



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización de la actividad fotoquímica de
Chlorella vulgaris (Chlorophyceae) expuesta a
 Cd^{2+}

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NORMA ROCÍO CORIA CORIA



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HUGO VIRGILIO PERALES VELA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

En contraste al orden de aparición, este apartado fue el último en escribirse, quiero agradecer a todas las personas que han estado en mi vida, que finalmente me han llevado a este momento. La escritura de esta tesis representa un ciclo en mi vida personal, lleno de momentos complicados, pero sobre todo de muchos aprendizajes. Por lo cual la culminación de este trabajo la agradezco y dedico principalmente a mi persona. Sin embargo esto no hubiera sido posible sin la presencia de todos aquellos que me han apoyado, asesorado y acompañado durante esta etapa.

A mi asesor: Dr. Hugo Perales Vela, gracias por su confianza, por todo su apoyo, por permitirme realizar este trabajo, y sobre todo por su inmensa paciencia. Mi más sincera admiración y respeto no sólo como profesor sino también como persona.

A la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, por su invaluable apoyo y amable disposición durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Manuel Mandujano Piña, gracias por sus enseñanzas desde el inicio de la carrera, por su apoyo y por darme el tiempo para escucharme y aconsejarme.

A mis sinodales: M. en C. Guadalupe Oliva, Dr., Dr. Gerardo Ortiz. Gracias por sus revisiones y por lo aprendido en clases.

Al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función, de la FES Iztacala, donde se realizó este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio: Erick, Moisés, Félix, Paco, Paquito, Amed, Rogelio y Maribel, fue un placer conocerlos y trabajar junto a ustedes, las tardes eran muy amenas a su lado.

Los amigos son las personas que elegimos en nuestra vida y que permanecen en ella por convicción. Fany, a pesar de la distancia y el tiempo sé que siempre estás conmigo, gracias por tantos años de amistad. Silvana, Sandy y Moni, sin duda su amistad y todos los recuerdos es de lo más valioso que me llevo de estos años, las quiero. Thalía, nunca pensé en conocer a una persona que me entendiera tan bien a pesar de ser tan diferentes, eres increíble, nada de esto hubiera sido lo mismo sin tu compañía. Mario, tu presencia ha sido invaluable en mi vida durante los últimos meses. Gracias por escucharme, por tu apoyo, por tus consejos, por las risas y por confiar en mí.

A mis grandes amores, mis sobrinos: Xavi, Liz, David, Dany, Ricky, Camila, Valentina, Mateo. Y a todas las personas que conforman mi hermosa y gran familia. Son una bendición.

A mis hermanas: Marisol, Paty y Ana, jamás voy a olvidar todo lo que han hecho por mí, todo lo que me han apoyado para que yo pudiera terminar la carrera pero sobre todo su apoyo en el aspecto personal. Las amo y las admiro.

A mi hermano: Jorge, siempre te he admirado por todo tu esfuerzo, crecí a tu lado y cada vez me siento más orgullosa de la persona que eres. Gracias por tu gran apoyo.

A mi mami, no tengo palabras que describan todo lo que eres para mí, eres la mujer más valiente, gracias por todo lo que has hecho por mí y mis hermanos. Gracias por tu infinito apoyo, por todo lo que has trabajado, por tus desvelos, porque jamás me faltó nada. Esto es sólo por ti y para ti, te amo.

A la memoria de mi padre

ÍNDICE

	Página
Resumen	8
I. Introducción	10
II. Antecedentes	11
1. Metales pesados	11
1.1 Fuente de emisión y contaminación	12
1.2 Toxicidad de los metales pesados	13
2. Cadmio	13
2.1 Características generales	13
2.2 Fuentes de contaminación	14
2.3 Producción de cadmio en México	15
2.4 Concentración de cadmio en ambientes acuáticos de México	15
2.5 Normatividad Mexicana	16
2.6 Toxicidad en humanos	16
3. El cadmio en organismos fotosintéticos	18
3.1 Función	18
3.2 Toxicidad	18
3.2.1 Estrés oxidativo	18
3.2.2 Daños en el aparato fotosintético	20
4. Mecanismos de tolerancia en algas a metales pesados	21
4.1 Componentes extracelulares	21
4.2 Exclusión de iones metálicos	22
4.3 Mecanismos de desintoxicación intracelulares	23
5. Biología de las algas	23
5.1 Definición y Clasificación	23
5.2 <i>Chlorella</i> Beijerinck 1890.	24
III. Objetivos	25
IV. Metodología	26
1. Organismo	26
2. Medio de cultivo	26
3. Protocolo experimental	27
4. Variables de respuesta	27
a. Crecimiento	27
b. Pigmentos fotosintéticos	27
c. Actividad fotosintética por oximetría	28
d. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia	28
5. Análisis estadístico	30
V. Resultados y discusión	31
a. Crecimiento	31
b. Contenido de clorofila y carotenoides totales	35

c. Actividad fotosintética: Liberación de oxígeno transporte electrónico y disipación térmica de energía de excitación.	38
d. Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila <i>a</i> del fotosistema II	44
e. Función del complejo liberador de oxígeno (CLO)	50
f. Estructura y función de los centros de reacción del fotosistema II	52
g. Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II	58
h. Actividad y eficiencia cuántica del transporte electrónico en los acarreadores intermedios (QB→PQ→Citb6/f →PC) y los acarreadores del lado aceptor del fotosistema I (A0 →A1→FX →FA/FB→ Fd FNR).	62
i. Índice de rendimiento total.	64
j. Acumulación celular de cadmio.	66
VI. Conclusiones	69
VII Bibliografía	71
VIII Apéndice	82

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales fuentes de emisión de los metales de mayor preocupación en México	13
Tabla 2. Producción volumétrica y valor mensual de cadmio	15
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP.	29
Fig. 1. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	32
Fig. 2. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la velocidad de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> .	33
Fig. 3. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el tiempo de duplicación celular de <i>C. vulgaris</i> .	34
Fig. 4. Efecto del cadmio sobre el contenido específico de clorofila total	36
Fig. 5. Efecto del cadmio sobre el contenido específico de carotenoides totales.	37
Fig. 6. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la liberación fotosintética de oxígeno de <i>C. vulgaris</i> .	39
Fig. 7. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la máxima eficiencia fotoquímica del PSII en la luz, en <i>C. vulgaris</i>	40
Fig. 8. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el transporte electrónico aparente en <i>C. vulgaris</i>	42
Fig. 9. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el decaimiento No-fotoquímico NPQ en <i>C. vulgaris</i> .	44
Fig. 10. Curva de inducción de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> y su correspondencia con la cadena transportadora de electrones	46
Fig. 11. Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP.	47
Fig. 12. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la fluorescencia variable relativa en <i>C. vulgaris</i> .	48
Fig. 13. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la fluorescencia variable relativa (Vt) en <i>C. vulgaris</i> .	49
Fig. 14. Efecto del Cd ²⁺ sobre el cambio (Δ) de la fluorescencia variable relativa (Vt experimental-Vt testigo) de <i>C. vulgaris</i>	49
Fig. 15. Efecto del Cd ²⁺ sobre la fracción activa de complejos liberadores de oxígeno	51
Fig. 16. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre los centros de reacción activos en la reducción de QA por cada complejo antena del Fotosistema II en <i>C. vulgaris</i> .	53
Fig. 17. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre flujo de excitación absorbido por centro de reacción del Fotosistema II en <i>C. vulgaris</i> .	54
Fig. 18. Efecto del cadmio sobre el flujo de excitación atrapado por centro de reacción que conduce a la reducción de QA en <i>C. vulgaris</i>	55
Fig. 19. Efecto del cadmio sobre el flujo electrónico por centro de reacción en <i>C. vulgaris</i> .	56

Fig. 20	Efecto del cadmio sobre la disipación térmica por centro de reacción en <i>C. vulgaris</i> .	57
Fig. 21	Efecto del cadmio sobre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en <i>C. vulgaris</i>	59
Fig. 22	Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la eficiencia con la que un electrón se mueve después de QA, en <i>C. vulgaris</i> .	60
Fig. 23	Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el rendimiento cuántico del transporte electrónico, en <i>C. vulgaris</i> .	61
Fig. 24	Efecto del cadmio sobre la probabilidad con la que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduce los acarreadores del lado aceptor del PSI, en <i>C. vulgaris</i>	63
Fig. 25	Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI, en <i>C. vulgaris</i> .	64
Fig. 26	Efecto del cadmio sobre el índice de rendimiento total en <i>C. vulgaris</i> .	65
Fig. 27	Relación entre la acumulación celular de Cadmio y la concentración inicial del metal en el medio de cultivo.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

CLO – Complejo liberador de oxígeno
EDTA – Ácido etildiaminotetraacético
LHCII – Complejo cosechador de luz del fotosistema II
NPQ – Decaimiento no fotoquímico
PSI – Fotosistema I
PSII – Fotosistema II
PC- Plastocianina
RC – Centros de reacción
ROS- Especies reactivas de oxígeno

RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal altamente tóxico con amplia presencia en suelo y agua, éste puede acumularse en los organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas, produciendo una variedad de efectos adversos tanto en el humano como en diferentes organismos. Las microalgas se han utilizado ampliamente en la evaluación de riesgo ecológico para evaluar los impactos de metales pesados y otros contaminantes en los sistemas acuáticos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fisiológicamente a la microalga *Chlorella vulgaris* durante su exposición a Cd²⁺, las variables consideradas fueron; crecimiento, contenido específico de pigmentos fotosintéticos, tasas de liberación oxígeno, y actividad fotoquímica. El experimento se realizó según el protocolo 121 para prueba de productos químicos de la OECD. Las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de Cd²⁺: 0 (testigo), 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 µM durante 72 h. a fotoperiodo y temperatura constantes, cultivadas en el medio mineral Bourrelly-Setlik libre de EDTA. El crecimiento se cuantificó por cambios de absorbancia a 750 nm y biomasa seca por filtración. El transporte electrónico fotosintético se cuantificó por medio de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II, y la liberación fotosintética de oxígeno utilizando un oxímetro acoplado a una fuente de luz actínica de luz blanca de 250 µmoles/m²/s⁻¹.

La concentración efectiva media para inhibir el 50% de crecimiento (CE₅₀) se calculó en 0.65µM de Cd². La clorofila total disminuye 77% en la concentración más elevada. Se presentó un aumento en el contenido de carotenoides en células de *C. vulgaris* expuestas a concentraciones de 0.6, 0.9 y 1.2 µM.

La actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno, y la eficiencia fotoquímica primaria a la luz (Fv/Fm) disminuyó en relación al grupo control en las concentraciones de 0.9 y 1.2 µM. Así mismo el transporte electrónico aparente (ETR) disminuyó a medida que aumentó la concentración del metal en el medio. El número de centros de reacción presentó una tendencia a disminuir (RC/ABS), sin embargo hay

una mayor absorción por centro de reacción (ABS/RC). Los rendimientos cuánticos para la fotoquímica primaria (Φ_{Po}), para el transporte electrónico (E_o) y para la reducción de los últimos aceptores del PSI (Φ_{Ro}), disminuyen al aumentar la concentración de Cadmio en el medio. Por lo cual el índice de rendimiento total (PI total), decrece de manera significativa en todos los casos respecto al grupo control.

Las bajas concentraciones de Cadmio utilizadas en el presente estudio, no poseen un sitio específico de inhibición en el metabolismo fotosintético de *Chlorella vulgaris*, sin embargo la acumulación de daño en distintos sitios, produce una reducción en el proceso fotosintético total. Por lo cual el Cadmio a bajas concentraciones, podría tener efectos nocivos sobre las poblaciones de microalgas en los sistemas naturales.

Palabras clave; *Chlorella vulgaris*; Cadmio; Fluorescencia

I. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales que forma parte del desarrollo de cualquier país; es el compuesto químico más abundante del planeta y resulta indispensable para el desarrollo de la vida. Sin embargo, su disponibilidad es paulatinamente menor debido a su contaminación por diversos medios, lo cual representa un desequilibrio ambiental, económico y social (Esponda, 2001).

En México se generan alrededor de 14.11 km³/año de aguas residuales, de las cuales, sólo un total de 4.93 km³/año son tratadas (CONAGUA, 2013). Estas aguas pueden provenir de fuentes diferentes: aguas residuales domésticas, agrícolas, pecuarias, e industriales. Las aguas residuales no tratadas son vertidas directamente o indirectamente al medio acuático, contaminando ríos, arroyos, presas y lagos así como la mayor parte de los acuíferos (Seghezzi *et al.*, 1998).

La contaminación de aguas superficiales o subterráneas con metales pesados es un serio problema ambiental que surge como consecuencia de una descarga indiscriminada de efluentes industriales, agrícolas y/o domésticos en ecosistemas acuáticos (Pradhan y Rai, 2000). La contaminación de estos nichos ecológicos, impacta directamente a los organismos productores primarios que son la puerta de entrada de los metales pesados a la cadena alimentaria en la cual el hombre está incluido (Rai *et al.*, 1981).

De los metales pesados: el cadmio (Cd) es un metal altamente tóxico con amplia presencia en suelo y agua, debido a erupciones volcánicas y actividades antropogénicas (Salazar y Reyes, 2000). La contaminación por este metal ha aumentado a causa de actividades industriales tales como minería, fundición de metales, enchapado eléctrico, uso y purificación de Cd (Palus *et al.*, 2003; Waisberg *et al.*, 2003). Como todos los metales pesados, el Cd puede acumularse en los

organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas (De Acevedo, 2003).

En los últimos años, las microalgas se han utilizado ampliamente en la evaluación de riesgo ecológico para evaluar los impactos de metales pesados y otros contaminantes en los sistemas acuáticos, esto se debe a su amplia presencia en la naturaleza, su asimilación con crecimiento continuo, su sensibilidad hacia los metales y a su importancia como productores primarios y base de la cadena alimentaria acuática. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto del Cadmio sobre la actividad fotosintética del alga verde *Chlorella vulgaris*.

II. ANTECEDENTES

1. Metales pesados

El término "metal pesado" se aplica a un grupo de metales con una densidad mayor o igual a 5 g/cm³ y número atómico superior a 20. Tales metales se asocian con problemas biológicos de toxicidad y contaminación de los ecosistemas (Jjemba, 2004). Debido a su persistencia en el medio y la toxicidad para los organismos vivos, los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más peligrosos. Los metales pesados son componentes naturales de la litósfera de la Tierra y la hidrósfera, encontrándose en suelos, sedimentos y aguas, e incluso en los organismos vivos. Sin embargo, la amplia gama de aplicaciones e intensivo uso de metales pesados en los procesos industriales han causado un aumento dramático en su concentración en el medio ambiente en relación con su concentración normal (Hart *et al.*, 1991).

Desde un punto de vista biológico, los metales pesados se pueden clasificar de acuerdo a su función fisiológica, su impacto medioambiental y su toxicidad. Algunos de esos elementos como Fe, Cu, Ni, Co y Zn, son etiquetados como esenciales, ya que son requeridos por la mayoría de los organismos vivos, en concentraciones mínimas, para su crecimiento y funcionamiento regular. De hecho, son parte de estructuras biológicas tales como membranas celulares y grupos prostéticos de enzimas, que juegan un papel crucial en los procesos metabólicos. Sin embargo, los niveles excesivos

de estos metales son tóxicos para los organismos. Por otro lado, los metales como As, Cd, Pb y Hg no juegan ningún papel bioquímico conocido, por lo que no son esenciales, se sabe que estos metales causan daños biológicos graves, algunos incluso a concentraciones muy bajas (Kaplan, 2004).

2. Fuente de emisión y contaminación

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos. Tanto las fuentes naturales como antropogénicas pueden contribuir importantemente a la emisión de elementos metálicos a la atmósfera. Cabe señalar que al comparar las emisiones globales, la emisión de elementos como selenio, mercurio y manganeso se realizan en su mayoría por fuentes naturales; sin embargo, en el plano regional las fuentes antropogénicas pueden contribuir de manera importante y estos metales se convierten en contaminantes en la escala local. La tabla 1 muestra las principales fuentes de emisión de los metales de mayor preocupación en México (INECC, 2013).

METAL	Fuentes de emisión
Mercurio	Actividades mineras de extracción de oro, plata y cobre. Fundición primaria y secundaria de metales. Producción de carbón y coque. Combustión de combustóleo y carbón en la generación de electricidad. Industria de cloro-sosa. Incineración de residuos peligrosos y biológico infecciosos.
Plomo	Fundición primaria y secundaria de metales. Loza vidriada Producción de pinturas Elaboración de latas soldadas con plomo Industria electrónica y de cómputo Uso de gasolina con plomo
Cadmio	Baterías Recargables de Níquel/Cadmio (Ni/Cd): Fertilizantes Pigmentos y Estabilizadores en Plástico y PVC Pigmentos en Pinturas Galvanización Catalizadores y Conservadores en la Industria del Plástico Elaboración de Pinturas Aleaciones

Tabla 1. Principales fuentes de emisión de los metales de mayor preocupación en México (INECC, 2013).

1.2 Toxicidad de los metales pesados

Los iones metálicos tóxicos con propiedades similares a los iones esenciales (por ejemplo, carga y tamaño), pueden competir con los iones esenciales por los sitios de unión a moléculas biológicas, lo que resulta en alteraciones en la estructura y la función. Además la exposición a metales tóxicos causa un aumento en la generación directa o indirecta de especies reactivas de oxígeno (ROS) en diferentes compartimientos celulares (Koedrith *et al.*, 2013).

2. Cadmio

2.1 Características generales

El cadmio es un metal pesado, miembro del grupo IIB de la tabla periódica de los elementos, está presente en los suelos, sedimentos, aire y agua. Es un elemento metálico, de color blanco brillante, dúctil, maleable y resistente a la corrosión. Su

densidad es de 8.642 g/cm^3 (Stoeppler, 1991). Su peso molecular es de 112.4, su punto de ebullición es de 767°C y su punto de fusión es de 321°C . A temperatura ambiente y en seco es estable, pero se oxida lentamente en presencia de humedad ambiental. Las sales que se forman son tóxicas. Los ácidos fuertes (clorhídrico y sulfúrico) lo disuelven desprendiendo hidrógeno. Con el ácido nítrico diluido se desprenden óxidos de nitrógeno. El cadmio y algunos de sus compuestos actúan como catalizadores en muchas reacciones de descomposición en las que se pueden desprender humos de óxidos de cadmio, altamente tóxicos (SIAFA, 2013).

El Cd fue aislado por primera vez y se identificó como una impureza en carbonatos de Zinc. Se presenta como metal divalente de color blanco azulado que es suave y maleable. Puede existir en el estado de oxidación 1^+ , pero en ambientes naturales, se encuentra casi exclusivamente en un estado 2^+ . A diferencia de la mayoría de los metales, el uso del cadmio comenzó hace relativamente poco tiempo con su aplicación a gran escala desde 1940. Se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración promedio de 0.1 mg/kg ; sin embargo en las rocas sedimentarias las concentraciones suelen ser más elevadas (Stoeppler, 1991).

2.2 Fuentes de contaminación

Las fuentes naturales de cadmio a la atmósfera son: la actividad volcánica, los incendios forestales y el transporte por el viento de partículas del suelo, de las cuales la actividad volcánica es la mayor fuente natural de Cd a la atmósfera, con un aporte de $100\text{-}500 \text{ ton/año}$ (WHO, 1992). Las fuentes antropogénicas aportan al ambiente 7300 ton/año de Cd a nivel mundial, y la principal ruta de entrada al ambiente son las emisiones atmosféricas derivadas de la actividad minera, y de la refinación y fundición de minerales, el uso de combustibles fósiles y las escorrentías de zonas agrícolas (Martelli *et al.*, 2006).

Hasta años recientes, el uso principal de este metal era el recubrimiento de objetos metálicos para protegerlos de la corrosión, mientras que en la actualidad se estima que más del 80-85% de la producción mundial es usado para la fabricación de baterías

recargables de níquel-cadmio. Otras aplicaciones incluyen pigmentos, recubrimientos y electroplateado, estabilizadores para plásticos y aleaciones no ferrosas en la industria aeronáutica y automotriz, entre otras (Landis y Yu, 1999). Las principales fuentes de Cd para los suelos agrícolas son los fertilizantes de fosfato (McLaughlin y Singh, 1999), ya que la materia prima para su producción son rocas fosfóricas, principalmente apatita, que contiene Cd en cantidades que varían entre 8 y 500 mg/kg (Laegreid *et al.*, 1999).

2.3 Producción de cadmio en México

La minería es una actividad económica primaria que se refiere a la exploración, explotación y aprovechamiento de minerales. Nuestro país, en la actualidad, ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la producción de plata, bismuto y fluorita; destaca en la producción de arsénico, plomo, cadmio, antimonio, zinc, barita, grafito y yeso, entre otros. México ocupa el 6to. Lugar en producción de cadmio a nivel mundial, con una producción mensual promedio de 135 toneladas en 2012 (SE, 2013).

PERIODO	CADMIO PROMEDIO VOLUMEN TONS.	CADMIO PROMEDIO VALOR MM\$
2004	135	\$1.84
2005	136	\$5.00
2006	117	\$3.82
2007	134	\$10.89
2008	129	\$8.25
2009	126	\$4.83
2010	122	\$5.96
2011	124	\$4.26
2012	135	\$3.65
2013	135	\$3.10

Tabla 2. Promedio volumen y valor mensual de cadmio (SE, 2013).

2.4 Concentración de cadmio en ambientes acuáticos de México

A pesar de la problemática ambiental y los riesgos a la salud que representa la presencia de cadmio en los sistemas acuáticos, los estudios sobre sus concentraciones en ambientes naturales son escasos en nuestro país.

Se determinó la concentración (mg/L^{-1}) de distintos metales en tres diferentes ambientes en el sistema acuático de la laguna de Términos, de marzo de 1994 a Enero de 1995, donde se obtuvo un rango de entre 0.001-0.59 (Vazquez, *et al.*, 1999a).

La concentración de Cd en aguas de la laguna costera Pom-Astata en el golfo de México tuvo una media de 0.0293 mg/L^{-1} en el periodo de Septiembre de 1996 a Mayo de 1997 (Vazquez, *et al.*, 1999b).

Justin, *et al.* (2001), determinaron el intervalo de la concentración de Cd en sitios seleccionados del Valle del Mezquital en un periodo de 6 meses, con un nivel mínimo de 0.011 y un máximo de 0.106 mg/L^{-1} en agua de riego.

Se evaluaron los niveles de cadmio en agua a lo largo del ecosistema estuarino Río Tigre-Laguna San Andrés (Golfo de México) de septiembre a diciembre de 2009. La concentración de Cd promedio en agua fue de 0.45 mg/L^{-1} (Vázquez-Sauceda, 2012).

2.5 Normatividad Mexicana

La Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, que en el caso de cadmio estos límites van de 0.1 mg/L^{-1} cuando se destina a uso público hasta 0.4 mg/L^{-1} cuando se trata de uso en riego agrícola.

2.6 Toxicidad en humanos

Los seres humanos y los animales respiran partículas que contienen cadmio e ingieren complejos de cadmio en los alimentos y bebidas. El tabaquismo es la principal vía de absorción, mientras que el contacto con la piel no está muy extendido debido a la dilución natural del cadmio. El Cadmio en alimentos está más concentrado en mariscos, vísceras, granos y semillas. Algunos cultivos, como el arroz, la soja, o el trigo, son más propensos que otros a acumular cadmio a partir de suelos contaminados.

Los casos de ingestión aguda accidental de cadmio son raros. Los síntomas pueden incluir náuseas, vómitos, ahogo, dolor de cabeza e irritación pulmonar después de la inhalación.

La fabricación de compuestos de cadmio en el siglo XX, trajo como resultado una exposición ocupacional, en donde los trabajadores fumadores que sufrieron exposición por inhalación fueron más propensos a sufrir de cáncer de pulmón. Otros tipos de cánceres que se han relacionado con la exposición al cadmio incluyen los de la próstata, riñón, vejiga, páncreas, y de mama (Maret y Moulis, 2013). El papel de cadmio como un co-carcinógeno, se apoya en datos bioquímicos. Los mecanismos básicos implicados en la carcinogénesis del cadmio incluyen: la regulación génica, el estrés oxidativo, la interrupción de las cadherinas, la inhibición de la reparación del ADN y la interferencia con la apoptosis (Waisberg, 2003).

