. Descripción de la especie

La especie utilizada en el presente trabajo es la microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis* Flotow (Figura 1). La cepa utilizada (CCAP 34/7) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos del laboratorio Windermere, de Cumbria (Reino Unido). *H. pluvialis* pertenece a la división *Chlorophyta*, al orden *Volvocales* y a la familia *Chlamydomonadaceae*.

El ciclo vital de *H. pluvialis* consiste en cuatro fases de morfologías celulares distinguibles: macrozooides (zoosporas), microzooides, células palmeloides y hematocistes (aplanosporas) (Hazen, 1899; Elliot, 1934). Los macrozooides, los microzooides y el estado palmeloide se considera generalmente como “fases vegetativas verdes” (Shah et al., 2016), mientras que, los hematocistes se consideran como fases de resistencia acumuladora de grandes cantidad de astaxantina.

Los macrozooides son células esféricas, elipsoidales o en forma de pera, cuyo tamaño es de 8 a 50 μm de diámetro (Figura 1A). Estas últimas presentan dos flagelos isocontos, los cuales emergen del extremo anterior. Además de un cloroplasto en forma de copa con numerosos pirenoides dispersos (Shah et al., 2016) y de numerosas vacuolas contráctiles dispersas por toda la superficie del protoplasto (Orosa, 2001). Estas células vegetativas flageladas de crecimiento rápido predominan bajo condiciones favorables, pudiendo dividirse, dando lugar entre 2 a 32 células hijas por mitosis (Wayama et al., 2013; Shah et al., 2016). Bajo condiciones ambientales desfavorables, los macrozooides comienzan a perder sus flagelos y aumentan su tamaño, dando lugar al estado palmeloide inmóvil y no flagelado (Figura 1B). Si el estrés persiste, se produce el cese de la división celular, transformándose las células palmeloides en “aplanosporas” asexuales o hematociste (Figura 1D). Dichas células se caracterizan por acumular grandes cantidades de carotenoides secundarios, particularmente la astaxantina, en gotitas lipídicas depositadas en el citoplasma, lo que da como resultado el color rojo brillante característico de estas células (Shah et al., 2016). Una vez que las condiciones ambientales o de cultivo vuelven a ser óptimas, los hematocistes germinan para formar zoosporas flageladas, conocidas como microzooides (tamaño $<10 \mu\text{m}$), cuya función es iniciar un nuevo ciclo vegetativo de crecimiento (Shah et al., 2016).

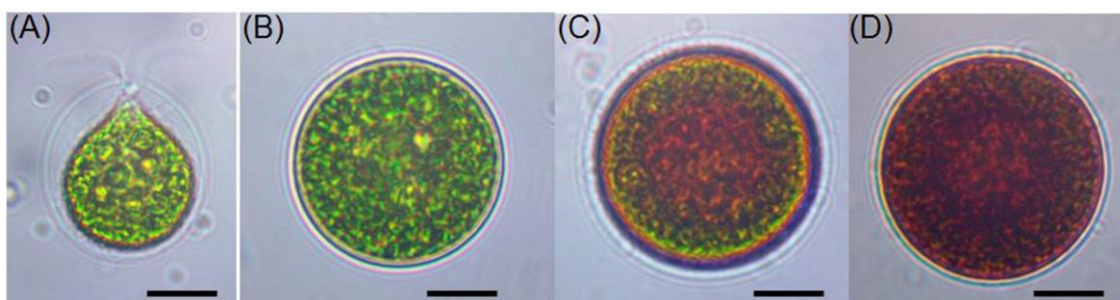


Figura 1: Los distintos estados del ciclo vital de *H. pluvialis*. (A) Célula móvil vegetativa; (B) Célula palmeloide; (C) Célula palmeloide en transición a hematociste, con acumulación de astaxantina; (D) Hematociste con acumulación de astaxantina. Barra de escala: 10 μm (Shah et al., 2016).

3.2. Cultivo microalgal

Los cultivos de *Haematococcus pluvialis* se realizaron en medio cultivo Bristol (Brown et al., 1967) esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min. A estos macronutrientes se le añade, en condiciones de asepsia, 3 mg l⁻¹ de una solución *stock* de oligoelementos (Fábregas et al., 1984), preparada con 0,5 g de Algal (Algal, Nutrición Avanzada S.A) en 100 ml de agua destilada que se mantiene a 4°C.

Todos los cultivos *stock* de *H. pluvialis* se realizaron en botellas Pyrex de 500 ml con aireación a flujo constante, insuflando aire atmosférico a través de un filtro Millipore FG de 0,20 µm a 10 l min⁻¹ mediante un turbosoplador. La cámara de cultivo presenta condiciones constantes de luz y de temperatura, con una iluminación de 80 µmol fotón m⁻² s⁻¹ proporcionada por tubos fluorescentes Philips TDL de 36W, aplicada con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura de una cámara se mantuvo a 18±1°C para uno de los cultivos y la de otra cámara de cultivo se mantuvo a 24±1°C para otros cultivos *stock*. Todas las experiencias, se iniciaron con una densidad celular de 2,5 × 10⁴ células ml⁻¹ a partir de un inóculo en fase exponencial.

3.3. Oxitetraciclina

La oxitetraciclina (OTC; 5-hydroxytetracycline) (Figura 2) es un antibiótico que pertenece a la familia de las tetraciclinas, producido por *Streptomyces rimosus* y que fue descubierto en 1948. Este antibiótico es de administración oral y parenteral. Las tetraciclinas son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis proteica evitando la unión del aminoacil-tRNA al dominio aceptor del ribosoma (sitio A) en la subunidad menor del ribosoma procariótico (30S) bloqueando por lo tanto el primer paso de la fase de elongación de manera irreversible (Chopra y Roberts, 2001).

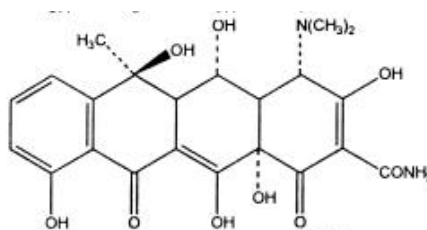


Figura 2: Estructura de la oxitetraciclina (Chopra y Roberts, 2001).

Estos antibióticos son agentes de amplio espectro, que exhiben actividad frente a una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas. El amplio espectro de acción de estos agentes y la ausencia de efectos secundarios mayores han conducido a su uso extensivo en terapias de infección humanas y animales. Además, en algunos países, como en los Estados Unidos, se añaden tetraciclinas a niveles subterapéuticos a piensos de animales para actuar como promotores del crecimiento (Chopra y Roberts, 2001).

En este estudio, se preparó una solución *stock* de este antibiótico a una concentración de 5 g l⁻¹, a partir de oxitetraciclina en polvo comercializada por *Sigma Aldrich*, con una pureza superior al 95%, y preparada en agua Milli-Q estéril.

3.4. Diseño experimental

Con el fin de evaluar los posibles efectos tóxicos de la oxitetraciclina en las células de *H. pluvialis*, se llevaron a cabo dos ensayos, ambos con una duración de 96 h. En ambos ensayos, las concentraciones de antibiótico ensayadas fueron las siguientes: 0,5 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹, 2,5 mg l⁻¹, 5 mg l⁻¹ y 10 mg l⁻¹, además de cultivos control sin oxitetraciclina.

