

EL MICROBIOMA MARINO Y SU RELACIÓN CON LA SALUD DEL PLANETA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO

Dra. Silvia Pajares Moreno

(spajares@cmarl.unam.mx)

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM)

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA201617



ÍNDICE

1. Objetivos del recurso educativo
2. Cuadro sinóptico
3. Características del medio marino
4. Características del plancton y sus principales funciones en el océano
5. Estudio de las comunidades microbianas marinas
6. Historia de los muestreos de microbios marinos
7. Bacterias y virus marinos que juegan un papel importante en el océano
8. Impactos de las actividades antrópicas en los microorganismos marinos
 - 8.1. Consecuencias del calentamiento del mar
 - 8.2. Desoxigenación de los océanos
 - 8.3. Florecimientos algales nocivos
 - 8.4. Acidificación del océano
 - 8.5. Blanquecimiento de coral
 - 8.6. El papel que juegan los microorganismos en el calentamiento global
9. Conceptos para recordar
10. Fuente de las figuras del documento

1. Objetivos del recurso educativo

(recurso para “saber más” en la asignatura de Microbiología Acuática)

Se busca que el alumno sea capaz de:

1. Tener una visión general de las características y función de los microorganismos marinos.
2. Conocer las metodologías para el estudio de la ecología microbiana marina.
3. Conocer los grupos microbianos que son clave en el funcionamiento de los ecosistemas marinos.
4. Entender la importancia de las comunidades microbianas en el mantenimiento de los ecosistemas marinos.

Este recurso se enmarca dentro de la Unidad 6 “Relación entre los microorganismos acuáticos y las actividades antrópicas”, pero también conecta temas y conceptos que se tratan en las otras Unidades de esta asignatura.

2. Cuadro sinóptico

PLANCTON MARINO

Características

- Viven en suspensión
- Enorme diversidad y abundancia
- Ubicuos

Funciones

- Base de la red trófica
- Mayores productores primarios
- Grandes degradadores de materia orgánica
- Motores de los ciclos de nutrientes

Influyen en la salud de los océanos

Grupos

Virus

Procariontes

- Bacterias
- Arqueas

Eucariontes
unicelulares

- Microalgas
- Protozoos
- Hongos

Eucariontes
pluricelulares

- Animales
(crustáceos, medusas,
fases larvarias)

¿Cómo se estudian?

Muestreos

Expediciones
oceanográficas

Análisis

Cultivos

Extrayendo
ADN
ambiental

Algunas consecuencias de las actividades antrópicas que afectan a los microbios marinos

Desoxigenación
de los océanos

Mareas
rojas

Emblanquecimiento
del coral

Secuestro
del CO₂

3. Características del medio marino

- 97% del agua del planeta.
- 71% de la superficie terrestre.
- Profundidad media de 3,800 m (la máxima de 11,000 m).
- Agua ligeramente alcalina (pH 7.8 – 8.4).
- 3.5% Salinidad: Na, Cl, Mg, sulfatos, Ca, K (mayor en trópicos).
- Elementos limitantes: N, P y Fe.
- La zona fótica, donde penetra la luz solar, llega hasta los 100-200 m de profundidad.
- Las corrientes marinas transportan grandes cantidades de agua y energía, influyendo en la distribución de la salinidad y temperatura, lo que afecta al clima y la productividad de las aguas.

¿Quiénes son los mayores habitantes del océano?

¿Qué funciones realizan?

¿Qué implicaciones tienen para la salud del planeta?

4. Características del plancton y sus principales funciones en el océano



Fig. 1: Plancton, conjunto de organismos, en su mayoría microscópicos, que viven en suspensión en el agua.

¿Quiénes son los principales habitantes del océano?

Biomasa en océanos

90% biomasa microbiana
(10^{29} células microbianas)

- **Plancton:** Conjunto de microorganismos pelágicos que se encuentran en suspensión. El plancton está formado por virus, procariotas (bacterias y arqueas) y eucariontes unicelulares (microalgas, protozoos, hongos) y pluricelulares (animales). En la Fig. 2 se muestran grupos representativos del plancton marino.
- Enorme biodiversidad y abundancia ($10^6 - 10^7$ cels/mL).
- Se encuentran en cualquier ambiente marino: desde la superficie hasta el fondo, desde los trópicos hasta los polos.
- Son comunidades altamente organizadas.
- Con grandísima diversidad metabólica.
- Realizan múltiples funciones en el medio marino.

Fig. 2a: Zooplancton

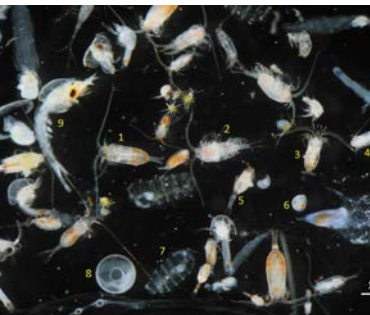


Fig. 2b: Diatomeas

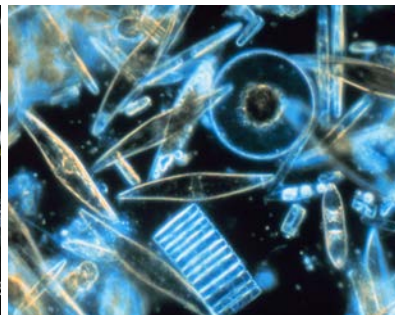


Fig. 2c: Cianobacterias

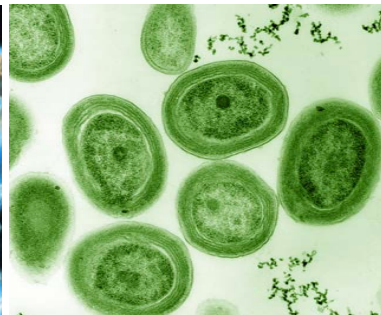


Fig. 2d: Bacterias heterótrofas

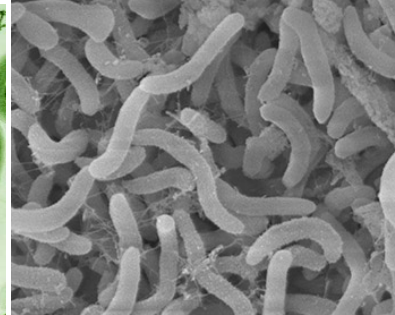


Fig. 2e: Bacteriófagos



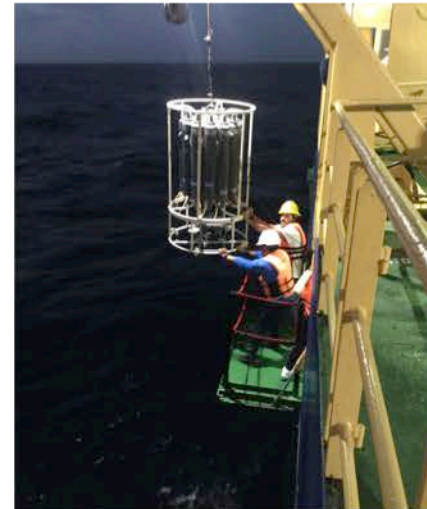
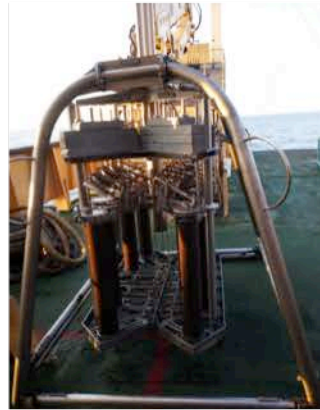
¿Cuál es la función de los microbios en el océano?

