

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Microbiología

Estudio de la interacción del cobalto y el
molibdeno con el cadmio en la microalga
Chlamydomonas moewusii.

Estudio da interacción do cobalto e do
molibdeno co cadmio na microalga
Chlamydomonas moewusii.

Study of the interaction of cobalt and
molybdenum with cadmium in the microalga
Chlamydomonas moewusii.

Sergio Codesal García
Trabajo de fin de grado
Fecha de defensa: 21/09/2015

Dirigido por el Dr. Enrique Torres Vaamonde.

Índice

- Resumen/ Summary
1. Introducción
 2. Materiales y métodos
 - 2.1. Microalga y condiciones del cultivo
 - 2.2. Productos químicos
 - 2.3. Soluciones stock de cadmio, cobalto y molibdeno
 - 2.4. Diseño experimental y tratamientos
 - 2.5. Estudio del crecimiento celular
 - 2.6. Estudio de la determinación de pigmentos
 - 2.7. Análisis estadístico
 3. Resultados
 - 3.1. Crecimiento celular
 - 3.2. Pigmentos fotosintéticos (Clorofilas *a/b* y Carotenoides)
 4. Discusión
 5. Conclusión/ Conclusions
 6. Bibliografía

Resumen

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos muy usados en estudios toxicológicos. Por eso en este ensayo se utiliza una microalga verde dulceacuícola llamada *Chlamydomonas moewusii* con el fin de observar el efecto de la interacción entre dos metales esenciales (cobalto y molibdeno) y uno no esencial (cadmio) estudiando dos parámetros, el crecimiento celular y la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales). En cuanto a la interacción cobalto-cadmio resultó estadísticamente significativo y con una gran robustez para los dos parámetros. En el segundo caso, molibdeno-cadmio, también para los dos parámetros, el resultado fue estadísticamente significativo aunque el efecto de la interacción fue mucho menor. Esto es debido a la diferente estructura que presentan el cobalto (Co^{2+}) y el molibdeno (MoO_4^{2-}), ya que el cobalto es un ion más parecido al cadmio (Cd^{2+}) que el molibdeno, lo cual permite que ambos puedan competir más fácilmente por los sitios de unión en las dianas celulares.

Summary

Algae are a group of photosynthetic organisms very used in toxicological studies. Why in this trial used a green microalgae freshwater called *Chlamydomonas moewusii* in order to observe the effect of the interaction between two essential metals (cobalt and molybdenum) and one not essential (cadmium) studying two parameters, cell growth and the concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids). As for the interaction cobalto-cadmio was statistically significant and with great strength for the two parameters. In the second case, molibdeno-cadmio, also for the two parameters, the result was statistically significant even though the effect of the interaction was much lower. This is due to the different structure featuring cobalt (Co^{2+}) and molybdenum (MoO_4^{2-}), cobalt is a more like cadmium (Cd^{2+}) to molybdenum ion, which allows that both can compete more easily by binding sites in the cellular targets.

1. Introducción

La contaminación de los organismos por metales es un tema que ha ido adquiriendo mucha importancia en las últimas décadas como consecuencia del aumento de los niveles de desechos contaminantes, con su consecuente impacto en los organismos (Deef, 2008). Esto se produce debido a que los organismos acumulan los metales en su interior y los incorporan en diferentes procesos de su metabolismo. Esta incorporación tiene lugar desde los primeros escalones de la cadena trófica (Carfagna et al., 2013).

Demirbas and Demirbas (2010) definen las microalgas como un grupo de microorganismos fotosintéticos que se encuentran en ambientes marinos y dulceacuícolas y clasificadas en tres grandes grupos (diatomeas, algas verdes y algas pardas). Estos microorganismos presentan una gran importancia debido a su rol de productores primarios, aportando gran cantidad de oxígeno a la atmósfera. También tienen uso comercial como alimento en la industria de la acuicultura y presentan importancia ecológica gracias a los diferentes efectos que sobre ellas ejercen los contaminantes como pueden ser los metales (Liu et al., 2011). Por todo esto, en este estudio se utilizó una microalga para ensayar los efectos de ciertos metales. Se utilizó una microalga verde de la familia de las Clorofíceas llamada *Chlamydomonas moewusii* Gerloff.

Los metales son un grupo de elementos químicos que tienen unas propiedades fisicoquímicas comunes. Dentro de los metales conviene distinguir entre metales no esenciales y metales esenciales (El-Sheekh et al., 2003). Los metales no esenciales (Fig. 1-B) son un grupo que se incorpora al organismo sin aportar un beneficio, sino que por el contrario pueden ser altamente tóxicos; mientras que los metales esenciales (Fig. 1-A) son necesarios a nivel fisiológico a bajas concentraciones puesto que desempeñan alguna función biológica, pero que sin embargo también pueden llegar ser tóxicos cuando su concentración es elevada. Las concentraciones óptimas de los metales varían entre los diferentes organismos.

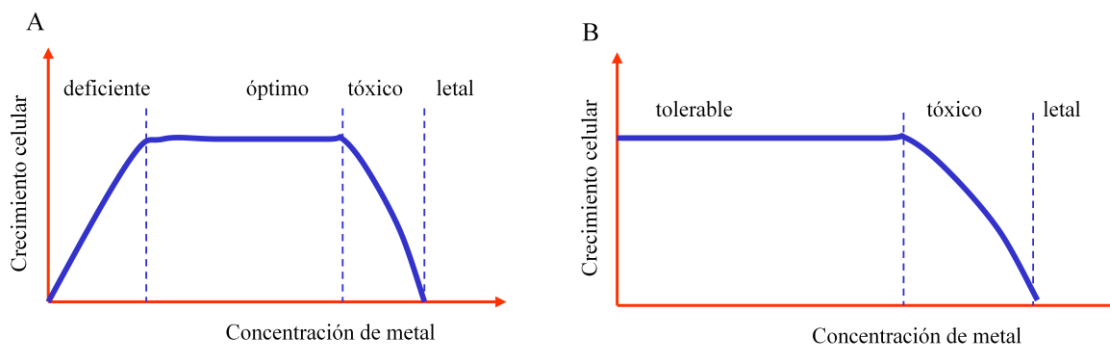


Fig. 1. Esquema de crecimiento celular a medida que aumenta la concentración de un metal esencial (A) o no esencial (B).

Como dice Sigfridsson *et al.* (2004), los microorganismos tienen metabolismos muy variados de los que entran a formar parte una gran cantidad de metales, que pueden

entrar en las células de una manera directa o por medio de canales o bombas, para finalmente ser productos de reacciones del metabolismo.

En este estudio, se realiza un ensayo a nivel de laboratorio en una microalga con el fin de detectar la posible interacción que pueda haber entre un metal no esencial como es el cadmio (Cd) con otros dos metales esenciales, que son el cobalto (Co) y el molibdeno (Mo). Esta posible interacción se valora a través de diferentes parámetros, como el crecimiento y la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales).

El cadmio es un elemento químico que no se encuentra en estado puro en la naturaleza, sino que se suele encontrar mayoritariamente en los concentrados acompañados de otros metales como zinc, plomo o cobre. La liberación de cadmio se produce principalmente por el desgaste o erosión de las rocas, aunque una vez alcanzada la etapa de la Revolución Industrial en la segunda mitad del siglo XVIII se produjo la volatilización de cadmio en el proceso de desulfuración de los productos de zinc, dando lugar a un aumento de la concentración de cadmio disponible. Actualmente el cadmio tiene múltiples usos en pigmentos, pinturas, baterías, cristales de PVC, soldaduras o reactores nucleares. Con el paso del tiempo la liberación de este elemento ha sido más alta hasta llegar a un pico en el año 2006, con casi 21000 toneladas de cadmio en todo el mundo, aunque desde ese momento hasta la actualidad este valor ha ido disminuyendo lentamente, a pesar de que sigue en unos niveles relativamente altos (<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm>).

En organismos fotosintéticos, como pueden ser las algas, el cadmio actúa con un efecto deletéreo mediante la inhibición del crecimiento, la formación de radicales libres o la inhibición de la fotosíntesis (mediante la inactivación del fotosistema II del aparato fotosintético en la fase luminosa de la fotosíntesis) (Faller *et al.*, 2005).

Por el contrario, el cobalto y el molibdeno son dos metales que se encuentran de una manera bastante abundante en la naturaleza, y actúan como nutrientes esenciales para una gran cantidad de microorganismos.

El cobalto se encuentra de una forma natural en las rocas ígneas, en aguas dulces y en el mar, además de aparecer trazas en minerales de hierro, cobre, plata, manganeso y zinc. Este compuesto es muy utilizado en la industria para combinarlo con el hierro en la producción de acero más resistente. Esta utilización provoca que parte del cobalto sea liberado y esté disponible para los organismos (<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/co.htm>). El cobalto forma parte de una serie de procesos en los que están involucradas numerosas enzimas, como es el caso, por ejemplo, de enzimas antioxidantes (Gholamioutimi and Soltani, 2014), que son utilizados como mecanismos de defensa por las plantas (Peralta-Perez and Volke-Sepúlveda, 2012).

El molibdeno es un metal que no se encuentra en forma pura en la naturaleza, su principal fuente es un mineral llamado molibdenita (MoS_2), aunque también se puede encontrar en menor cantidad en otros minerales como wulfenita (PbMoO_4) y powellita

(CaMoO₄). Este compuesto es muy utilizado para la creación de isótopos nucleares estables, en piezas de avión, coches y en la construcción (<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mo.htm>). Además participa en reacciones metabólicas muy importantes para el organismo como puede ser el papel que juega en la incorporación del nitrógeno, formando parte de la enzima nitrogenasa dependiente de molibdeno (Zimmer and Mendel, 1999; Zahalak *et al.*, 2004).

2. Materiales y métodos

2.1. Microalga y condiciones del cultivo

La microalga elegida para este estudio es *Chlamydomonas moewusii* Gerloff (Fig. 2) (ver ANEXO I). Este organismo es una microalga verde de vida libre con una gran capacidad de movimiento gracias a sus flagelos y se caracteriza por ocupar ambientes de agua dulce en la naturaleza.

Estructuralmente se caracteriza por presentar una pared celular relativamente gruesa, un gran cloroplasto con una morfología variable y con el que puede realizar la fotosíntesis, y dos vacuolas pulsátiles (Fig. 2-A).