Los distintos cultivos se realizaron por duplicado en tubos *Afora* con 75 ml de cultivo y se mantuvieron en las mismas condiciones de aireación e iluminación que las descritas para el cultivo *stock*. Con el fin, de estudiar la posible interacción entre los efectos del tóxico y un incremento de la temperatura, se llevaron a cabo dos ensayos en paralelo. En uno de ellos, los distintos cultivos se expusieron a una temperatura de 18±1°C, mientras que, en otro ensayo los cultivos se expusieron a una temperatura de 24±1°C, utilizando en este caso el cultivo *stock* previamente mantenido a esta temperatura. Tras 96 h de exposición, se llevaron a cabo los análisis de los diferentes parámetros.

3.5. Determinación de la densidad celular

La densidad celular se determina por recuento en cámara del número de células microalgales presentes en el cultivo, tanto a tiempo 0 como después de 96 h de exposición a la oxitetraciclina. Para eso, se retira un volumen conocido de cada tratamiento y se procede a su fijación con Lugol. A continuación, mediante una cámara Malassez se procede al recuento, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (NIKON Eclipse E400).

Una vez llevado a cabo el recuento, se determinan las tasas de crecimiento (μ) mediante la siguiente fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t - t_0)$$

donde μ representa la tasa de crecimiento en días⁻¹, N_t representa la densidad celular (cél ml⁻¹) tras 96 h de exposición al contaminante, N_0 la densidad celular a tiempo 0. t y t_0 representan el tiempo inicial y el tiempo final del periodo estudiado, ambos expresados en días.

3.6. Análisis de viabilidad celular

La viabilidad celular en los distintos cultivos de *Haematococcus pluvialis* se analiza mediante el ensayo de la hidrólisis enzimática llevado a cabo por esterazas inespecíficas del diacetato de fluoresceína (*fluorescein diacetate*, FDA) en las células microalgales.

El FDA (3,6-diacetil-fluoresceína) es un compuesto fluorogénico, constituido por una molécula central de fluoresceína unida a dos grupos acetatos. Se trata de un éster no polar, lipofílico y no fluorescente, el cual atraviesa libremente las membranas celulares hasta llegar al interior de las células. Si las células son viables, es decir, metabólicamente activas, las enzimas esterases inespecíficas del citoplasma hidrolizan los enlaces éster que unen la fluoresceína a los radicales acetatos. La fluoresceína, es una molécula polar e hidrofílica que emite fluorescencia en el espectro del verde (540 nm) cuando es excitada con luz azul (490 nm). En base a esto, la ausencia de fluorescencia verde propia de la fluoresceína puede relacionarse con la pérdida de viabilidad celular, permitiendo distinguir entre células con fluorescencia metabólicamente activas (FDA +, viables) y células no fluorescentes no activas metabólicamente (FDA -, no viables).

Para realizar el análisis, se retira $2,5 \times 10^4$ células ml^{-1} de cada tratamiento en 1 ml de tampón fosfato salino pH 7,4 (phosphate buffer saline; PBS) por duplicado, y se le añaden 5 μl de FDA, a partir de una solución de FDA de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en dimetilsulfóxido (dimethyl sulfoxide; DMSO). Cada tratamiento se incuba durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lleva a cabo la detección de la fluorescencia celular gracias a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado de una lámpara de mercurio, utilizando un filtro de excitación entre 450-490 nm de longitud de onda y un filtro barrera LP (Long-Pass) de emisión a 520 nm de longitud de onda. De cada tratamiento, se analizaron 50 células en cada portaobjetos y por duplicado.

El resultado se expresa como porcentaje (%) de células viables (FDA +) frente al total de células analizadas.

3.7. Cálculo de la Concentración Inhibitoria media (IC₅₀)

La relación entre la concentración nominal del tóxico a la cual un organismo está expuesto y la respuesta de los organismos frente a la acción del tóxico, está descrita por la relación concentración-respuesta (Murialdo, 2016). Esta última se representa en una gráfica, donde en el eje de las abscisas se sitúa la concentración de tóxico, en este caso la oxitetraciclina, y en el eje de las ordenadas se encuentra el porcentaje de inhibición. A partir de esta relación, se puede establecer la concentración inhibitoria media (Inhibitory Concentration 50; IC₅₀), que se define como la concentración de la sustancia que causa un 50% de inhibición de la variable estudiada con respecto al control (Murialdo, 2016). Los parámetros utilizados en este trabajo para el cálculo de esta variable fueron el crecimiento y la viabilidad.

El porcentaje de inhibición para estos parámetros se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{inhibición} = \left[\frac{\text{control} - \text{tratamiento}}{\text{control}} \right] \times 100.$$

La determinación de la IC₅₀ para cada tratamiento se llevó a cabo gracias al paquete estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0, aplicando en todos los casos un modelo sigmoidal de tres parámetros.

3.8. Determinación espectrofotométrica de la clorofila a

La cuantificación del contenido en clorofila *a* de las células de *H. pluvialis* de los distintos tratamientos incluyendo el control, se lleva a cabo centrifugando 10 ml de cada muestra durante 15 min a 4500 rpm en la centrifuga *Multifuge 3L-R Heraeus*. A continuación, se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 3 ml de acetona. Luego, se procede a la rotura de la pared celular mediante tres ciclos de 45 segundos de sonicación utilizando el *Sartorius stedim LABSONIC P*, manteniendo unas condiciones de baja temperatura. A continuación, se incuban las muestras durante 24 h a 4°C en oscuridad. Una vez transcurrido este periodo, se procede de nuevo a la centrifugación (4500 rpm, 15 min) del extracto celular con el fin de eliminar los restos celulares. Se retira el sobrenadante y se realizan lecturas de absorbancia a las longitudes de onda 661,6 y 644,8 en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A frente a un blanco de acetona. Por último, se procede al cálculo de la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g ml}^{-1}$) utilizando la ecuación de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a (C_a) = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

donde $A_{661,6}$ y $A_{644,8}$ representa las absorbancias medidas a una longitud de onda de 661,6 nm y 644,8 nm respectivamente.

3.9. Determinación espectrofotométrica de astaxantina

La cuantificación del contenido en astaxantina de las células de *H. pluvialis* de los distintos tratamientos incluyendo el control se lleva a cabo mediante un método espectrofotométrico (Boussiba et al., 1992). Se centrifugan 10 ml de cada tratamiento durante 15 min a 4 500 rpm en la centrífuga *Multifuge 3L-R Heraeus*. A continuación se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 500 μL de una solución de KOH al 5% (p/v) en 30% (v/v) de metanol. Tras una incubación de 10 minutos en un baño a 70°C con el fin de eliminar la clorofila, se procede a la centrifugación del mismo a 8 000 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, y el precipitado se resuspende en 10 μL de ácido acético glacial y en 500 μL de DMSO. Tras una nueva incubación de 10 minutos en un baño a 70°C, y una centrifugación (8 000 rpm, 5 min), se retira el sobrenadante con el fin de medir su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (A_{490}), para poder determinar la concentración de astaxantina (mg ml^{-1}) mediante la siguiente ecuación: $A_{st} = 4,5 \times A_{490}$ (Zheng et al., 2014; Cheng et al., 2016; Zheng et al., 2016).

3.10. Determinación de células palmeloides

El ciclo vital de *H. pluvialis* es complejo, debido a la existencia de distintas fases celulares.

Esta microalga, biflagelada y móvil en estado vegetativo, tiene una forma elíptica, aunque tiende a redondearse al final de la parte anterior y posterior. (Orosa, 2001) (Figura 3A). Bajo condiciones ambientales desfavorables, o

debido a diferentes tipos de estrés, las células de *H. pluvialis* pierden sus flagelos y forman células palmeloides redondeadas y de pared celular delgada, comenzando la acumulación del carotenoide astaxantina (Figura 3B). Si las condiciones de estrés continúan, estas palmelas se transforman en células de resistencia denominadas hemotocistes dado que acumulan grandes cantidades de astaxantina en su citoplasma, dando lugar a una coloración rojiza de la célula (Orosa, 2005). Para analizar el porcentaje de células palmeloides los cultivos se analizaron con un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse E400). De cada tratamiento, se analizaron 50 células en cada portaobjetos y por duplicado. El resultado se expresa como porcentaje de células palmeloides frente al total de células analizadas.