Se ha observado que los seres humanos y animales con una alta exposición a cadmio sufren de enfermedades renales. Se demostró que las ratas que recibieron 5 ppm de cadmio en el agua potable a partir del momento del destete hasta la muerte desarrollaron hipertensión arterial crónica. La enfermedad arterial periférica se ha asociado con una alta carga de cadmio. Además, algunos indicios epidemiológicos de exposición al cadmio, lo colocan como un factor de riesgo para la diabetes tipo II y complicaciones de la diabetes, en particular, la nefropatía.

Un aumento en el riesgo de la osteoporosis se correlaciona con la carga de cadmio en diferentes poblaciones, especialmente para las mujeres post-menopáusicas. La exposición a cadmio disminuye la densidad mineral ósea y por lo tanto aumenta el riesgo de fracturas. Estos efectos sobre los huesos están relacionados con un mal funcionamiento del riñón y una pobre reabsorción de calcio en la nefrona. Las consecuencias de la exposición al cadmio en el esqueleto humano fueron particularmente evidentes para los japoneses que vivieron a lo largo de la cuenca del río Jinzu en el siglo XX. El agua y el arroz contaminados con cadmio como resultado de las actividades de extracción de zinc, afectaron a la población local con la enfermedad

Itai-Itai, una forma particularmente aguda y dolorosa de osteomalacia (Maret y Moulis, 2013).

3. El cadmio en organismos fotosintéticos

3.1 Función

El cadmio no tiene función en la mayoría de los organismos, sin embargo, se descubrió una anhidrasa carbónica que contienen cadmio la cual se expresa en la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii*, esto sucede cuando existe una limitación de zinc en el medio. En el océano, el zinc se encuentra a menudo en concentraciones tan bajas que puede limitar el crecimiento del fitoplancton, como diatomeas, por lo que una anhidrasa carbónica con un ion metálico diferente podría ser benéfico en estos ambientes (Lane *et al.*, 2005).

3.2 Toxicidad

En organismos fotosintéticos, el Cd^{2+} es fácilmente absorbido y afecta a varias actividades metabólicas en diferentes compartimentos celulares. Estos efectos incluyen la inhibición de la fotosíntesis, la inhibición del crecimiento, inhibición de la síntesis de la clorofila, así como disminución de la absorción de agua y nutrientes. Las concentraciones de Cd^{2+} en la que se ejerce un 50% en la inhibición de crecimiento (CE_{50}) son dependientes del organismo, así como de condiciones fisiológicas (Faller *et al.*, 2005).

3.2.1 Estrés oxidativo

La toxicidad por metales pesados se debe en parte al estrés oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas a través de diferentes mecanismos dependiendo del metal de que se trate (Stohs y Bagchi, 1995). Los cationes metálicos Cd^{2+} y Pb^{2+} no experimentan cambios redox y por lo tanto, a diferencia del Fe^{2+} o Cu^{2+} , no actúan directamente en la generación de ROS. Sin embargo, pueden actuar como pro-oxidantes a través de la reducción del contenido de glutatión (GSH), necesario para la síntesis de fitoquelatinas, al disminuir su disponibilidad para la defensa antioxidante (Pinto *et al.*, 2003). El estrés oxidativo producido por el cadmio se

manifiesta por daños oxidativos a membranas, tales como peroxidación lipídica (Sandalo *et al.*, 2001), y también se han descrito daños oxidativos a proteínas por formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas *et al.*, 2002). Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasas (POD) y la catalasa (CAT), encargadas de la defensa celular frente a las ROS, experimentan reducciones o incremento de su actividad en función de la concentración de cadmio incluida en el medio de crecimiento, la duración del tratamiento, el tipo de tejido y la especie de que se trate (Benavides *et al.*, 2005).

Se ha demostrado la producción de ROS en distintos compartimentos celulares (membrana plasmática, mitocondrias y peroxisomas) siendo la NADPH oxidasa una de las principales fuentes de ROS (Olmos *et al.*, 2003; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2006). En los últimos años se ha prestado atención especial al estudio de la regulación de la producción de ROS y la síntesis de antioxidantes, así como la implicación de hormonas como el ácido jasmónico y el etileno. En base a los resultados obtenidos por distintos autores (Romero-Puertas *et al.*, 2004, 2007; Olmos *et al.*, 2003, entre otros), el Cd podría inducir la NADPH oxidasa de membrana y las ROS que se formarían (O_2^- y H_2O_2) podrían intervenir en la lignificación de la pared celular que actúa como barrera de entrada del metal (Sanità di Topi y Gabbrielli, 1999). Las ROS pueden ser eliminadas por los sistemas antioxidantes pero cuando la intensidad y duración del tratamiento superan la barrera antioxidante, se produce un exceso de ROS que se traduce en daños oxidativos a membranas y proteínas. Los daños a membranas van acompañados de un incremento en la síntesis de etileno y jasmónico (JA), que junto con el H_2O_2 van a regular la expresión de un gran número de proteínas de defensa (HSPs, quitinasa o antioxidantes, entre otras) (Rodríguez-Serrano, 2008).

3.2.2 Daños en el aparato fotosintético

El aparato fotosintético, tanto en la fotoquímica primaria como en la fijación de carbono, es uno de los sitios más importantes que sufren inhibición por parte de muchos metales pesados como el cadmio. Esto ha sido observado en varios estudios utilizando concentraciones extremadamente altas de Cd^{2+} (4.5 a 18 mM) que inespecíficamente inhiben todas las partes del metabolismo, sin embargo estas concentraciones en el medio natural no se presentan inclusive en los ambientes más contaminados (Andresen y Küpper, 2013).

Aravind y Prasad (2004) observaron que en la macrophyta *Ceratophyllum demersum* L., la clorofila *a*, *b* y carotenoides fueron severamente reducidos en las plantas tratadas con Cd. Lo cual atribuyeron a que el cadmio puede inhibir la biosíntesis de clorofila, al afectar la actividad de la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD) y la protoclorofila reductasa, por su interferencia con los sitios sulfhídrido, lo cual conduce a la menor producción del ácido δ -aminolevulínico (ALA), el primer precursor común para todos los tetrapirroles.

Monteiro *et al.* (2009) utilizando altas concentraciones de Cd, encontraron variaciones inducidas por Cd en la eficiencia fotosintética (F_v/F_m) y el contenido de pigmentos en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Así mismo cuatro líneas de trigo (*Triticum aestivum* L.) con diferente tolerancia hacia el Cd fueron sometidas a 50 μM de CdCl_2 . En donde se observó daño en el fotosistema II (PSII), ya que la eficiencia máxima de la fotoquímica del PSII (F_v/F_m) y el potencial de eficiencia de la fotoquímica del PSII adaptada a la oscuridad (F_v/F_o) disminuyó, mientras que la fluorescencia inicial (F_o) aumentó en todas las líneas en virtud al estrés por exposición a Cd (Ci *et al.*, 2009).

Perreault *et al.* (2011) trabajaron con el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, estos autores utilizaron concentraciones ambientalmente realistas (0.15-4.62 μM) de Cd^{2+} , determinando diferentes efectos negativos sobre el aparato fotosintético de *C. reinhardtii*, se encontró que el Cd induce efectos inhibitorios sobre el sistema

disociador de agua y en el fotosistema I, así mismo disminuye la capacidad de transporte electrónico en ambos fotosistemas.

Dias *et al.* (2013) reportaron que la exposición de lechuga a 1 μM de Cd afectó el crecimiento de la planta (biomasa seca), pero, no indujo daños graves en el aparato fotosintético. Sin embargo, el aumento de las concentraciones de este metal a 10 y 50 μM promovió una fuerte reducción de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII y un deterioro de la tasa neta de asimilación de CO_2 . Se ha observado en algunos estudios que los efectos de los metales pesados en la fotosíntesis se pueden deber principalmente a la inhibición de las enzimas del ciclo de Calvin, localizadas en el estroma del cloroplasto, provocando una disminución en la asimilación de CO_2 (Sheoran *et al.*, 1999).

4. Mecanismos de tolerancia en algas a metales pesados

Los mecanismos de las microalgas para tolerar altas concentraciones de metales tóxicos, se pueden dividir en tres grandes categorías. El primero; comprende mecanismos que secuestran los metales en los componentes extracelulares que reducen la biodisponibilidad de los metales, la entrada en la célula y la concentración intracelular. El segundo aumenta el flujo de salida de metales desde la célula. El tercero incluye varios tipos de desintoxicación intracelular, los cuales incluyen el secuestro de cuerpos de polifosfato, fitoquelatinas y metalotioneínas, o la unión a quelantes fuertes. La desintoxicación también puede implicar la oxidación o reducción de metales de transición para producir estados menos tóxicos o menos solubles (Gaur y Rai, 2001).

4.1 Componentes extracelulares

La unión de los iones metálicos en componentes extracelulares y paredes celulares, es uno de los principales mecanismos de tolerancia a metales en algas y otros microorganismos. La pared celular de las algas tienen muchos grupos funcionales, tales como, hidroxilo (OH), fosforilo (PO_3O_2), amino (NH_2), carboxilo (COOH), sulfhidrilo (SH), etc, que confieren una carga negativa a la superficie celular. Puesto que los iones

metálicos en el agua se encuentran generalmente como cationes, estos son adsorbidos por la superficie celular (Crist *et al.*, 1981). Estos grupos funcionales se encuentran asociados con varios componentes de la pared celular, por ejemplo, peptidoglicano, ácidos teicurónicos, ácido teicoico, polisacáridos y proteínas. Entre los diferentes constituyentes de la pared celular, los polisacáridos y las proteínas tienen la mayor parte de los sitios de unión de metal (Mehta y Gaur, 2005).

Algunos estudios han demostrado que la unión de metales con materiales orgánicos excretados son ambientalmente más significativos que la unión del metal sobre la superficie de células algales (González-Davila *et al.*, 1995; Muller y Kester, 1991). Los materiales excretados por las algas consisten en una amplia variedad de compuestos, incluyendo carbohidratos, proteínas, y lípidos. La actividad de los microorganismos y el metabolismo, y la asociación de metales con sus productos de excreción son importantes, ya que pueden promover la solubilización de iones, afectando su especiación. Esto puede hacer que los iones metálicos se encuentren más o menos disponibles para la biota. Sin embargo, esta capacidad varía en función del organismo que produce los materiales orgánicos y con la fase de crecimiento (Tonietto *et al.*, 2014).

4.2 Exclusión de iones metálicos

El flujo de salida de metal se considera como un mecanismo activo que requiere gasto de energía. Sin embargo, Jin *et al.*, (1996) sugirieron que el flujo de salida de Níquel en algunas cepas de *Scenedesmus acutus* ocurre por difusión pasiva en la oscuridad después de que se transfirieron a medio libre de Níquel. Verma y Singh (1991) mostraron la presencia de un sistema de eflujo de Cu, dependiente de energía en un mutante de *Nostoc calcicola* resistente a Cu. Un mecanismo de expulsión activa también ha sido sugerido para la tolerancia de *Cyanidium caldarium* al aluminio (Yoshimura *et al.*, 199).

De Filippis (1978) presentó evidencia de que *Chlorella sp.* tiene un sistema enzimático general para la reducción de compuestos de mercurio (cloruro de mercurio y fenil

acetato de mercurio) al mercurio metálico (Hg^0), que se volatiliza y pierde de la célula rápidamente. Este sistema utiliza NADPH o en menor medida NADH.

4.3 Mecanismos de desintoxicación intracelulares

Las algas, plantas y algunos hongos, sintetizan una familia de péptidos de unión a metal que contienen grupos sulfhidrilo (SH), llamadas fitoquelatinas, las cuales son unidades peptídicas repetidas de los aminoácidos Glutámico-Cisteina_(n=2-9)-Glicina. Altas concentraciones de Cd, Cu, Zn, Ag, Au, Co, Ni y Bi, pueden inducir la síntesis de fitoquelatinas (Robinson *et al.*, 1993). Basándose en los datos disponibles sobre la posible participación de fitoquelatinas en la desintoxicación de metales, la secuencia de eventos se puede resumir en tres pasos: 1) la síntesis inducida de la enzima fitoquelatin sintasa, consiguiente a la acumulación intracelular de los metales pesados, resulta en la producción de fitoquelatinas, 2) una concentración decreciente de iones metálicos no unidos en el citosol mediante el secuestro/quelación por fitoquelatinas, y 3) la toxicidad reducida de metales reducido debido a la menor concentración de metales no unidos. Este proceso, en cierto modo, ofrece tolerancia a la célula porque este paso protege muchos atributos funcionales de la célula de la actividad de los iones metálicos. Vogeli-Lange y Wagner (1990) asigna una tarea adicional para la quelación de metal en el citosol, en el que las fitoquelatinas podrían funcionar como un transportador de metales desde el citoplasma hacia una vacuola (Gaur y Rai, 2001).

5. Biología de las algas

5.1 Definición y Clasificación

El término algas se refiere a un conjunto grande y diverso de organismos que contienen clorofila y llevan a cabo fotosíntesis oxigénica (Davis *et al.*, 2003). De acuerdo con esta definición, las plantas podrían ser consideradas como una división de algas. Sin embargo, las algas a diferencia de las plantas no poseen raíces, tallos, hojas, ni tejidos vasculares bien definidos. A pesar de que muchas algas podrían confundirse morfológicamente con plantas y algunas de ellas muestran especialización y diferenciación de células vegetativas, no forman embriones y carecen de células

estériles que los cubran. El desarrollo parenquimatoso está presente sólo en algunos grupos y tienen ciclos de vida tanto monogenéticos como digenéticos.

La profunda diversidad de tamaño va desde 0.2-2.0 mm de diámetro hasta las laminarias gigantes con hojas de hasta 60 m de longitud. La ecología y hábitats colonizados, estructura celular, los niveles de organización y morfología, pigmentos para la fotosíntesis, reserva y polisacáridos estructurales, y el tipo de historia de vida refleja la variedad de orígenes evolutivos de este conjunto heterogéneo de organismos, incluyendo especies tanto procariotas y eucariotas (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Un esquema provisional de clasificación de las algas se basa en la obra de Van Den Hoek *et al.* (1995) en donde los miembros procariotas de este conjunto se agrupan en dos divisiones: Cyanophyta y Prochlorophyta, mientras que los miembros eucariotas se agrupan en nueve divisiones: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta (Barsanti y Gualtieri, 2006).

5.2 *Chlorella* Beijerinck 1890.

Descripción: Células solitarias o agregados en grupos pequeños. Las células son generalmente esféricas raramente elipsoidales, ovales u ovadas. Poseen paredes celulares lisas. Núcleo único y excéntrico; cloroplasto único y parietal; pirenoide único y cubierta envolvente de almidón. La reproducción es asexual por autosporas, de 2 a 8 por célula. Especie tipo: *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890.

Se encuentra en todos los hábitats acuosos; es esencialmente cosmopolita en hábitats de agua dulce y marinos. Se han identificado alrededor de 100 especies en este género.

JUSTIFICACIÓN

Las actividades antropogénicas han provocado un aumento en las concentraciones de cadmio en los sistemas acuáticos, este incremento podría repercutir en los organismos fotosintéticos modificando aspectos poblacionales y fisiológicos. Si bien el efecto tóxico del Cadmio en estos organismos se ha comprobado por varios estudios, no se han establecido con certeza los sitios de inhibición y las concentraciones mínimas, en las cuales este metal podría modificar aspectos fisiológicos importantes, como la actividad fotosintética, y por ende afectar a las poblaciones algales en ambientes naturales.

III. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad fotoquímica de *Chlorella vulgaris* durante la exposición a Cd^{2+} .

Objetivos particulares

- Analizar el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de Cd^{2+} .
- Determinar el contenido de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de cadmio.
- Caracterizar la actividad fotosintética, por liberación de oxígeno en *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de Cd^{2+} .
- Caracterizar la actividad fotoquímica por emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII en *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de Cd^{2+} .

IV. METODOLOGÍA

1. Organismo

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

2. Medio de cultivo

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

Las células se mantuvieron en un régimen de cultivo en lote en las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (20-25°C), iluminación (200 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fotoperiodo (14/10 luz/oscuridad), y flujo de aire 200 $\text{ml}\cdot\text{m}^{-1}$. Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, botellas cuadradas de vidrio de 500 ml (Schott-Duran[®]) con una trayectoria de luz de 7.5 cm y un volumen de trabajo de 400 ml. Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, aproximadamente células de 72 h de cultivo.

3. Protocolo experimental

El efecto del Cd^{2+} en el metabolismo de *C. vulgaris* se estudió de acuerdo a los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias (OECD, 2004). Las unidades experimentales se inocularon a 0.1 de absorbancia a 750 nm., aproximadamente 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de peso seco.

En las condiciones de cultivo antes mencionadas, las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de Cd^{2+} : 0 (testigo), 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 μM . Los cultivos se expusieron al metal por 72 h de acuerdo al protocolo de la OECD, para después determinar el peso seco (PS), el contenido de pigmentos fotosintéticos y la actividad fotosintética.

4. Variables de respuesta

a. Crecimiento

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

La tasa de crecimiento relativo (μ) se determinó según la siguiente fórmula: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / 72$. Donde X_2 es el peso a las 72 horas y X_1 es el peso al tiempo 0. La tasa de duplicación celular (t_d) se calculó según la siguiente fórmula: $t_d = \ln 2 / \mu$.

b. Pigmentos fotosintéticos

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

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

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

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

c. Actividad fotosintética por oximetría.

Transcurrido el tiempo de exposición a Cadmio, se tomaron por triplicado de cada lote experimental, alícuotas de 10 ml o su equivalente en *densidad* óptica. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. La tasa fotosintética se midió como liberación de oxígeno. Las mediciones se realizaron en un oxímetro (Oxygraph, Hansatech[®], U.K.) a 30°C por medio de un baño de agua circulante. La tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis) se realizó iluminando la muestra con luz blanca actínica (400-700nm) y un flujo fotónico de 400 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

d. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad por 20 minutos, se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK). Se tomaron muestras de 2 ml de cada tratamiento (n=8) y fueron incubadas a la oscuridad por 20 min a temperatura ambiente (25°C), para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante (3000 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la fluorescencia mínima, F_0 a los 50 μs , la fluorescencia máxima, F_m a los 200 ms y la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, U.K.) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Los parámetros medidos (tabla 3) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (van Heerden *et al.*, 2004).

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	F_0	
Fluorescencia máxima	F_M	
Fluorescencia variable	F_v	$= F_M - F_0$
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	M_0	$= 4 \cdot [(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)]$
Fluorescencia variable a 2 ms	V_j	$= (F_{2ms} - F_0)/(F_M - F_0)$
Fluorescencia variable a 30 ms	V_i	$= (F_{30ms} - F_0)/(F_M - F_0)$
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	$= (M_0/V_j)/(1 - F_0/F_M)$
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TR_0/RC	$= M_0/V_j = (ABS/RC) \cdot \phi P_0$
Disipación a tiempo 0 por RC	DI_0/RC	$= (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ET_0/RC	$= (TR_0/RC) \cdot \psi_0$
Productos (o relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕP_0	$= TR_0/ABS = (F_M - F_0)/F_M = F_v/F_M$
Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica	ϕD_0	$= DI_0/ABS = 1 - \phi P_0 = F_0/F_M$
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de QA	ψ_0	$= ET_0/TR_0 = 1 - V_j$
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	ϕE_0	$= \phi P_0 \cdot \psi_0 = (TR_0/ABS)/(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_M)(1 - V_j)$

Rendimientos cuánticos y eficiencias		
Flujo específico de transferencia de electrones de Q_B hasta el lado aceptor del PSI	$(TR_0/RC) \cdot (1 - V_i)$	$= M_0/V_j \cdot (1 - V_i)$
Eficiencia con la que un electrón de los transportadores de electrones entre sistemas se mueve para reducir el lado aceptor del PSI	δR_0	$= (1 - V_i)/(1 - V_j)$
Eficiencia cuántica para el transporte de electrones en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del PSI	ΦR_0	$[1 - (F_0/F_M)] \psi_0 \phi E_0 \delta R_0$
Índices vitales		
Índice de rendimiento en base a la absorbancia	PI_{ABS}	$= [RC/ABS][\phi P_0/(1 - \phi P_0)][\psi_0/(1 - \psi_0)]$
Índice de rendimiento total	PI_{TOTAL}	$= PI_{ABS} \cdot \delta R_0 / (1 - \delta R_0)$

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP (van Hereden *et al.*, 2004).

El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico se realizó utilizando un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). La eficiencia cuántica operacional del fotosistema II (Φ_{PSII}), se registró por la técnica de

pulsos modulados (PAM por sus siglas en inglés). El valor de FO a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ($0.1 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), después de 60 s se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia FM. La fluorescencia estacionaria FS, se obtuvo utilizando una luz actínica de $900 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El valor de fluorescencia máxima en estado estacionario FM' se obtuvo sobreponiendo un pulso de luz blanca saturante de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s. La fluorescencia mínima FO' en estado estacionario se obtuvo apagando la luz roja e irradiando con luz infrarroja de 750 nm a baja intensidad, $5 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En base a la cinética y valores de fluorescencia puntuales se obtuvieron los siguientes valores: El rendimiento máximo para la fotoquímica primaria (FV/FM) y la eficiencia cuántica operacional del PSII ($\Phi_{\text{PSII}} = \text{FM}' - \text{FS} / \text{FM}'$) (Maxwell y Johnson, 2000).

El decaimiento fotoquímico (NPQ) se determinó incubando las muestras en la oscuridad por 20 minutos. El valor de FO a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ($0.1 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), y después de 10 s se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia FM en oscuridad. Inmediatamente después del pulso saturante se irradiaron las muestras con una luz actínica blanca no saturante a $200 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por cinco minutos hasta alcanzar un estado estacionario y entonces sobreponer un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0.8 s y obtener el valor de FM'. La eficiencia cuántica para la disipación no fotoquímica (NPQ) se calculó utilizando la fórmula reportada por (Maxwell y Johnson, 2000).

$$\text{NPQ} = \text{Fm} - \text{Fm}' / \text{Fm}'$$

5. Análisis estadísticos

Las variables de respuesta se analizaron mediante un Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, con al menos una diferencia significativa estadísticamente (Prueba de Tukey), para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS®.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Crecimiento

Los resultados de crecimiento medido por peso seco muestran que la adición de Cd^{2+} afecta significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de *C. vulgaris*, disminuyendo progresivamente hasta un 75.79% en la máxima concentración ($1.2 \mu\text{M}$). La concentración efectiva media para inhibir el 50% de crecimiento (CE_{50}) se calculó en $0.65 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} después de 72h (Fig. 1). Kaplan *et al.* (1995) reportaron que la inhibición del 50% de crecimiento en *Chlorella sp.* se da a una concentración de $3 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , Qian y colaboradores en 2009 calcularon el valor CE_{50} de Cd en $4.68 \mu\text{M}$ para *C. vulgaris*, estos resultados indican que el efecto del Cd^{2+} sobre el crecimiento pueden variar dependiendo del tiempo de exposición al metal, de la especie utilizada, de la composición del medio de cultivo, entre otros factores. En el presente estudio se utilizó un medio libre de EDTA, este aspecto es importante ya que se ha demostrado que la presencia de EDTA posee una correlación negativa con la adsorción y la inhibición del crecimiento de algas por metales pesados (Ma *et al.*, 2003), a lo cual se le atribuye principalmente que la CE_{50} sea menor que en otros estudios con el mismo metal, tiempo de exposición y especie utilizada.

Una cantidad excesiva de Cd en medio de cultivo conduce a una grave inhibición del crecimiento celular en microalgas (Huang *et al.*, 2009). En varios estudios el cadmio ha demostrado perturbar la nutrición en organismos fotosintéticos, al presentar una correlación negativa en la captación de cationes esenciales, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , ya que el Cd^{2+} podría impedir su transporte al utilizar sus respectivos transportadores de membrana (Daud *et al.*, 2009). La adquisición de nutrientes esenciales en cantidades requeridas es importante para el crecimiento óptimo de los organismos, ya que son componentes estructurales o funcionales de las células.