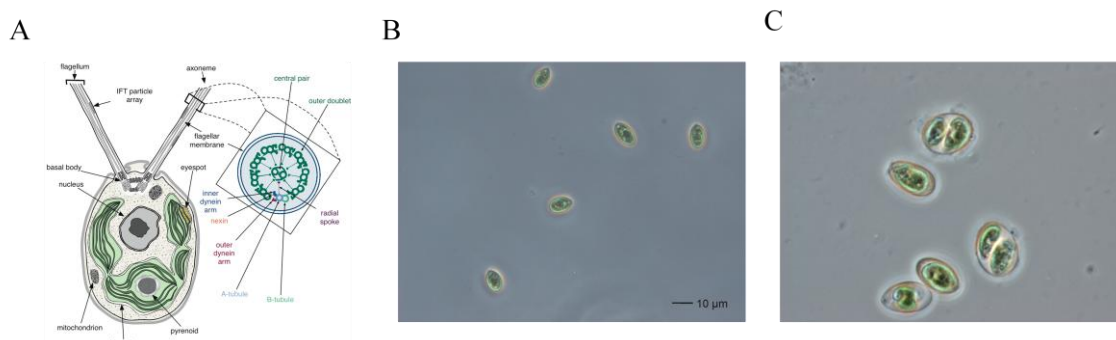


Fig. 2. Estructura de la microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. (A) Esquema de una célula de la microalga con la estructura flagelar. (B) Microfotografía obtenida con microscopio de contraste de fases (40X). (C) Microfotografía obtenida con el microscopio óptico con aceite de inmersión (100X).

Con el fin de realizar nuestro estudio, las microalgas son cultivadas y mantenidas en un medio de cultivo Bristol modificado (Tabla 1), que previamente es esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Tabla. 1. Composición del medio de cultivo Bristol para las experiencias.

Compuesto	Concentración (g/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.85x10 ⁻²
MgCl ₂	0.029
K ₂ HPO ₄	0.075
KH ₂ PO ₄	0.175
NaCl	0.025
NaNO ₃	0.250
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.510
H ₃ BO ₃	0.200
ZnCl ₂	0.105
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.510
MoO ₄ Na ₂ ·2H ₂ O	Variable
CuCl ₂	0.043

CoCl ₂ .6H ₂ O	Variable
Na ₂ SO ₄	1.92
pH	6.9

Las diferentes concentraciones de MoO₄Na₂.2H₂O y CoCl₂.6H₂O dependen de las experiencias. Los cultivos de microalgas se mantienen en unas condiciones determinadas que son 18±1°C de temperatura, bajo una intensidad de luz de 68μE/(m²s) con una luz fluorescente y usando ciclos de luz y oscuridad 12:12h. Las microalgas se mantienen en constante aireación con un flujo continuo de aire de aproximadamente 10 L/min.

2.2. Productos químicos

Todos los productos utilizados, tanto para la preparación del medio de cultivo como para la preparación de los stocks, son de la mayor pureza posible. Para la preparación de los productos químicos se ha utilizado una balanza de precisión (hasta cuatro decimales), completando la disolución de los productos con agua destilada.

2.3. Soluciones stock de cadmio, cobalto y molibdeno

La solución stock de cadmio se prepara a partir de cloruro de cadmio (CdCl₂) con una concentración de 10 g/L. A partir de esta solución stock se toman diferentes volúmenes para obtener las concentraciones que se utilizan en las diferentes experiencias (0, 1, 2, 4, 6, 8 mg Cd(II)/L).

Las solución stock de cobalto, preparada a partir de CoCl₂.6H₂O, con una concentración de 3.99x10² mg/L y de molibdeno MoO₄Na₂.2H₂O, con 3.75x10³ mg/L se realizan de manera similar. Las concentraciones escogidas corresponden a diferentes múltiplos (x0, x1/2, x1, x2, x3) de la concentración normal de estos metales esenciales en el medio de cultivo y que correspondería a la concentración denominada x1.

2.4. Diseño experimental y tratamientos

El cultivo de *C. moewusii* se realiza en botellas de vidrio Pyrex de 100 mL bajo las condiciones descritas anteriormente. Para estudiar la posible interacción se utiliza un método de experimento bifactorial en el que hay dos variables.

Para la primera experiencia se varían las concentraciones de cadmio y de cobalto, mientras que para la segunda experiencia las variaciones serán entre el cadmio y el molibdeno. En la variable cadmio, los valores que se utilizan son 1, 2, 4, 6, 8 mg/L, mientras que tanto para el cobalto como para el molibdeno, las variables son x0, x1/2, x1, x2 y x3 de la concentración normal que presentan estos elementos en el medio de cultivo. También se incluyen cultivos control sin cadmio. Previamente a los experimentos, la microalga se mantiene sin el metal esencial que se va a ensayar. Los experimentos se llevan a cabo con una duración de 96h. La densidad inicial de los cultivos para los ensayos es de 40x10⁴ células/mL. En total, se prueban 72 tratamientos diferentes según las variables especificadas.

2.5. Estudio del crecimiento celular

Para evaluar el crecimiento de la microalga, se llevó a cabo un recuento celular en cada uno de los tratamientos. Los recuentos celulares se realizaron cada 24h a tiempos similares. La metodología empleada para este proceso consiste en recoger una muestra de 1 mL de cada tratamiento en un tubo de ensayo de plástico, a continuación se le añade a cada tubo 10 μ L de lugol ($I_2 + KI$) con el fin de fijar las células y así impedir el movimiento continuo que tienen debido a sus flagelos. Finalmente se añaden 10 μ L de la mezcla a una cámara de recuento Neubauer y se cuentan las células con la ayuda de un microscopio de contraste de fases. Cada una de las pruebas del recuento celular se ha realizado por triplicado con el fin de obtener un error menor en los datos.

2.6. Estudio de la determinación de pigmentos

Para obtener datos acerca de los pigmentos fotosintéticos se sigue una metodología que consiste, en primer lugar, en la extracción del pigmento y luego la cuantificación del mismo. En este proceso se siguen una serie de pasos:

1. Recoger 15 mL de cada uno de los cultivos en un tubo Falcon de plástico y centrifugar las células a 4500xg durante 15 minutos, desechando posteriormente el sobrenadante.
2. Lavar el pellet con 5 mL de agua destilada y volver a centrifugar a 4500xg durante 15 minutos, desechando el sobrenadante.
3. Si el proceso no se va a continuar en el momento, guardar las muestras en el congelador a $-80^{\circ}C$ para la posterior extracción.
4. Descongelar las muestras a temperatura ambiente y añadir 3 mL de acetona 90%.
5. Sonicar cada muestra en un ciclo de 30 segundos de sonicación (100% de amplitud y continuo), 30 segundos sin sonicación y 30 segundos de sonicación. Los tubos se mantienen a una temperatura de $4^{\circ}C$ (agua con hielo).
6. Tapar herméticamente los tubos (sin que les incida la luz) y colocar en la nevera ($4^{\circ}C$) durante 24h en oscuridad para realizar la extracción de los pigmentos.
7. La clarificación del extracto se lleva a cabo mediante la centrifugación a 13000xg durante 15 minutos.
8. Los sobrenadantes se colocan en cubetas de vidrio para la lectura en el espectrofotómetro a 664, 647, 630 y 480 nm utilizando acetona 90% como blanco.

Una vez cuantificadas las muestras en el espectrofotómetro, se calcula la concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides que tiene cada tratamiento según las fórmulas tricromáticas:

- $CLO-a$ ($\mu g/L$) = $(11.85 \times A_{664}) - (1.54 \times A_{647}) - (0.08 \times A_{630}) \times \text{vol. extracto (mL)} / \text{vol. cultivo (L)}$
- $CLO-b$ ($\mu g/L$) = $(-5.43 \times A_{664}) + (21.03 \times A_{647}) - (2.66 \times A_{630}) \times \text{vol. extracto (mL)} / \text{vol. cultivo (L)}$
- CAR (g/L) = $A_{480} \times \text{vol. extracto (mL)} / ((100 \times E_{1cm}^{1\%}) / \text{vol. cultivo (L)})$
 $100 \times E_{1cm}^{1\%} = 2500$

Esta prueba de cuantificación de las clorofilas se ha realizado por triplicado con el objetivo de disminuir el error en los datos que se obtienen.

2.7. Análisis estadístico

Para cada una de las experiencias citadas anteriormente se realiza un ANOVA de dos factores mediante la utilización del paquete estadístico R con su aplicación R-commander. Este análisis se realiza con el fin de detectar una posible interacción entre el cadmio y el cobalto o molibdeno. Los análisis se harán siempre bajo un nivel de significación $\alpha=0.05$.

3. Resultados

3.1. Crecimiento celular

De manera general se observa que el patrón de crecimiento es similar tanto para las experiencias en las que la variable era el cobalto como para experiencias en las que la variable era el molibdeno, es decir, comienza el crecimiento en la fase exponencial hasta aproximadamente el tercer día de crecimiento hasta que, entre el tercer y el cuarto día se produce el cambio a la fase estacionaria en las que el crecimiento es prácticamente nulo.

También se observa que se produce un mayor crecimiento en las experiencias en las que el metal ensayado es el cobalto, obteniéndose en este caso un crecimiento máximo de $290,775 \times 10^4$ células/mL en la concentración normal de cobalto ([Co]=x1).

Se produce un descenso en el crecimiento según se va aumentando la concentración de cadmio, lo cual es debido a su alta toxicidad, así a partir de los 2 mg Cd(II)/L el crecimiento es muy reducido o prácticamente nulo (Fig. 3).

El crecimiento con cobalto según las diferentes concentraciones de cadmio (Fig. 4), muestra un crecimiento óptimo en la concentración normal de cobalto, mientras que en la variación de la concentración, tanto aumentando como disminuyéndola se produce un descenso en el crecimiento. Este descenso en el crecimiento es más acusado cuando se aumenta la concentración de cobalto ([Co]= x2 y x3).

En esta gráfica también se observa que a medida que el tiempo de exposición al cobalto es mayor, se obtiene mayor crecimiento llegando a la fase estacionaria en el día cuatro en donde se ve que el crecimiento se detiene.