- Forman la base de la red alimentaria marina.
- Mayores productores primarios del planeta.
- Producen más del 50% del O₂ del planeta.
- Causantes de enfermedades.
- Productores de metabolitos importantes (biotecnología).
- Grandes biodegradadores de materia orgánica y otros compuestos.
- Los **motores** que impulsan los grandes **ciclos biogeoquímicos** del océano (influencia en el clima).
- Bioindicadores de cambios ambientales.

5. Estudio de las comunidades microbianas marinas

Se necesitan realizar **expediciones oceanográficas** con buques equipados con laboratorios y equipos para muestreos de agua (ej: roseta con botellas Niskin, redes para fitoplancton y zooplancton) y sedimento (ej: multinucleador, dragas).

Fig. 3: La UNAM cuenta con dos grandes buques oceanográficos, el Puma y el Justo Sierra, que tienen los equipos necesarios para muestrear comunidades microbianas marinas.

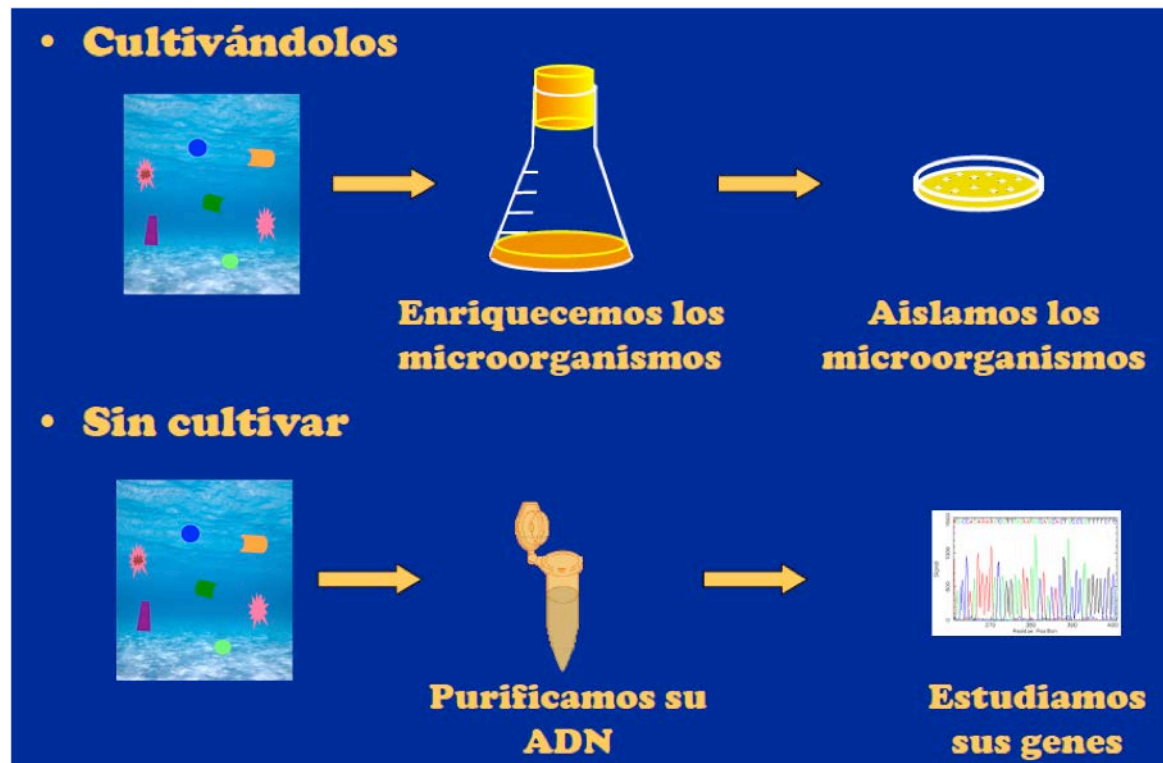


MÉTODOS PARA ESTUDIAR LOS MICROBIOS MARINOS

Si los microbios son tan abundantes, ¿por qué son tan difíciles de estudiar?

- No podemos cultivar la mayor parte de ellos (99%).
- Su morfología es demasiado simple como para ser utilizada para su identificación.

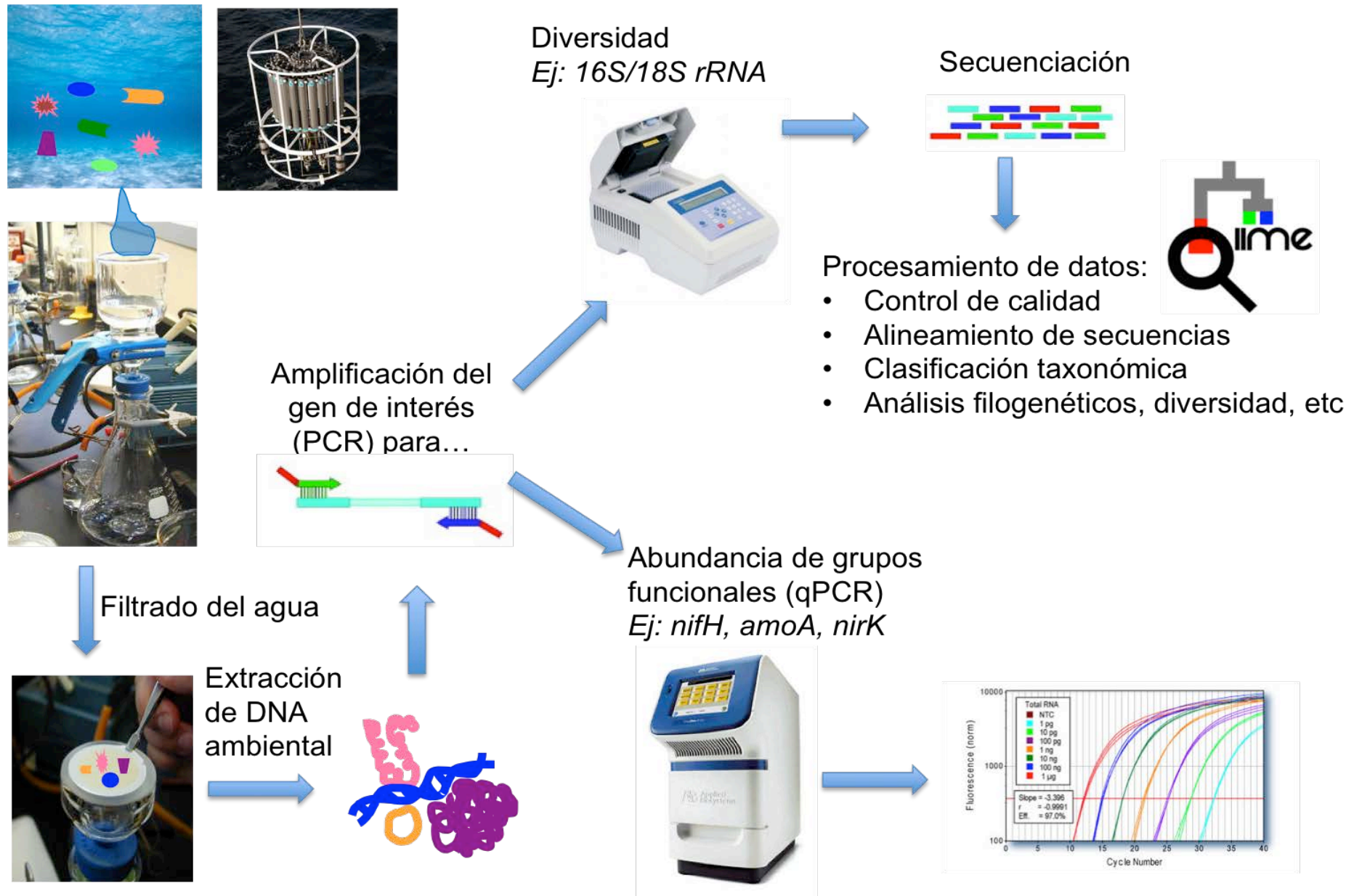
Fig. 4: Dos métodos para estudiar los microorganismos