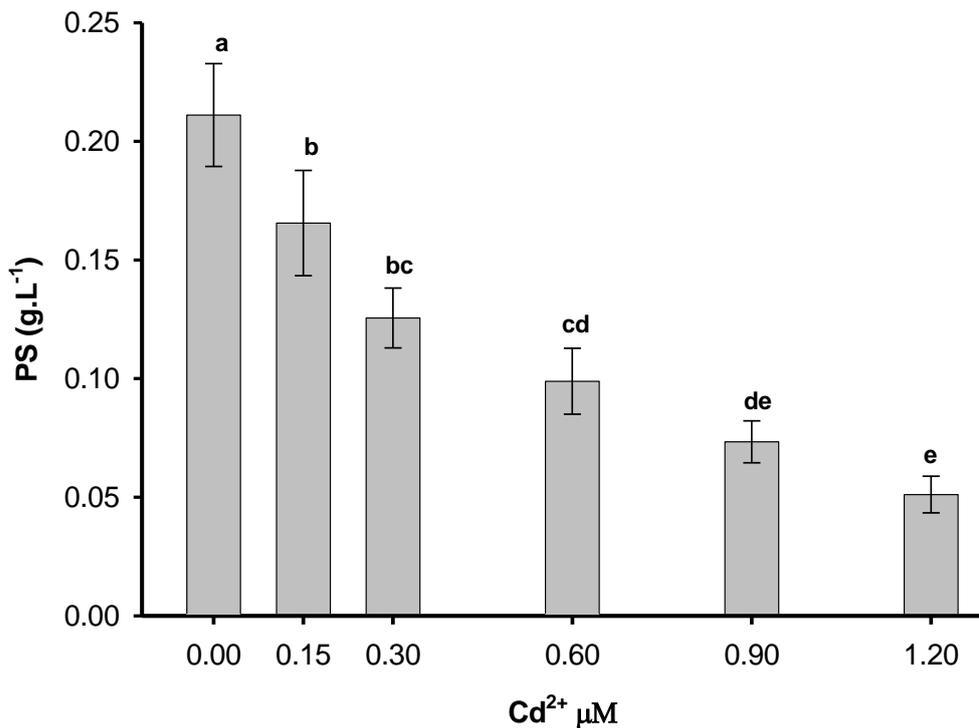


Figura 1. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el crecimiento de *C. vulgaris* traducido en peso seco al término del tratamiento (72 hrs.) n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Se ha observado una disminución en la fijación de CO₂ por parte de la enzima Rubisco en organismos expuestos a Cadmio, los iones interfieren con su activación, reducen su actividad y causan daño en su estructura mediante la sustitución de iones Mg²⁺, que son cofactores importantes de las reacciones de carboxilación (Pietrini *et al.*, 2003). Una disminución en la asimilación de CO₂ podría ser el resultado de la influencia del Cd sobre las actividades de las enzimas del ciclo fotosintético de la reducción de carbono. Estudios anteriores han demostrado que los efectos de los metales pesados en la fotosíntesis se debieron principalmente a la inhibición de las enzimas del ciclo de Calvin, localizadas en el estroma del cloroplasto (Sheoran *et al.*, 1990). Sin embargo, Ying *et al.* (2010) observaron que las enzimas analizadas en *Picris divaricata* (Rubisco Fructosa-1-6,bifosfatasa y la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) eran tolerantes al Cd, aumentado o no modificando significativamente su actividad. Adicionalmente, el contenido de la Rubisco aumentó en los tratamientos con bajos niveles Cd. Estos

resultados podrían ser diferentes debido a las diferentes especies, la dosis de cadmio aplicado y el tiempo de tratamiento.

En la figura 2 se muestra la disminución de la tasa de crecimiento relativo de manera gradual hasta llegar a un 42.1% respecto al grupo testigo en la concentración más elevada (1.2 μ M).

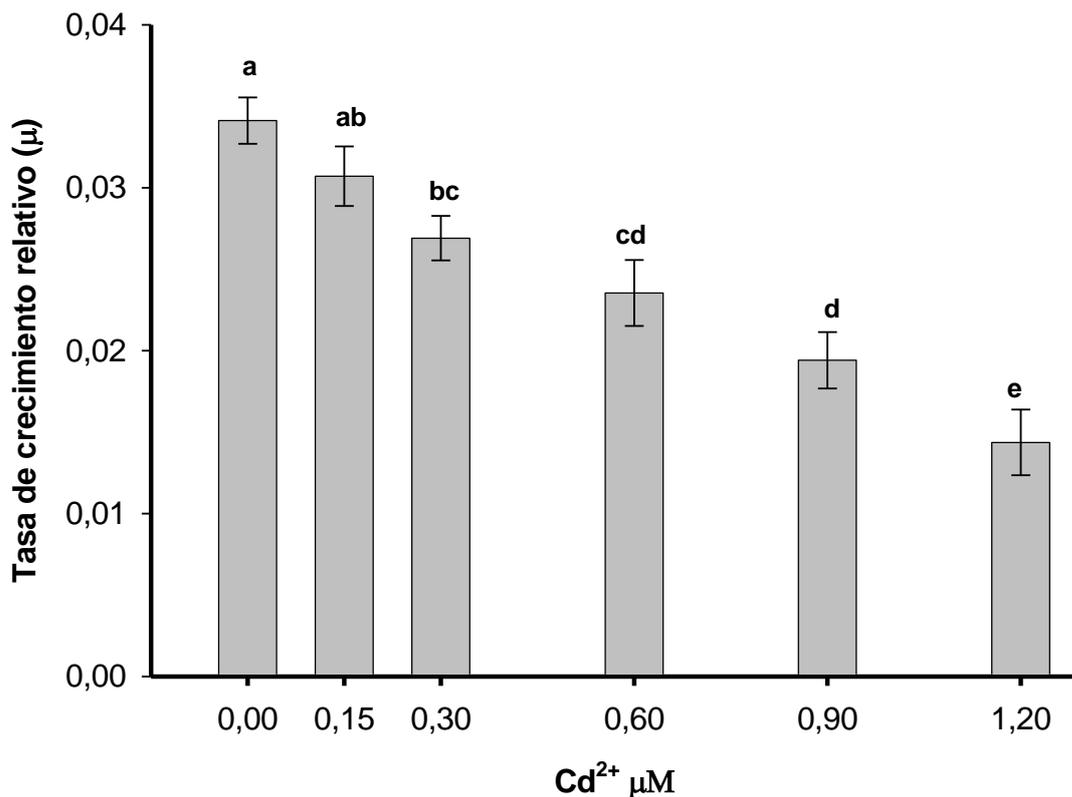


Figura 2. Efecto de las concentraciones cadmio sobre la velocidad de crecimiento (μ) de *C. vulgaris*. n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

En dosis altas de Cd, varios parámetros celulares (fotosíntesis, acumulación de nutrientes, estrés oxidativo y genotoxicidad) se ven afectados negativamente, lo cual en su conjunto contribuye a la reducción de la biomasa (Azevedo *et al.*, 2005), sin embargo esta reducción en el peso seco puede deberse principalmente a la genotoxicidad inducida y la división celular retardada (Monteiro *et al.*, 2012). La figura 3 indica que el tiempo en el cual el cultivo tarda en duplicarse aumenta a medida que

se incrementa la concentración del metal en el medio, el tiempo de duplicación de la población, se retrasó 28.5 h en las células expuestas a 1.2 μM .

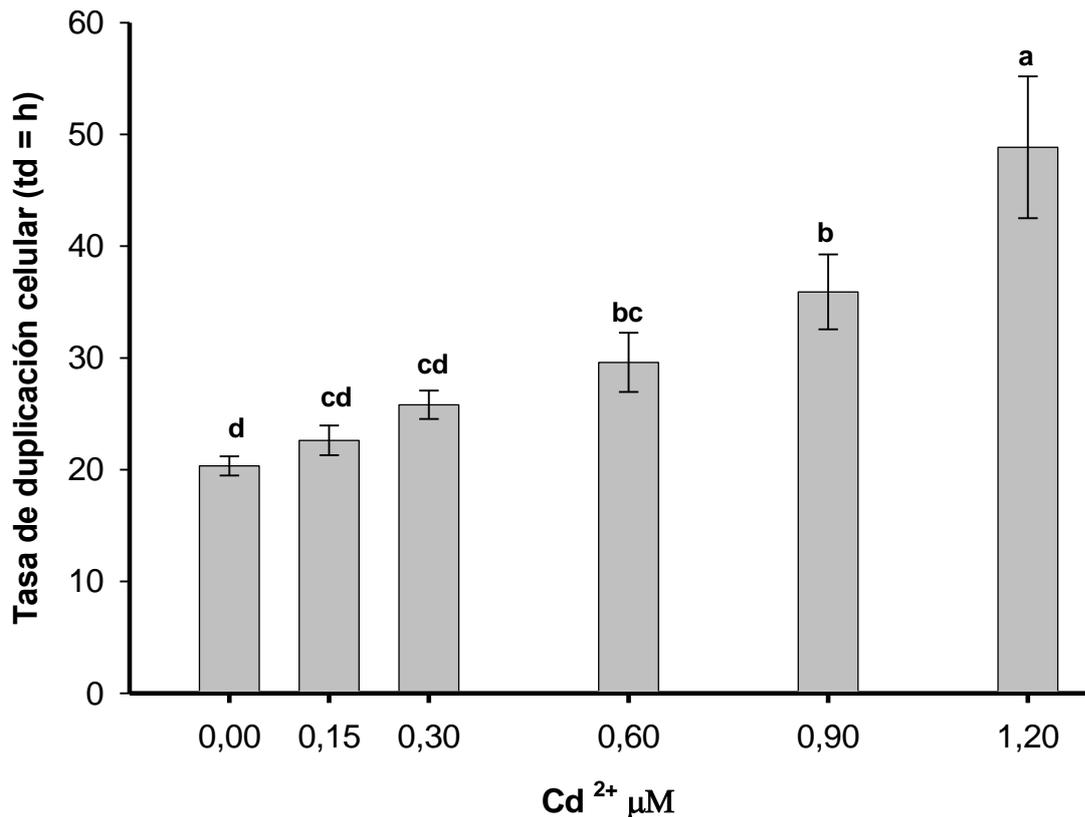


Figura 3. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el tiempo de duplicación celular (horas) de *C. vulgaris*. $n=3$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

La reducción en el crecimiento podría ser una consecuencia de la interferencia del Cd con un número de procesos metabólicos asociados con el desarrollo normal, especialmente: (1) la síntesis de proteínas (2) las actividades de algunas enzimas importantes por la unión a grupos amino o carboxilo libres; y (3) diversos procesos fotosintéticos tales como la biosíntesis de la clorofila, actividad fotosintética, o de transporte de electrones (Ouzounidou *et al.*, 1997).

B. Contenido de clorofila y carotenoides totales

El tratamiento con Cd^{2+} disminuyó el contenido de clorofila total específica al aumentar la concentración del metal en el medio, hasta un 77% en la concentración más elevada (Fig. 4). Estos resultados concuerdan con otros estudios en donde el Cd ha demostrado inhibir la síntesis de clorofila en cianobacterias y microalgas (Neelam y Rai, 2003; Zhou *et al.*, 2006). La disminución en el contenido de clorofila también se ha observado en la cebada (Vassilev *et al.*, 2002.), tomate (Ammar *et al.*, 2008; López-Millán *et al.*, 2009) y maíz (Ekmekci *et al.*, 2008) expuestos a Cd.

Un mecanismo propuesto es la acción directa del Cd sobre las enzimas de la ruta de biosíntesis de clorofila (Aravind y Prasad, 2004). Se ha observado que el Cd interfiere con la biosíntesis de la clorofila mediante la inhibición en la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), así como la inhibición de la protoclorofila reductasa (Li, 2012), la enzima clave de fototransformación de la protoclorofila a clorofilida (Stobart *et al.*, 1985). En contraste, Padmaja *et al.* (1990) han demostrado que el cadmio interactúa principalmente con la biosíntesis de la clorofila antes de la formación de la protoclorofila mediante la inhibición de ALA deshidratasa. Dado que esta enzima requiere grupos tiol libres en su sitio de unión para la actividad enzimática (Nandi y Shemin, 1968), se asumió que la inhibición se debió a la unión del cadmio con los grupos -SH en el sitio activo de la enzima (Padmaja *et al.*, 1990).

Otro mecanismo propuesto, implica la sustitución *in vivo* de los iones Mg^{2+} en la molécula de Chl por iones de metales pesados; es decir, la formación de una molécula de clorofila sustituida con un metal pesado [Hms]-Chl (Küpper *et al.*, 1996). En *Elodea canadensis* se encontró una relación entre la capacidad de un ion de metal pesado para formar una molécula [Hms]-Chl y su toxicidad para las plantas, los iones que se observaron sustituyen al Mg fueron; Hg, Cu, Cd, Ni, Zn y Pb (Küpper *et al.*, 1996). Además, estudios anteriores demostraron la formación *in vivo* de [Hms]-Chls en cianobacterias (Kowalewska *et al.*, 1992) y algas unicelulares (Gross *et al.*, 1970; De Filippis, 1979).

El cadmio parece influir en otros procesos metabólicos que conducen a una alteración en el ensamble correcto de los complejos pigmento-proteína de los fotosistemas (Horvath *et al.*, 1996). La molécula [Cd]-Chl tiene una menor tendencia a unirse a ligandos axiales que [Mg]-Chl. Estos ligandos son necesarios para la unión de la clorofila a proteínas, que es necesario para el plegamiento correcto del LHCII, la formación de [Cd]-Chl dará lugar a la posterior desnaturalización del LHCII (Andresem y Küpper, 2013). Igualmente se ha observado que el Cd provoca la inhibición de la síntesis del ácido trans- Δ^3 -hexadecanoico (Krupa, 1987) necesario para la oligomerización del LHCII (Trémolières *et al.*, 1981). Tanto la sustitución por el Cd en la molécula de clorofila como la alteración en el montaje de los complejos pigmento-proteína, podrían provocar una posterior degradación de la clorofila en los sistemas (Küpper *et al.*, 1998).

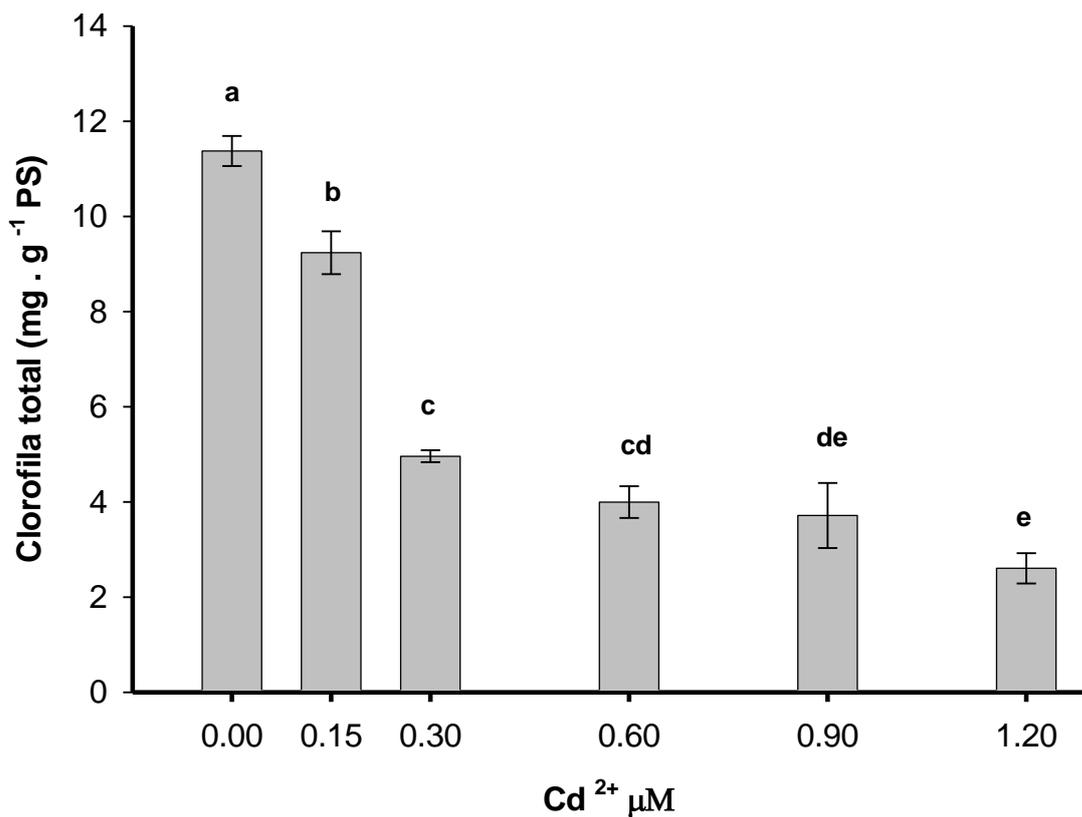


Figura 4. Efecto del cadmio en el contenido de clorofila total por Peso seco en *C. vulgaris* n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

El aumento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de carotenoides (Fig. 5) en células de *C. vulgaris* expuestas a concentraciones de 0.6, 0.9 y 1.2 μM de Cd^{2+} puede deberse a un intento de proteger el aparato fotosintético contra los daños fotooxidativos por radicales libres de oxígeno (Choudhury y Behera, 2001). Los carotenoides actúan como pigmentos captadores de luz, y pueden proteger a la clorofila y la destrucción de membranas, apagando o llevando a un estado basal a las clorofilas en estado triplete ($^3\text{Chl}^*$) y el oxígeno en estado de singlete ($^1\text{O}_2^*$) (Young, 1991).

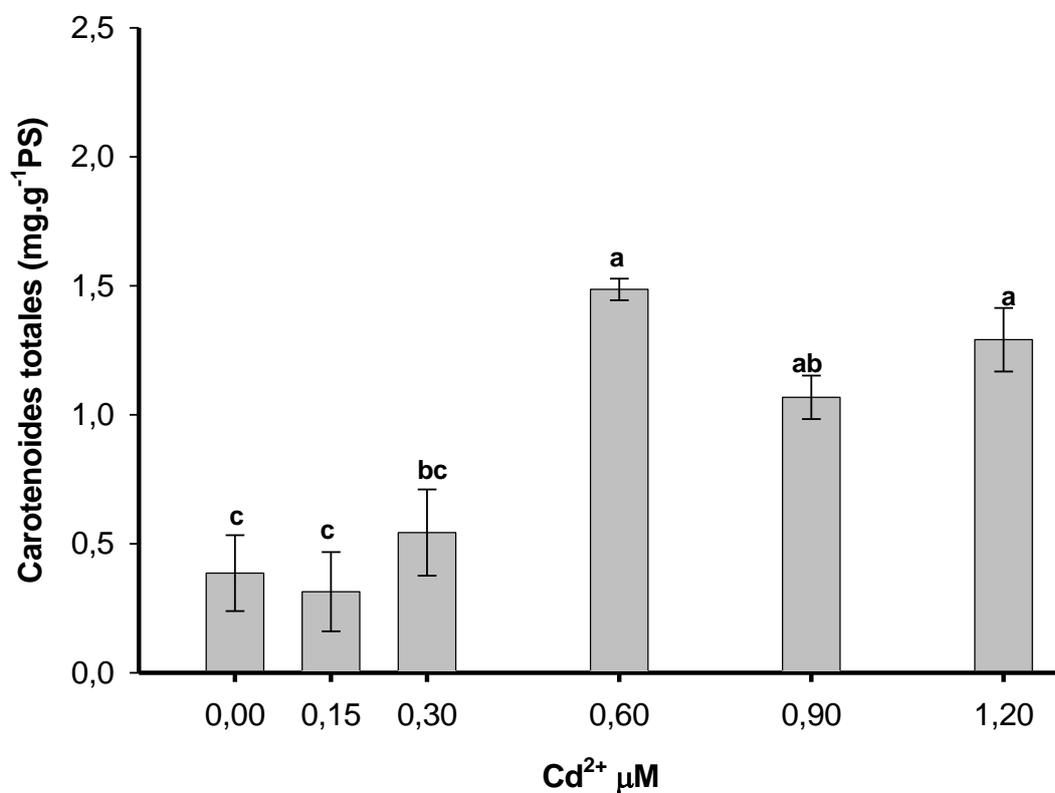


Figura 5. Efecto del cadmio en el contenido de carotenoides totales por Peso seco en *C.vulgaris* $n=3$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

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

La actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno, se muestra en la fig. 6 en donde la liberación de oxígeno del grupo testigo es de $(82.97 \pm 3.52 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl. h}^{-1})$, con diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de 0.9 y 1.2 μM , al disminuir en un 46.7 y 58% respectivamente.

Wang *et al.*, (2013) observaron que en concentraciones de 1 μM o inferiores, el cadmio no presenta ningún efecto sobre la evolución de oxígeno, la respiración y la actividad del PSI, de *Chlorella pyrenoidosa*. Sin embargo diversos estudios han reportado una disminución en la liberación de oxígeno en algas y cianobacterias sometidas a tratamientos con Cadmio (Stobart *et al.*, 1985; Ata *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1996). Estudios en cloroplastos aislados indicaron que la inhibición de la fotosíntesis por Cd^{2+} se realiza en el lado donador del PSII, es decir, alrededor del complejo liberador de oxígeno CLO (Vrettos *et al.*, 2001). Durante el ensamble de PSII a su estado funcional, este centro catalítico es la última unidad introducida. Este último paso se llama foto-activación, porque aparte de los cofactores Mn^{2+} y Ca^{2+} , también es necesaria la luz. La foto-activación es un proceso muy frecuente, debido al alto recambio de la proteína D1, donde se encuentra el centro catalítico del PSII.

Sigfridsson *et al.*, (2004) establecieron al menos tres sitios que parecen ser afectados por el Cd en el proceso fotosintético. Uno de los sitios, es el clúster de $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$, la sustitución de Cd^{2+} por Ca en este sitio da como resultado la inhibición de la liberación de oxígeno. Faller y colaboradores (2005) sugieren que el Cd^{2+} inhibe la fotoactivación en concentraciones bajas (μM) por su unión a un sitio esencial de Ca^{2+} , ya que durante el montaje existe una menor selectividad del sitio de unión a metal para el metal nativo durante el montaje y/o plegado de proteínas y por lo tanto la proteína es ocupada por otros iones más fácilmente. Estos iones no nativos pueden dar lugar a una pérdida de actividad de la proteína, lo que podría tener efectos tóxicos. Estas observaciones tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, apoyan la idea de que en

entornos contaminados con cadmio, uno de los principales efectos adversos de este metal es la fotoinhibición del PSII (Pagliano *et al.*, 2006).