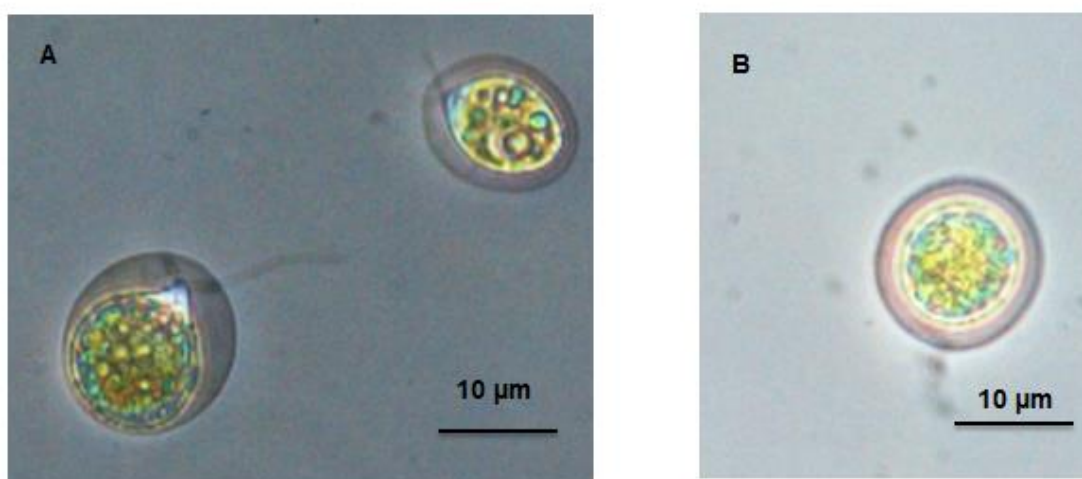


Figura 3: (A) Células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* Flotow. (B) Células palmeloides de *Haematococcus pluvialis* Flotow. Las imágenes fueron tomadas bajo un microscopio de contraste de fases (NIKON Eclipse E400), a un aumento de $\times 400$.

3.11. Determinación de células palmeloides ricas en lípidos neutros

El Rojo Nilo (9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona) es un fluorocromo que se utiliza para medir el contenido en lípidos neutros, que son generalmente triacilglicéridos, y ésteres de colesterol (Martin y Parton, 2006, Prado, 2007). Este fluorocromo es hidrofóbico y metacromático, con poca solubilidad y baja fluorescencia en el agua. Su emisión varía desde el rojo intenso hasta el oro amarillo fuerte (Rumin et al., 2015) debido a su sensibilidad ante el grado de hidrofobicidad de los lípidos (Díaz et al., 2008; Prado, 2010).

Para realizar el análisis, se preparan suspensiones celulares de $2,5 \times 10^4$ cél ml^{-1} en 1 ml de PBS pH 7,4 a partir de cada tratamiento por duplicado, y se incuba en presencia de 5 μl de Rojo Nilo (preparado a partir de una solución *stock* de 1 mg ml^{-1} en DMSO durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lleva a cabo la detección de las células palmeloides con emisión fluorescente naranja, denominadas Rojo Nilo +, gracias a un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado de una

lámpara de mercurio y bajo un filtro de excitación de 488nm y un filtro barrera LP (Long-Pass) de 625 nm de longitud de onda. De cada tratamiento, se analizaron 50 células en cada portaobjetos y por duplicado. El resultado se expresa como porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros frente al total de células palmeloides analizadas.

3.12. Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, y se analizaron estadísticamente los datos obtenidos mediante un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, utilizando el software IBM SPSS Statistics 21.0 y considerando como hipótesis nula que, la concentración de oxitetraciclina (OTC) no afecta a los parámetros de estudio en la microalga *H. pluvialis*. La prueba de Duncan de múltiples rangos se aplicó en todos los casos para comparar las distintas medias y generar subconjuntos de datos de elevada similitud y permitir analizar de qué forma afecta cada concentración de oxitetraciclina al parámetro estudiado. Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (sd).

Con el fin de estudiar la posible interacción entre la concentración de oxitetraciclina y la temperatura, se realizó por último un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, considerando como hipótesis nula que no existe interacción entre la concentración de oxitetraciclina y la temperatura sobre los parámetros de toxicidad de la OTC estudiados en *H. pluvialis*.

Las gráficas se realizaron con el paquete estadístico y de gráficas SigmaPlot 12.0, representando los resultados como medias acompañadas de sus respectivas desviaciones estándar.

4. Resultados y discusión

4.1. Tasa de crecimiento

El crecimiento es el parámetro más estudiado en los ensayos de toxicidad con microalgas (van Wezel y van Vlaardingen, 2004; Prado, 2012) ya que es un parámetro que refleja el estado fisiológico de las células (Geoffroy et al., 2007; Prado, 2012).

El crecimiento de *Haematococcus pluvialis* a una temperatura de 18°C se ve significativamente afectado a todas las concentraciones ensayadas (p -valor $< 0,05$; Tabla 1). En los cultivos expuestos a la concentración de oxitetraciclina más baja ensayada, el crecimiento mostró una inhibición de 8,68% con respecto a los valores observados en los cultivos control (Tabla 1). Esta inhibición fue además dependiente de la concentración. A la concentración más alta ensayada de oxitetraciclina, la tasa de crecimiento presentó valores de $0,35 \pm 0,03$ día⁻¹, representando una inhibición del 56,6% con respecto a los valores obtenidos en los cultivos sin contaminante. A la

temperatura de 24°C, el crecimiento se ve también afectado, siendo la inhibición estadísticamente significativa (p -valor $<0,05$) en este caso a partir de la concentración intermedia ensayada (2,5 mg l⁻¹) con un descenso en el crecimiento del 21,66% con respecto a los valores observados en los cultivos control (Tabla 1). Por lo tanto, estos datos indican la existencia de una interrelación entre la exposición al contaminante y la temperatura, la cual parece disminuir el efecto tóxico del mismo, tal y cómo se confirmó gracias a un análisis estadístico (ANOVA multifactorial, p -valor $<0,05$).

Este mismo efecto deletéreo de la OTC sobre el crecimiento de *H. pluvialis* se observó con otros contaminantes, como el selenio, un oligoelemento importante en sistemas biológicos y ambientales y cuyo rango entre deficiencia, suficiencia y toxicidad es pequeño, el cual en altas dosis redujo el crecimiento de esta microalga (Zheng et al., 2016). A su vez, este efecto inhibitorio sobre el crecimiento microalgal también se observó en otras microalgas como *Tetraselmis suecica* y *Tetraselmis chuii* donde después de 96 h de exposición a la oxitetraciclina, los cultivos mostraron tasas de crecimientos inferiores al control y de manera también dependiente de la concentración (Ferreira et al., 2007; Seoane et al., 2014).