Durante mucho tiempo los microorganismos se han descrito mediante técnicas tradicionales de cultivo. Desde el desarrollo de la secuenciación de los ácidos nucleicos, en los años 70s, las comunidades planctónicas se pueden clasificar molecularmente sin necesidad de cultivarlas.

Análisis de la comunidad microbiana marina mediante técnicas moleculares (estudio de sus genes sin necesidad de cultivar los microorganismos)

Fig. 5: Flujo de trabajo en el análisis molecular de microorganismos de la columna de agua



6. Historia de los muestreos de microbios marinos:

Las grandes exploraciones marinas en busca de nuevos microbios

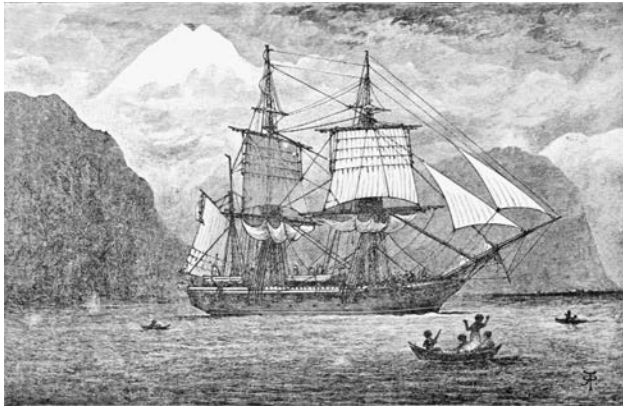


Fig. 6a: Expedición Beagle

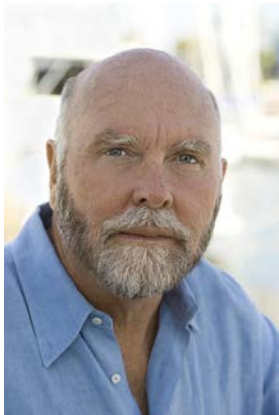


Fig. 6b: Expedición TARA

Iniciativas de muestreo y recolección de datos de microbios marinos a gran escala inspiradas en la gran expedición de Darwin en el Beagle (1831-1836). Destacan dos grandes expediciones sobre microbiología marina: una de iniciativa privada (Global Sampling Expedition –GOS–) y otra de iniciativa pública (Expedición TARA Oceans).

The Global Ocean Sampling Expedition (GOS)

- Primer proyecto de exploración del genoma microbiano del océano.
- Se llevó a cabo en dos partes: el proyecto piloto en el mar de los Sargazos (2003) y la expedición completa que circunnavegó el globo (2004-2006).
- Financiado principalmente con dinero privado.
- Expedición en el yate personal de Craig Venter (Sorcerer II).
- Se tomaron muestras de agua cada 200 millas.
- Cada muestra de agua fue 80% única en sus genes microbianos.
- Se encontraron 6 millones de nuevos genes y miles de nuevas familias de proteínas.
- Resultados publicados en la revista Plos Biology (2007).



Para saber más:

https://www.ted.com/talks/craig_venter_on_dna_and_the_sea#t-17182

Fig. 7: J. Craig Venter

EXPEDICIÓN TARA OCEANS:

El primer catálogo genético global del microbioma marino

Para saber más: www.taraexpeditions.org

- Proyecto de cooperación científica mundial liderado por científicos franceses.
- 35,000 muestras de plancton en las principales zonas oceánicas (2009-2013).
- El análisis de 243 muestras ha dado lugar a un catálogo genético microbiano de 40 millones de genes, el 80% de los cuales son nuevos para la ciencia.
- Se ha detectado al menos 150,000 taxones de protistas, 35,000 taxones bacterianos y 5,000 poblaciones de virus a escala global.
- Principal hallazgo: la temperatura determina las especies que están presentes en el plancton a escala global.
- Resultados publicados en un número especial en Science (2015).



Fig. 8: Expedición TARA

7. BACTERIAS Y VIRUS MARINOS QUE JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN EL OCÉANO

Debido a su gran abundancia, diversidad y actividad, el bacterioplancton y virioplancton marino constituyen piezas fundamentales del entramado biológico del océano.

- Las **bacterias marinas** se pueden dividir en tres grandes grupos:
 - **Fotosintéticas:** Son los principales fijadores de CO_2 en el océano. La fotosíntesis bacteriana se debe, sobre todo, a los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*.
 - **Heterótrofas:** Son los degradadores primarios de la materia orgánica producida por las algas y bacterias fotosintéticas o la que llega a través de los ríos y aguas residuales. El género *Roseobacter* es la bacteria heterótrofa marina más abundante.
 - **Fotoheterótrofas:** Bacterias que usan la luz como fuente de energía y la materia orgánica como fuente de carbono (es decir, no usan la energía de la luz para fijar CO_2). El clado SAR11 es el fotoheterótrofo más abundante del océano.
- Los **virus** son las entidades más abundantes del océano y juegan un papel fundamental en el entramado trófico. La mayoría son **bacteriófagos**, es decir, virus que infectan a bacterias.

Prochlorococcus y *Synechococcus*

- Cianobacterias cocoides muy pequeñas.
- Organismos fotosintéticos más abundantes del planeta.
- Principales productores primarios y responsables de un gran porcentaje del O₂ producido en el océano.
- *Synechococcus* está ampliamente distribuido y *Prochlorococcus* predomina en mares tropicales y subtropicales.
- *Synechococcus*, como todas las cianobacterias, tiene clorofila a. *Prochlorococcus* es una excepción porque tiene divinil-clorofila a y b, que le permite absorber luz a $\lambda >$ longitud de onda.
- *Prochlorococcus* tiene dos ***ecotipos** que ocupan diferentes nichos de luz a lo largo de la profundidad.