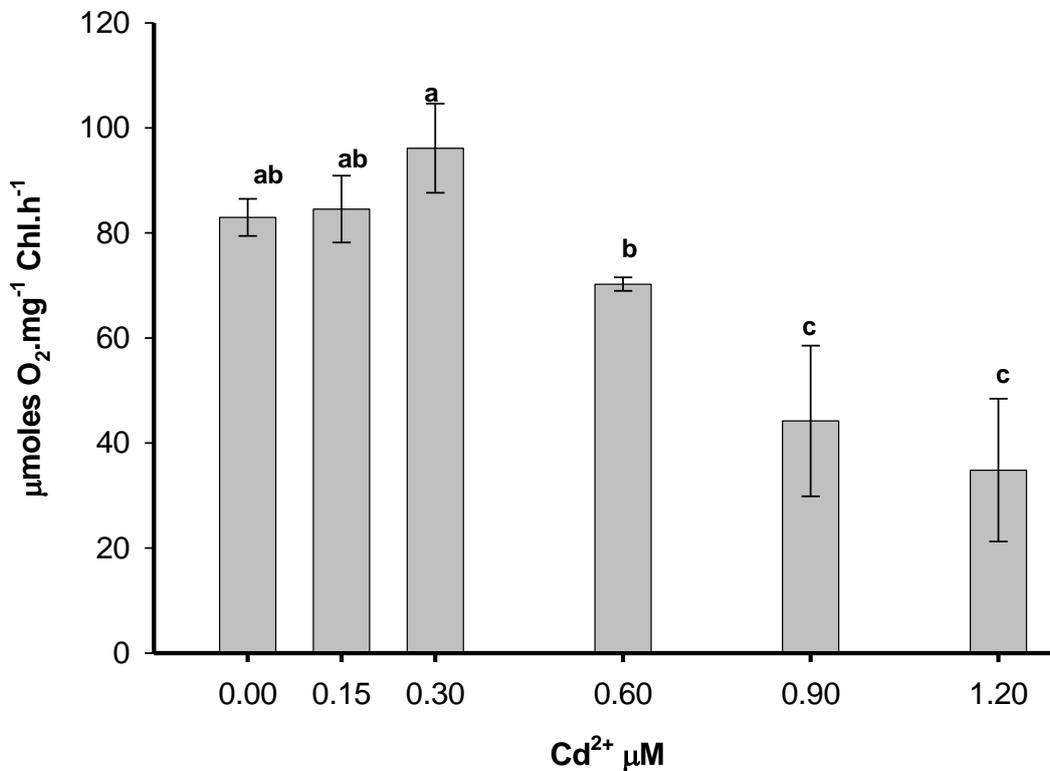


Figura 6. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la liberación fotosintética de oxígeno de *C. vulgaris*. n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Una disminución en la relación F_v/F_m indica una pérdida de la eficiencia del PSII que está generalmente relacionada con la fotoinhibición, regulación de la energía de excitación o a una modificación en la estructura y función del centro de reacción del fotosistema II (Pagliano *et al.*, 2006). La eficiencia fotoquímica primaria del fotosistema II a la luz (F_v/F_m) o lo que es equivalente al número de centros de reacción abiertos, no disminuye a concentraciones bajas, sin embargo disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de 0.9 y 1.2 μM respecto al grupo testigo. El F_v/F_m es la eficiencia cuántica máxima del PSII, en el que la luz absorbida se utiliza para la reducción de la aceptor primario (Q_A) y se utiliza generalmente como un indicador preciso de la eficacia fotosintética (Rod *et al.*, 2012). En plantas de lechuga expuestas a

bajas concentraciones de Cd (1 μM) no se presentaron efectos negativos sobre la Fv/Fm (Dias *et al.*, 2012). Sin embargo, la exposición de plantas de lechuga a 10 y 50 μM , trajo como resultado una reducción de Fv/Fm. Esta respuesta es típica de las plantas estresadas e indica una menor eficiencia en la captación de luz (Dias *et al.*, 2013).

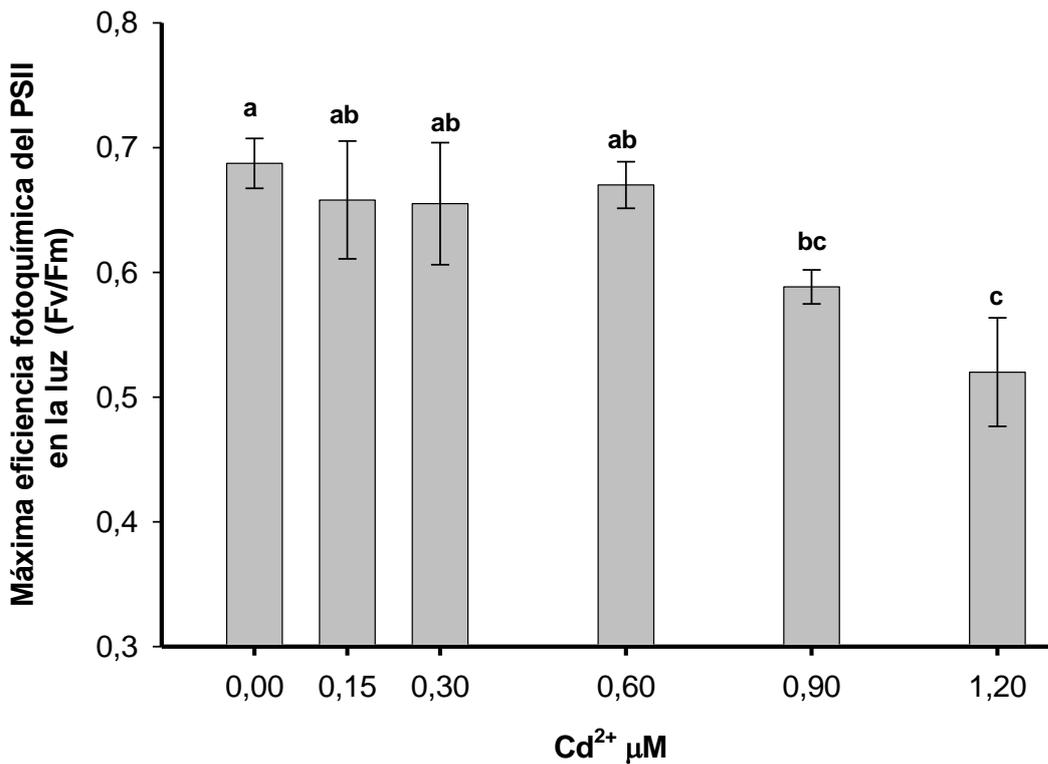


Figura 7. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la máxima eficiencia fotoquímica del PSII en la luz, en *C. vulgaris*. n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

La eficiencia cuántica operacional (ΦPSII), mide la proporción de energía absorbida que es usada para impulsar el proceso fotoquímico en una condición lumínica dada. De este modo, es una medida de la eficiencia del transporte electrónico lineal. Este parámetro proporciona una imagen más exacta del funcionamiento del transporte electrónico, ya que refleja la capacidad fotosintética del sistema para mantener abiertos los centros de reacción en la luz. La disminución de ΦPSII , indica que el metal produce un incremento en el cierre de los centros de reacción, y por lo tanto una disminución en el transporte electrónico fotosintético, lo cual afecta directamente la

asimilación de CO₂. Se ha observado que bajo condiciones de laboratorio hay una relación lineal entre la eficiencia cuántica operacional (Φ_{PSII}) y la eficiencia en la fijación de carbono, aunque puede haber variaciones debido a cambios en la fotorrespiración o el flujo pseudocíclico (Maxwell y Johnson, 2000).

La eficiencia cuántica operacional (Φ_{PSII}), se usa para calcular la tasa de transporte electrónico (ETR) a determinada condición lumínica. El transporte electrónico tiende a disminuir a medida que aumenta la concentración del metal en el medio, con diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de 0.6, 0.9 y 1.2 μM respecto al grupo control (Fig. 8). Wu y colaboradores (2014) midieron la tasa de transporte electrónico (ETR), fotofosforilación y la actividad de la Ca²⁺-ATPasa, encontrando que concentraciones de 100 μM de cadmio disminuyen significativamente el valor de ETR en plántulas de arroz. Igualmente en comparación con el control, el estrés por cadmio provoca una seria inhibición en la fotofosforilación, y la actividad de Ca²⁺-ATPasa, disminuyendo en 28.02 y 62.3%, respectivamente, lo cual conduce a una disminución en la reducción del CO₂, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio en donde el tratamiento con Cadmio provoca una inhibición en el crecimiento medido por biomasa seca.

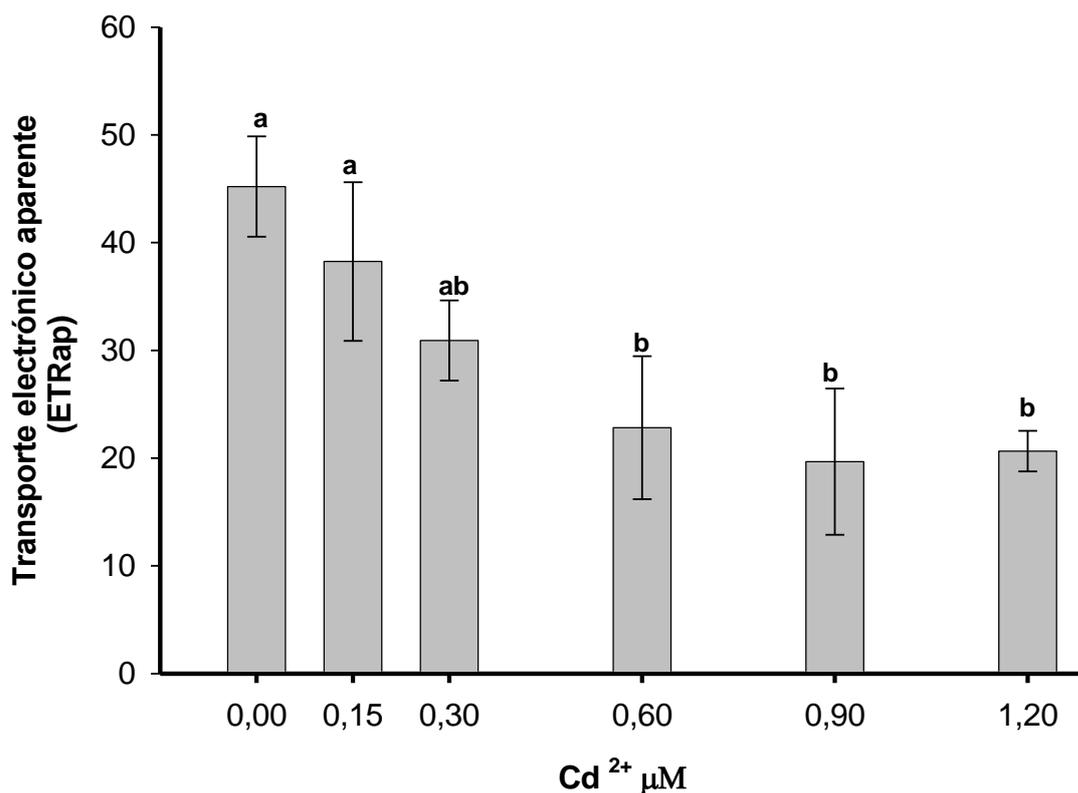


Figura 8. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el transporte electrónico aparente en *C. vulgaris*. n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Los organismos fotosintéticos poseen procesos fotoprotectores, para reducir al mínimo condiciones de estrés, procesos especialmente vinculados a la disipación del exceso de energía absorbida que no está siendo utilizada para el proceso fotoquímico. El decaimiento No-fotoquímico (NPQ) es uno de los más importantes mecanismos para la regulación rápida de la fotosíntesis en plantas superiores y algas (Szabo *et al.*, 2005; Demmig-Adams y Adams 2006; Lavaud, 2007). NPQ, es la suma de diferentes mecanismos que contribuyen a la disipación total de calor. Este término refleja la influencia de procesos no fotoquímicos en la emisión de fluorescencia de la clorofila durante la transición de una muestra del estado adaptado a la oscuridad al estado adaptado a la luz, como cambios en el gradiente de pH transtilacoidal, inactivación de centros de reacción (fotoinhibición) y cambios conformacionales dentro de los complejos de pigmentos en la membrana tilacoide, desconexión de complejos cosechadores de luz móviles del PSII y formación de zeaxantina. En este estudio NPQ

aumenta (Figura 9) al agregar cadmio al medio, observándose diferencias significativas en al menos en un par de medias ($p < 0.05$). Este aumento en NPQ está relacionado con la disminución de la eficiencia fotoquímica primaria a la luz (F_v/F_m), ya que cuando la energía de excitación disponible excede la capacidad fotoquímica, puede ser disipada en forma de calor antes de que llegue el centro de reacción PSII.

La acumulación de energía de excitación que no puede ser eficientemente canalizada hacia la ruta fotoquímica provoca la rápida destrucción de una de las subunidades proteicas del PS II, la proteína D1. En ese momento se interrumpe el transporte electrónico y disminuye la eficiencia del PS II. Cuando la tasa de destrucción de D1 supera la de síntesis y reparación se acumulan fotosistemas inactivos, incrementa la carga energética del sistema que no puede ser transferida y los diferentes componentes moleculares del entorno pueden resultar irreversiblemente dañados. Durante el proceso fotoquímico el transporte de electrones en los transportadores de la membrana tilacoidal conlleva el bombeo de protones desde el estroma cloroplástico al lumen tilacoidal donde se acumulan.

Esta acumulación implica una disminución del pH en el interior del lumen hecho que dispara la activación de la enzima violaxantina deepoxidasa, localizada en la cara interna de los sacos tilacoidales. Esta enzima es la encargada de transformar el diepóxido violaxantina en zeaxantina deepoxidada a través del intermediario monoepoxidado anteraxantina. En cada paso la violaxantina pierde uno de los dos grupos epoxi que posee en cada uno sus anillos. Esto implica un alargamiento del sistema de dobles enlaces conjugados pasando de 9 en violaxantina a 10 en anteraxantina y 11 en zeaxantina, esta es capaz de recibir la energía directamente de la clorofila excitada disipándola posteriormente en forma de calor, sin emisión de radiación (Manrique, 2013).

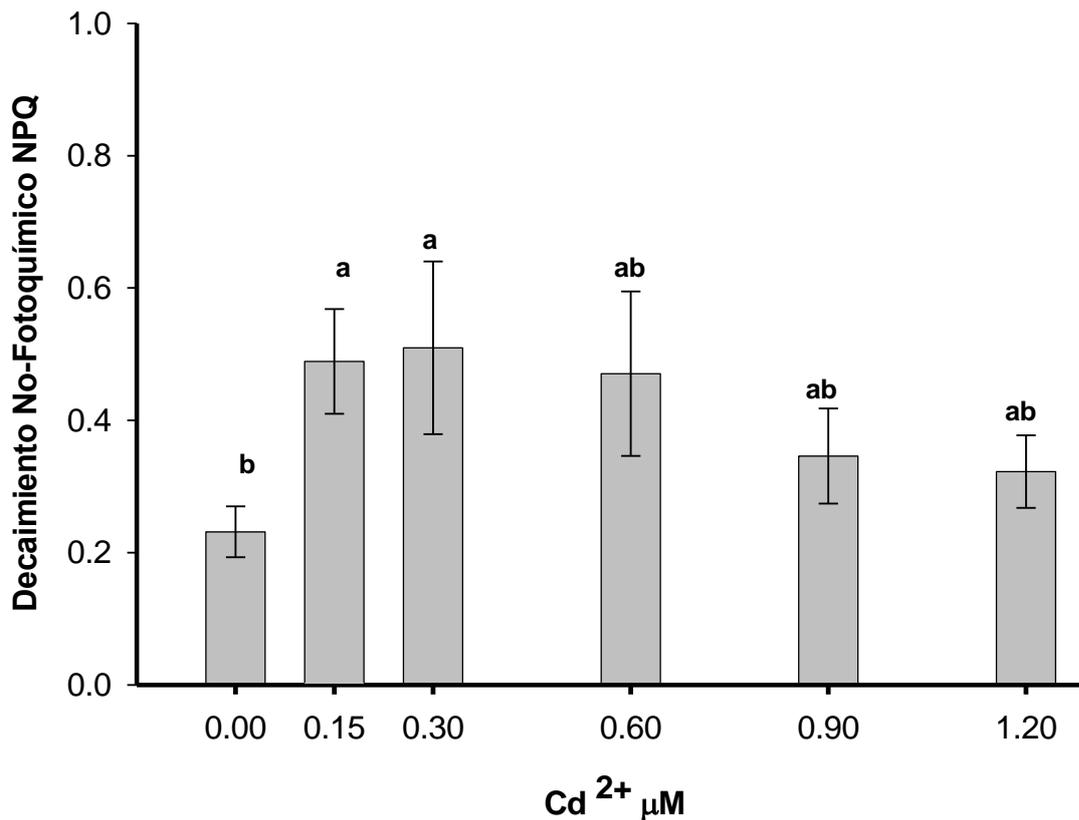


Figura 9. Decaimiento No-Fotoquímico NPQ en células de *Chlorella vulgaris* sometidas a tratamiento con cadmio n=3. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

D. Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila α del fotosistema II

El evento inicial en la fotosíntesis oxigénica, es la absorción de la luz por los complejos antena. La energía de excitación se transfiere de manera eficiente y rápidamente dentro de la antena, hasta que llega a los centros de reacción, donde la fotoquímica primaria se lleva a cabo. La parte de la energía de excitación que no se utiliza en la proceso fotoquímico, se disipa ya sea en forma de calor, o se remite en forma de fluorescencia, esta última siendo del 2-10 %. Dado que estos tres procesos, es decir, la fotoquímica, la disipación de calor, y la fluorescencia, no son independientes, sino que están en competencia unos con otros, el rendimiento de fluorescencia contiene información sobre la eficiencia de los otros dos procesos (Stirbet *et al.*, 2014).

La curva de Kautsky, también conocida como la curva de la inducción de fluorescencia, refleja los cambios en el estado redox del centro de reacción del fotosistema II (RCII), los cuales coinciden con los procesos primarios de la fotosíntesis tras la iluminación de un alga o de una hoja adaptada a la oscuridad. Este patrón fue descrito por primera vez por Kautsky y Hirsch en 1931. La curva de inducción de fluorescencia es un fenómeno complejo que se puede dividir en dos fases principales: una fase rápida (hasta 1 segundo) seguida de una fase lenta (varios minutos). La fase rápida recibe el nombre curva polifásica, por las inflexiones formadas, existiendo al menos 4, denominadas O, J, I y P, por lo cual la curva se le conoce como “curva OJIP” (figura 10), aunque otras inflexiones pueden aparecer bajo ciertas condiciones experimentales (Stirbet *et al.*, 2014).

La primera inflexión de la curva de la inducción de fluorescencia, denominada “O”, por ser el origen, representa un valor mínimo de la fluorescencia y es la fluorescencia emitida desde moléculas excitadas de Clorofila *a* en el complejo antena, antes que los excitones hallan migrado al centro de reacción. Esta primera inflexión se desarrolla entre los 10 a 50 μ s después de encendida la luz. La inflexión J, se desarrolla a los 2 ms y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A. La inflexión I, aparece alrededor de los 20 ms después de la iluminación y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B. El Rendimiento de fluorescencia continúa aumentando hasta que alcanza el punto de fluorescencia máxima (P) en este momento todos los centros de reacción están reducidos. P es el punto de fluorescencia máxima debido a que el flujo de electrones desde PQ a través del complejo b/f es el paso más lento de la cadena. El rápido aumento O-J en la fluorescencia representa la fase fotoquímica, esta fase es conocida como “fase luminosa” ya que es modificada con la intensidad lumínica. El aumento restante en rendimiento de fluorescencia desde J a su pico (P) representa la fase térmica, ya que se ve afectado por la temperatura (Lazar, 2006).

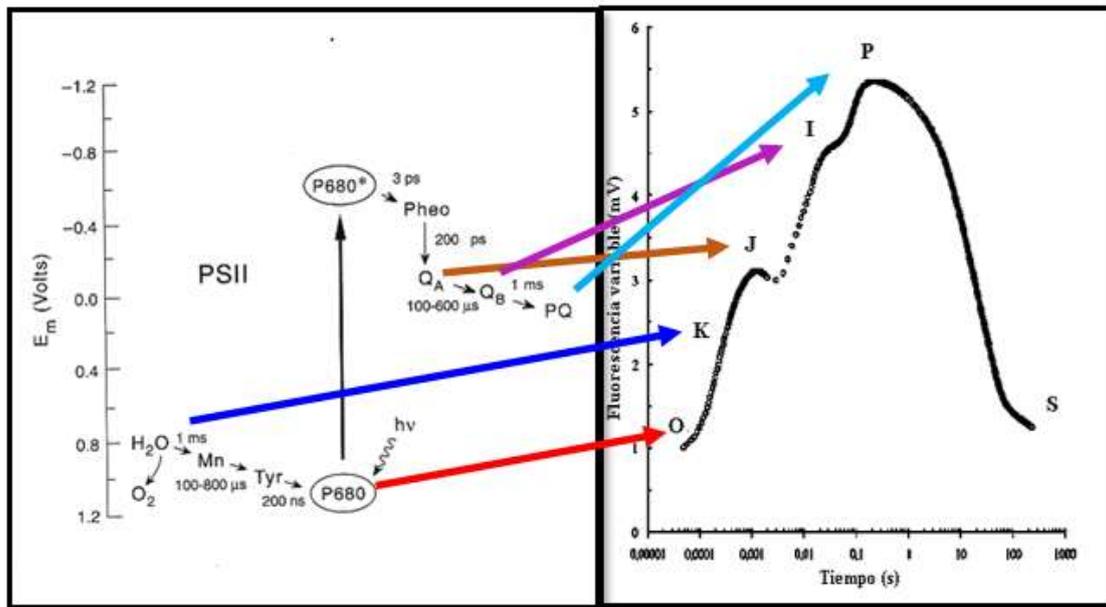


Figura 10. Curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a* (fases rápida) y su correspondencia con las reacciones de la cadena transportadora de electrones.

El modelo del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP permite el cálculo de los siguientes flujos:

- (1) Flujo absorbido (ABS)
- (2) Flujo atrapado (TR)
- (3) Flujo utilizado para el transporte electrónico en los acarreadores intermedios de la cadena (ET)
- (4) Flujo disipado como calor (DI)
- (5) Flujo utilizado para la reducción de los aceptores finales del lado aceptor del fotosistema PSI (RE)

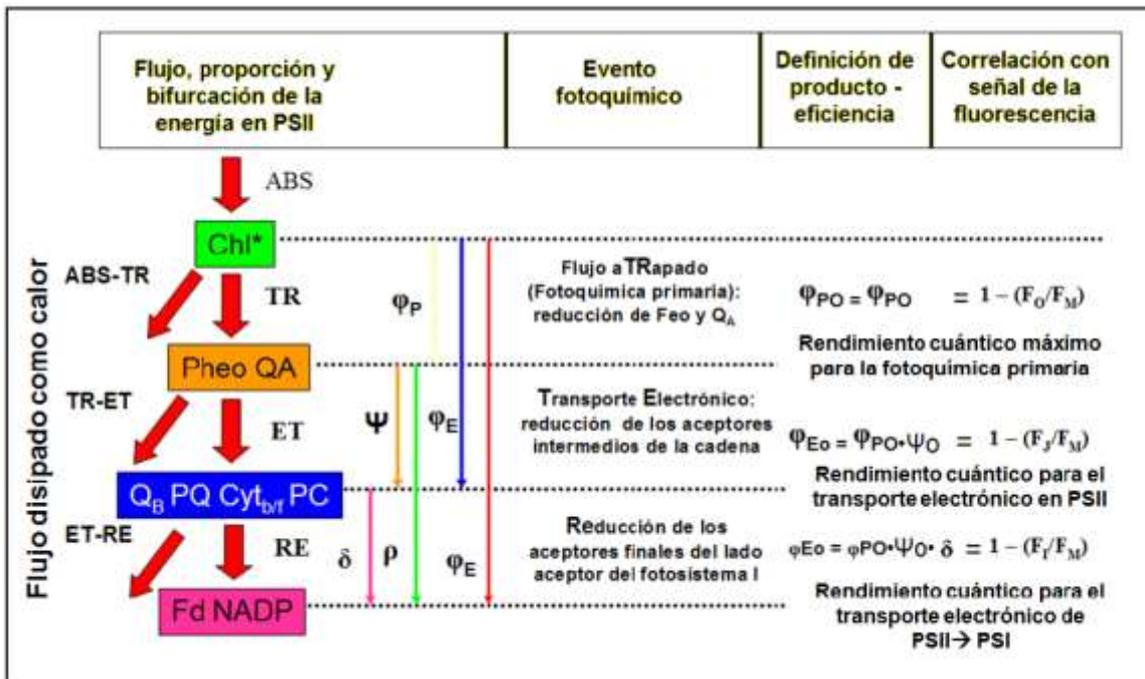


Figura 11. Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008).

La prueba OJIP considera cada una de las inflexiones de la curva, los valores extremos (F_0 y F_M), así como la pendiente inicial de la emisión de la fluorescencia de la clorofila a en PSII (M_0). Utilizando estos valores se pueden calcular los parámetros descritos en la tabla 1 (van Heerden *et al.*, 2003).