Tabla 1: Tasas de crecimiento obtenidas en los cultivos de *Haematococcus pluvialis* tras 96 h de exposición a distintas concentraciones de oxitetraciclinas ensayadas, en función de dos temperaturas: 18 y 24°C.

| Oxitetraciclina (mg l ⁻¹) | Tasa de crecimiento 18°C (μ) (día ⁻¹) | Tasa de crecimiento 24°C (μ) (día ⁻¹) |
|--|--|--|
| control | 0,82 ± 0,04 ^a | 0,81±0,04 ^a |
| 0,5 | 0,75 ±0,02 ^{ab} | 0,74±0,04 ^{ab} |
| 1 | 0,55±0,03 ^{bc} | 0,66±0,09 ^{ab} |
| 2,5 | 0,52±0,06 ^c | 0,63±0,03 ^b |
| 5 | 0,34±0,12 ^c | 0,64±0,03 ^b |
| 10 | 0,35±0,03 ^c | 0,43±0,02 ^c |

Los datos representan los valores medios de cada tratamiento ± la desviación estándar, y las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor $< 0,05$).

Por otra parte, a partir de la representación de curvas de concentración-respuesta se obtuvo la concentración de oxitetraciclina que produjo un 50% de inhibición en la tasa de crecimiento (IC₅₀) en *H. pluvialis* tras 96 h de exposición a dicho contaminante, y para las dos temperaturas experimentales ensayadas. El valor de IC₅₀ obtenido, fue inferior en los cultivos mantenidos a 18°C que el valor obtenido en los cultivos expuestos a 24°C de temperatura (3,42 y 6,54 mg l⁻¹, respectivamente) (Tabla 2). Estos, valores se encuentran en los rangos de concentraciones inhibitorias medias publicadas para otras especies de microalgas, como *Tetraselmis chuii* con valores de IC₅₀ a las 96 h de cultivo de 11,18 mg l⁻¹ (Ferreira et al., 2007), o bien en *Raphidocelis subcapitata* y en el protista unicelular *Rhodomonas salina* cuyos respectivos valores de IC₅₀ después de 72h fueron 1,6 y 4,5 mg l⁻¹ (Lützhøft et al., 1998). El valor más alto registrado de IC₅₀ para la OTC hasta la fecha es el descrito en cultivos de *Tetraselmis suecica* tras 96 h de exposición, 17,25 mg l⁻¹ (Seoane et al., 2014). A la vista de los resultados, *H. pluvialis* es una especie más resistente que *Raphidocelis subcapitata* pero más sensible que *Tetraselmis chuii* y *Tetraselmis suecica* al antibiótico oxitetraciclina. Sin embargo, las diferencias

que se observan entre los distintos valores de IC₅₀ obtenidos también pueden ser causadas por la utilización de medios de ensayos distintos, ya que, los iones di- y trivalentes en medios de ensayos pueden quelar este antibiótico OTC, reduciendo, por lo tanto su biodisponibilidad (Halling-sØrensen et al., 2002, Ferreira et al., 2007).

Tabla 2: Concentración inhibitoria media del antibiótico OTC sobre el crecimiento y la viabilidad celular de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición para las dos temperaturas ensayadas.

| | IC ₅₀ Crecimiento (mg l ⁻¹) | IC ₅₀ viabilidad celular (mg l ⁻¹) |
|------|---|--|
| 18°C | 3,42 | 1,02 |
| 24°C | 6,54 | 2,49 |

4.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular en los distintos cultivos de *Haematococcus pluvialis* se analiza mediante el estudio de la hidrólisis enzimática llevado a cabo por esterases inespecíficas del diacetato de fluoresceína (FDA) en las células microalgales.

El porcentaje de viabilidad celular en los cultivos de *H. pluvialis* se ve significativamente afectado por la exposición a diferentes concentraciones de OTC y a ambas temperaturas ensayadas (p-valor<0,05) (Tabla 3). A 18°C de temperatura, la viabilidad se vio afectada significativamente a una concentración igual o superior a 1 mg l⁻¹, presentando estos cultivos una reducción en el porcentaje de células viables del 56,43±29,3% con respecto al cultivo control, y acentuándose, a medida que aumentó la concentración de contaminante ensayada (Tabla 3). A 24°C, la viabilidad celular se vio afectada a una concentración igual o superior de contaminante de 2,5 mg l⁻¹, reduciéndose dicho parámetro a valores de 54,17±3,79% a dicha concentración con respecto al control (Tabla 3). Esto revela la existencia de una posible interacción entre la temperatura y la exposición al contaminante por lo que se realizó un análisis estadístico (ANOVA multifactorial, p-valor<0,05). Dicho análisis confirmó la significación de dicha interacción, de forma que el incremento de temperatura parece reducir el efecto tóxico del contaminante, observándose valores de viabilidad más altos en los cultivos expuestos a 24°C.

Esta pérdida de viabilidad directamente proporcional a la concentración de tóxico no se ha observado en todas las especies ensayadas, como por ejemplo en *Tetraselmis suecica*, donde la viabilidad no se ve afectada por los antibióticos, permaneciendo cerca de 100% (Seoane et al., 2014). Sin embargo, en otra microalga dulceacuícola, *Chlamydomonas reinhardtii*, también se ha observado una pérdida de viabilidad directamente proporcional a la concentración de contaminante tras 24 h de exposición a la oxitetraciclina (Conde, 2016).

Tabla 3: Viabilidad celular en los cultivos de *H. pluvialis* tras 96 horas de exposición a las distintas concentraciones de oxitetraciclina, expresadas como porcentaje sobre el total de células analizadas, en función de dos temperaturas: 18 y 24°C.

| Oxitetraciclina (mg l ⁻¹) | % viabilidad 18°C (día ⁻¹) | % viabilidad 24°C (día ⁻¹) |
|--|---|---|
| control | 98±2,83 ^a | 82,65±6,86 ^{ab} |
| 0,5 | 88±16,97 ^a | 93,91±2,71 ^a |
| 1 | 56,43±29,3 ^{ab} | 70,61±10,82 ^{bc} |
| 2,5 | 6,25±0,31 ^{ab} | 54,17±3,79 ^{cd} |
| 5 | 3,33±0,27 ^b | 39,05±1,34 ^{de} |
| 10 | 6±2,83 ^b | 18,13±0,88 ^e |

Los datos representan los valores medios de cada tratamiento ± la desviación estándar, y las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor<0,05).

Por otra parte, se obtuvieron los valores de IC₅₀ para la viabilidad celular de los cultivos de *H. pluvialis* expuestos a diferentes concentraciones de OTC y a las dos temperaturas ensayadas, siendo respectivamente 1,02 mg l⁻¹ a 18°C y 2,49 mg l⁻¹ a 24°C (Tabla 2). Al comparar estos valores, con los valores IC₅₀ de crecimiento (respectivamente 3,42 y 6,54 mg l⁻¹) (Tabla 2), se puede observar que el parámetro de viabilidad celular es el más sensible de ambos frente a la toxicidad del antibiótico, presentando valores inferiores a las dos temperaturas ensayadas. Tanto en el parámetro de crecimiento como en el de viabilidad celular, los valores de IC₅₀ obtenidos son superiores cuando los cultivos se llevaron a cabo a la temperatura de 24°C frente a los valores obtenidos tras el tratamiento de los cultivos microalgales a 18°C (Tabla 3). Este hecho indicaría que el incremento de temperatura disminuye la toxicidad ejercida por el antibiótico sobre el crecimiento y la viabilidad celular de la microalga *H. pluvialis*.

4.3. Contenido celular en clorofila a

Los resultados del análisis por espectrofotometría de clorofila a (Figura 4) muestran que el contenido celular en este pigmento fotosintético se ve afectado significativamente (p-valor<0,05) por la exposición al contaminante, reduciéndose a medida que se aumenta la concentración de oxitetraciclina en el medio. A 18°C, las células de *H. pluvialis* se ven afectadas significativamente a partir de 5 mg l⁻¹ de OTC, concentración donde el contenido de clorofila presenta un valor de clorofila de 0,64 pg cél⁻¹ frente al contenido en clorofila a en los cultivos control (5,57 pg cél⁻¹). En los cultivos expuestos a 24°C, las células se ven afectadas significativamente a partir de 2,5 mg l⁻¹ con una concentración de clorofila a de 3,77 pg cél⁻¹ frente a los valores del control (6,49 pg cél⁻¹).