Fig. 9: *Prochlorococcus*

***Ecotipo:** Una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico.

Roseobacter

- Alphaproteobacteria de coloración púrpura o rosada.
- Muy abundantes y ubicuos.
- Gran diversidad metabólica.
- Es heterótrofa, pero también es capaz de realizar fototrofía anoxigénica aerobia porque tiene **bacterioclorofila a**.
- Si hay oxígeno y materia orgánica crece heterotróficamente. Si hay poco oxígeno y poca materia orgánica crece fotoautótroficamente.
- Importante en los ciclos del C (nieve marina) y S (ruptura del DMSP)
- Asociado con afloramientos de algas tóxicas.
- **Copiótrofo**: adaptado a altas concentraciones de nutrientes.



Fig. 10a: El color rosado de *Roseobacter* es causado por su pigmentación fotosintética

Fig. 10b: *Roseobacter denitrificans*

Clado SAR 11: *Pelagibacter ubiquus*

- SAR11: clona 11 obtenida del Mar de los Sargazos en 1990.
- Cultivada por primera vez en 2002.
- Alphaproteobacteria, muy pequeña (longitud máx 0.8 μm , diámetro 0.2 μm).
- Genoma más pequeño conocido para un organismo de vida libre (1,350 genes).
- La bacteria más abundante: 25% de las células microbianas del plancton.
- Ubicua: Tanto en superficie como en fondo marino (gran éxito).
- **Oligótrofo** planctónico (adaptado a bajas concentraciones de nutrientes)
- fotoheterótrofo facultativo (con **proteorrodopsina**).
- Importante papel en el ciclo del C (degrada la materia orgánica).

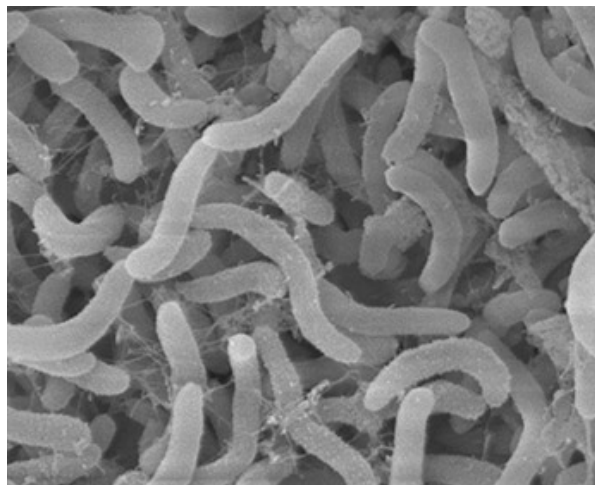
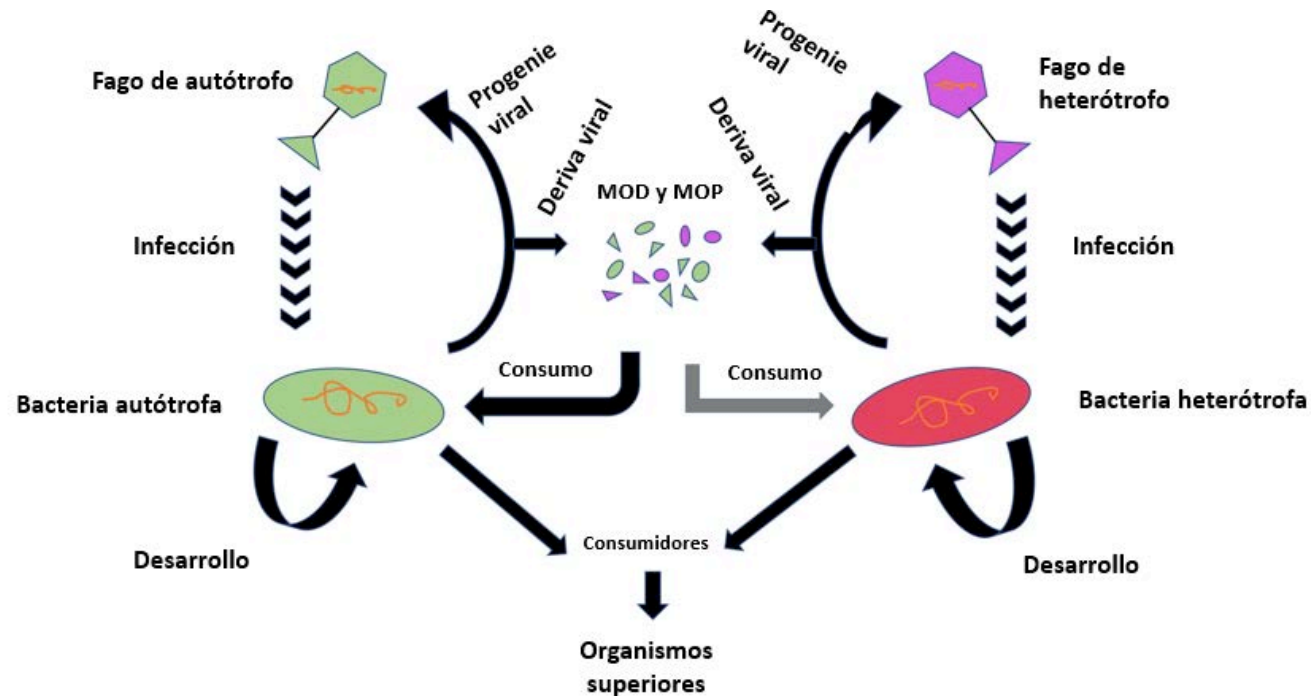


Fig. 11: SAR11

VIRUS MARINOS

- Las formas **más abundantes** en el océano y reservorio de la mayor diversidad genética.
- Debido a su pequeño tamaño representan sólo un 5% de la biomasa microbiana.
- Cada infección tiene el potencial para introducir información genética en un organismo
→ evolución de huéspedes y virus.
- La abundancia de los virus varía con la abundancia de los microorganismos que parasitan.
- Como agentes de mortalidad influyen en:
 1. Los ciclos biogeoquímicos (**deriva viral**: liberación de materia orgánica y nutrientes)
 2. La composición y estructura de las comunidades (eliminan microbios predominantes e intercambio genético)

Fig. 12. Esquema simplificado del flujo de la materia orgánica disuelta (MOD) y particulada (MOP) en la **deriva viral**. La lisis de las células microbianas, como las bacterias, libera MOD y MOP que se pueden volver a incorporar al crecimiento microbiano.



Océanos de virus: bacteriófagos

- Más del 60% de las secuencias víricas obtenidas del mar no se han podido clasificar porque no se parecen a nada previamente secuenciado.
- La mayor parte de los virus marinos son **FAGOS**.
- Predominan los que tienen cola (**Myo-, Sipho- y Podovirus**) y fagos pequeños con genoma de ADN de cadena sencilla (**Microviridae**).
- Se encuentran ampliamente distribuidos.
- Pueden matar entre el 20 y 40% de las bacterias diariamente, liberando materia orgánica y nutrientes al ambiente.