Como se puede observar en la figura 12, los valores de fluorescencia a tiempo o (F_0) y la fluorescencia máxima (F_M) tienden a disminuir a medida que aumenta la concentración del metal en el medio, lo cual indica que el cadmio provoca una reducción en el número de centros de reacción abiertos.

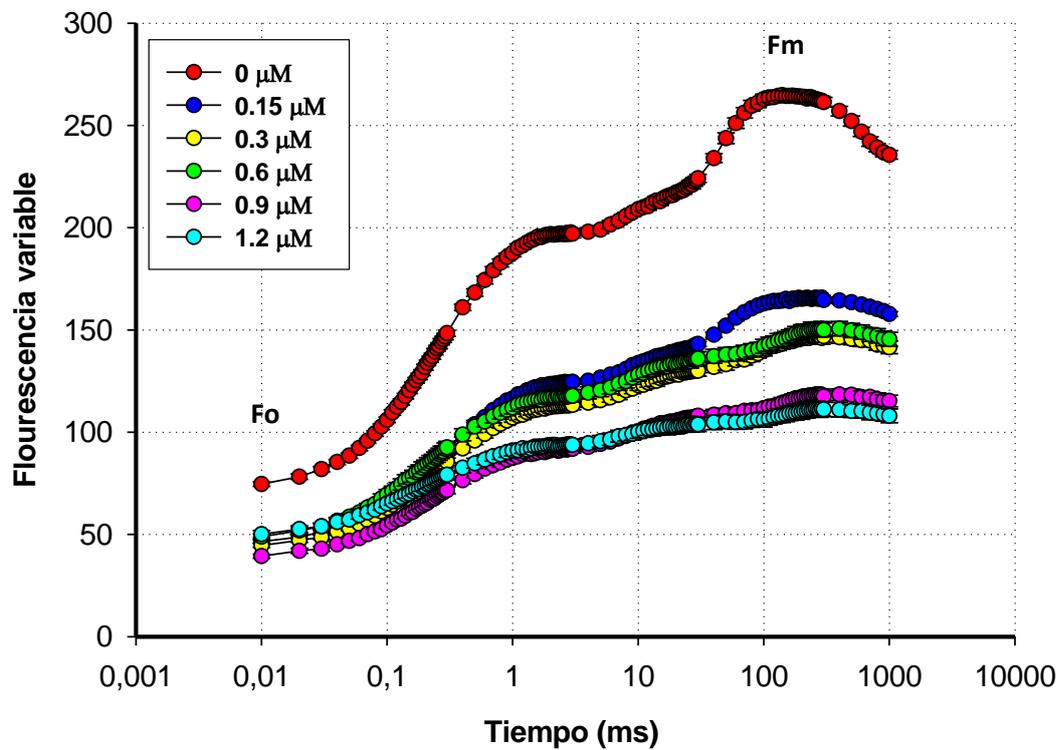


Figura 12. Efecto del cadmio sobre la fluorescencia variable en *C. vulgaris* n=8.

La figura 13 muestra los valores de fluorescencia graficados como fluorescencia relativa en tiempo logarítmico [$V_t = (F_t - F_o) / (F_m - F_o)$]. El cálculo de la fluorescencia variable relativa (V_t) permite visualizar de manera dinámica la reducción de Q_A en el tiempo de F_o a F_m . Los cambios en la cinética de OJIP se observan con más detalle cuando se grafica el cambio (Δ) dado entre el testigo y las muestras experimentales (Fig 14).

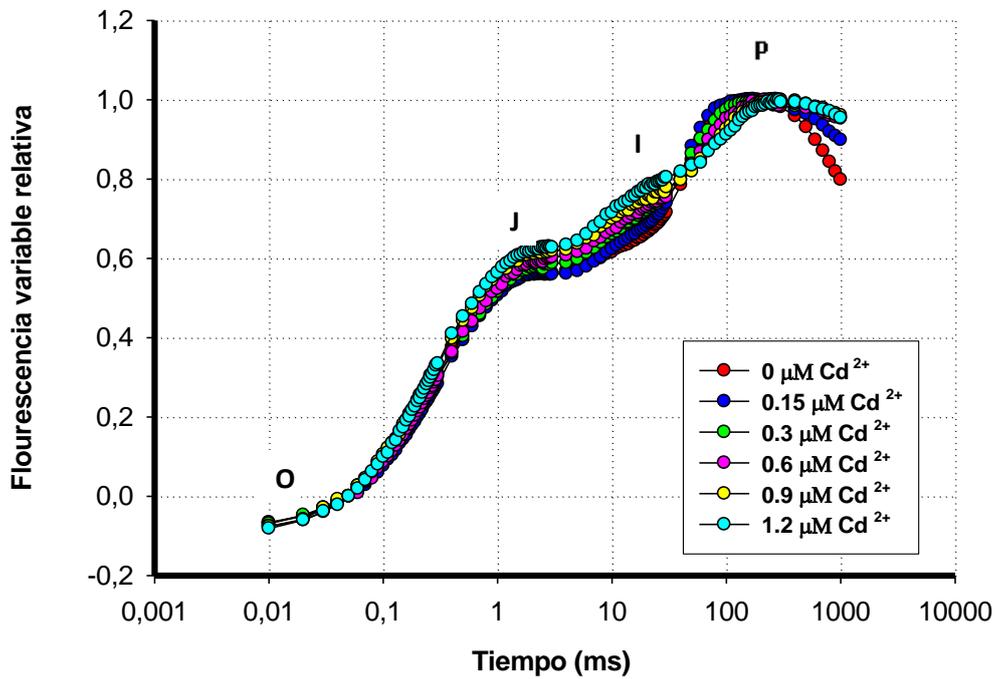


Figura 13. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la fluorescencia variable relativa (V_t) expresada en tiempo logarítmico en *C. vulgaris*. $n=8$.

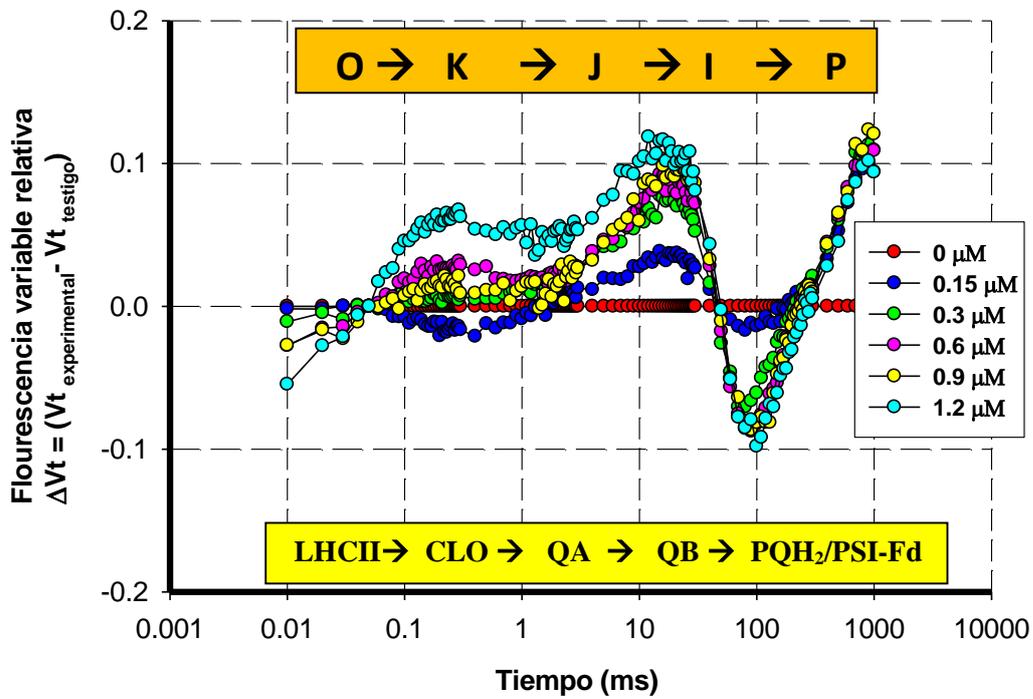


Figura 14. Efecto del Cd^{2+} sobre la fluorescencia variable relativa (V_t experimental- V_t testigo) de *C. vulgaris* $n=8$.

Las curvas ΔVt (Fig 14), se construyeron restando los valores de la cinética de fluorescencia normalizada de los tratamientos (Vt) el valor de Vt del grupo testigo. Inflexiones hacia arriba indican inhibiciones en el transporte electrónico e inflexiones hacia abajo indican estimulaciones.

Como se puede observar en la figura 14, aparece una inflexión alrededor de los 0.3 ms, esta inflexión (K) se encuentra relacionada con una inactivación en el CLO. Según Stirbet *et al.* (2014), este incremento momentáneo de la fluorescencia se desarrolla cuando Q_A recibe un electrón desde la Feo^- , mientras que $P680^+$ es reducido por Y_z . Sin embargo, cuando el CLO se encuentra inactivo, aun cuando Q_A sigue reduciéndose, $P680^+$ no se puede reducir, y por lo tanto Y_z^+ sigue siendo oxidado, existiendo una recombinación rápida de carga entre Q_A^- y $P680^+$, lo cual provoca la aparición de esta inflexión.

Una segunda inhibición se presenta entre las fases J e I (Fig. 14), lo cual indica una inhibición en el transporte electrónico entre los aceptores Q_A y Q_B . Por otro lado, se observa una disminución de entre la fase I a P, lo cual indica una estimulación en la reducción de la plastoquinona o el flujo de electrones del lado donado del PSI, quizás debido a una estimulación del flujo cíclico. Una vez alcanzado el valor máximo (F_m), se puede observar un aumento al final de la fase P, lo cual nos podría indicar una inhibición en el acarreo electrónico en el lado aceptor del fotosistema I. El efecto del cadmio en cada fase será analizado de manera detallada a continuación.

E. Función del complejo liberador de oxígeno (CLO)

La estimación de la cantidad de los complejos liberadores de oxígeno activos a partir de los datos obtenidos por emisión de fluorescencia del PSII, se realizó considerando los valores de la fluorescencia variable en la fase K [$VK = (F_{300\mu S} - F_0) / (F_M - F_0)$] (Liu *et al.*, 2011). Usando esta información se puede calcular la fracción activa de complejos liberadores de oxígeno después del tratamiento según la siguiente fórmula:

$$\text{Fracción de CLO activos: } \frac{\left(1 - \frac{VK}{VJ}\right)_{\text{experimental}}}{\left(1 - \frac{VK}{VJ}\right)_{\text{testigo}}}$$

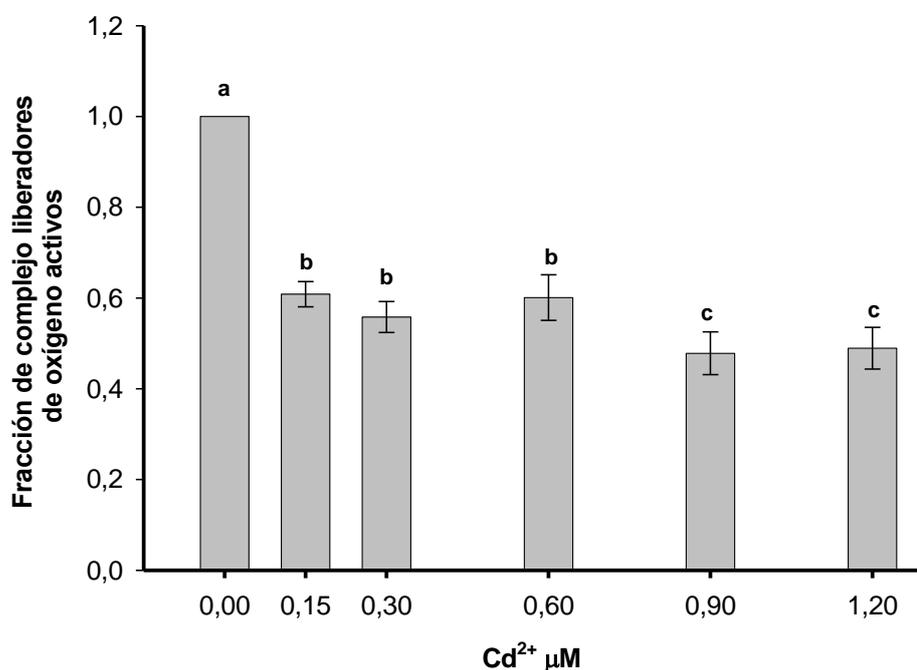


Figura 15. Fracción activa de complejos liberadores de oxígeno después del tratamiento con cadmio respecto al grupo testigo n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Los datos obtenidos muestran que existe una disminución en la fracción de CLO activos en todos los tratamientos, respecto al grupo testigo (p<0.05). Las mediciones de liberación de oxígeno y de emisión de fluorescencia polifásica de la clorofila *a* del fotosistema II, indican que el Cd podría tener efectos negativos en el funcionamiento del complejo liberador de oxígeno.

En diversos estudios se ha observado que existen alteraciones tanto estructurales como funcionales en la actividad fotosintética de diversos organismos (Bartlett *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2011). Andosch y colaboradores (2012) observaron que este efecto adverso se ve reducido por la adición de Ca al medio de cultivo antes de la exposición a Cd, esto indica que el Cd en este sentido ataca principalmente la homeostasis del Ca en *Micrasterias* probablemente desplazando al Ca desde el núcleo catalítico del CLO.

Por otro lado se ha establecido cambios en el contenido de la proteína D1 en diversas condiciones de estrés. Franco y colaboradores (1999) observaron que bajo tratamiento

prolongado con cadmio, el recambio de la proteína D1 se inhibió en gran medida. Al ser la proteína D1 el principal componente del complejo supramolecular PSII, la inhibición en su recambio afectaría el funcionamiento del CLO.

F. Estructura y función de los centros de reacción del fotosistema II

El Fotosistema II es un complejo proteico de múltiples subunidades embebido en la membrana tilacoidal, se encuentra constituido por un complejo central dimérico, cada monómero se compone de un centro de reacción y unidades proteicas asociadas a pigmentos que conforman el complejo cosechador de luz.

En este estudio el número de centros de reacción activos (RC/ABS) tiende a disminuir cuando aumenta la concentración de cadmio en el medio de cultivo, hasta un 32.4% en la concentración más elevada, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación al grupo testigo (Fig. 16), por lo cual la captación de energía que es utilizada para la fotoquímica primaria disminuye. Esta reducción en el número de centros de reacción activos podría deberse a un daño estructural sobre el fotosistema II. El cadmio genera indirectamente un estrés oxidativo, ocasionando un desequilibrio entre la generación y remoción de especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de dañar membranas y proteínas. En este caso se ha observado que la presencia de radicales libres en su entorno conducen a la destrucción de las proteínas del centro de reacción del PS II (Jegerschold *et al.*, 1990).

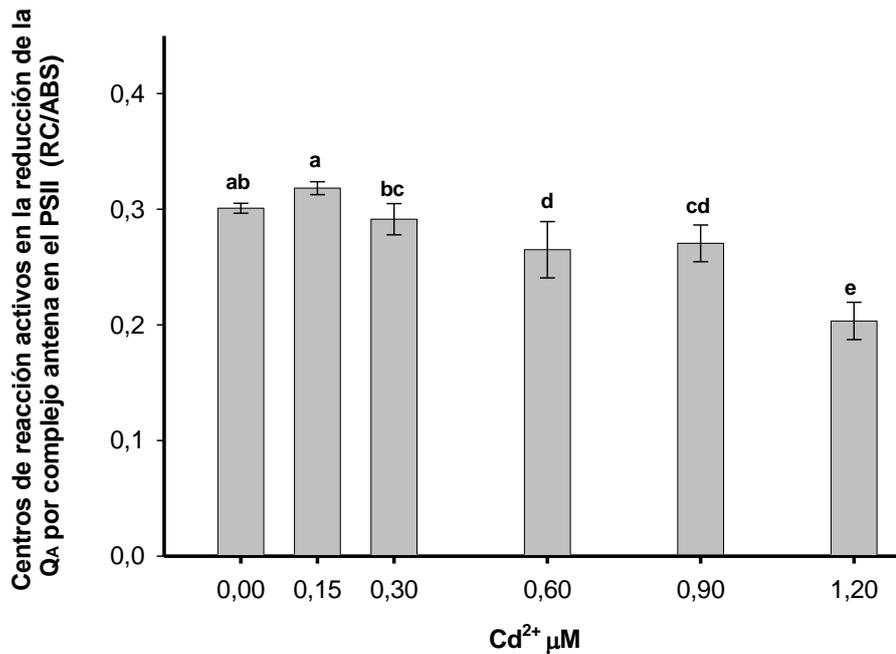


Figura 16. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre los centros de reacción activos en la reducción de QA por cada complejo antena del Fotosistema II en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Por el contrario, el flujo de excitón absorbido por centro de reacción (ABS/RC) tiende a aumentar, con diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de 0.6, 0.9 y 1.2 μM , respecto al grupo testigo, al aumentar 48.88% en la última concentración (Fig. 17). El flujo de excitación atrapado por centro de reacción que conduce a la reducción del aceptor primario (Q_A) del PSII (TRo/RC), aumenta un 8.78% ($p < 0.05$) en la concentración de 1.2 μM comparado con al grupo control (Figura 18). Sin embargo, como se puede observar en la figura, el flujo electrónico por centro de reacción después de Q_A (ETo/RC), no varía en los grupos experimentales respecto al testigo ($p < 0.05$) (Fig. 19).

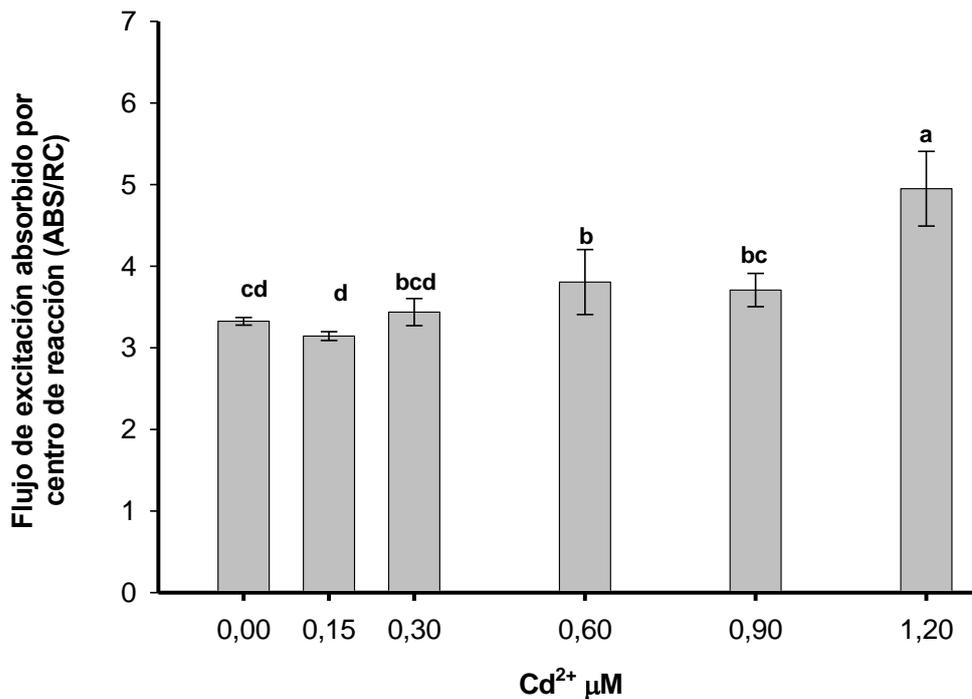


Figura 17. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre flujo de excitación absorbido por centro de reacción del Fotosistema II en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Estos flujos de energía están relacionados entre sí y dependen de propiedades estructurales y de la actividad fotosintética de la muestra. El parámetro ABS/RC, es considerado como una medida del tamaño aparente del Complejo cosechador de luz del PSII (LCHII) o bien indica el número de centros de reacción activos. Al existir una disminución en el número de centros de reacción activos pero un aumento en la absorción por centro de reacción, se deduce que la energía absorbida se distribuye entre los centros de reacción que permanecen activos, sin embargo como veremos más adelante esta energía no está siendo utilizada para impulsar el proceso fotoquímico.

El flujo de excitón atrapado (TRo/RC), representa la fracción del flujo de fotones absorbidos utilizada para la separación de la carga primaria del PSII y la estabilización de los RCs como $P680^+Q_A^-$. Por lo tanto, el número de electrones transferidos a la Q_A , es igual al número de excitones atrapados por el RC (Stirbet y Govindjee, 2011).

ETo/RC, es una medida indirecta de la reoxidación de la Q_A vía transporte electrónico en un centro de reacción activo, ya que involucra por un lado, la capacidad del centro

de reacción para atrapar energía y utilizarla para reducir a la Q_A y por otro el otro, la capacidad del centro de reacción de mover los electrones más allá de Q_A .

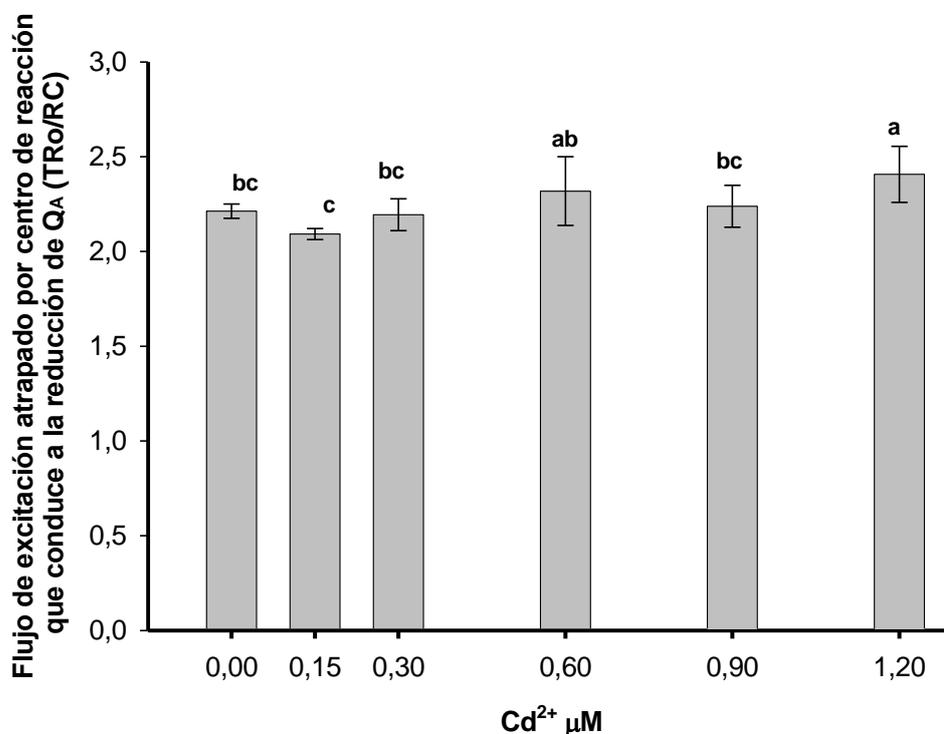


Figura 18. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el flujo de excitación atrapado por centro de reacción que conduce a la reducción de Q_A en *C. vulgaris*. $n=8$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

En este caso el atrapamiento por centro de reacción (TRo/RC) si bien aumenta, no lo hace de una manera proporcional al aumento de la absorción por centro de reacción (ABS/RC) lo mismo sucede con el transporte electrónico después de Q_A (ETo/RC), esto indica que hay una fracción de energía absorbida que no está siendo utilizada para la reducción de la Q_A y por lo tanto tampoco para la reducción de la Q_B , por lo cual esta energía estaría siendo disipada en forma de calor, como se puede observar en la figura 20, en donde la disipación térmica por centro de reacción (Dlo/RC), aumenta de manera significativa ($p<0.05$) a partir de la concentración de $0.6\mu M$ al compararse con el grupo control. Esto se corrobora con una disminución inversa de (ABS/RC), respecto al rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria (Fig. 21) y una disminución significativa en el rendimiento cuántico para el transporte electrónico (Fig. 22).