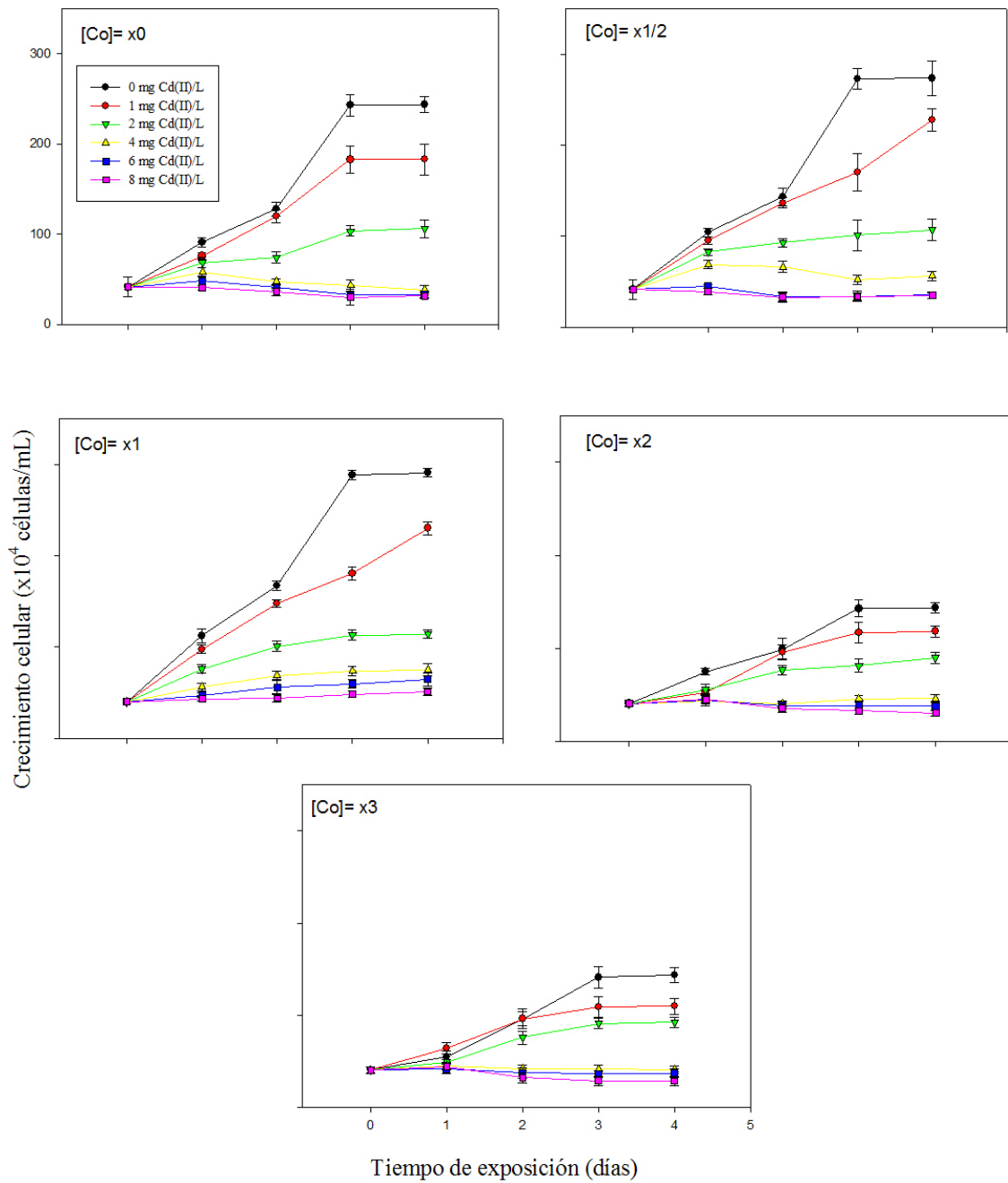


Fig. 3. Gráficos de crecimiento de los cultivos con diferentes concentraciones de cadmio según la concentración de cobalto.

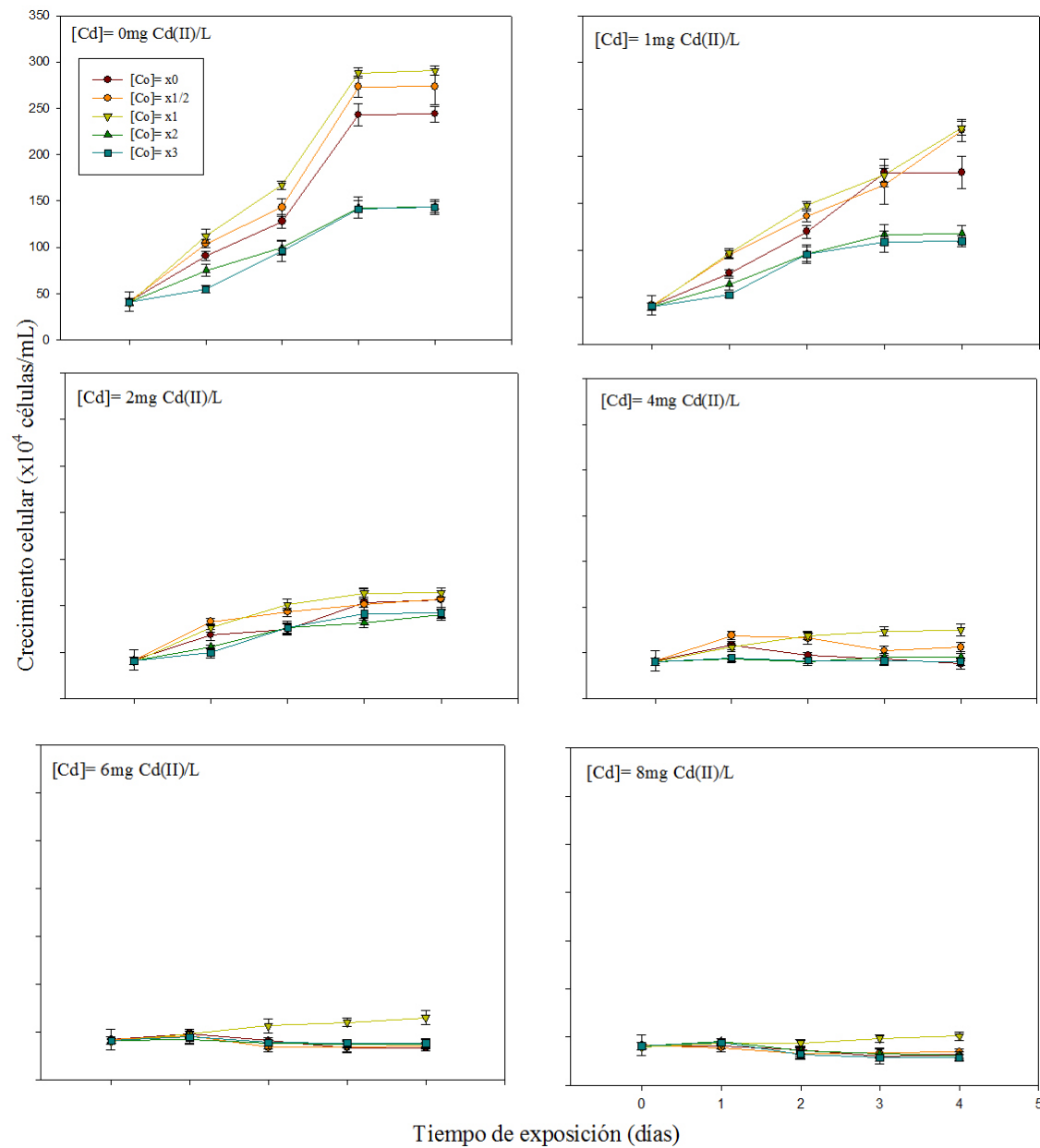


Fig. 4. Gráficos de crecimiento de las diferentes concentraciones de cobalto según la concentración de cadmio presente.

En lo que se refiere al molibdeno, se obtiene un crecimiento máximo de $164,5 \times 10^4$ células/mL. Se observa que a medida que disminuye la concentración del elemento tóxico, en este caso el cadmio, el efecto sobre el crecimiento es una tendencia a aumentar y el crecimiento, igual que en cobalto, es mayor con la concentración normal ([Mo]= x1), mientras que a concentración superior e inferior el crecimiento se ve afectado reduciéndose (Fig. 5). Comparando este resultado con los del cobalto, globalmente se aprecia un menor crecimiento en el caso del molibdeno.