Fig. 13a: Bacteria SAR 11 infectada por fagos

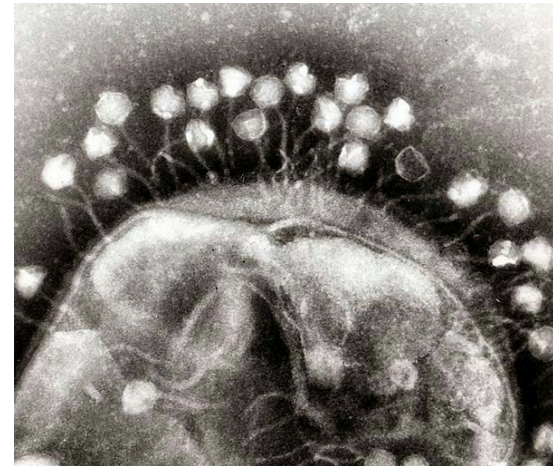


Fig. 13b: Bacteriófagos unidos a una célula bacteriana

8. Impactos de las actividades antrópicas en los microorganismos marinos

Algunos ejemplos de impactos relacionados con **actividades antrópicas** que afectan al equilibrio de los ecosistemas marinos:

- Calentamiento global
- Eutrofización
- Acidificación
- Contaminación (plásticos, plaguicidas, derrames petroleros, etc)
- Sobrepesca
- Turismo no regulado



Ocasionan cambios en comunidades microbianas marinas, las cuales pueden provocar fenómenos adversos, como:

- Desoxigenación de los océanos
- Florecimientos algales nocivos
- Blanqueamiento del coral
- Enfermedades emergentes

8.1. Consecuencias del calentamiento del mar

- Elevación del nivel del mar.
- Intensificación de tormentas tropicales.
- Mayor estratificación y, por tanto, menor ingreso de nutrientes a la superficie.
- Cambios en la biodiversidad y distribución de organismos.
 - Disminución del Krill.
 - Proliferación de especies invasoras y enfermedades marinas.
 - Pérdida de corales.
- Menor solubilidad del O_2 : Desoxigenación del mar y mayor emisión de gases de efecto invernadero.

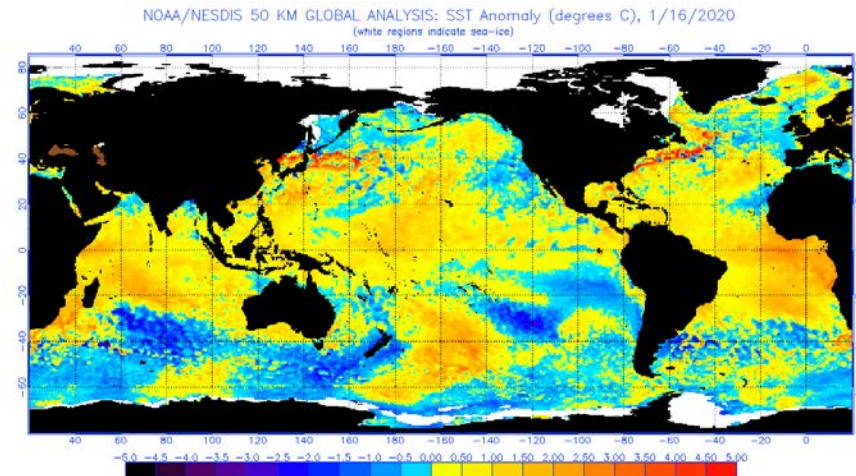


Fig. 14a: Anomalía de la temperatura superficial del océano

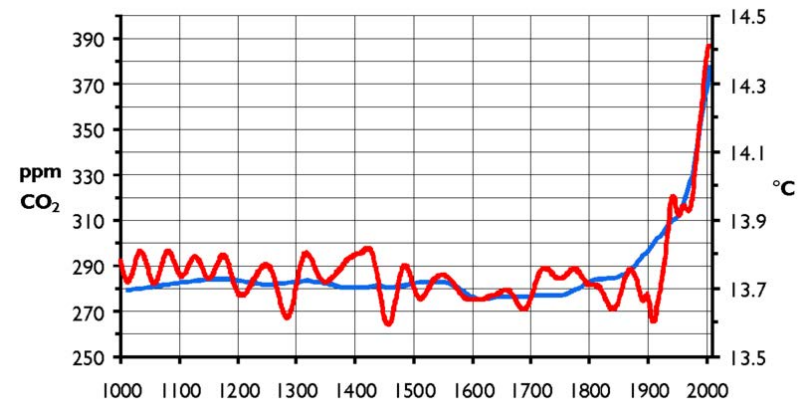


Fig. 14b: Evolución del CO_2 atmosférico y la temperatura terrestre

8.2. Desoxigenación de los océanos

Zonas de mínimo oxígeno: grandes regiones oceánicas donde el oxígeno prácticamente se agota entre los 100 m y 1,000 m de profundidad. Asociadas a zonas de surgencia, donde se produce mucha materia orgánica, provocando el consumo masivo de oxígeno. Hay tres grandes ZMO: Mar Arábigo, Pacífico Tropical Norte y Sur.

Zonas muertas: regiones oceánicas con bajos niveles de oxígeno por la excesiva contaminación de las actividades humanas (nutrientes).

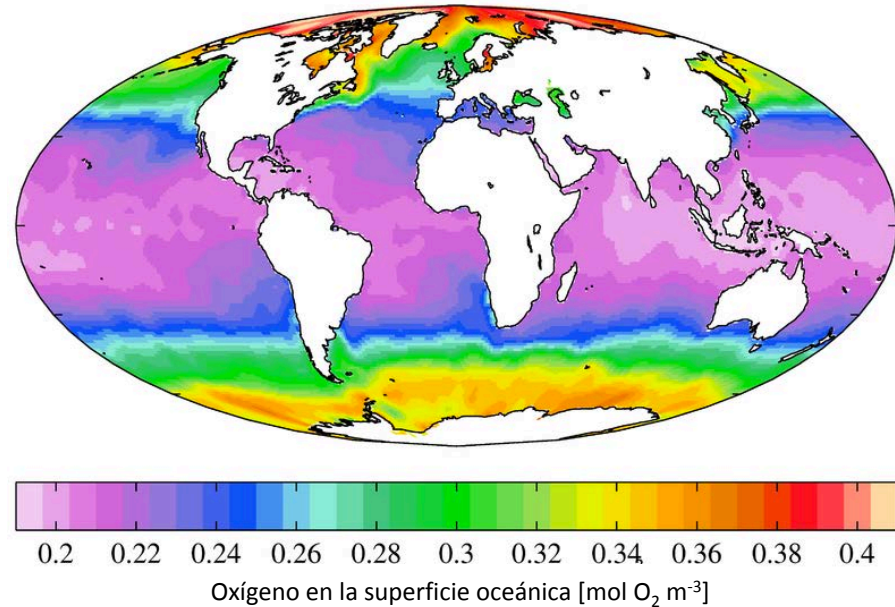


Fig. 15: Concentración de oxígeno en la superficie del océano

Eutrofización (exceso de nutrientes) y aumento de temperatura como principales causantes de la desoxigenación de los océanos

Para saber más puedes leer este informe de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza:
https://www.iucn.org/sites/dev/files/content/documents/es_iucn_issues_brief_-_ocean_deoxygenation.pdf

8.3. Florecimientos algales nocivos (FAN)

- Proliferación masiva de microalgas, principalmente **dinoflagelados** (protistas flagelados) que puede consumir el oxígeno y nutrientes, afectando a la biota acuática.
- Algunas de estas microalgas producen **toxinas** que pueden bioacumularse en moluscos y peces, afectando a la salud humana si son ingeridos.
- También se conocen como **mareas rojas**, ya que en algunos casos proliferan ciertas algas con pigmentos que tiñen el agua de tonalidad rojiza.
- Los FAN están asociados a un aumento de la temperatura y concentración de nutrientes en las aguas y pueden durar desde horas hasta semanas.
- En las costas mexicanas los FAN son eventos comunes.