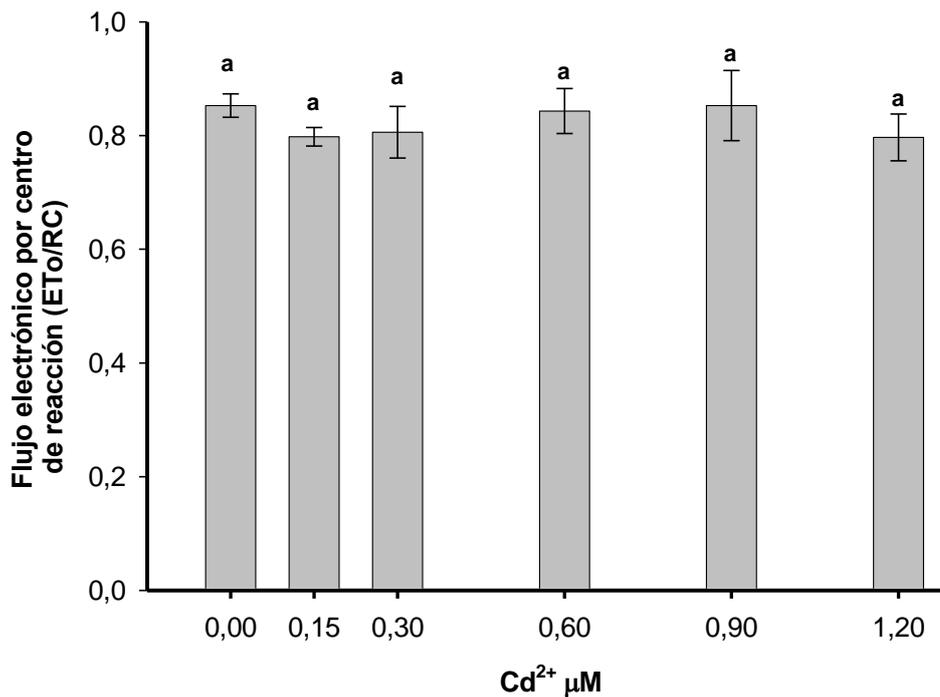


Figura 19. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el flujo electrónico por centro de reacción en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Wang y colaboradores (2014) sometieron a tratamiento con cadmio a plántulas de *Oryza sativa* L., lo que provocó una disminución del número de centros de reacción PSII activos, y un aumento del tamaño medio de la antena por cada centro de reacción activo (ABS/RC). Así mismo la disipación de la energía no fotoquímica por centro de reacción (Dio/RC) aumentó en un 290% en plántulas sometidas a tratamiento de 100 μM de cadmio respecto al grupo control. Por otro lado, el transporte de electrones por cada centro de reacción (ETo/RC) disminuyó en un 36 %.

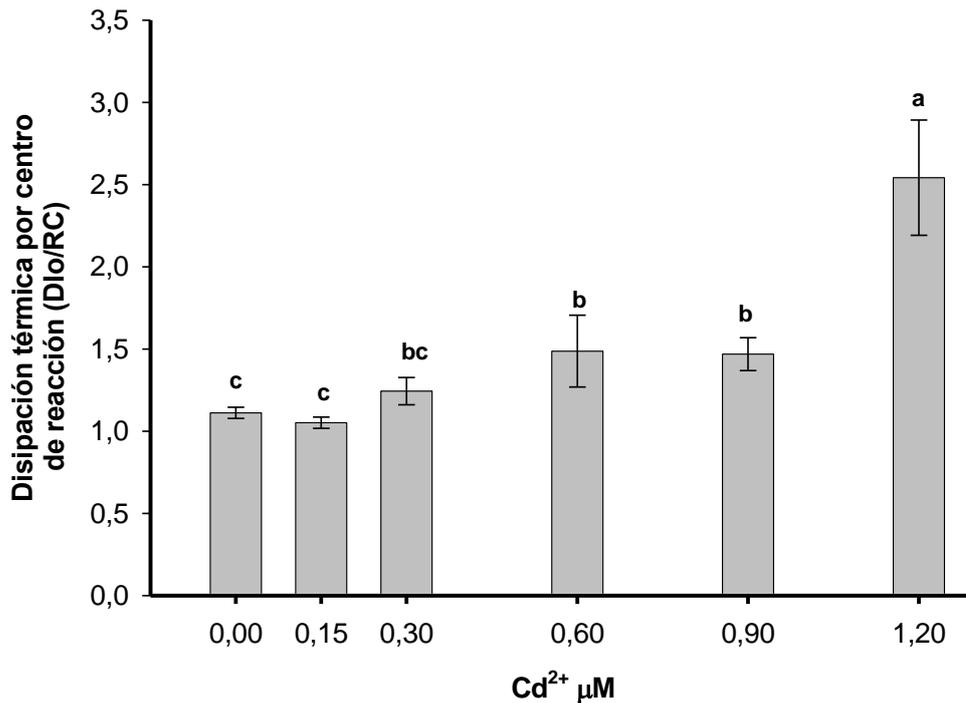


Figura 20. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la disipación térmica por centro de reacción en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

La mayoría de las condiciones ambientales estresantes limitan la habilidad de los organismos fotosintéticos para utilizar la energía luminosa absorbida produciéndose sobreexcitación de los fotosistemas, consecuentemente el daño fotooxidativo, especialmente al fotosistema II, sin embargo los organismos fotosintéticos han desarrollado estrategias para evitar o disminuir los efectos de la absorción excesiva de luz. Entre los mecanismos implicados en la protección de PSII, se cree que la disipación de energía absorbida en forma de calor es una de las más relevantes. Sin embargo los mecanismos que provocan el decaimiento No-fotoquímico, son diversos y se pueden facilitar por la acidificación del lumen de los tilacoides y la deepoxidación de carotenoides xantófilos. Además a partir de cambios conformacionales en el aparato fotosintético, componentes de los complejos PSII se asocian con los PSI, traspasando energía a estos últimos, los que son capaces de des-excitar pigmentos espontáneamente. Esto denota la existencia de PSII funcionales con distintas conformaciones moleculares, es decir heterogéneos (González *et al.*, 2001).

En la naturaleza, el PSII es heterogéneo en términos de la antena y el lado donador. La heterogeneidad de la antena incluye el tamaño de la antena y la variación en la conectividad de las moléculas del complejo antena. Basado en el tamaño de la antena, los centros de reacción del PSII se han clasificado como alfa (α), beta (β), y gamma (γ) (Melis y Homann, 1976). Se diferencian entre sí en la duración de vida y el número de clorofilas asociadas. La heterogeneidad del lado donador está vinculada con la capacidad de transferir un electrón desde la Q_A .

El interés en la heterogeneidad del fotosistema II aumentó cuando se observó que puede cambiar bajo diferentes condiciones ambientales. En base a estudios recientes, se sabe que hay cambios en la heterogeneidad del fotosistema II en virtud de las altas temperaturas (Mathur *et al.*, 2011), alta salinidad (Mehta *et al.*, 2010a), pH (Tongra *et al.*, 2011), y algunos contaminantes (Singh y Jajoo, 2013). Hay cambios en el número de centros de reacción activos, interconversión de los centros alfa activos en centros beta y gamma inactivos, y también se presenta un aumento en el número de centros que no son capaces de reducir a la Q_B en diversas condiciones de estrés (Kalaji *et al.*, 2014).

G. Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II

En el presente trabajo se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en PSII ($\Phi_{Po} = TR_o/ABS$) en concentraciones de $0.3 \mu M$ y superiores. Analizando nuestros resultados podemos atribuir esta disminución a que los valores de fluorescencia a tiempo (F_o) y la fluorescencia máxima (F_m) tienden a disminuir a medida que aumenta la concentración del metal en el medio, lo cual indica que el cadmio provoca una reducción en el número de centros de reacción abiertos. Una disminución de F_o puede ser atribuido a una menor disipación de energía en el complejo antena, previo a la separación de cargas, ya que como se observó la absorción por centro de reacción tiende a aumentar, sin embargo esta energía que no fue disipada, posteriormente tampoco será atrapada por el centro de reacción para la reducción de la Q_A (TR_o/RC), por lo cual estos centros de reacción serían considerados como "RCs silenciosos", término propuesto por Strasser y Tsimilli-Michael (1998) para los centros de reacción

inactivos, que no reducen a la Q_A , ni contribuyen a la fluorescencia variable. Su rendimiento de fluorescencia se mantiene baja, igual a la de los RC abiertos. Este tipo de inactivación es reversible, y desaparece tras eliminar el estrés, que había provocado la transformación.

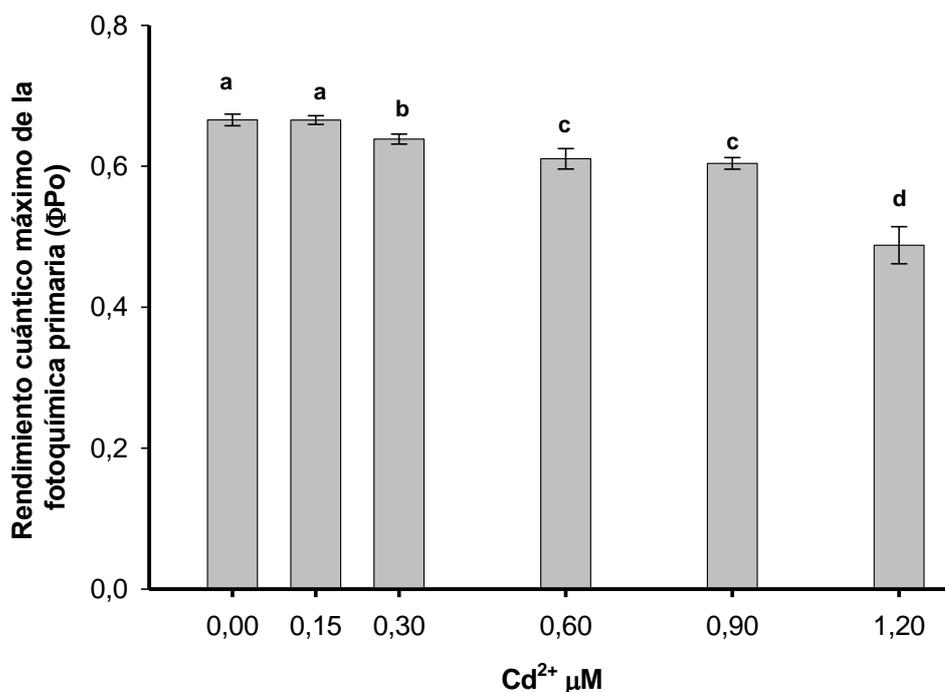


Figura 21. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Estos resultados pueden atribuirse a la inestabilidad del complejo central del PSII en las membranas tilacoides. La influencia del cadmio en la estructura y composición de dominios PSII en las membranas tilacoides se ha presentado en varios informes (Ling y Hong, 2009; Janik *et al.*, 2013). Wang y colaboradores (2014) investigaron la alteración en la presencia de D1, D2, Lhcb1 y Lhcb2 por análisis inmunoblot, la proteína D1 presentó una disminución notable en su recambio. Sin embargo, D2, Lhcb1 y Lhcb2, eran menos afectadas bajo la misma condición. Por lo tanto, los resultados implican que la proteína D1 en el centro de reacción PS II era el blanco principal del cadmio en plántulas de arroz. En dicho estudio se realizaron observaciones ultraestructurales, las cuales revelaron que el Cd afecta de manera negativa la ultraestructura de los

cloroplastos y tilacoides. Cuando esto sucede, el proceso fotosintético se bloquea inevitablemente. Estos cambios son similares a la desorganización de las membranas tilacoides observadas en plantas de tomate (Gratao *et al.*, 2009) y algodón (Daud *et al.*, 2013). La estructura de los tilacoides está relacionada con la absorción de la energía de la luz. Por lo tanto los resultados del presente estudio, pueden ser también causados por la modificación en el apilamiento tilacoide.

Por otro lado, la probabilidad de que un electrón se mueva más allá de la Q_A (Ψ_o), disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones más elevadas un 13.11% en relación al grupo control (Fig. 22). El rendimiento cuántico para el transporte electrónico ($E_o = E_{To}/ABS$), es el producto entre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (ΦP_o) y la probabilidad que un electrón atrapado en el centro de reacción se mueva más allá de Q_A^- (Ψ_o), una disminución en ambos parámetros conlleva a una disminución (35.7%) en el rendimiento cuántico para el transporte electrónico de manera significativa ($p < 0.05$) en la concentración de 1.2 μM de Cadmio comparado con el grupo testigo.

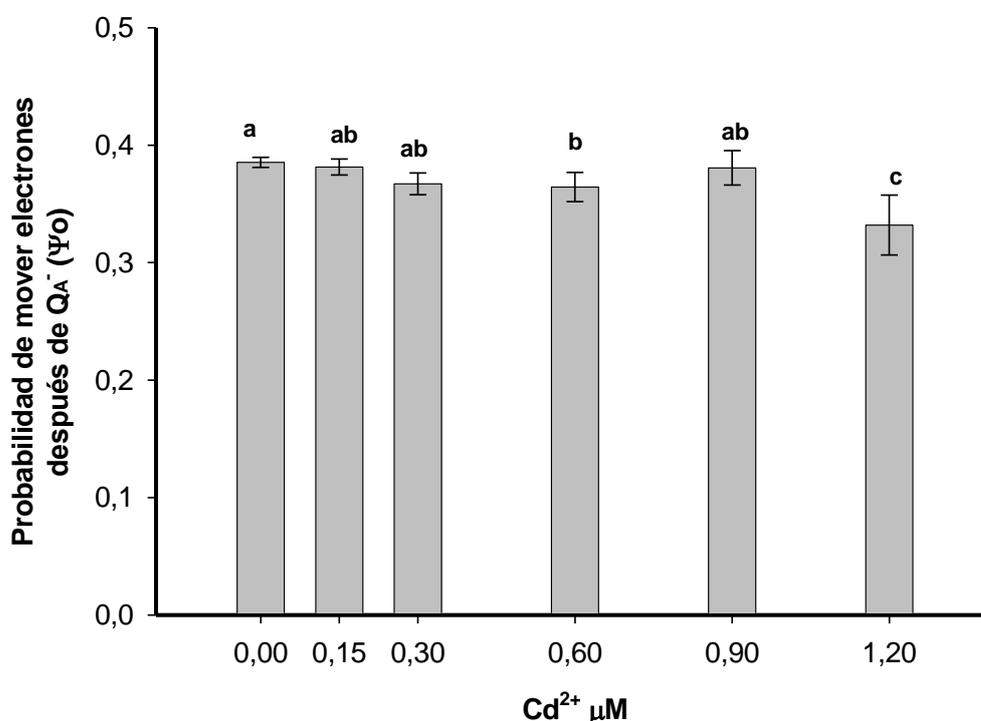


Figura 22. Efecto de las concentraciones del cadmio sobre la eficiencia con la que un electrón se mueve después de Q_A , en *C. vulgaris*. $n=8$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los resultados indican que el efecto del cadmio se presenta tanto en el lado donador como receptor del PSII, un sitio candidato que podría ser afectado en el lado receptor del PSII, es el complejo quinona-hierro (Q_A -Fe- Q_B). Ya que como muestran nuestros resultados y estudios anteriores (Utsching *et al.*, 1998), el Cd^{2+} inhibe la transferencia de electrones entre la Q_A y Q_B . El mecanismo más probable de inhibición es a través de cambios en los estados de protonación de los residuos de histidina alrededor de la Q_B (Ädelroth *et al.*, 2001; Paddock *et al.*, 2003). Sigfridsson y colaboradores (2004) presentaron una propuesta, derivada de la unión del Cd^{2+} a dos residuos de histidina en la subunidad H. Estos histidinas constituyen el punto de entrada para los protones que participan en la protonación de la Q_B reducida. En relación a este aspecto, D1-His252 podría estar en contacto con D1-Ser264, que está conectado directamente a Q_B . Esto sugiere que D1-His252 participa en la vía de la protonación de Q_B . Si esto es cierto, D1-His252 podría ser el sitio donde el Cd^{2+} se une, y que esto afecte la transferencia de electrones entre los aceptores de quinona y provoque interacciones magnéticas de baja afinidad entre la Q_A y el Fe^{2+} .

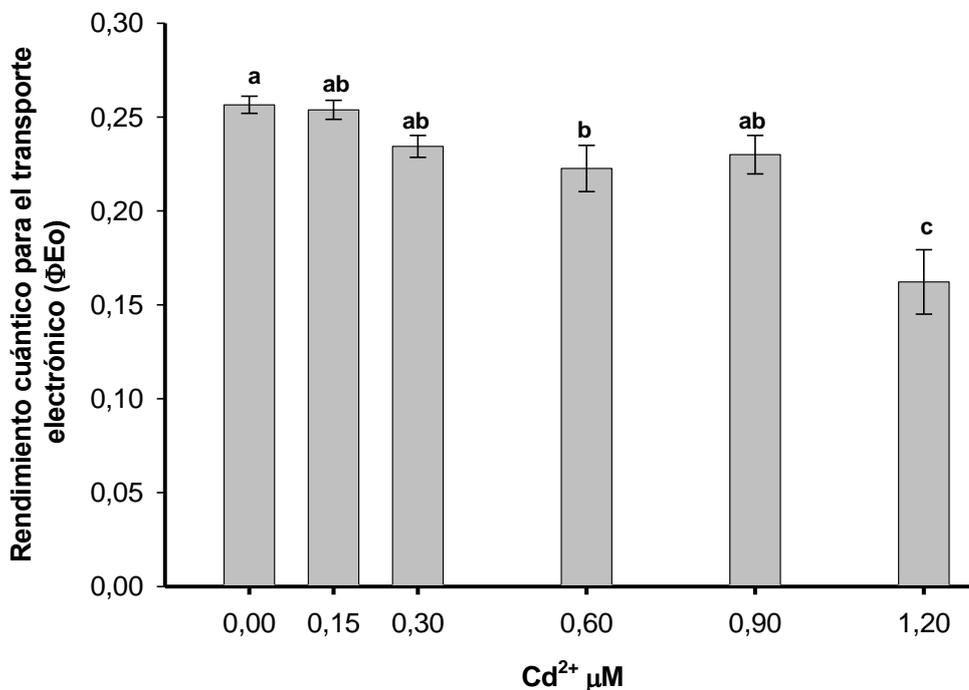


Figura 23. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el rendimiento cuántico del transporte electrónico, en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

H. Actividad y eficiencia cuántica del transporte electrónico en los acarreadores intermedios (QB→PQ→Citb6/f →PC) y los acarreadores del lado aceptor del fotosistema I (A0 →A1→FX →FA/FB→ Fd →FNR).

El PSI es un complejo proteico localizado en la membrana tilacoide que media el flujo electrónico entre el PSII y NADP⁺. La energía de excitación del complejo antena del PSI se transfiere al centro P700, por su parte P700 dona electrones al aceptor primario A0. La separación de carga y la estabilización se da a través del aceptor secundario A1, y finalmente se da el flujo electrónico hacia los centros de hierro-azufre (FX, FA, y FB), lo que provoca la reducción de la ferredoxina (Fd). El catión P700⁺ formado después de la separación de cargas se vuelve a reducir por la plastocianina (PC). A su vez, la PC oxidada recibe electrones del Cyt b₆/f (Belatik *et al.*, 2013).

La mayoría de los estudios revela que el PSII es un sitio altamente sensible al efecto perjudicial del cadmio y que su funcionamiento se inhibe a un grado mucho mayor que el funcionamiento del PSI. Sin embargo, en este caso tanto el PSI como el PSII se vieron afectados. Ya que como podemos observar en la Figura 24, a medida que aumenta la concentración del metal, disminuye la probabilidad de que los acarreadores intermedios (QB →PQ →Citb6/f →PC) reduzcan a los aceptores finales del PSI [$\delta R0 = (1-VI)/(1-VJ)$] presentándose diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) y el grupo testigo.

Como se ha mencionado anteriormente, los metales pesados pueden competir con metales esenciales por los sitios de unión a metal en proteínas. Muchos de estos sitios se encuentran relacionados con la inhibición de la cadena fotosintética de transferencia de electrones (Küpper *et al.*, 2004). Belatik y colaboradores (2013) examinaron la interacción entre el Pb y fracciones submembranales del PSI de espinaca. El análisis espectroscópico mostró que el Pb²⁺ se une a polipéptidos del PSI a través de átomos de oxígeno y nitrógeno. En concentraciones de 0.2 mM, la interacción de Pb se limita a la pérdida de hojas-β antiparalelas. Sin embargo, a concentraciones de 0.5 mM se presenta una fuerte perturbación en el PSI con una pérdida significativa en la estructura de la α-hélice. Igualmente se observó un bloqueo

en la transferencia de electrones entre la PC y P700, lo cual podría ser explicado por la unión de Pb^{2+} a la Plastocianina, la cual es un polipéptido que contiene un ión de Cu. Cationes como el Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cd^{2+} , son conocidos por competir en dianas moleculares específicas con otros cationes divalentes esenciales. Por lo cual es plausible que el cadmio pueda perturbar el sitio de unión de Cu en la Plastocianina. Una alteración de este tipo sin duda podría alterar la actividad de transporte de electrones entre los Fotosistemas I y II.

Otro mecanismo alternativo o complementario podría deberse a la deficiencia de Hierro provocada por cadmio en orgánulos celulares reportado por varios estudios anteriores y que posiblemente sea la principal causa de daño en el PSI (Siedlecka y Baszyński 1993; Timperio *et al.*, 2007). La deficiencia prolongada de hierro da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno en los tilacoides que destruyen principalmente los centros de hierro-azufre (FX, FA y FB) desestabilizando el PSI y por ende provocando la inhibición en el transporte electrónico (Parmar *et al.*, 2013).

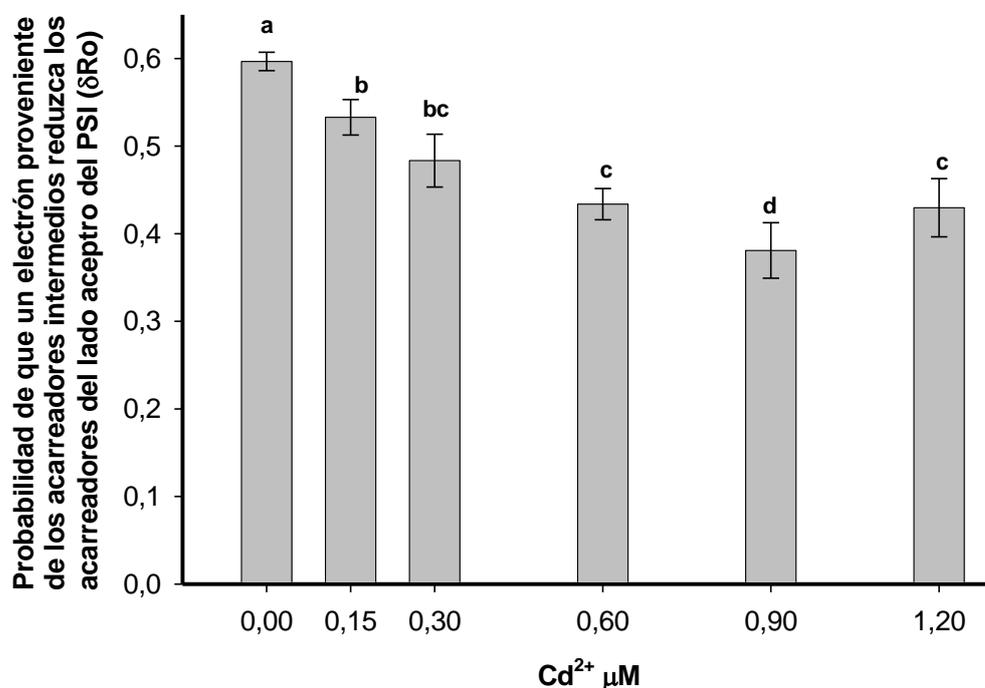


Figura 24. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la probabilidad con la que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduce los acarreadores del lado aceptor del PSI, en *C. vulgaris*. $n=8$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$).

El rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI (Φ_{Ro}), es el resultado del producto de la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria (Φ_{Po}), la probabilidad de que un electrón se mueva más allá de Q_{A-} (Φ_{Eo}) y la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor de PSI (δ_{Ro}). En el presente estudio todos estos parámetros tienden a disminuir por lo cual como se puede observar en la figura 25 a medida que aumentó la concentración de cadmio, la eficiencia con la que se redujeron los últimos aceptores del lado reductor del PSI disminuye de manera significativa ($P < 0.05$) al agregar cadmio al medio.

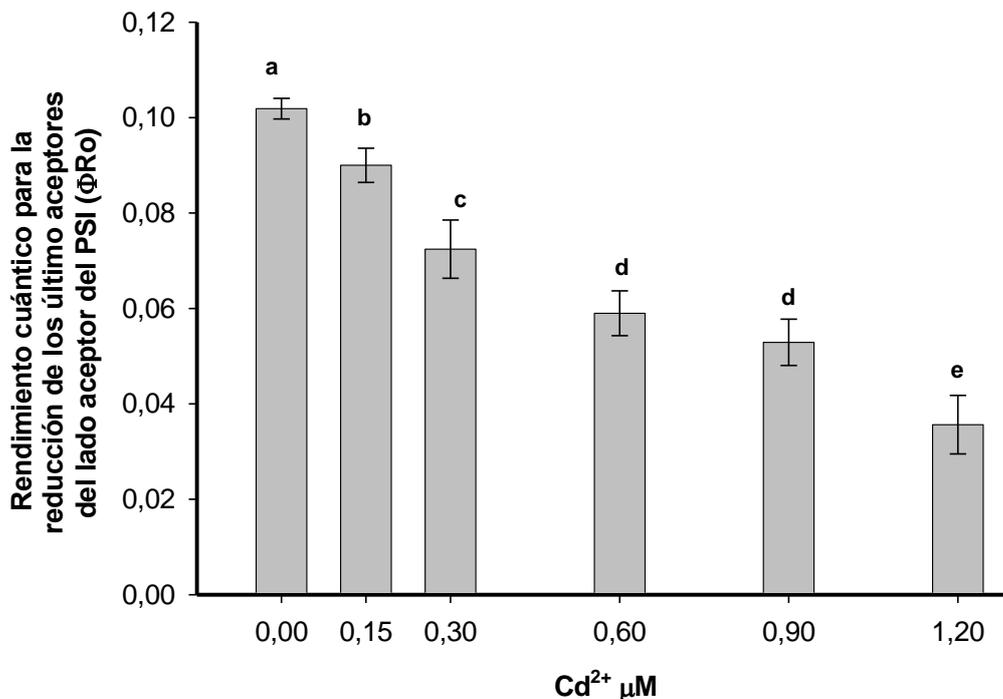


Figura 25. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI, en *C. vulgaris*. $n=8$. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

I. Índice de rendimiento total.

El índice de rendimiento total (PI total) es un parámetro bastante sensible al estrés en sobre la actividad fotoquímica. PI total, es un índice multifactorial el cual a partir de varios componentes independientes; la densidad de centros de reacción (RC/ABS), una

expresión relacionada a la fotoquímica primaria ($\Phi_{Po}/(1-\Phi_{Po})$), una expresión relacionada al transporte de electrones después de Q_A [$\Psi_o/(1-\Psi_o)$] y la probabilidad de reducir los aceptores finales del PSI [$\delta Ro/(1-\delta Ro)$]. En consecuencia, si un tipo de estrés afecta alguno de estos componentes, el efecto se mostrará en el índice de rendimiento, que por lo tanto tiene una sensibilidad superior a la alcanzada por cualquiera de sus componentes aislados (Stirbet y Govindjee, 2011).

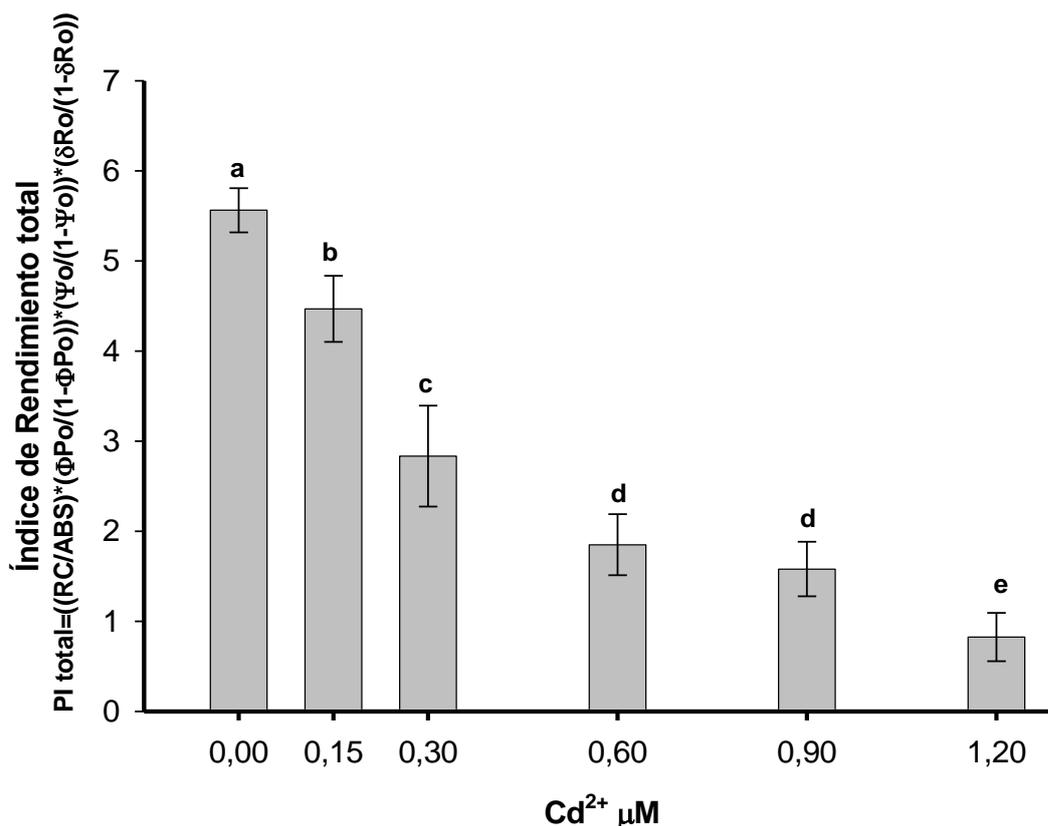


Figura 26. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el índice de rendimiento total en *C. vulgaris*. n=8. (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Xue y colaboradores (2014) sometieron a estrés por cadmio a plantas de soja, obteniendo una disminución en el PI_{ABS} , lo cual se debe a una disminución en el número de centros de reacción activos así como a una disminución en el transporte de electrones más allá de la Q_{A-} , lo que indica que tanto el lado donador como aceptor del PSII son inhibidos por Cd, en adición a esto, en el presente estudio los resultados indican que el efecto negativo del cadmio en la actividad fotosintética comprende

efectos inhibitorios en ambos fotosistemas. Al comparar los resultados del grupo testigo respecto a la concentración más elevada; la inhibición en cada parámetro: (RC/ABS), ($\Phi_{Po}/(1-\Phi_{Po})$), ($\Psi_o/(1-\Psi_o)$) y ($\delta R_o/(1-\delta R_o)$) fue de; 32.4%, 51.95%, 20.43% y 42.95% respectivamente. Lo cual conduce a una reducción significativa ($p < 0.05$) del PI total en todos los tratamientos en relación al grupo control, hasta un 83.9% en 1.2 μ M.

J. Acumulación celular de Cd²⁺

En la figura 27 se muestra la acumulación de cadmio por gramo de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* en relación a la concentración de cadmio al inicio del tratamiento en el medio de cultivo. Como podemos observar a medida que aumenta la concentración de cadmio en el medio hay una mayor acumulación del metal por gramo de biomasa seca, con diferencias significativas en al menos un par de medias ($p < 0.05$). En la gráfica se puede observar que en la acumulación de cadmio se presentó en dos fases, en primer lugar se da de una manera lenta, hasta llegar a 0.51 (mg Cd²⁺/g PS), donde la acumulación presenta una tendencia a aumentar rápidamente, sin embargo no llega a un punto de saturación.

La biosorción de metales por microalgas es considerado normalmente como un proceso de dos etapas: (1) una eliminación inicial rápida (pasiva) de metales por la célula y (2) una mucho más lenta que se produce dentro de la célula. Durante la extracción pasiva, iones de metales pesados son adsorbidos en los grupos funcionales presentes en la superficie celular mediante interacciones electrostáticas. Se trata de procesos no metabólicos, rápidos, esencialmente reversibles, que se producen tanto en las células vivas como no vivas. Incluye; la adsorción física, intercambio de iones, adsorción química, formación de complejos, la quelación, y difusión a través de la pared celular y la membrana (Muñoz *et al.*, 2006; Sud *et al.*, 2008). Cuando la concentración extracelular de iones de metales pesados es considerablemente mayor que su contraparte intracelular, los grupos de unión en la superficie puede ayudar en el transporte de los cationes a través de la membrana celular hacia el citoplasma (Franklin *et al.*, 2002).

La segunda fase es esencialmente un proceso metabolismo dependiente, que implica el transporte de iones metálicos a través de la barrera de la membrana celular y la posterior acumulación dentro de la célula, con la unión posterior a compuestos intracelulares y/o orgánulos de contención. Este proceso de absorción de metales es mucho más lento y generalmente irreversible, y se produce únicamente en las células vivas.

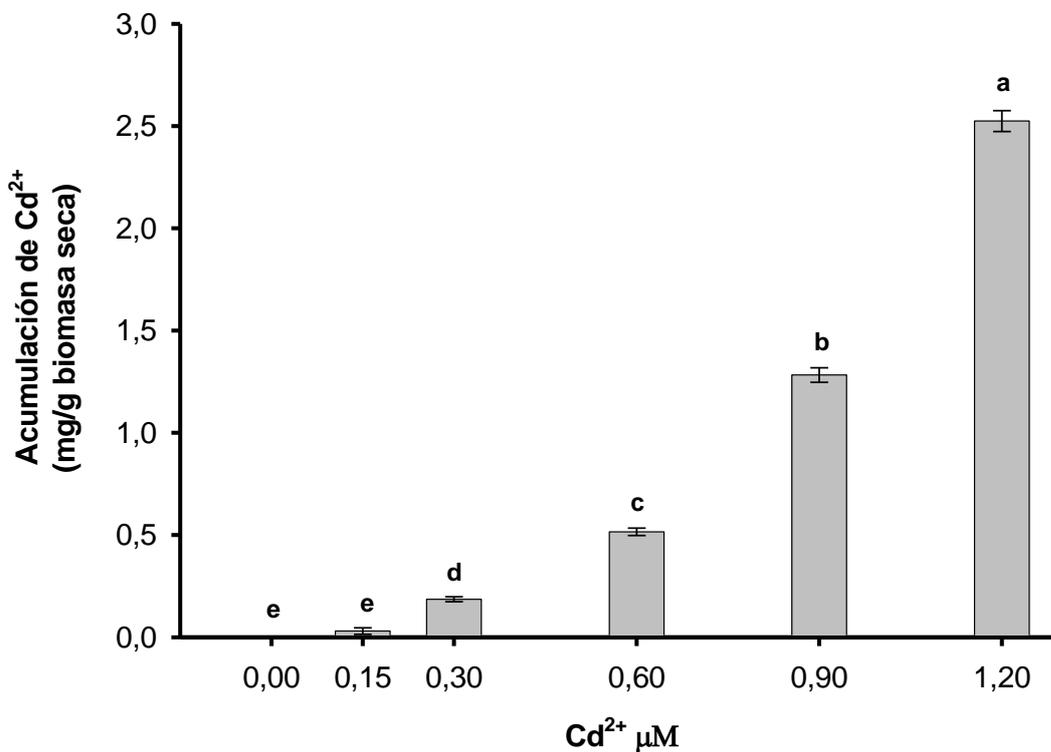


Figura 27. Relación entre la acumulación celular de cadmio y la concentración inicial del metal en el medio de cultivo, después de 72 horas. n=3 (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Los parámetros considerados con anterioridad poseen relación con la cantidad de cadmio acumulado en las células. En primer lugar el crecimiento medido por peso seco (Fig. 1) muestra una disminución sin embargo no existe una acumulación significativa de cadmio respecto al grupo control, esto puede atribuirse a la excreción de materiales con grupos de unión a metal por las células, los cuales consisten en una amplia variedad de compuestos, incluyendo carbohidratos, proteínas, y lípidos. Este

mecanismo afectaría el crecimiento sin embargo impide la acumulación del metal en la célula. En cuanto a pigmentos fotosintéticos, la cantidad de clorofila se ve afectada drásticamente a partir de 0.185 (mg Cd²⁺/g PS), por otro lado el contenido de carotenoides totales (Fig. 5) aumenta de manera significativa al acumular 0.51 (mg Cd²⁺/g PS).

La actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno (Fig. 6) y transporte electrónico aparente (Fig. 8), no se ven afectados hasta que la acumulación de cadmio en las células rebasa 0.51 (mg Cd²⁺/g PS). Por otro lado, la Máxima eficiencia fotoquímica del PSII en la luz (Fv/Fm), mostró mayor tolerancia al disminuir cuando la célula acumula 1.28 (mg Cd²⁺/g PS).

Al analizar por etapas el proceso fotosintético, se observa que la estructura y eficiencia funcional de los centros de reacción (Figuras 16-20) se ven modificados cuando la cantidad de cadmio en las Células sobrepasa el 0.51 (mg Cd²⁺/g PS), lo mismo pasa con la actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II, si bien muestran una disminución en los flujos electrónicos y rendimientos cuánticos cuando la célula sobrepasa 0.51 (mg Cd²⁺/g PS), la eficiencia del proceso no disminuye de una manera proporcional al aumento en la concentración celular de Cadmio. Finalmente el índice de rendimiento total (PI Total), presenta una tendencia clara a disminuir, sin embargo tampoco lo hace de manera directa al aumento del cadmio en las células.

Estos resultados indican que las células de *Chlorella vulgaris* son capaces de almacenar cierta cantidad de cadmio sin que su metabolismo sea directamente modificado, debido posiblemente a ciertos mecanismos de tolerancia que las células pueden exhibir bajo condiciones de estrés. Sin embargo el resultado de la exposición y posterior acumulación de cadmio, es una disminución en el proceso fotosintético y una reducción en el crecimiento medido por Peso seco.

VI CONCLUSIONES

El cadmio puede presentar diferentes mecanismos de inhibición sobre el aparato fotosintético, lo cual ha sido propuesto en diferentes estudios, sin embargo en muchos de estos trabajos manejan concentraciones extremadamente altas de Cd^{2+} que pocas veces se presentan en ambientes naturales, incluso los más contaminados, o bien en condiciones *in vitro*, por lo cual varios modos de acción atribuidos al cadmio podrían llegar a ser ambientalmente irrelevantes.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la adición de cadmio al medio de cultivo, provoca una disminución del crecimiento de *Chlorella vulgaris* medido por peso seco, y una reducción en el contenido de clorofila total específica. Concentraciones de 0.6, 0.9 y 1.2 μM de Cd^{2+} provocan un aumento en el contenido de carotenoides totales, lo cual se explica como un intento de proteger al aparato fotosintético contra daños fotooxidativos por radicales libres de oxígeno. Así mismo una vez que se adicionan al medio cantidades de 0.6 μM o superiores de Cadmio, la tasa fotosintética medida como liberación de oxígeno disminuye respecto al grupo control.

El número de centros de reacción presentó una tendencia a disminuir (RC/ABS), no obstante hay una mayor absorción por centro de reacción (ABS/RC). Los rendimientos cuánticos para la fotoquímica primaria (ΦPo), para el transporte electrónico (Eo) y para la reducción de los últimos aceptores del PSI (ΦRo), disminuyeron al aumentar la concentración de cadmio en el medio. Por lo cual el índice de rendimiento total (PI total), decrece de manera significativa en todos los casos respecto al grupo control.

Las bajas concentraciones de cadmio utilizadas en el presente estudio, no poseen un sitio específico de inhibición en la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris*, incluso la célula es capaz de acumular cierta cantidad de metal, sin afectar significativamente varios procesos metabólicos relacionados con la actividad fotoquímica primaria y el transporte electrónico. Sin embargo la inhibición en distintas etapas, produce una reducción en el proceso fotosintético total y por ende una disminución en el

crecimiento, incluso en la concentración más baja utilizada en este trabajo ($0.15\mu\text{M}/0.0168\text{ mg.L}^{-1}$). Sí bien el efecto del cadmio sobre organismos fotosintéticos puede modificarse por condiciones multifactoriales en ambientes naturales, de acuerdo a las condiciones planteadas en este estudio, el cadmio a concentraciones permisibles por la NOM-001-ECOL-1996, podría tener efectos nocivos sobre las poblaciones de microalgas en los sistemas acuáticos.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Ädelroth, P., Paddock, M.L., Tehrani, A., Beatty, J.T., Feher, G., and Okamura, M.Y. (2001). Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Decrease of proton transfer rate by mutation of surface histidines at H126 and H128 and chemical rescue by imidazole identifies the initial proton donors. *Biochemistry* 40, 14538–14546.
- Ammar, W.B., Nouairi, I., Zarrouk, M., Ghorbel, M.H., and Jemal, F. (2008). Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. *Biology Plant* 52, 727–731.
- Andosch, A., Affenzeller, M.J., Lütz, C., and Lütz-Meindl, U. (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *Journal of Plant Physiology* 169, 1489–1500.
- Andresen, E., and Küpper, E. (2013). Chapter 13: Cadmium Toxicity in Plants En: Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences. Sigel, A., Sigel, H., Sigel R.K.O. (eds.), Springer, New York. pp 395-414.
- Aravind, P., and Prasad, M.N.. (2004). Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Science* 166, 1321–1327.
- Ata, N., Saradhi, P. P., and Mohanty, P. (1991). Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Cell Physiology* 32, 943–951.
- Azevedo, H., Glória Pinto, C.G., Fernandes, J., Loureiro, S., and Santos, C. (2005). Cadmium Effects on Sunflower Growth and Photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition* 28, 2211–2220.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006) *Algae, anatomy, biochemistry and biotechnology*. Taylor & Francis Group. Florida, US. pp 1-2.
- Bartlett, J.E., Baranov, S. V, Ananyev, G.M., and Dismukes, G.C. (2008). Calcium controls the assembly of the photosynthetic water-oxidizing complex: a cadmium(II) inorganic mutant of the Mn₄Ca core. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363, 1253–1261.
- Belatik, A., Hotchandani, S., Tajmir-Riahi, H.-A., and Carpentier, R. (2013). Alteration of the structure and function of photosystem I by Pb²⁺. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 123, 41–47.

- Benavides, M.P., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 21–34.
- Borowitzka, M.A., and Borowitzka L.J. (1988). *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press. New York.
- Choudhury, N.K., and Behera, R.K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplasts. *Photosynthetica* 39, 481–488.
- Ci, D., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., and Cao, W. (2009). Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 77, 1620–1625.
- Comisión Nacional del Agua. (2013). Atlas digital del agua México 2012. Sistema Nacional de Información del Agua. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/atlas/usosdelagua31.html>.
- Crist, R.H., Oberholser, K., Shank, N., and Nguyen, M. (1981). Nature of Bonding between Metallic Ions and Algal Cell Walls. *Environmental Science & Technology* 15, 1212–1217.
- Daud, M.K., Ali, S., Variath, M.T., and Zhu, S.J. (2013). Differential physiological, ultramorphological and metabolic responses of cotton cultivars under cadmium stress. *Chemosphere* 93, 2593–2602.
- Daud, M.K., Sun, Y., Dawood, M., Hayat, Y., Variath, M.T., Wu, Y.X., Raziuddin, Mishkat, U., Salahuddin, Najeeb, U., et al. (2009). Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *Journal of Hazardous Materials* 161, 463–473.
- Davis, T. a, Volesky, B., and Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* 37, 4311–4330.
- De Acevedo, F. (2003) *Toxicologia do Mercúrio*. RiMa. Sao Paulo, Brasil. p 292.
- De Filippis, L. F. (1978). The effect of sublethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella* IV. Characteristics of a general reducing enzyme system for metallic ions. *Z Pflanzen physiologie* 86, 339-352.
- De Filippis, L.F. (1979). The effect of heavy metals on the absorption spectra of *Chlorella* cells and chlorophyll solutions. *Z Pflanzen physiologie* 93, 129–137.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. (2006). Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172, 11–21.
- Dias, M.C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., and Santos, C. (2012). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 1281–1289.

- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., and Ayhan, B. (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology* *165*, 600–611.
- Esponda, A. (2001). Arranque de un sistema experimental de flujo vertical a escala piloto de tipo humedal artificial para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Faller, P., Kienzler, K., and Krieger-Liszky, A. (2005). Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta* *1706*, 158–164.
- Franco, E., Alessandrelli, S., Masoji, J., and Teresa, M. (1999). Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [35 S] methionine incorporation. *144*, 53–61.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., and Lim, R.P. (2002). Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* *21*, 742–751
- Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, J.P., Blein, J.P., Ranjeva, R., and Montillet, J.L. (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell and Environment* *29*, 1956–1969.
- Gaur, J. P., and Rai, L.C. (2001). Heavy metal tolerance in algae. En: *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Rai L. C. y Gaur J. P., (Eds) Springer-Verlag, Berlin. pp 363–388.
- Gonzalez, J., Pastenes, C., and Horton, P. (2001). Efecto de la temperatura, el estrés hídrico y luminoso sobre la heterogeneidad del fotosistema II en cuatro variedades de poroto (*Phaseoules vulgaris* L.). *Revista Chilena de Historia Natural* *74*, 779-791.
- Gonzalez-Davila, M., Santana-Casiano, J.M., Perez-Pena, J., and Millero, F.J. (1995). Binding of Cu(II) to the Surface and Exudates of the Alga *Dunaliella tertiolecta* in Seawater. *Environmental Science & Technology* *29*, 289–301.
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Peres, L.E.P., Medici, L.O., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. (2009). Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* *67*, 387–394.
- Gross, R.E., Pugno, P., and Dugger, W.M. (1970). Observations on the mechanism of copper damage in chlorella. *Plant Physiology* *46*, 183–185.
- Hart, L.E., Cheng, K.M., Whitehead, P.E., Shah, R.M., Lewis, R.J., Ruschkowski, S.R., Blair, R.W., Bennett, D.C., Bandiera, S.M., and Norstrom, R.J. (1991). Dioxin contamination and growth and development in great blue heron embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* *32*, 331–344.

- Huang, Z., Li, L., Huang, G., Yan, Q., Shi, B., and Xu, X. (2009). Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands) *91*, 54–61.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2013). Metales pesados. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales>
- Janik, E., Szczepaniuk, J., and Maksymiec, W. (2013). Organization and functionality of chlorophyll-protein complexes in thylakoid membranes isolated from Pb-treated *Secale cereale*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* *125*, 98–104.
- Jegerschold, C., and Styring, S. (1991). Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction center protein in photosystem II. *FEBS Letters* *280*, 87–90.
- Jjemba, P. K. (2004). *Environmental Microbiology: Principles and Applications*, Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. p 372.
- Justin, L., Vázquez, A., Siebe, C., Alcántar, G., and Isla, M.D. la (2001). Cadmio, níquel y plomo en agua residual, suelo y cultivos en el valle del Mezquital, Hidalgo. México. *Agrociencia* *35*, 267-274.
- Kalaji, H, M., Jajoo, A., Abdallah Oukarroum, Marian Brestic, Marek Zivcak, Izabela A. Samborska, Magdalena D. Cetner, Izabela Łukasik, Vasiliy Goltsev, Richard J. Ladle, Piotr Dałbrowski and Parvaiz AhmadP. (2014). The Use of Chlorophyll Fluorescence Kinetics Analysis to Study the Performance of Photosynthetic Machinery in Plants Ahmad (Ed): *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, Volume 2.
- Kaplan, D. (2004). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae, En: A Richmond (ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, UK. pp 439-447.
- Kaplan, D., Heimerb, Y.M., Abeliovich, A., and Goldsbrough, P.B. (1995). Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp . *109*, 129–137.
- Kautsky, H., and Hirsch, A. 1931. *Naturwissenschaften* *19*, 964.
- Koedrith, P., Kim, H., Weon, J.-I., and Seo, Y.R. (2013). Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* *216*, 587–598.
- Kowalewska, G., Lotocka, M., and Latala, A. (1992). Formation of the copper-chlorophyll complexes in cells of phytoplankton from the Baltic Sea. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* *39*, 41–49.
- Krupa, Z. (1987). Cadmium induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex II in radish cotyledons. *Physiology Plant* *73*, 518-524.