Los resultados obtenidos reflejan que el contenido celular de clorofila a fue siempre inferior en el ensayo a 18°C con respecto a los valores observados en el ensayo a 24°C para todas las concentraciones de OTC ensayadas (Figura 4). Este hecho sugiere una interacción entre la concentración de oxitetraciclina y la temperatura para este parámetro, como así se constatan los análisis estadísticos (ANOVA multifactorial, p-valor<0,05).

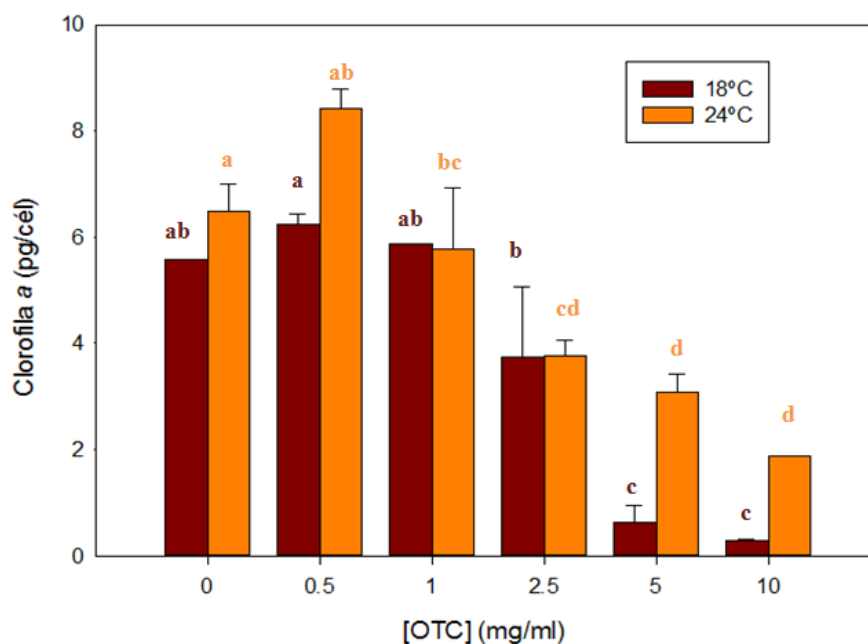


Figura 4: Contenido celular en clorofila *a*, en los cultivos de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición al antibiótico oxitetraciclina a 18 y 24°C de temperatura. Los datos representan los valores medios de clorofila *a* de cada tratamiento \pm desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor $<0,05$).

Fenómenos similares de disminución del contenido en clorofila, han sido descritos también en la microalga *H. pluvialis*, organismo de estudio del presente trabajo, en presencia de otros contaminantes como el selenio (Zheng et al., 2016) o el paraquat (Rioboo et al., 2011).

Además, tanto en los ensayos llevados a cabo a 18°C como a 24°C de temperatura, se produce un leve incremento en el contenido de clorofila *a* en las células expuestas a la concentración menor ensayada, si bien dicho incremento no es estadísticamente significativo (p -valor $>0,05$). Este hecho puede deberse un fenómeno de hormesis. La hormesis es un término que se refiere a un proceso en el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o un factor ambiental que daña a dosis más alta induce un efecto adaptativo sobre la célula u organismo (Mattson, 2007).

Cuando comparamos los resultados de este estudio con otros trabajos publicados, se observa que en la microalga marina *Tetraselmis suecica* el contenido de clorofila *a* también se vio afectada por la presencia del antibiótico oxitetraciclina, reduciéndose significativamente su contenido en comparación con el control, a excepción de la concentración más baja ensayada, que en este caso fue de 2,5 mg l⁻¹. En los cultivos expuestos a dicha concentración de OTC, el contenido celular en clorofila *a* de *Tetraselmis suecica* también mostró un incremento excediendo los valores del control, apoyando la hipótesis de hormesis como respuesta al efecto tóxico a bajas concentraciones de este antibiótico estimulando la síntesis de clorofila *a* (Seoane et al., 2014).

4.4. Contenido celular en astaxantina

El contenido celular en astaxantina de *H. pluvialis*, no se ve afectado de manera significativa (p -valor $<0,05$) por la exposición al antibiótico OTC a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 5). Los cultivos expuestos a OTC a 18°C de temperatura mostraron un incremento en la acumulación de astaxantina, de forma que el valor del control ($6,32\pm 0,00$ pg cél⁻¹) fue inferior al valor de contenido en astaxantina para la concentración más alta ensayada de OTC ($10,25\pm 3,94$ pg cél⁻¹ a 10 mg l⁻¹) (Figura 5). Por el contrario, los cultivos expuestos a OTC a 24°C de temperatura sufrieron una reducción en la acumulación celular de astaxantina, de forma que el valor del control ($6,85\pm 1,12$ pg cél⁻¹) fue mayor que el valor de la concentración más alta ensayada de OTC, $4,03\pm 1,34$ pg cél⁻¹ a 10 mg l⁻¹. Los análisis estadísticos (ANOVA multifactorial) indicaron la existencia de una interacción significativa (p -valor $<0,05$) entre la temperatura y la exposición a OTC en el contenido celular de astaxantina en los cultivos de *H. pluvialis*.

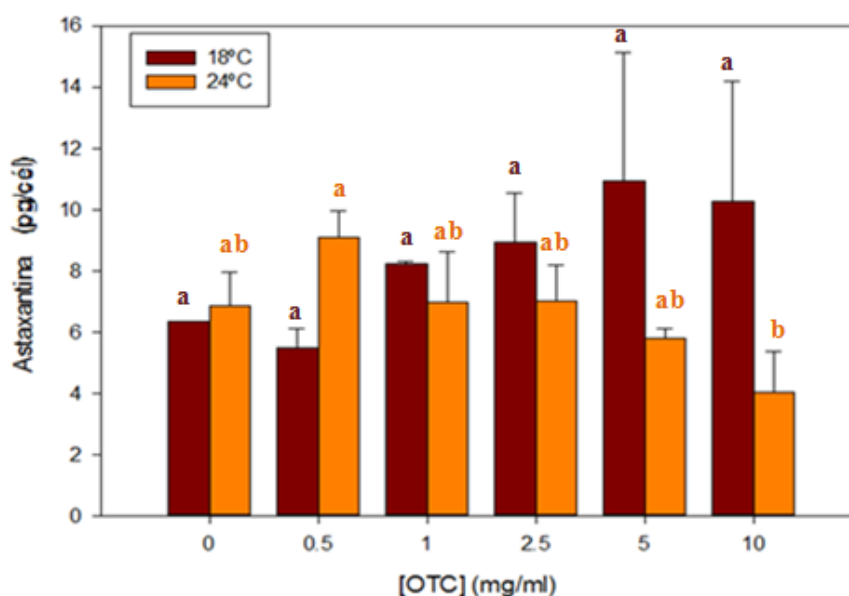


Figura 5: Contenido celular en astaxantina en los cultivos de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición al antibiótico oxitetraciclina a 18 y 24°C. Los datos corresponden a los valores medios de astaxantina en cada tratamiento \pm desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamiento (p -valor $< 0,05$).