Para saber más de los FAN en México:

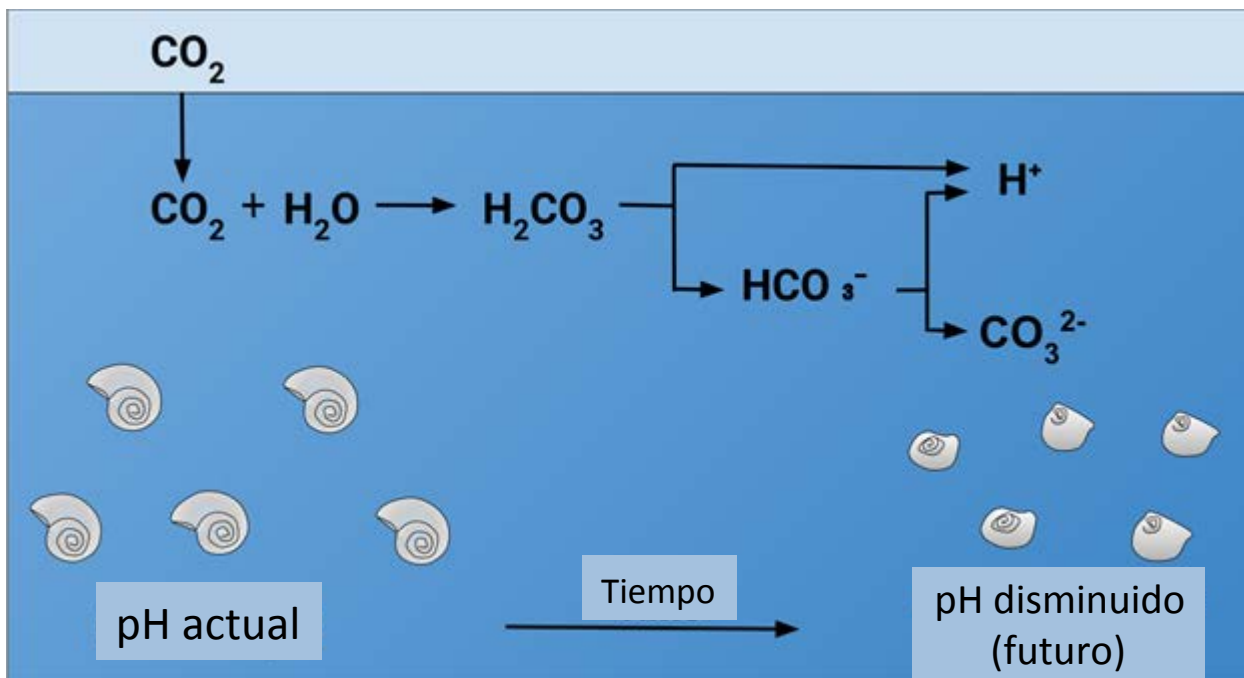
<https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/mares/simar/satfa/index.html>



Fig. 16: Marea roja.

8.4. Acidificación del océano: “el otro problema del CO₂”

Es un descenso del pH de los océanos por la absorción del CO₂, el cual al disolverse en el mar incrementa la concentración de iones hidrógeno y disminuye la disponibilidad de carbonato, necesario para la construcción de conchas de los organismos calcáreos (cocolitofóridos, foraminíferos, crustáceos, moluscos) y los corales.

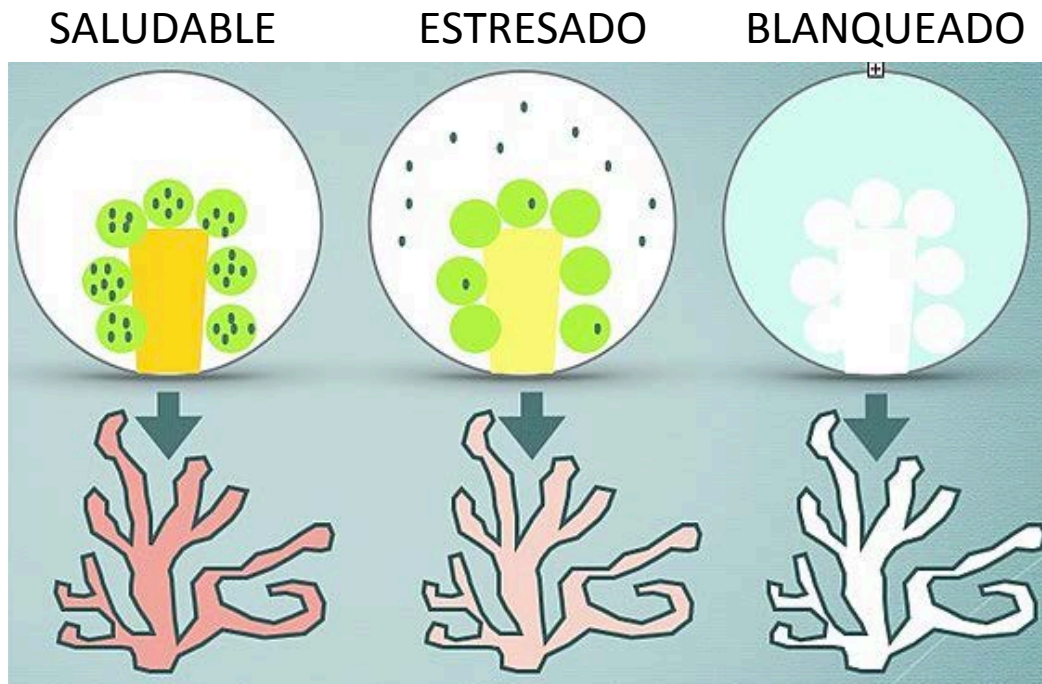


Organismos calcáreos se vuelven menos abundantes y resistentes a enfermedades y cambios ambientales

Fig. 17: Efecto de la acidificación del océano (por Elizajans)

8.5. Blanqueamiento de coral:

Ruptura de la simbiosis entre corales y las algas zooxantelas



Los corales y las algas zooxantelas viven simbióticamente. El alga le proporciona el color y alimento al coral.

El incremento de la temperatura y la contaminación hacen que el alga abandone el tejido del coral.

El coral se vuelve blanco y susceptible a enfermedades. Se muere lentamente sin su fuente de alimento.