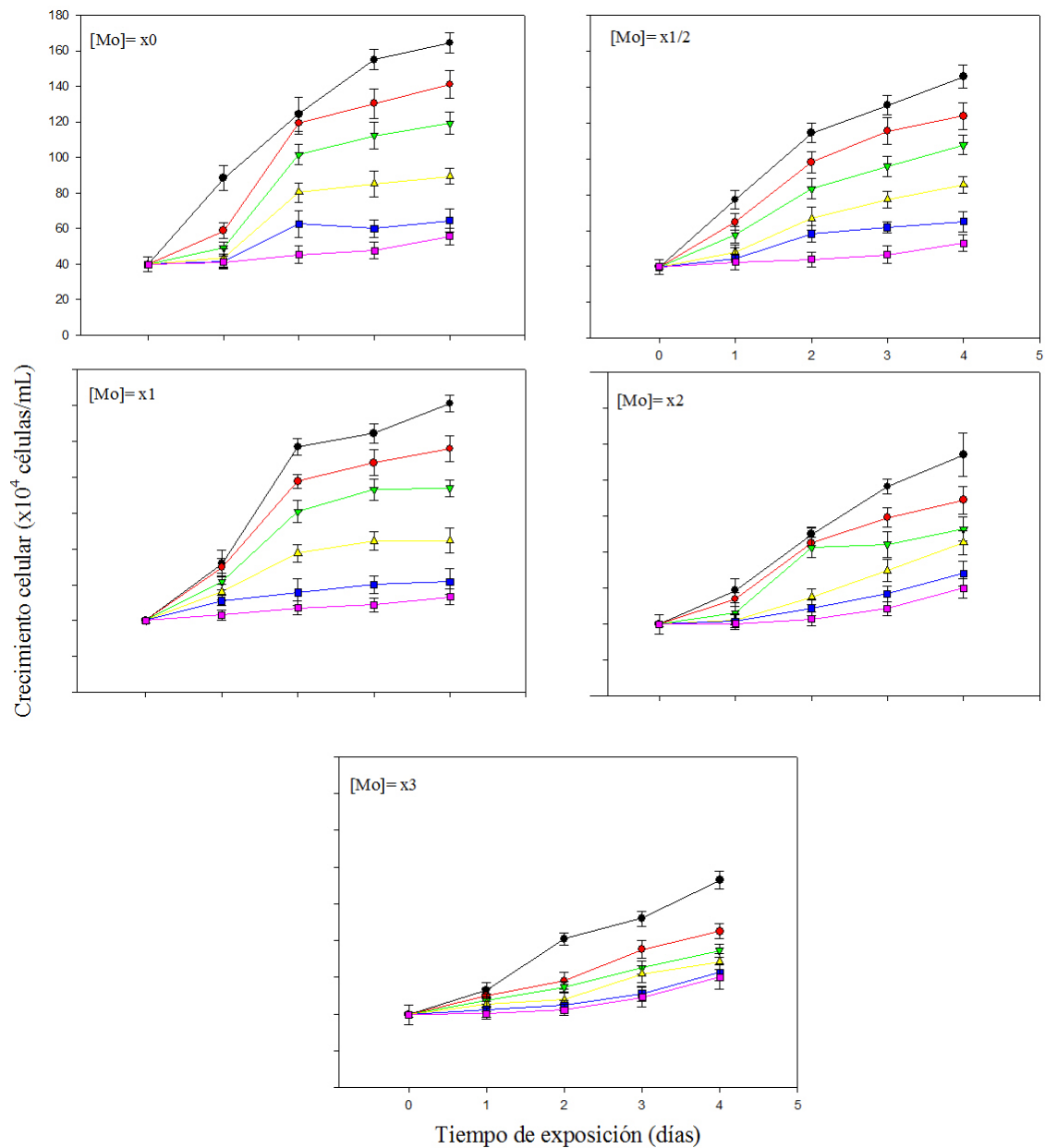


Fig. 5. Gráficos de crecimiento del cadmio según la concentración de molibdeno.

Los datos obtenidos para el crecimiento de molibdeno según la concentración de cadmio (Fig. 6) muestran que en ausencia de cadmio los cultivos aumentan su crecimiento a medida que se restablecen los niveles de este metal esencial.

En este caso también se observa el efecto de reducción del crecimiento según aumenta la concentración de cadmio aunque la toxicidad en este caso se ve ampliamente incrementada a partir de los 4 mg Cd(II)/L, siendo prácticamente nulo en 6 y 8 mg Cd(II)/L.

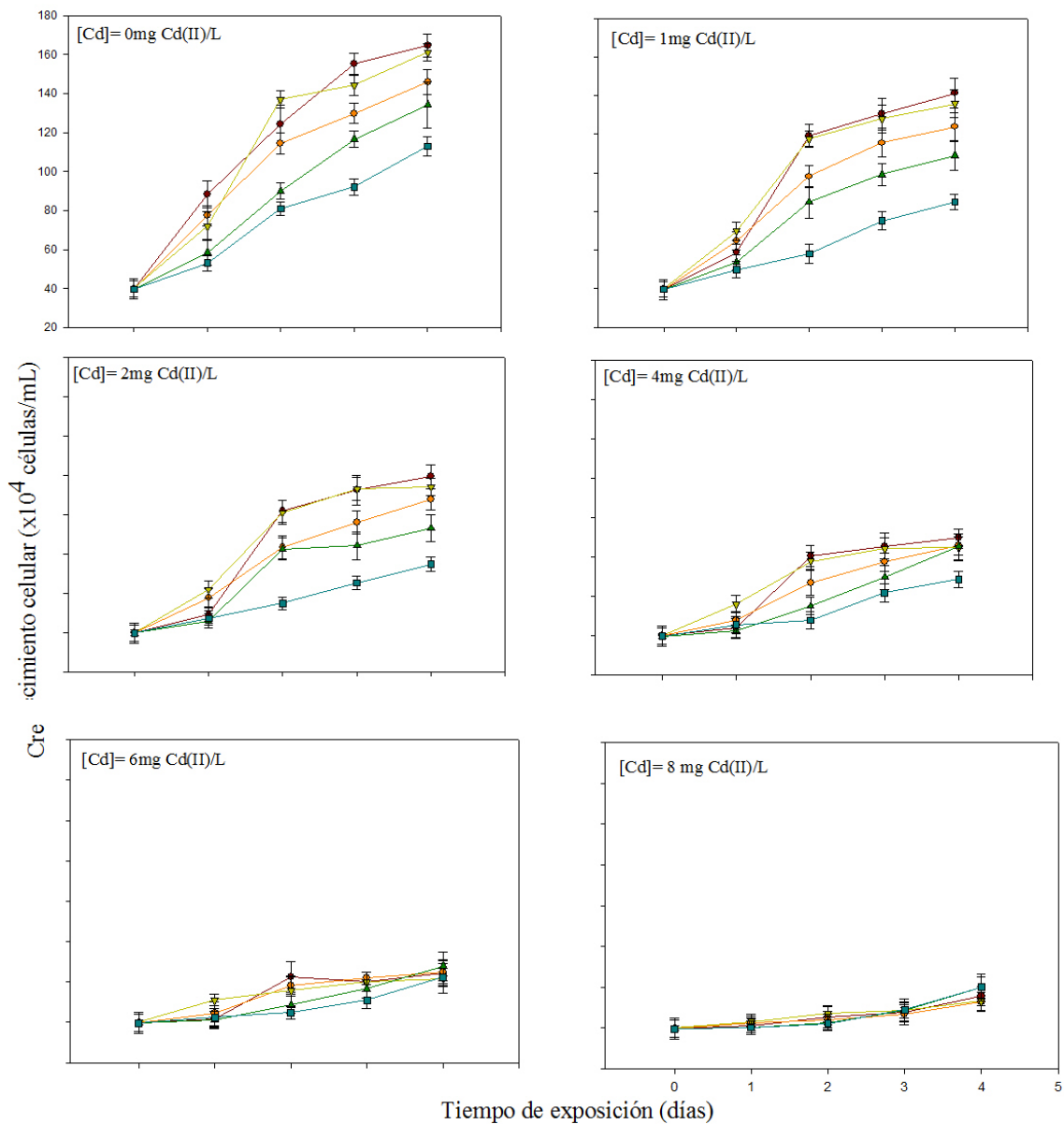


Fig. 6. Gráficos de crecimiento de molibdeno según la concentración de cadmio.

3.2. Pigmentos fotosintéticos (Clorofilas *a/b* y Carotenoides)

Las curvas que presentan las gráficas de los pigmentos son similares a las que se presentaban para los ensayos de crecimiento celular: 1- mayor cantidad de pigmentos por unidad de volumen a menor concentración de cadmio, 2- cambio en la cantidad de pigmento según el micronutriente esencial que se varíe (molibdeno o cobalto), 3- valores mayores de contenido de pigmento por unidad de volumen con cobalto que con molibdeno (Fig. 7-18).

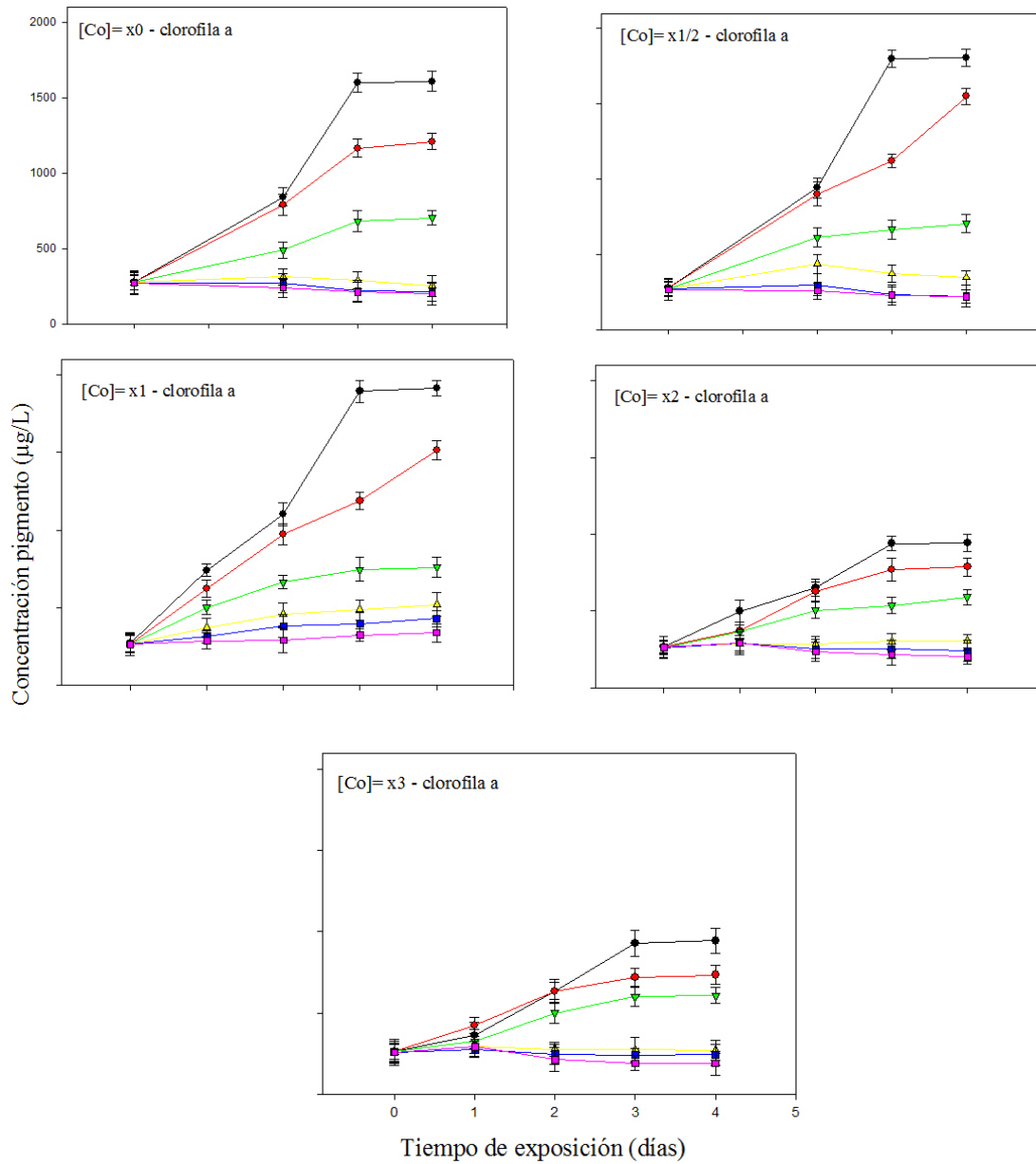


Fig. 7. Gráfica del pigmento clorofila *a* en función de la concentración de cadmio para cada una de las concentraciones de cobalto.