Al comparar los resultados del presente estudio con otros trabajos también con esta especie microalgal, se puede observar un patrón de respuesta común en cuanto a la acumulación de astaxantina en los cultivos expuestos a OTC a 18°C de temperatura. Esta respuesta se observó en *H. pluvialis* en presencia de otros contaminantes como el selenio, donde tras diez días de exposición se observó una acumulación de astaxantina de 5,2, 6, y 6,6 veces el valor de registrado en los cultivos control frente a 13, 23, 33 mg l⁻¹ de selenio (Zheng et al., 2016). En presencia del herbicida paraquat, la exposición a este contaminante provocó un aumento en la cantidad celular de astaxantina, registrándose los valores máximo de este pigmento tras 12h de exposición a 300 y 600 nM de este herbicida (Rioboo et al., 2011). El aumento de la cantidad de astaxantina puede ser debido al papel antioxidante descrito para este pigmento, lo que explicaría su acumulación en *H. pluvialis* para hacer frente al

estrés oxidativo y para eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la toxicidad de la OTC (Zheng et al., 2016). Esto viene verificado por el hecho de que el estrés oxidativo debido al prooxidante paraquat sólo se produjo en las células ricas en clorofila pero no en las células ricas en astaxantina de otra especie microalgal, *Chlorella vulgaris* (Rioboo et al., 2011).

4.5. Porcentaje de células palmeloides.

La microalga dulceacuícola *Haematococcus pluvialis*, como se ha dicho anteriormente, presenta varios estados a lo largo de su complejo ciclo vital, dentro del cual destacan células vegetativas móviles y flageladas ricas en clorofila (Figura 6A), y células inmóviles, no flageladas, redondeadas (Figura 6B), que se forman cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables, o debido a un estrés ambiental (Orosa et al.; 2005), cuya forma final es la de hematocistes o células de resistencia.

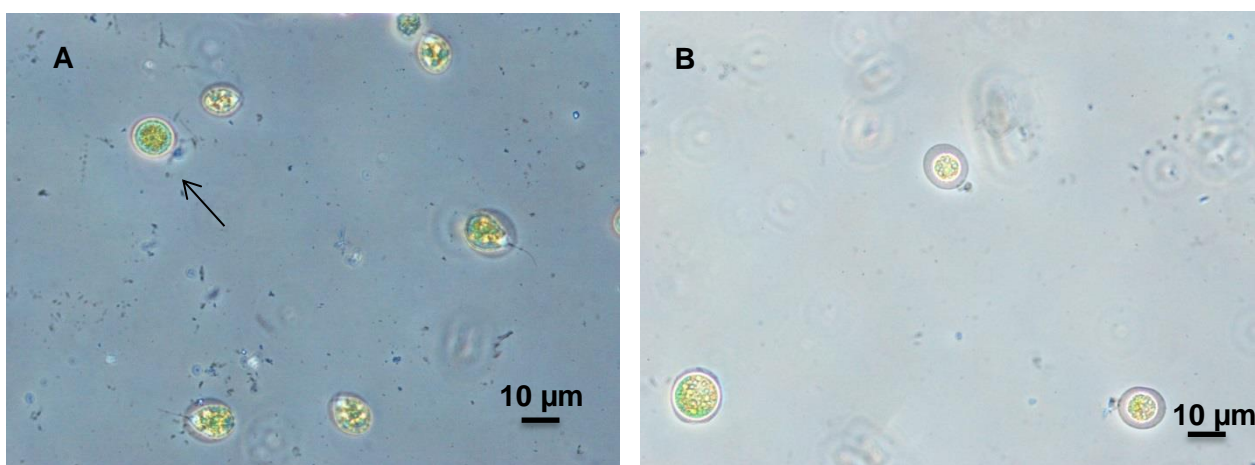


Figura 6: (A) Cultivo control de *Haematococcus pluvialis* tras 96 h de cultivo. En esta imagen se observa la presencia de células flageladas vegetativas y de una célula palmeloide indicada por una flecha. (B) Cultivo expuesto a una concentración de 5 mg.ml⁻¹ de OTC tras 96 h de experimento. En esta imagen se observa la presencia de células palmeloides. Las imágenes fueron tomadas bajo un microscopio de contraste de fases (NIKON Eclipse E400) a un aumento de x400.

A lo largo de las 96 h de ensayo sólo se observaron células flageladas y células palmeloides que se consideran una repuesta a la toxicidad ejercida por el contaminante. En este ensayo, sin embargo, no se llegó a observar la formación de células en forma de ciste, probablemente debido a la falta de tiempo de exposición al contaminante (Figura 6). En base a esto, en el presente trabajo se analizó el porcentaje de células palmeloides frente al total de células analizadas mediante microscopía óptica (Figura 6). Los resultados obtenidos reflejan que el porcentaje de células en estado palmeloide aumenta significativamente (p -valor $<0,05$) a medida que se aumenta la concentración de

contaminante ensayada (Tabla 4). En los ensayos llevados a cabo a 18°C de temperatura, estas diferencias significativas se observan a partir de la concentración 2,5 mg l⁻¹ de oxitetraciclina, donde esta subpoblación representó el 59,18±0,29% del total de células presentes en el cultivo, mientras que en los ensayos llevados a cabo a 24°C las diferencias significativas se observaron ya a la concentración menor ensayada 0,5 mg l⁻¹, donde esta subpoblación representó el 79,31±7,7% del total de células presentes en el cultivo.

Tabla 4: Porcentaje de células palmeloides en los cultivos de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición a distintas concentraciones de oxitetraciclinas, en función de dos temperaturas: 18 y 24°C.

| Oxitetraciclina (mg l ⁻¹) | % células palmeloides 18°C | % células palmeloides 24°C |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Control | 15,97±2,37 ^a | 45,86±3,58 ^a |
| 0,5 | 31,03±1,55 ^a | 79,31±7,7 ^b |
| 1 | 32,26±2,58 ^a | 90±2,99 ^{bc} |
| 2,5 | 59,18±0,29 ^b | 90,56±5,49 ^{bc} |
| 5 | 84,97±4,94 ^b | 90,72±4,55 ^{bc} |
| 10 | 63,61±10,41 ^c | 96,15±4,81 ^c |

Los datos representa los valores medios de cada tratamiento ± desviación estándar, y las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor< 0,05).

A la vista de los resultados, se observa que en el ensayo realizado a 18°C, a partir de la concentración intermedia ensayada (2,5 mg l⁻¹) y para concentraciones superiores (5 y 10 mg l⁻¹), el porcentaje de células palmeloides representa la mayoría de las células en estos cultivos (59,18±0,29%, 84,97±4,94% y 63,61±10,41%, respectivamente). Este mismo hecho se ha descrito tras la exposición al paraquat, donde tras 12 h de exposición a las concentraciones intermedias y más altas ensayadas (300 y 600 nM), el porcentaje de células palmeloides aumenta continuamente hasta convertirse en la subpoblación mayoritaria (Rioboo et al., 2011).

Al comparar los resultados de los ensayos a 18°C y a 24°C de temperatura, se observa que a mayor temperatura, el porcentaje de células palmeloides es siempre mayor, siendo más elevado incluso en los cultivos control (45,86±3,58% frente a 15,97±2,37%). Tras realizar los análisis estadísticos se constató la interacción significativa (ANOVA multifactorial, p-valor<0,05) existente entre la temperatura y la exposición al contaminante, aumentando drásticamente el porcentaje de células palmeloides como consecuencia de la exposición de *H. pluvialis* a ambos factores. Teniendo en cuenta, que la astaxantina protege frente a la peroxidación de los lípidos, al daño del DNA y al efecto de la luz ultravioleta (Savoure et al., 1995; Rioboo et al., 2011), esto puede indicar que los cultivos sometidos a una temperatura superior (24°C) están mejor adaptados para resistir a un nuevo estrés y, en particular al estrés oxidativo que podría generar el antibiótico ensayo, presentando ya inicialmente una mayor proporción de células palmeloides como respuesta al estrés que el incremento de temperatura parece provocar en los cultivos de esta especie microalgal. Esta observación puede relacionarse

por lo tanto con los valores de crecimiento y de viabilidad celular (Tabla 1 y 2, respectivamente) que presentan valores superiores a 24°C que a 18°C tanto para el control como para las concentraciones de OTC ensayadas. El mismo fenómeno se observa en los valores de IC₅₀ tanto de crecimiento como de viabilidad celular, los cuales fueron mayores a 24°C que a 18°C de temperatura (Tabla 3).