Fig. 18a: Blanqueamiento del coral

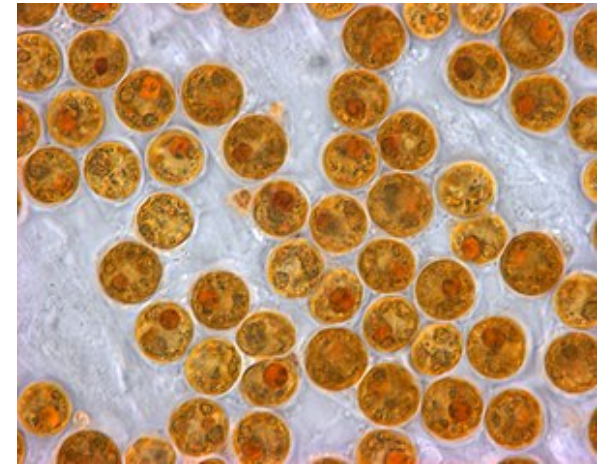


Fig. 18b: *Symbiodinium* (zooxantela)



Fig. 18c: Coral blanqueado

8.6. El papel que juegan los microorganismos en el calentamiento global: el Fitoplancton

Fig. 19a: Niveles de clorofila en el océano global

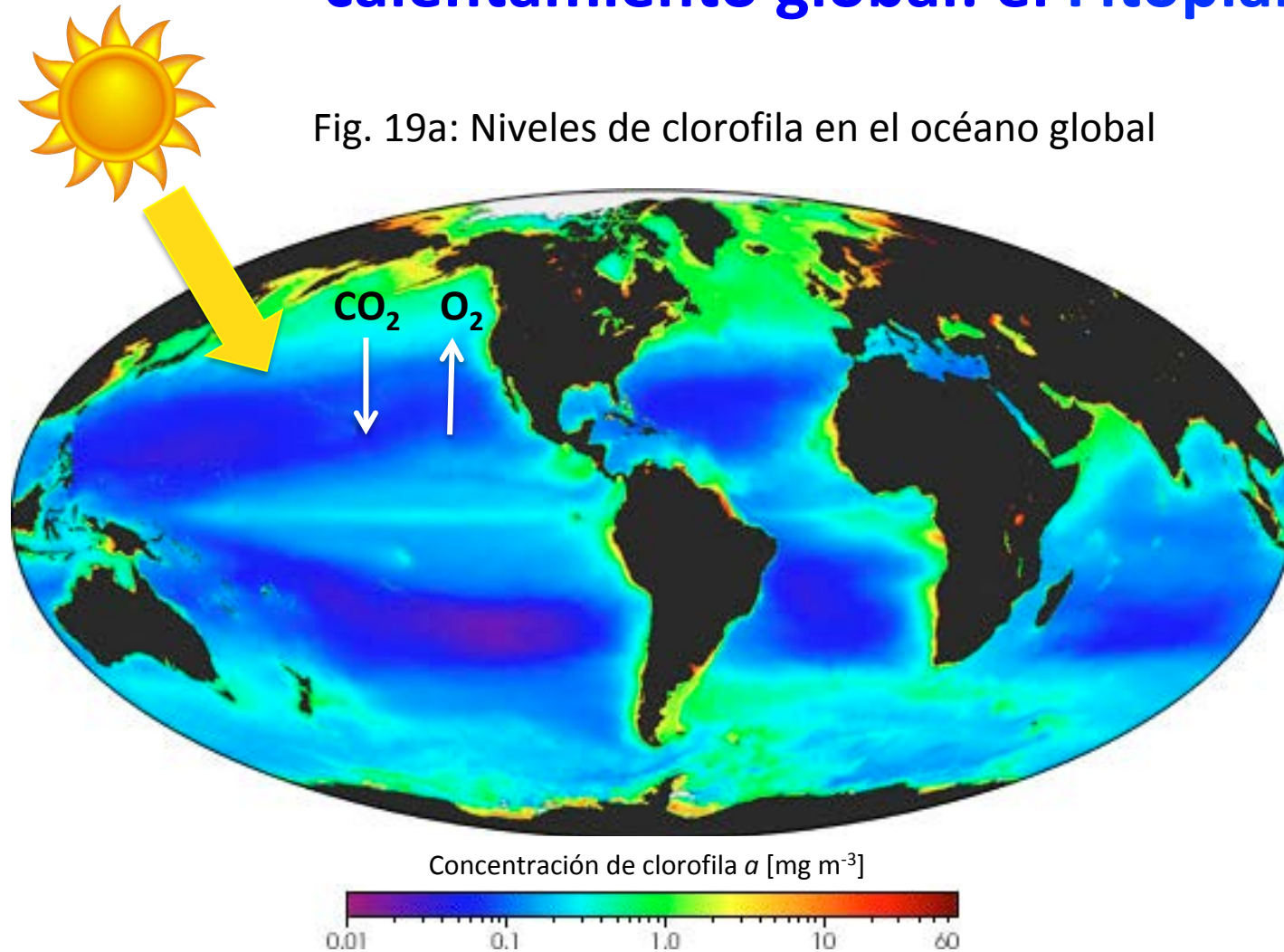


Fig. 19b: Diatomeas

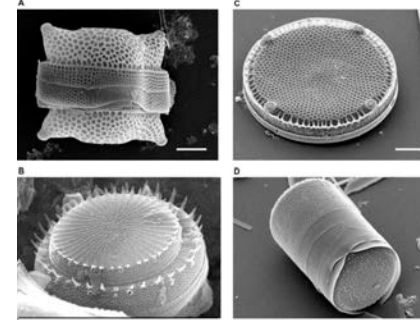


Fig. 19c: Cocolitofóridos
(por A. R. Taylor)