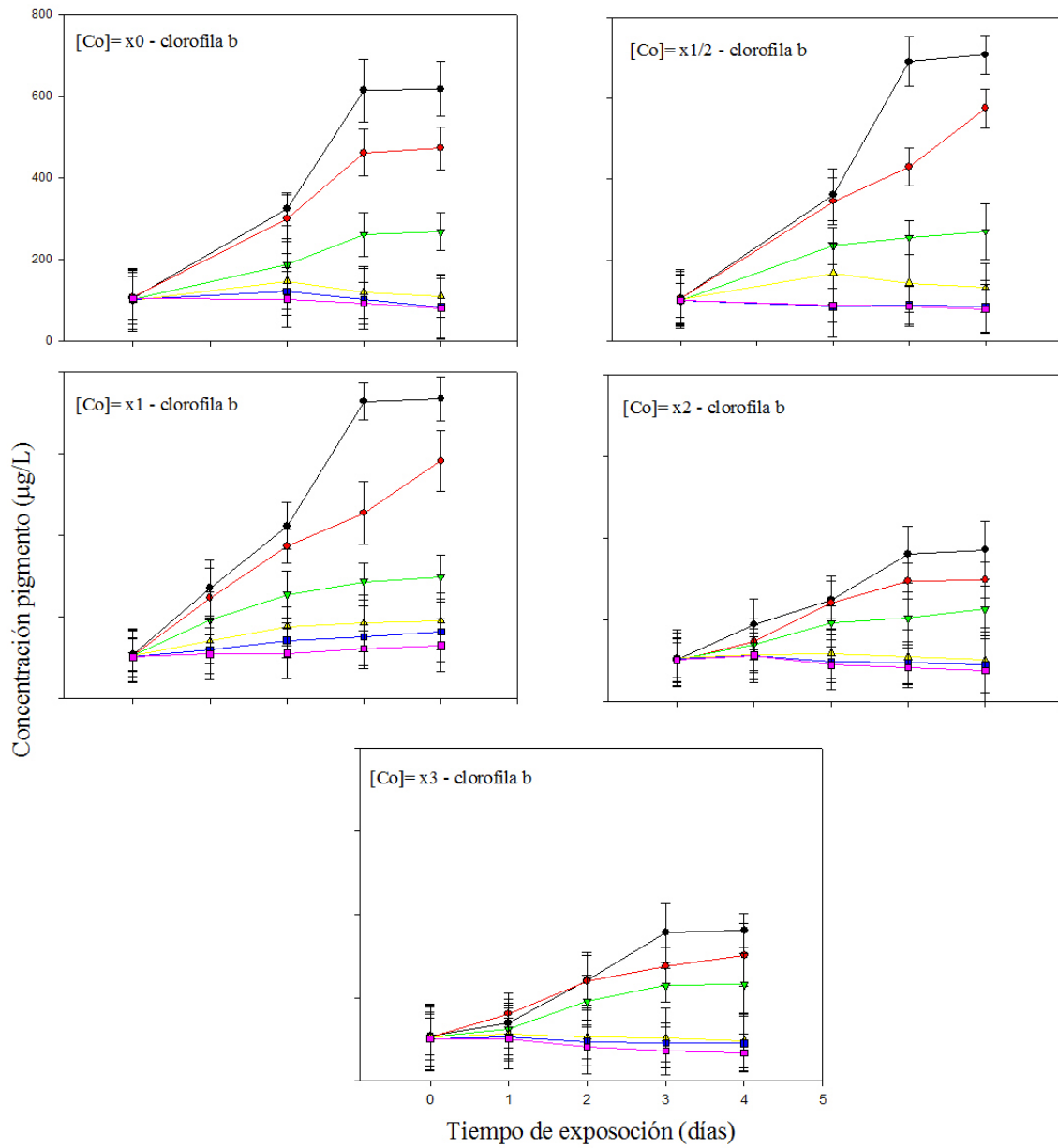


Fig. 8. Gráfica del pigmento clorofila *b* en función de la concentración de cadmio para cada una de las concentraciones de cobalto.

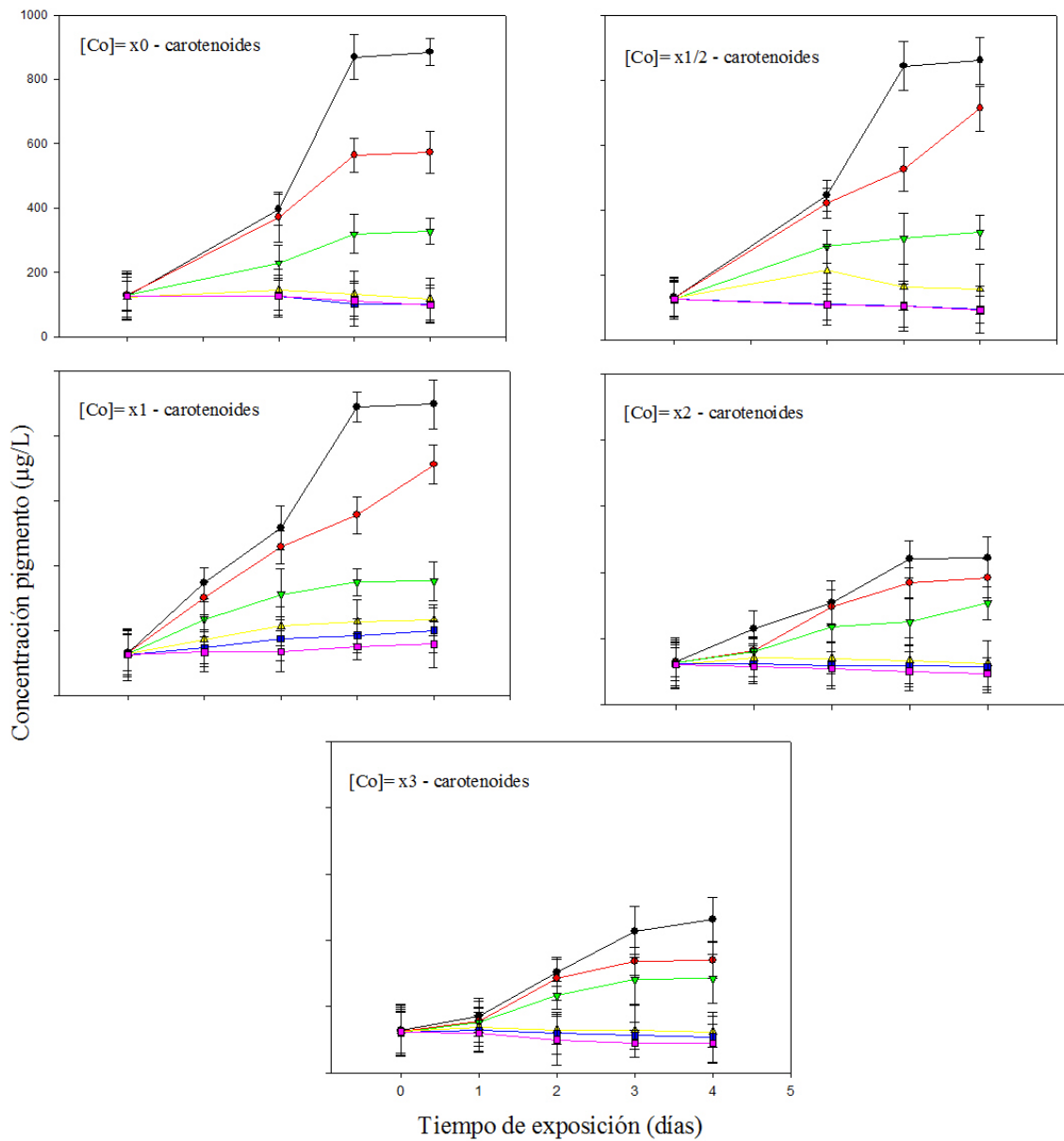
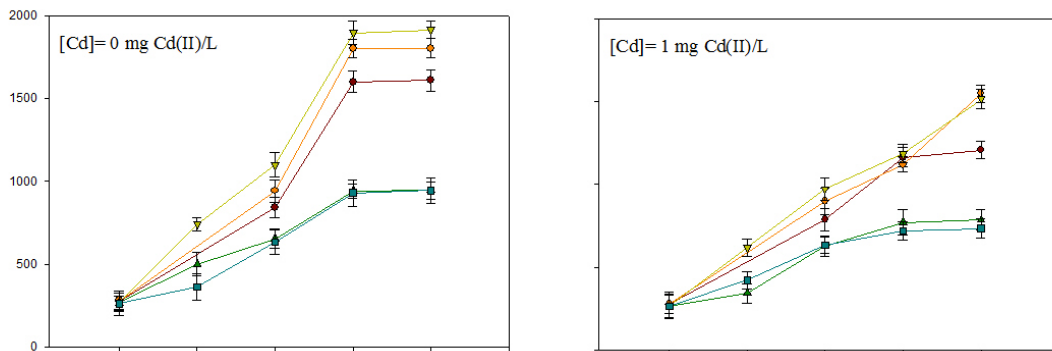


Fig. 9. Gráfica del pigmento carotenoides totales en función de la concentración de cadmio para cada una de las concentraciones de cobalto.