- Kupper, H., Kupper, F., and Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47, 259–266.
- Küpper, H., Küpper, F., and Spiller, M. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. 123–133.
- Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C. and Prásil, O. (2002). Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology* 38, 429-441.
- Laegreid, M., Bockman, O.C., and Kaarstad, E. O. (1999). Agriculture fertilizers and the environment, CABI Publishing, Wallingford. p 320.
- Landis, W.G., and Yu., M. H. (1999). Introduction to environmental toxicology. Lewis Publishers, New York. p 390.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., and Morel, F.M.M. (2005). Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435, 42.
- Lavaud, J., Strzepek, R.F., and Kroth, P.G. (2007). Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography* 52, 1188–1194.
- Lazár, D. (2006). The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* 33, 9–30.
- Li, X., Zhao, M., Guo, L., and Huang, L. (2012). Effect of cadmium on photosynthetic pigments, lipid peroxidation, antioxidants, and artemisinin in hydroponically grown *Artemisia annua*. *Journal of Environmental Sciences* 24, 1511–1518.
- Liu, B. Y., Nie, X. P., Liu, W. Q., Snoeijs, P., Guan, C., and Tsui, M. T. K. (2011). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1027-1035.
- López-Millán, A.-F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., and Abadía, J. (2009). Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany* 65, 376–385.
- Ma, M., Zhu, W., Wang, Z., and Witkamp, G. J. (2003). Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology* 63, 221-228.
- Manrique, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Ecosistemas* 2003/1. Disponible En : <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>.

- Maret, W., and Moulis, J.-M. (2013). *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. Sigel, A., Sigel, H. and Sigel, R. K. O. (eds.). Dordrecht: Springer Finance, p. 1-29.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., and Moulis, J.-M. (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807–1814.
- Mathur, S., Allakhverdiev, S.I., and Jajoo, A. (2011). Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of Photosystem II in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807, 22–29.
- Maxwell, K., Johnson, G., N. (2000). Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Mclaughlin, M., and Singh, B. R. (1999). Cadmium in Soils and Plants: a Global Perspective, En: Mclaughlin, M., and Singh, B. R. (Eds.), *Cadmium in soils and plants*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp 1-19.
- Mehta, P., Allakhverdiev, S.I., and Jajoo, A. (2010). Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis Research* 105, 249–255.
- Mehta, S.K., and Gaur, J.P. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 113–152.
- Melis, A., and Homann, P.H. (1976). Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology* 23, 343-350.
- Monteiro, C., Santos, C., Pinho, S., Oliveira, H., Pedrosa, T., and Dias, M.C. (2012). Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chemical Research in Toxicology* 25, 1423–1434.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares A.M.V.M., and Mann R.M. (2009). Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 811–818.
- Muller, F.L., and Kester, D.R. (1991). Voltammetric determination of the complexation parameters of zinc in marine and estuarine waters. *Marine Chemistry* 33, 71–90.
- Muñoz, R., Alvarez, M.T., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., and Mattiasson, B. (2006). Sequential removal of heavy metal ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere* 63, 903–911.
- Nandi, D.L., and Shemin, D. (1968). δ -aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* 243, 1236-1242.
- Neelam, A. and Rai, L. (2003). Differential responses of three cyanobacteria to UV-B and Cd. *J. Microbiology Biotechnology* 13, 544–551.

- NOM-001-ECOL-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, Diario Oficial/23-04-2003.
- Okamoto, O.K., Asano, C.S., Aidar, E., and Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis Gracilis* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 32, 74–79.
- Olmos, E., Martínez-Solano, J.R., Piqueras, A., and Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany* 54, 291-301.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., and Eleftheriou, E.P. (1997). Environmental Contamination and Toxicology Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. 160, 154–160.
- Paddock, M.L., Graige, M.S., Feher, G., and Okamura, M.Y. (1999). Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of Zn²⁺ or Cd²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6183–6188.
- Padmaja, K., Prasad, D.D.K., and Prasad, A.R.K. (1990). Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* 24, 399-405.
- Pagliano, C., Raviolo, M., Dalla Vecchia, F., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., Rascio, N., Barbato, R., and La Rocca, N. (2006). Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 84, 70–78.
- Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A.T., and Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research* 540, 19–28.
- Parmar, P., Kumari, N., and Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies* 54, 45.
- Perreault, F., Dionne, J., Didur, O., Juneau, P., and Popovic, R. (2011). Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II. *Photosynthesis Research* 107, 151–157.
- Pietrini, F., Iannelli, M.A., Pasqualini, S., and Massacci, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology* 133, 829–837.

- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39, 1008–1018.
- Pradhan, S., and Rai, L.C. (2000). Optimization of flowrate, initial metal ion concentration and biomass density for maximum removal of Cu²⁺ by immobilized *Microcystis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 579-584.
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W., and Fu, Z. (2009). Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 94, 56–61.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., and Kumar, H.D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. *Biological Reviews* 56, 99–151.
- Rod, M., Liu, M., Qi, H., Zhang, Z.P., Song, Z.W., and Kou, T.J. (2012). Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars. *African Journal Agriculture Research* 34, 4751–4760.
- Rodríguez-Serrano, M., Martínez-de la Casa, N., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., and Sandalio, L. M. (2008). Toxicidad del Cadmio en Plantas, *Ecosistemas* 17, 139-146.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A., and Sandalio, L.M. (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164, 1346–1357.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., and Sandalio, L.M. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂ .- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* 27, 1122–1134.
- Salazar, R., and Reyes, R. (2000). Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. *Universidad, Ciencia y Tecnología* 13, 17-22.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 2115-2126.
- Sanità Di Toppi, L., and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105–130.
- Schäfer, H., Hettler, H., Fritsche, U., Pitzen, G., Röderer, G., and Wenzel, A. (1994). Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 27, 64–81.
- Secretaría de Economía. (2013). Disponible en: <http://portalweb.sgm.gob.mx/economia/es/produccion-minera/cadmio/388-tablas-cadmio.html>.

- Seghezzi, L., Zeeman, G., Van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M., and Lettinga, G. (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65, 175-190.
- Sheoran, I.S., Singhal, H. R., and Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynth Res* 23, 345–51.
- SIAFA S.R.I. (2013) Disponible en: <http://www.siafa.com.ar/notisiafa/fichas/cadmio.pdf>.
- Siedlecka, A., and Baszyński, T. (1993). Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiology Plant* 87, 199–202.
- Sigfridsson, K.G. V, Bernát, G., Mamedov, F., and Styring, S. (2004). Molecular interference of Cd(2+) with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1659, 19–31.
- Singh Tomar, R., and Jajoo, A. (2013). A quick investigation of the detrimental effects of environmental pollutant polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on the photosynthetic efficiency of wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology* 22, 1313–1318.
- Stirbet, a, Riznichenko, G.Y., Rubin, a B., and Govindjee (2014). Modeling chlorophyll a fluorescence transient: relation to photosynthesis. *Biochemistry. Biokhimiia* 79, 291–323.
- Stirbet, A., and Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 104, 236–257.
- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., and Sherwood, R.P. (1985). The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum* 63, 293–298.
- Stoepler, M. (1991). Cadmium. In: Merian, E. (Ed.), *Metals and their Compounds in the Environment*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge. pp 803–851.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321–336.
- Strasser, R. J., and Tsimilli-Michael, M. (1998). Activity and heterogeneity of PSII probed in vivo by the chlorophyll a fluorescence rise O–(K)–J–I–P, in: G. Garab (Ed.), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary, vol. V, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 4321–4324.

- Sud, D., Mahajan, G., and Kaur, M. (2008). Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – a review. *Bioresource Technology*: 99, 6017–6027.
- Timperio, A.M., D'Amici, G.M., Barta, C., Loreto, F., and Zolla, L. (2007). Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *Journal of Experimental Botany* 58, 3695–3710.
- Tongra, T., Mehta, P., Mathur, S., Agrawal, D., Bharti, S., Los, D.A., Allakhverdiev, S.I., and Jajoo, A. (2011). Computational analysis of fluorescence induction curves in intact spinach leaves treated at different pH. *Bio Systems* 103, 158–163.
- Tonietto, A.E., Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H., Parrish, C.C., and Choueri, R.B. (2014). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) exudates: chemical characterization and complexation capacity for Cu, Zn, Cd and Pb. *Water Research* 49, 381–390.
- Tsimilli-Michael, M., and Strasser, R.J. (2008). *In vivo* assessment of stress impact on plant's vitality: Applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. En *Mycorrhiza*. Ed. A. Varma. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 679-703.
- Utsching, L.M., Ohigashi, Y., Thurnauer, M.C., and Tiede, D.M. (1998). Centers that modulates QA to QB electron transfer. *Biochemistry* 37, 8278–8281.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., and Jahns, H. M., (1995). *Algae — An Introduction to Phycology*, Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
- Van Heerden, P. D. R., Strasser, R. J., and Krüger, G. H. J. (2004). Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as indicate by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiology Plantarum* 12, 239-249.
- Vassilev, A., Lidon, F.C., Matos, M.C., Ramalho, J.C., and Yordanov, I. (2002). Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium and copper treated barley plants. *Journal of Plant Nutrition* 25, 2343– 2360.
- Vazquez, G.F., Enciso, G., Morales, J.W., and Sharma, V.K. (1999b). Metal ions in water and sediments of the Pom-Atasta lagoon, Mexico. *Environment International* 25, (5) 599-604.
- Vazquez, G.F., Sharma, V.K., Magallanes, V.R., and Marmolejo, A.J. (1999a). Heavy Metals in a Coastal Lagoon of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 38, 479–485.
- Vázquez-Sauceda, M.D.L.L., Pérez-Castañeda, R., Sánchez-Martínez, J.G., and Aguirre-Guzmán, G. (2012). Cadmium and lead levels along the estuarine ecosystem of Tigre River-San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89, 782–785.

- Verma, S.K., and Singh, S.P. (1991). Evidence for energy-dependent copper efflux as a mechanism of Cu²⁺ resistance in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. *FEMS Microbiology Letters* 84, 291-294.
- Vrettos, J.S., Stone, D.A., and Brudvig, G.W. (2001). Quantifying the ion selectivity of the Ca²⁺ site in photosystem II: Evidence for direct involvement of Ca²⁺ in O₂ formation. *Biochemistry* 40, 7937–7945.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117.
- Wan, G., Najeeb, U., Jilani, G., Naeem, M.S., and Zhou, W. (2011). Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napus* L. plants by strengthening their photosynthetic system. *Environmental Science and Pollution Research International* 18, 1478–1486.
- Wang, S., Zhang, D., and Pan, X. (2013). Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow. *Chemosphere* 93, 230–237.
- Wang, Y., Jiang, X., Li, K., Wu, M., Zhang, R., Zhang, L., and Chen, G. (2014). Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L. seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 27, 389–401.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307-313.
- WHO. (1992). Environmental health criteria 134, Cadmium. World Health Organization, Geneva. p 280. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>.
- Wu, M., Wang, P.-Y., Sun, L.-G., Zhang, J.-J., Yu, J., Wang, Y.-W., and Chen, G.-X. (2014). Alleviation of cadmium toxicity by cerium in rice seedlings is related to improved photosynthesis, elevated antioxidant enzymes and decreased oxidative stress. *Plant Growth Regulation*.
- Xue, Z., Gao, H., and Zhao, S. (2014). Effects of cadmium on the photosynthetic activity in mature and young leaves of soybean plants. *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 4656–4664.
- Ying, R.-R., Qiu, R.-L., Tang, Y.-T., Hu, P.-J., Qiu, H., Chen, H.-R., Shi, T.-H., and Morel, J.-L. (2010). Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. *Journal of Plant Physiology* 167, 81–87.
- Young, A.J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiology Plant* 83, 702–708.

Zhou, W., Juneau, P., and Qiu, B. (2006). Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere* 65, 1738–1746.

VIII APÉNDICE

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

Figura 1. Crecimiento (Peso Seco)

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Peso Seco

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.05269496	0.01053899	43.98	<.0001
Error	12	0.00287574	0.00023965		
Total correcto	17	0.05557070			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE y Media
0.948251 12.77578 0.015480 0.121171

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
t	5	0.05269496	0.01053899	43.98	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Peso Seco

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.00024
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0425

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.21110	3	1
B	0.16556	3	2
B			
C B	0.12556	3	3
C			
C D	0.09889	3	4
D			
E D	0.07333	3	5
E			
E	0.05259	3	6

Figura 2. Tasa de crecimiento relativo (μ)

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Tasa de crecimiento relativo (μ)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.00081478	0.00016296	48.57	<.0001
Error	12	0.00004026	0.00000335		
Total correcto	17	0.00085504			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.952914	7.35937	0.001832	0.024889

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.00081478	0.00016296	48.57	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Tasa de crecimiento relativo

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	3.355E-6
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.005

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.034433	3	1
A			
B A	0.030700	3	2
B			
B C	0.026900	3	3
C			
D C	0.023533	3	4
D			
D C	0.019400	3	5
E	0.014367	3	6

Figura 4. Clorofila total específica

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Clorofila total

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	183.6588203	36.7317641	220.27	<.0001
Error	12	2.0011177	0.1667598		
Total correcto	17	185.6599380			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.989222	6.827736	0.408362	5.980933

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
t	5	183.6588203	36.7317641	220.27	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Clorofila total

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.16676
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	1.1199

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	11.3743	3	1
B	9.2378	3	2
C	4.9597	3	3
C			
D C	3.9949	3	4
D			
D E	3.7141	3	5
E			
E	2.6048	3	6

Figura 5. Carotenoides totales específicos

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Carotenoides totales específicos

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	3.72723601	0.74544720	15.36	<.0001
Error	12	0.58236101	0.04853008		
Total correcto	17	4.30959702			

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE y Media
0.864869 25.98249 0.220295 0.847861

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
t	5	3.72723601	0.74544720	15.36	<.0001

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 12
Error de cuadrado medio 0.04853
Valor crítico del rango estudentizado 4.75015
Diferencia significativa mínima 0.6042

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	1.4857	3	4
A			
A	1.2907	3	6
A			
B A	1.0675	3	5
B			
B C	0.5434	3	3
C			
C	0.3859	3	1
C			
C	0.3139	3	2

Figura 6. Liberación de oxígeno

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Liberación de oxígeno

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	8870.384766	1774.076953	20.55	<.0001
Error	12	1035.854583	86.321215		
Total correcto	17	9906.239349			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.895434	13.50053	9.290921	68.81893

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	8870.384766	1774.076953	20.55	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Liberación de oxígeno

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	86.32122
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	25.48

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	96.127	3	3
A			
B A	84.548	3	2
B A			
B A	82.967	3	1
B			
B	70.242	3	4
C	44.201	3	5
C			
C	34.828	3	6

Figura 7. Máxima eficiencia fotoquímica del PSII en la luz (Fv/Fm)

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Fv/Fm

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.06039578	0.01207916	9.73	0.0007
Error	12	0.01490333	0.00124194		
Total correcto	17	0.07529911			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.802078	5.595820	0.035241	0.629778

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.06039578	0.01207916	9.73	0.0007

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Fv/Fm

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.001242
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0966

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.68733	3	1
A			
B A	0.67000	3	4
B A			
B A	0.65800	3	2
B A			
B A	0.65500	3	3
B			
B C	0.58833	3	5
C			
C	0.52000	3	6

Figura 8. Transporte electrónico aparente ETR

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Transporte electrónico aparente

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1634.555877	326.911175	10.69	0.0004
Error	12	366.900177	30.575015		
Total correcto	17	2001.456054			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.816683	18.69042	5.529468	29.58450

Fuente	DF	Cuadrado de Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1634.555877	326.911175	10.69	0.0004

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Transporte electrónico aparente

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	30.57501
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	15.165

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	45.205	3	1
A			
A	38.251	3	2
A			
B A	30.916	3	3
B			
B	22.820	3	4
B			
B	20.647	3	6
B			
B	19.669	3	5

Figura 9. Decaimiento No-Fotoquímico NPQ

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Decaimiento No-Fotoquímico

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.18638244	0.03727649	4.62	0.0140
Error	12	0.09689067	0.00807422		
Total correcto	17	0.28327311			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.657960	22.76133	0.089857	0.394778

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.18638244	0.03727649	4.62	0.0140

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Decaimiento No-fotoquímico

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.008074
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.2464

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.50967	3	3
A			
A	0.48900	3	2
A			
B A	0.47033	3	4
B A			
B A	0.34600	3	5
B A			
B A	0.32233	3	6
B			
B	0.23133	3	1

Figura 15. Complejos liberadores de oxígeno activos

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Complejos liberadores de oxígenos activos

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.48654558	0.29730912	203.28	<.0001
Error	42	0.06142604	0.00146252		
Total correcto	47	1.54797162			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.960318	6.143223	0.038243	0.622523

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	1.48654558	0.29730912	203.28	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Complejos liberadores de oxígeno activos

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001463
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0571

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	1.00000	8	1
B	0.60833	8	2
B	0.60104	8	4
B	0.55800	8	3
C	0.48951	8	6
C	0.47826	8	5

Figura 16. Centros de reacción activos RC/ABS

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Centros de reacción activos

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.06448233	0.01289647	57.81	<.0001
Error	42	0.00937025	0.00022310		
Total correcto	47	0.07385258			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.873122	5.433143	0.014937	0.274916

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.06448233	0.01289647	57.81	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Centros de reacción activos

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000223
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0223

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.318223	8	2
A			
B A	0.300895	8	1
B			
B C	0.291456	8	3
C			
D C	0.270536	8	5
D			
D	0.265018	8	4
E			
E	0.203368	8	6

Figura 17. Absorción por centro de reacción ABS/RC

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Absorción por centro de reacción

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	16.69065484	3.33813097	45.31	<.0001
Error	42	3.09461410	0.07368129		
Total correcto	47	19.78526894			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.843590	7.281826	0.271443	3.727677

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	16.69065484	3.33813097	45.31	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para la absorción por centro de reacción

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.073681
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.4052

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	4.9489	8	6
B	3.8053	8	4
B			
C B	3.7068	8	5
C B			
C B D	3.4378	8	3
C			
C	D	3.3240	8
D			
D	3.1433	8	2

Figura 18. Atrapamiento por centro de reacción (TRo/RC)

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Atrapamiento por centro de reacción

Fuentes	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.47057498	0.09411500	7.41	<.0001
Error	42	0.53359409	0.01270462		
Total correcto	47	1.00416907			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.468621	5.023626	0.112715	2.243694

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.47057498	0.09411500	7.41	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Atrapamiento por centro de reacción

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.012705
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.1682

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	2.40704	8	6
A			
B A	2.31840	8	4
B			
B C	2.23838	8	5
B C			
B C	2.21248	8	1
B C			
B C	2.19419	8	3
C			
C	2.09169	8	2

Figura 19. Transporte electrónico por centro de reacción (ETo/ RC)

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Transporte electrónico por centro de reacción

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.03008269	0.00601654	3.68	0.0075
Error	42	0.06875108	0.00163693		
Total correcto	47	0.09883377			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.304377	4.905459	0.040459	0.824775

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.03008269	0.00601654	3.68	0.0075

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Transporte electrónico por centro de reacción

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001637
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0604

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.85266	8	1
A			
A	0.85261	8	5
A			
A	0.84304	8	4
A			
A	0.80583	8	3
A			
A	0.79776	8	2
A			
A	0.79675	8	6

FIGURA 20. Disipación por centro de reacción Dio/RC

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Disipación por centro de reacción

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	12.02251607	2.40450321	76.10	<.0001
Error	42	1.32704600	0.03159633		
Total correcto	47	13.34956207			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.900593	11.97814	0.177754	1.483983

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	12.02251607	2.40450321	76.10	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Disipación por centro de reacción

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.031596
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.2653

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	2.54186	8	6
B	1.48686	8	4
B	1.46845	8	5
B	1.24358	8	3
C B	1.11154	8	1
C	1.05161	8	2

Figura 21. Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria Φ_{Po}

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.17533322	0.03506664	187.18	<.0001
Error	42	0.00786825	0.00018734		
Total correcto	47	0.18320146			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.957051	2.236385	0.013687	0.612023

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.17533322	0.03506664	187.18	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000187
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0204

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.665625	8	1
A	0.665500	8	2
B	0.638525	8	3
C	0.610563	8	4
C	0.604063	8	5
D	0.487863	8	6

Figura 22. Probabilidad que un electrón atrapado en el centro de reacción se mueva más allá de $Q_A - \Psi_0$

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.01559856	0.00311971	16.05	<.0001
Error	42	0.00816290	0.00019435		
Total correcto	47	0.02376146			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.656465	3.783356	0.013941	0.368485

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.01559856	0.00311971	16.05	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000194
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0208

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.385363	8	1
A			
B A	0.381413	8	2
B A			
B A	0.380650	8	5
B A			
B A	0.367100	8	3
B			
B	0.364388	8	4
C	0.332000	8	6

Figura 23. Rendimiento cuántico del transporte electrónico Eo

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.01559856	0.00311971	16.05	<.0001
Error	42	0.00816290	0.00019435		
Total correcto	47	0.02376146			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.656465	3.783356	0.013941	0.368485

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.01559856	0.00311971	16.05	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000194
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0208

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.385363	8	1
A			
B A	0.381413	8	2
B A			
B A	0.380650	8	5
B A			
B A	0.367100	8	3
B			
B	0.364388	8	4
C	0.332000	8	6

Figura 24. Probabilidad con la que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduce los acarreadores del lado aceptor del PSI SRO.

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.23393766	0.04678753	38.28	<.0001
Error	42	0.05132971	0.00122214		
Total correcto	47	0.28526736			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.820065	7.286841	0.034959	0.479756

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.23393766	0.04678753	38.28	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001222
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0522

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.59669	8	1
B	0.53290	8	2
B			
C B	0.48344	8	3
C			
C	0.45092	8	6
C			
C	0.43373	8	4
D	0.38085	8	5

Figura 25. Rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI Ro

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.02404290	0.00480858	208.75	<.0001
Error	42	0.00096749	0.00002304		
Total correcto	47	0.02501039			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.961317	6.992763	0.004800	0.068636

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	0.02404290	0.00480858	208.75	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000023
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0072

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	0.101869	8	1
B	0.090006	8	2
C	0.072417	8	3
D	0.058989	8	4
D	0.052901	8	5
E	0.035632	8	6

Figura 26. Índice de rendimiento total PI Total

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Y

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	133.5131535	26.7026307	203.66	<.0001
Error	42	5.5067048	0.1311120		
Total correcto	47	139.0198584			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Y Media
0.960389	12.69221	0.362094	2.852882

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
T	5	133.5131535	26.7026307	203.66	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.131112
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.5405

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	5.5621	8	1
B	4.4679	8	2
C	2.8331	8	3
D	1.8495	8	4
D	1.5799	8	5
E	0.8248	8	6

Figura 27. Acumulación celular de Cd²⁺

Sistema SAS
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Acumulación celular de Cd²⁺

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	14.65739931	2.93147986	3850.76	<.0001
Error	12	0.00913527	0.00076127		
Total correcto	17	14.66653458			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.999377	3.647612	0.027591	0.756417

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
t	5	14.65739931	2.93147986	3850.76	<.0001

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000761
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0757

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	2.52446	3	6
B	1.28240	3	5
C	0.51567	3	4
D	0.18577	3	3
E	0.03019	3	2
E			
E	0.00000	3	1