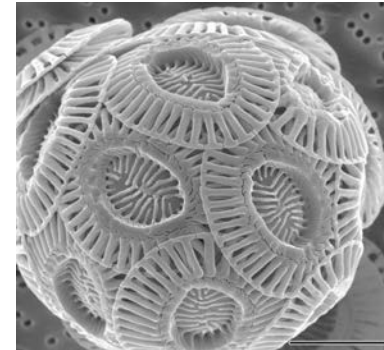


Fig. 19d: *Prochlorococcus*

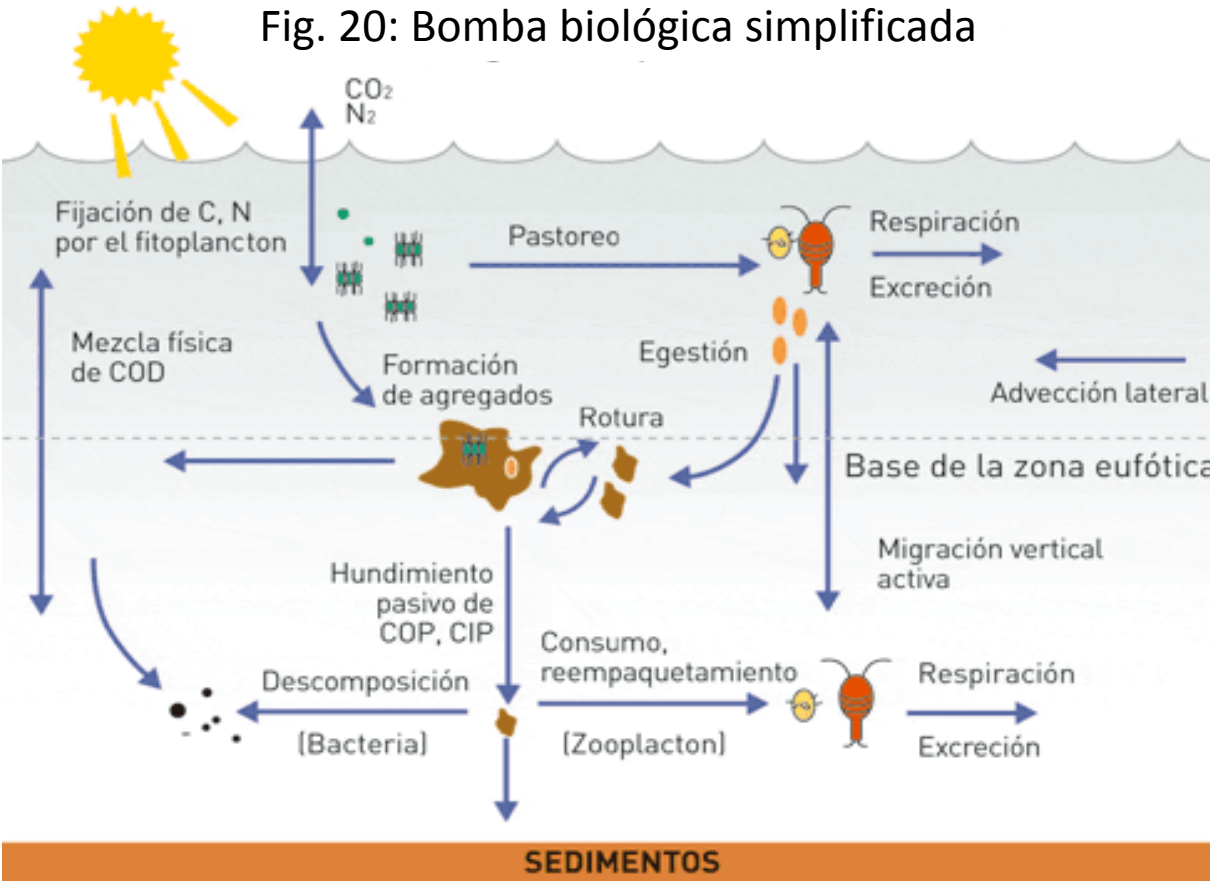


Productores primarios marinos: fijan alrededor de 45-50 Petagramos de C al año, lo que supone casi la mitad del C total fijado en la Tierra (Field *et al.*, Science 1998).

El océano como secuestrador de CO₂: Bomba biológica de C

Los componentes de la **bomba biológica** son responsables de transformar el carbono inorgánico disuelto en biomasa orgánica y bombearlo al océano profundo:

Fig. 20: Bomba biológica simplificada



- El fitoplancton fija CO₂ y nutrientes, libera materia orgánica disuelta (MOD) y es consumido por el zooplancton.
- Los gránulos fecales se hunden o se acumulan con otros detritos orgánicos, que se hunden más rápidamente.
- Las bacterias consumen y respiran parte de la MOD.
- La MOD refractaria restante y los agregados se mezclan en las profundidades del mar.
- Aproximadamente el 1% de las partículas de la superficie del océano llegan al fondo marino, donde se consumen, respiran o entierran en los sedimentos. Allí, el carbono se almacena durante millones de años.

Para saber más:

Ducklow et al. (2015). Upper Ocean Carbon Export and the Biological Pump. *Oceanography*. 14: 50-58.

9. Conceptos para recordar

- Los océanos forman un extenso ecosistema que contiene una **biomasa microbiana mayor** al de plantas y animales.
- El plancton marino incluye una **gran diversidad y abundancia** de virus y organismos unicelulares pertenecientes a los tres dominios de la vida: Bacterias, Arqueas (ambos son procariontes o microorganismos sin núcleo celular) y Eucariontes (organismos con núcleo celular).
- Los microbios son la **base de la red trófica** marina y los **grandes productores primarios** del planeta.
- La **actividad** de estos microorganismos es esencial para el mantenimiento de los **ciclos biogeoquímicos** del planeta y la **salud** de los océanos.
- Las **actividades antrópicas** ocasionan **cambios en las comunidades microbianas** marinas, produciéndose fenómenos adversos como la desoxigenación de los océanos, florecimientos algales nocivos y el blanqueamiento del coral, entre otros.
- Los microbios marinos son **excelentes aliados** para combatir el cambio climático; un ejemplo es la **bomba biológica de carbono**.
- Es necesario el uso de **herramientas moleculares** y **grandes expediciones** para el estudio del microbioma marino y los procesos que realizan.

10. Fuente de las figuras del documento

- Fig. 1: https://www.ecured.cu/images/6/69/Plancton_2.jpeg
- Fig. 2a: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Mixed_zooplankton_sample.jpg
- Fig. 2b: https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Diatomeas_centrales.png
- Fig. 2c: <https://es.wikipedia.org/wiki/Prochlorococcus>
- Fig. 2d: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:SAR11.jpg>
- Fig. 2e: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Phage.jpg>
- Fig. 3: Silvia Pajares
- Fig. 4: Silvia Pajares
- Fig. 5: Silvia pajares
- Fig. 6a: https://en.wikipedia.org/wiki/The_Voyage_of_the_Beagle#/media/File:PSM_V57_D097_Hms_beagle_in_the_straits_of_magellan.png
- Fig. 6b: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_schooner_TARA_\(Port_Lay,_%C3%8Ele_de_Groix,_2009\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_schooner_TARA_(Port_Lay,_%C3%8Ele_de_Groix,_2009).jpg)
- Fig. 7: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Craigventer2.jpg>
- Fig. 8: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_schooner_TARA_\(Port_Lay,_%C3%8Ele_de_Groix,_2009\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_schooner_TARA_(Port_Lay,_%C3%8Ele_de_Groix,_2009).jpg)
- Fig. 9: <https://es.wikipedia.org/wiki/Prochlorococcus>
- Fig. 10a: https://twitter.com/Leibniz_DSMZ_en/status/1068449363851190272/photo/1
- Fig. 10b: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Roseobacter_denitrificans
- Fig. 11: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:SAR11.jpg>
- Fig. 12: Modificado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Viral_Shunt_.jpg
- Fig. 13a: <https://www.flickr.com/photos/oregonstateuniversity/8429356753>
- Fig. 13b: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Phage.jpg>
- Fig. 14a: <https://www.ospo.noaa.gov/Products/ocean/notice.html>
- Fig. 14b: <https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:CO2-Temp.png>
- Fig. 15: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:WOA09_sea-surf_O2_AYool.png
- Fig. 16: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Red_tide.jpg
- Fig. 17: Modificado de <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=79625305>
- Fig. 18a: Modificado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coral_Bleaching.jpg
- Fig. 18b: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zooxanthellae#/media/File:Zooxanthellae.jpg>
- Fig. 18c: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Keppelbleaching.jpg>
- Fig. 19a: Modificado de <https://svs.gsfc.nasa.gov/30801>
- Fig. 19b: https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Diatomeas_centrales.png
- Fig. 19c: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15662212>
- Fig. 19d: [https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Prochlorococcus_marinus_\(cropped\).jpg](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Prochlorococcus_marinus_(cropped).jpg)
- Fig. 20: <https://seguridadypromociondelasalud.fundacionmapfre.org/n116/articulo4.html>