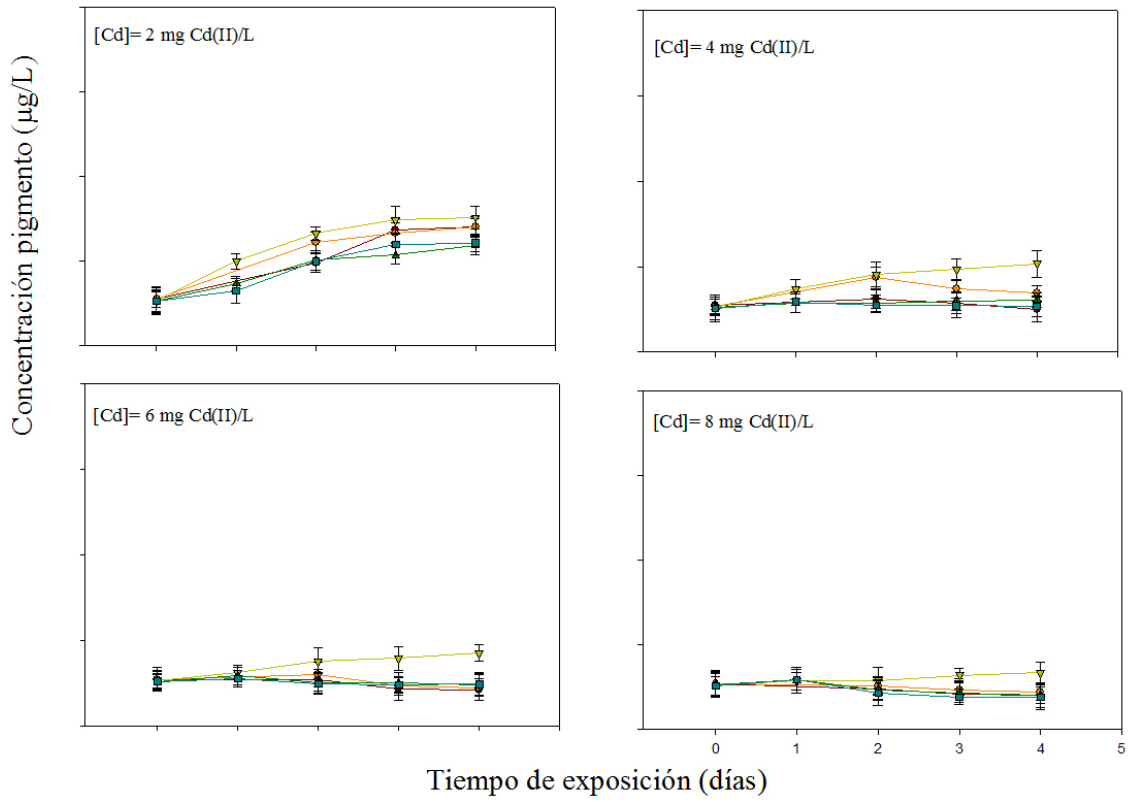
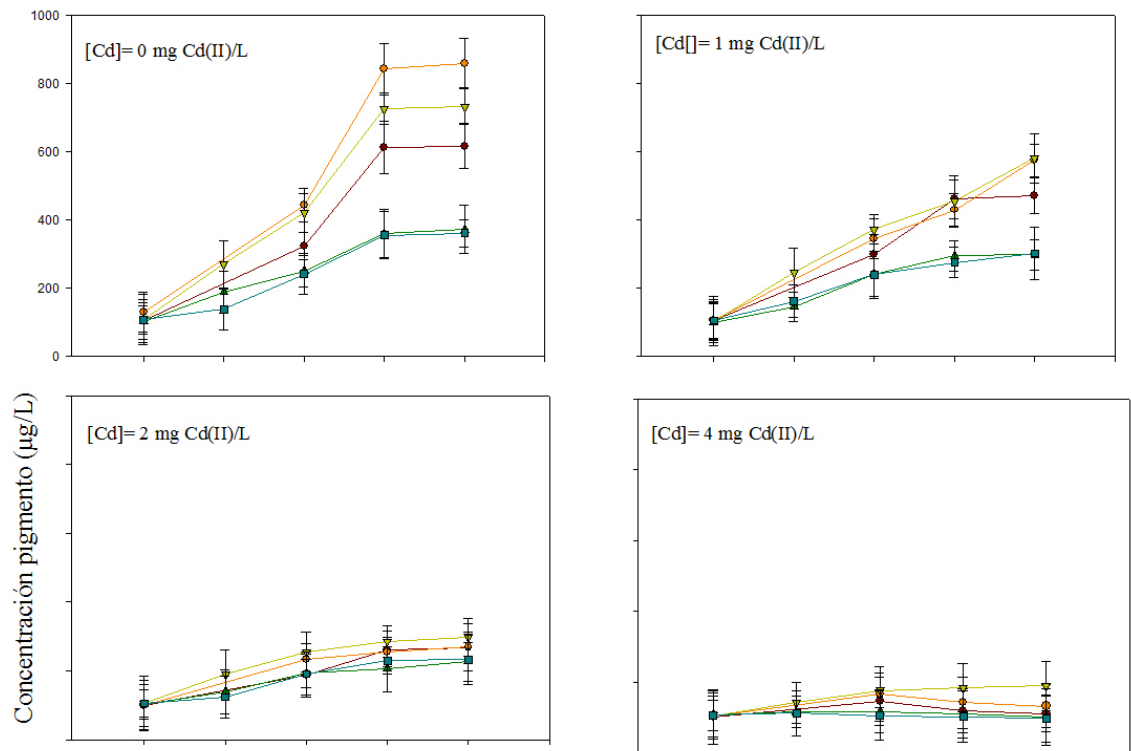


Fig. 10. Gráfica del pigmento clorofila *a* en función de la concentración de cobalto para las diferentes concentraciones de cadmio.



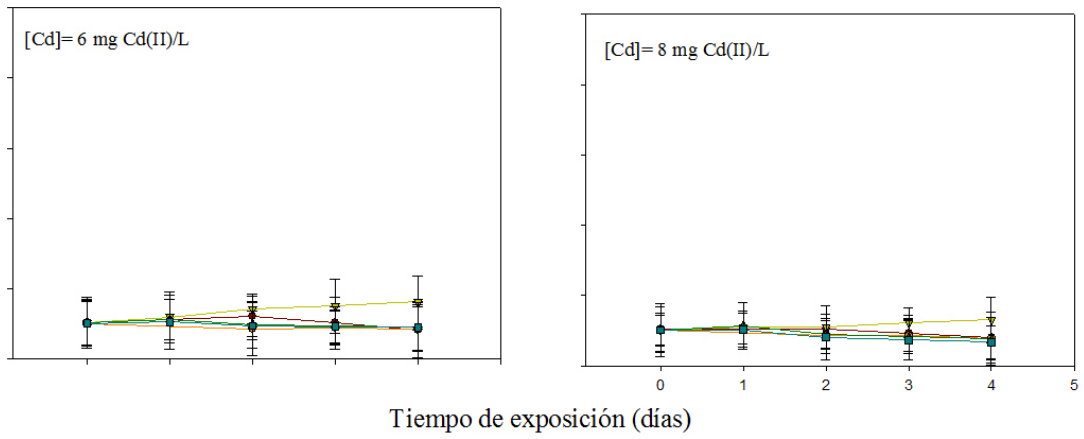


Fig. 11. Gráfica del pigmento clorofila *b* en función de la concentración de cobalto para las diferentes concentraciones de cadmio.

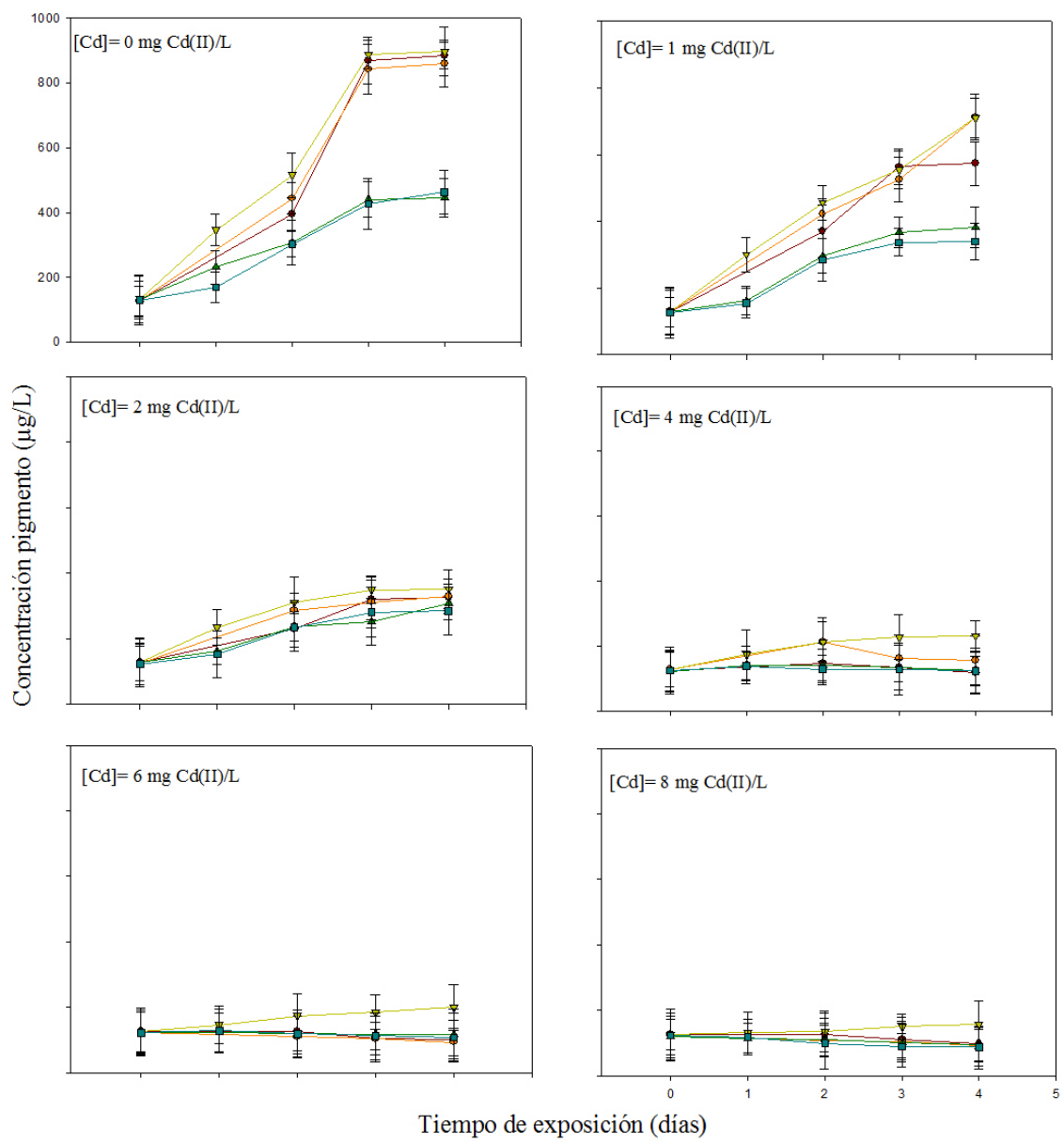


Fig. 12. Gráfica del pigmento carotenoides totales en función de la concentración de cobalto para las diferentes concentraciones de cadmio.