4.6. Porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros

La acumulación de lípidos neutros se ha considerado un biomarcador que responde a la generación de un estrés oxidativo, y se ha observado que, en un contexto de contaminación ambiental ha resultado ser un buen índice del estrés celular experimentado por un organismo (Prado, 2010). Concretamente, el incremento en la proporción de lípidos neutros ya se ha descrito como respuesta a situaciones de estrés en microalgas (Guckert y cooksey, 1990; Prado, 2010). En el trabajo de Boussiba y Vonshak (1991), se ha descrito que el aumento en el contenido de lípidos también se correlaciona con la acumulación de pigmento, en este caso la astaxantina (Boussiba S., 2000).

El porcentaje de células ricas en lípidos neutros se analizó gracias al fluorocromo Rojo Nilo (9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona), cuya emisión varía desde el rojo intenso hasta el oro amarillo fuerte (Rumin et al., 2015) debido a su sensibilidad ante el grado de hidrofobicidad de los lípidos (Díaz et al., 2008; Prado, 2010). De este modo, mediante microscopia fluorescencia, se procedió al recuento de las células palmeloides Rojo Nilo +, frente al total de células palmeloides (Figura 7).

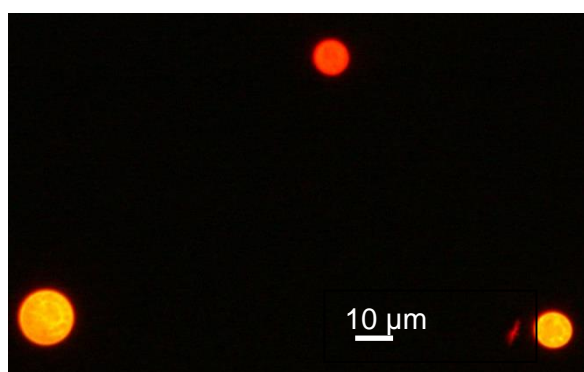


Figura 7: Células palmeloides de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición a 5 mg ml⁻¹ de OTC, analizadas tras incubación con el fluorocromo Rojo Nilo. En esta imagen podemos ver dos células ricas en lípidos neutros Rojo Nilo + (células naranja) y una célula Rojo Nilo - (célula roja). Imagen tomada bajo un microscopio de contraste de fases (NIKON Eclipse E400) de fluorescencia a un aumento de x400.

En el trabajo presente, el porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros aumenta de forma significativa a 18°C (p-valor<0,05) a partir de la exposición a una concentración igual o superior a 1 mg ml⁻¹ de OTC (Tabla 5). En los cultivos tratados a 24°C de temperatura, el aumento del porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros aumenta de forma significativa (p-valor<0,05) a partir de una concentración de 5 mg ml⁻¹ de OTC. En otro estudio

con la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* expuesta al contaminante paraquat se ha descrito del mismo modo un aumento significativo del contenido de lípidos neutros en las células a partir de un concentración de paraquat superior o igual a 0,1 μM (Prado, 2010).

Tabla 5: Porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros, en los cultivos de *H. pluvialis* tras 96 h de exposición a distintas concentraciones de oxitetraciclina, en función de dos temperaturas, 18°C y 24°C.

| Oxitetraciclina (mg l ⁻¹) | % células ricas en lípidos neutros (18°C) | % células ricas en lípidos neutros (24°C) |
|--|--|--|
| Control | 20±0 ^a | 10±14,14 ^a |
| 0,5 | 24,45±3,14 ^{ab} | 19,02±8,46 ^{ab} |
| 1 | 32,5±3,54 ^{bc} | 27,5±3,54 ^{ab} |
| 2,5 | 32,94±1,92 ^{bc} | 37,74±10,94 ^{ab} |
| 5 | 35,58±1,11 ^c | 47,7±1,56 ^b |
| 10 | 46,21±2,55 ^d | 48,17±0,23 ^b |

Los datos representa los valores medios de cada tratamiento \pm desviación estándar, y las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor< 0,05).

Si se compara los datos del porcentaje de células palmeloides (Tabla 4) con el porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros (Tabla 5), se observa que hay una relación entre ambos parámetros incrementándose a medida que se aumenta la concentración de contaminante ensayada en el medio. Por lo tanto, esto indica que la acumulación de lípidos neutros en *H. pluvialis* puede estar relacionada con cambios morfológicos observados en los cultivos expuestos al contaminante (Figura 7) y que dichos cambios se deben a los descritos en esta especie durante el encistamiento junto con la acumulación del pigmento astaxantina (Figura 7, Tabla 5) (Camacho et al, 2013).

Por último, para comprobar la posible existencia de una interacción entre la temperatura y la concentración de oxitetraciclina, se realizó un análisis estadístico (ANOVA multifactorial), el cual demostró que no existe una interacción significativa (p-valor<0,05) entre ambos parámetros sobre el porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros.

5. Conclusiones/ Conclusions

La exposición al antibiótico OTC durante 96 h provocó una inhibición significativa (p-valor<0,05) de la tasa de crecimiento, de la viabilidad celular y del contenido en clorofila *a* en los cultivos de *Haematococcus pluvialis* tratados a las dos temperaturas ensayadas, 18°C y 24°C. Dicha inhibición fue dependiente de concentración.

En cuanto a las IC₅₀, se observó que tanto para la tasa de crecimiento como para la viabilidad celular, los valores fueron más elevados en los cultivos expuestos a 24°C de temperatura que en los cultivos expuestos a 18°C de

temperatura. Por lo tanto, este hecho parece sugerir que el incremento de la temperatura disminuye los efectos tóxicos de la OTC.

En los cultivos tratados a 18°C de temperatura durante 96 h, la exposición al antibiótico indujo de manera no significativa la producción del pigmento astaxantina (p-valor>0,05), incrementándose de manera significativa el porcentaje de células palmeloides (p-valor<0,05) al igual que el porcentaje de células palmeloides ricas en lípidos neutros (p-valor<0,05) en estos cultivos. Este hecho puede deberse a los cambios morfológicos descritos en las células de *H. pluvialis* ante la presencia de una situación de estrés. La exposición a OTC provoca una disminución del contenido celular en clorofila *a* mientras promueve la formación de astaxantina, pasando las células de un estado móvil flagelado, a un estado inmóvil no flagelado de resistencia con acumulación de astaxantina.

En los ensayos realizados a 24°C de temperatura se observa una interacción entre el incremento de la temperatura y la exposición a OTC, con una reducción en la producción de astaxantina (p-valor>0,05), un aumento en las células palmeloides (p-valor<0,05) y un aumento en las células palmeloides ricas en lípidos neutros (p-valor<0,05). Paralelamente, se observó también, la presencia de una mayor proporción inicial de células palmeloides en los cultivos expuestos a 24°C de temperatura, lo que explicaría que estos cultivos estén mejor adaptados para hacer frente al efecto tóxico provocado por la exposición al antibiótico OTC y los mayores valores de IC₅₀ para el crecimiento y la viabilidad celular registrados en los cultivos mantenidos a 24°C con respecto a los cultivos a 18°C.