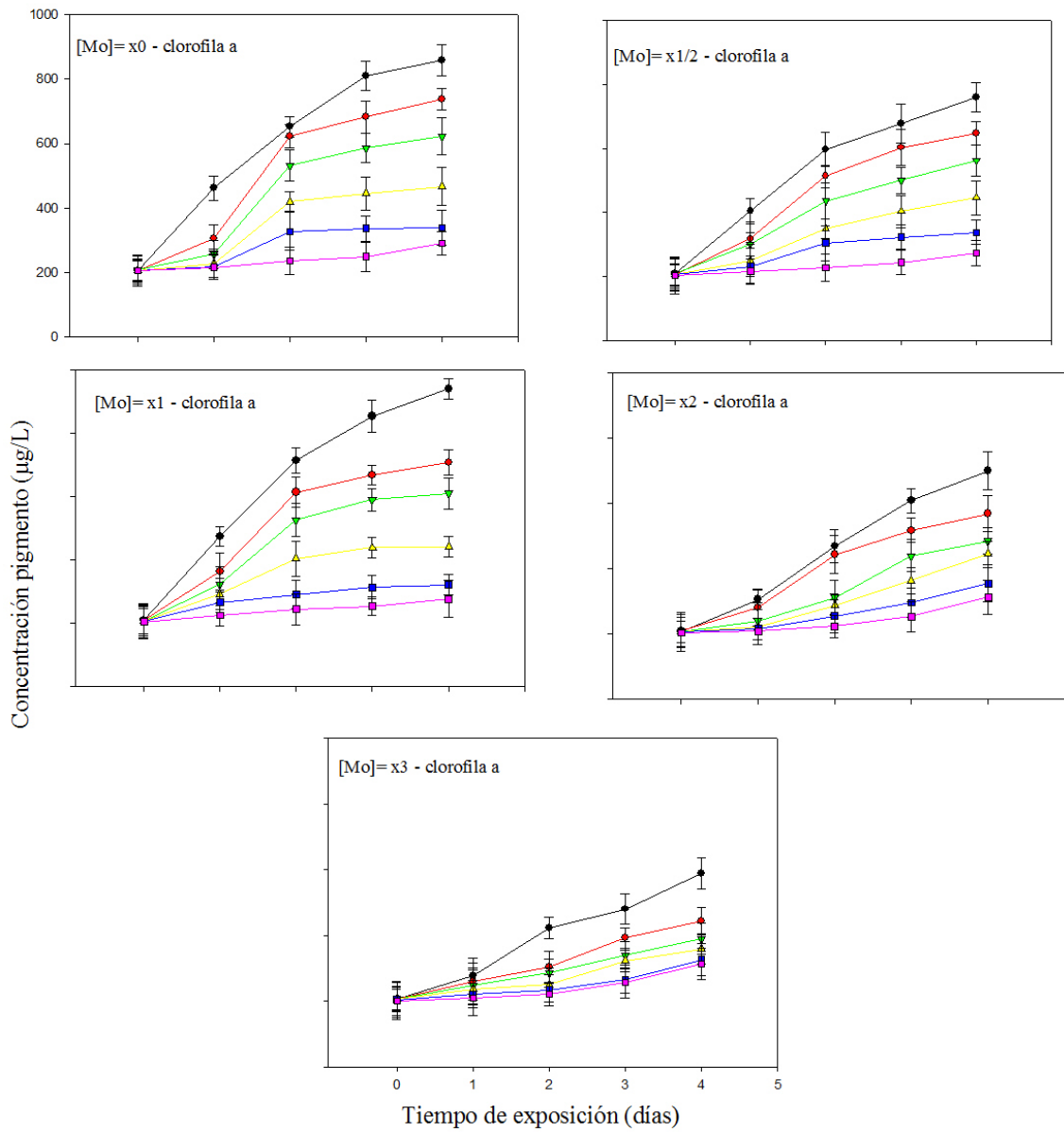
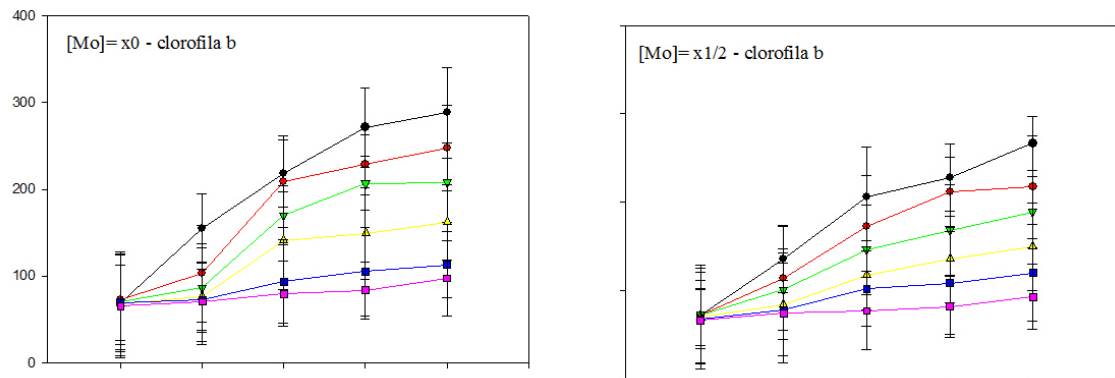


Fig. 13. Gráfica del pigmento clorofila *a* en función de la concentración de cadmio en función de las diferentes concentraciones de molibdeno.



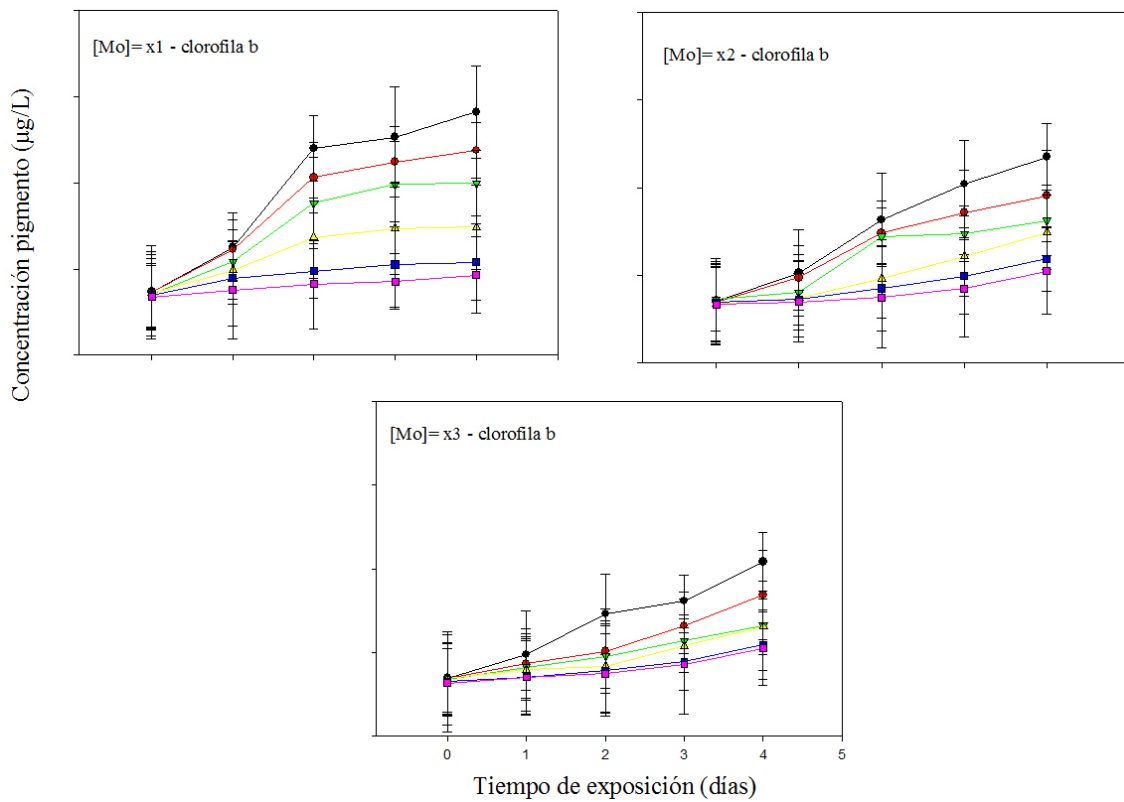
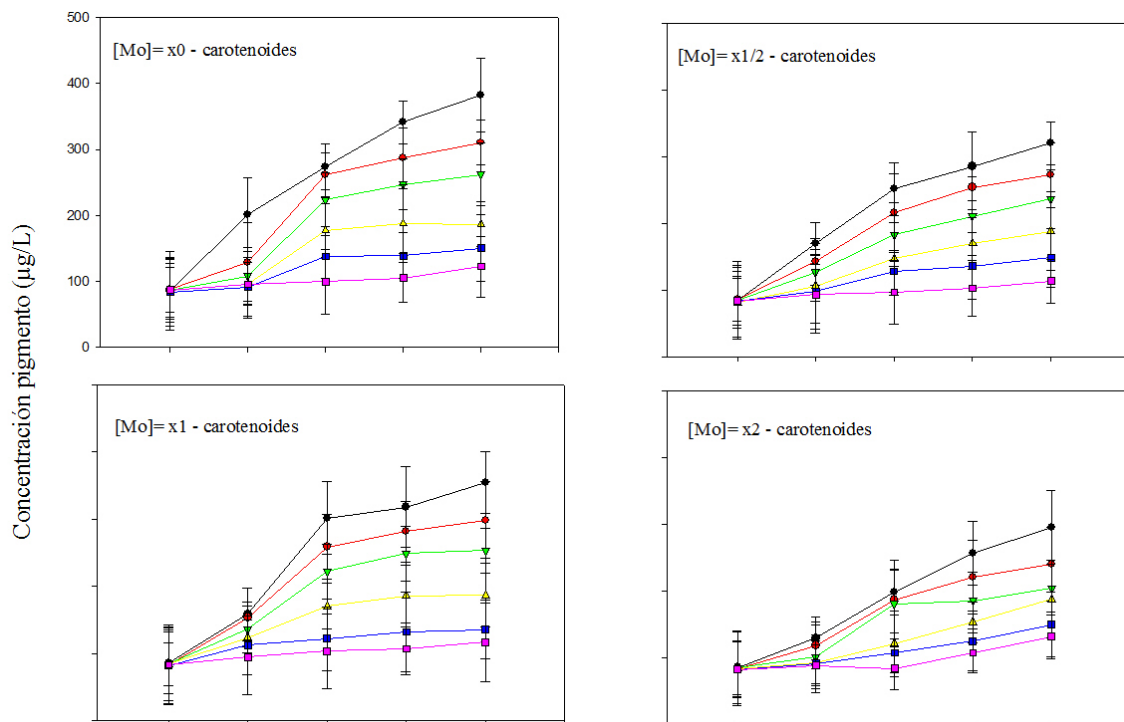