Exposure to the OTC antibiotic for 96 h resulted in significant (p-value<0.05) inhibition of growth rate, cell viability, and chlorophyll *a* content in *Haematococcus pluvialis* cultures treated at the two temperatures tested, 18°C and 24°C. This inhibition was concentration dependent.

Regarding the IC₅₀, it was observed that for both the growth rate and the cell viability, the values were higher in the cultures exposed to 24°C temperature than for the cultures exposed to 18°C temperature. Therefore, this fact seems to suggest that the increase in temperature decreases the toxic effects of OTC.

In the treated cultures at 18°C for 96 h, exposure to the antibiotic significantly induced the production of the pigment astaxanthin (p-value>0.05), significantly increasing the percentage of palmeloid cells (p-value<0.05) as well as the percentage of neutral lipid rich palm-cell (p-value<0.05) in these cultures. This fact may be due to the morphological changes described in *H. pluvialis* cells in the presence of a stress situation. Exposure to OTC causes a decrease in cellular content in chlorophyll *a* while promoting the formation of astaxanthin, passing the cells from a flagellated motile state to a non-flagellated stationary resistance state with astaxanthin accumulation.

In the tests carried out at 24°C, an interaction between temperature increase and exposure to OTC was observed, with a reduction in astaxanthin production (p-value>0.05), an increase in palmeloid cells (p-value<0.05) and an increase in palmoid cells rich in neutral lipids (p-value<0.05). At the same time, the presence of a higher initial proportion of palmeloid cells was observed in the cultures exposed to 24°C temperature, which would explain that these cultures are better adapted to cope with the toxic effect caused by exposure to the OTC antibiotic and the greater IC₅₀ values for cell growth and viability recorded in cultures maintained at 24°C with respect to cultures at 18°C.

6. Bibliografía.

- Ambati, R.R., Phang, S.-M., Ravi, S., Aswathanarayana, R.G. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Mar Drugs*. 12: 128–152.
- Boussiba, S., Fan, L., Vonshak, A. (1992). Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods enzymol.* 213: 386-391.
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiología Plantarum*. 108: 111-117.
- Boussiba S, Vonshak A (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiology*. 32: 1077–1082.
- Brown, T. E., Richardson, F. L. & Vaughn, M. L. (1967). Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). *Phycologia*. 6: 167-184.
- Camacho Kurmen, J.E., González, G., Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. Nova-publicación Científica en ciencias biomédicas. ISSN: 1794-2470- Vol. 11.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P., Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research*. 35: 69-76.
- Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J., Cen, K. (2016). Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresource Technology*. 204: 49–54.
- Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65: 232-260.
- Conde, K. (2016). Efecto del antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Trabajo de Fin de Grado. Universidade da Coruña.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*. 42: 207-215.
- Ferreira, C.S.G., Nunes, B. Á., Henriques-Almeida, J. M., Guilhermino, L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 452-458.

Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H. (2004) Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. 57: 1733-1738.

Elliot A. M. (1934). Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Archiv für Protistenkunde*. 82: 250–272.

Geoffroy, L. Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. y Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 83: 149-158.

Guckert, J.B. y Cooksey, K.E. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell-cycle inhibition. *Journal of Phycology*. 26: 72-79.

Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund J. (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 42: 263–271.

Hazen T. E. (1899). The life history of *Sphaerella lacustris*. *Memoirs Torrey Botanical Club*. 6: 211–244.

Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L., Wang, J. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*. 5: 18.

Lützhof, H.C., Halling-Sorensen, B., Jorgensen, S.E. (1998). Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36: 1-6.

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of hazardous materials*. 301: 197-205.

Mattson, M.P., (2007) Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*. 7:1-7.

Murialdo, R. (2016). *Ecología, ecosistemas, ecotoxicología: conceptos fundamentales*. Editorial Brujas Argentina Nueva Córdoba.

Naidu, R., Jit, J., Kennedy, B., Arias, V., 2016. Emerging contaminant uncertainties and policy: The chicken or the egg conundrum. *Chemosphere*. 154: 385–390.

Orosa García, M. (2001). Estudio de la producción de astaxantina y otros carotenoides secundarios en microalgas dulceacuícolas, con especial atención

a *Haematococcus pluvialis* Flotow. (Memoria de tesis doctoral). Universidade da Coruña.

Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J. (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 96: 373-378.

Patra, R W., Chapman J.C., Lim, R.P., Gehrke, P.C., Sunderam, R. M. (2015). Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environmental Toxicology Chemistry*. 34:1809–17.

Prado Lodeiro, R., (2010). Citotoxicidad ejercida por el herbicida bupirílico paraquat sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. (Tesis doctoral) Universidade da Coruña.

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-Bregua, P., Cid, A. (2012). Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology*. 21: 409-420.

Rioboo, C., González-Barreiro, Ó., Abalde, J., Cid, Á. (2011). Flow cytometric analysis of the encystment process induced by paraquat exposure in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *European Journal of Phycology*. Vol. 46, Iss. 2: 89-97.

Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, Á. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquatic toxicology*. 83: 247-253.

Römer S, Fraser P. (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*. 221: 305–308.

Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O, Cadoret, J-P., Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for biofuels*. 8:42.

Santaefemia, S., Torres, E., Mera, R., Abalde, J. (2016) Bioremediation of oxytetracycline in seawater by living and dead biomass of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Hazardous Materials*. Vol 320: 315-325.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effect of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere*. 65: 725-759.

Savoure, N, Briand, G, Amory-Touz, MC, Combre, A, Maudet, M and Nicol, M. (1995). Vitamin A status and metabolism of cutaneous polyamines in the hairless mouse after UV irradiation: action of beta-carotene and astaxanthin. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 65: 79–86.

Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R-W. (2007). Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin*. 54: 1845–1856

Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, E. (2017). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere*. 171: 339-347.

Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Marine Environmental Research*. 101: 1-7.

Shah, R.M., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M. (2016). Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*. 7:531.

Shao, Z.J. (2001) Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities, *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 50: 229-243.

Ueno, R., Kinoshita, A., Wakabayashi, J. (2004) Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in ceel and its fate in a closed aquatic environment. *Aquaculture*. 235: 53-63.

Van Wexel, A. P. y van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*. 66:427-444.

Wang, C., Hu, Z., Zhao, C., Mao, X. (2012). Isolation of the β -carotene ketolase gene promoter from *Haematococcus pluvialis* and expression of *ble* in transgenic *Chlamydomonas*. *Journal of Applied Phycology*. 24:1303–1310.

Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plos one*. 8: e53618.

Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., Hu, Z. (2016). Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin. *Aquatic Toxicology*. 189: 21-27.

Zheng, K., Wang, C., Xiao, M., Chen, J., Li, J., Hu, Z.(2014). Expression of *bkt* and *bch* genes from *Haematococcus pluvialis* in transgenic *Chlamydomonas*. *Science China Life Science*. 57: 1028–1033.

7. Abreviaturas

DMSO: dimethylsulfoxide

FDA: fluorescein diacetate

IC₅₀: concentración inhibitoria media

OTC: oxitetraciclina

PBS: phosphate buffer saline

ROS: reactive oxygen species

8. Índice de figuras

| | |
|-----------------|----|
| FIGURA 1:..... | 9 |
| FIGURA 2:..... | 10 |
| FIGURA 3:..... | 14 |
| FIGURA 4:..... | 19 |
| FIGURA 5:..... | 20 |
| FIGURA 6: | 21 |
| FIGURA 7:..... | 23 |

9. Índice de tablas

| | |
|----------------|----|
| Tabla 1: | 16 |
| Tabla 2: | 17 |
| Tabla 3: | 18 |
| Tabla 4: | 22 |
| Tabla 5: | 24 |