Fig. 14. Gráfica del pigmento clorofila *b* en función de la concentración de cadmio en función de las diferentes concentraciones de molibdeno.



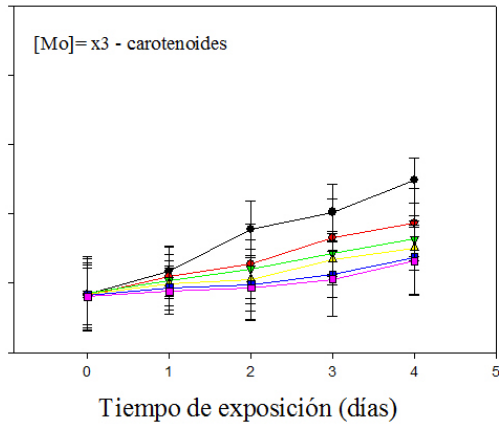


Fig. 15. Gráfica del pigmento carotenoides totales en función de la concentración de cadmio en función de las diferentes concentraciones de molibdeno.

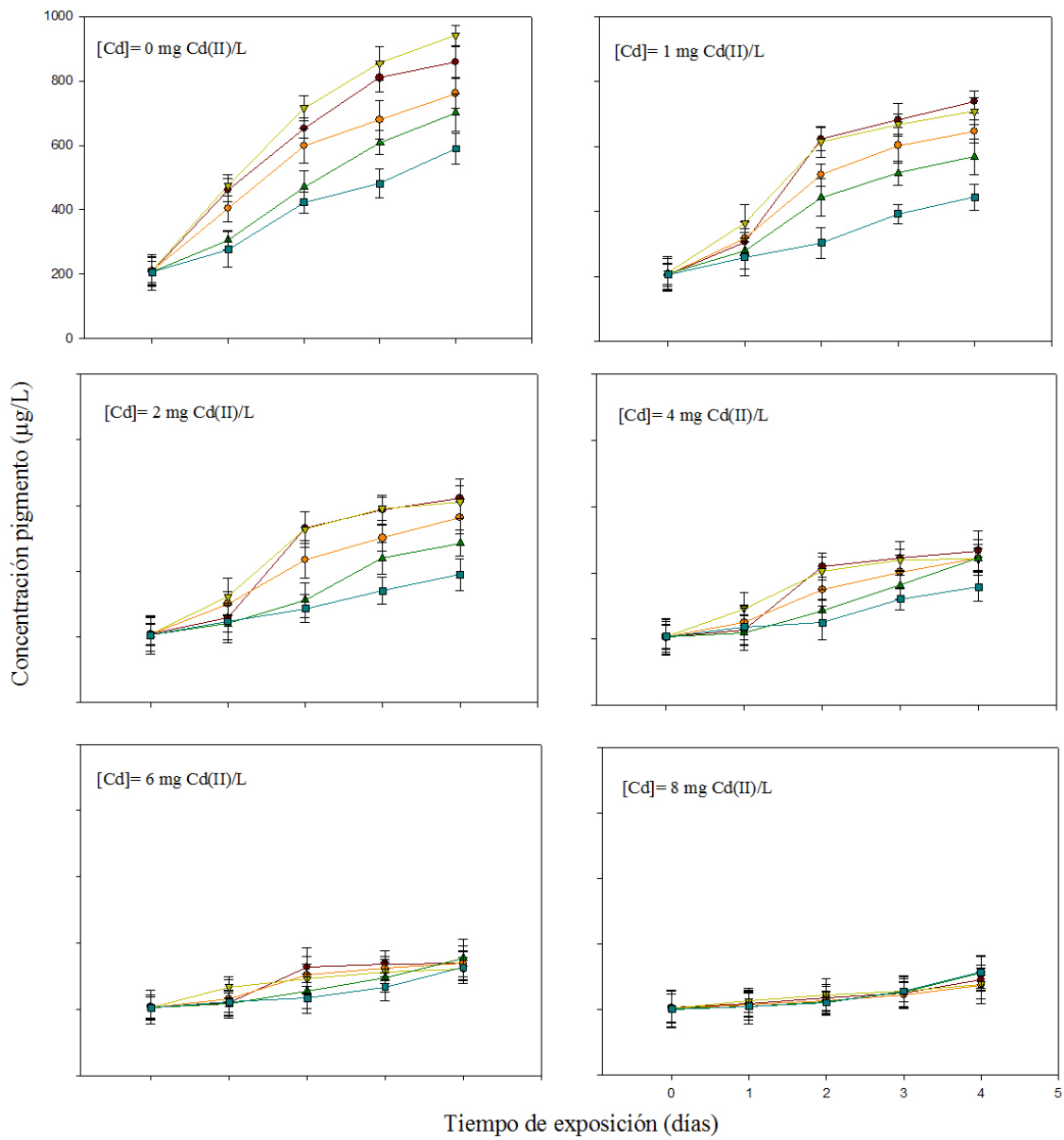


Fig. 16. Gráfica del pigmento clorofila *a* en función de la concentración de molibdeno para las diferentes concentraciones de cadmio.

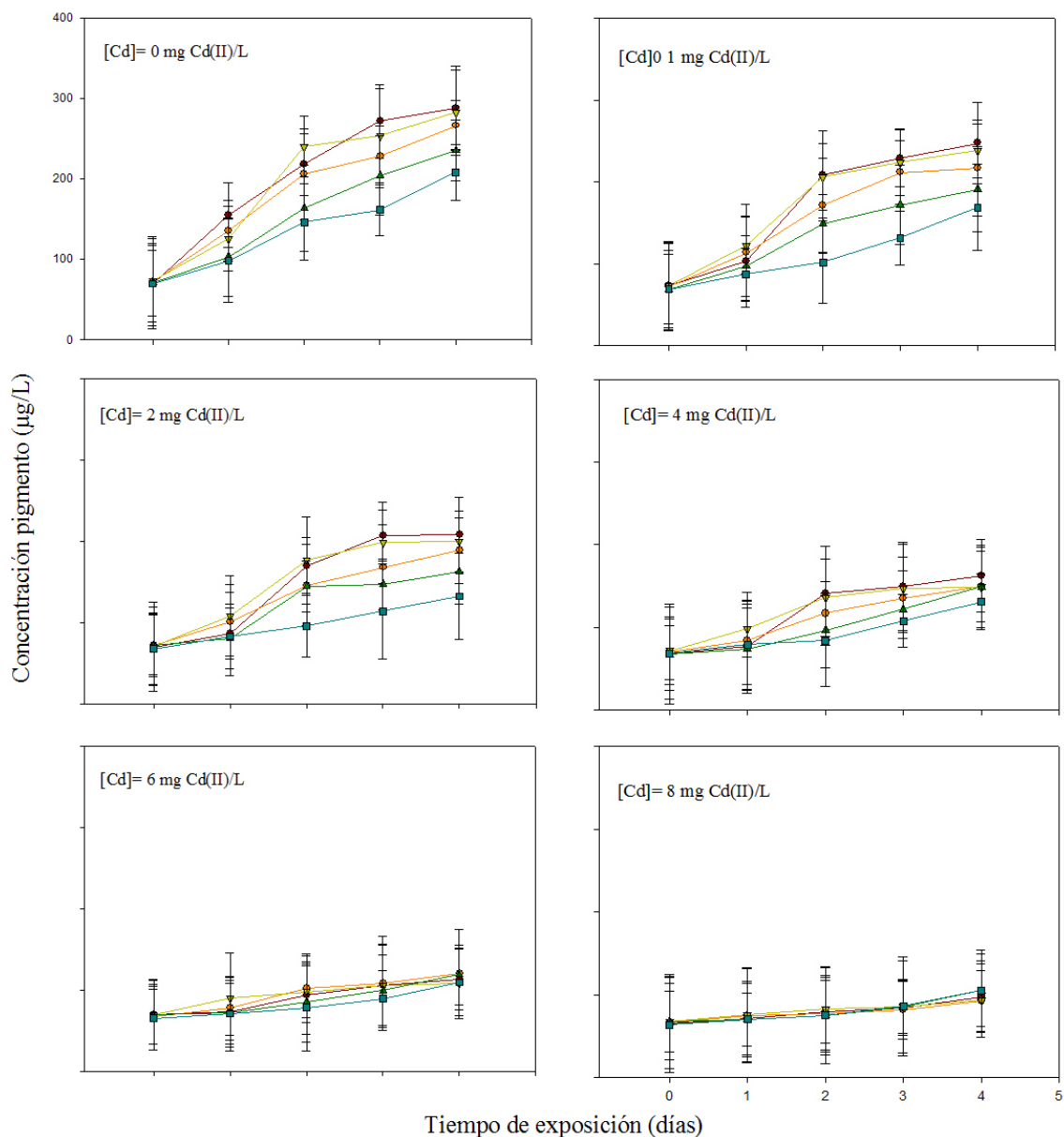
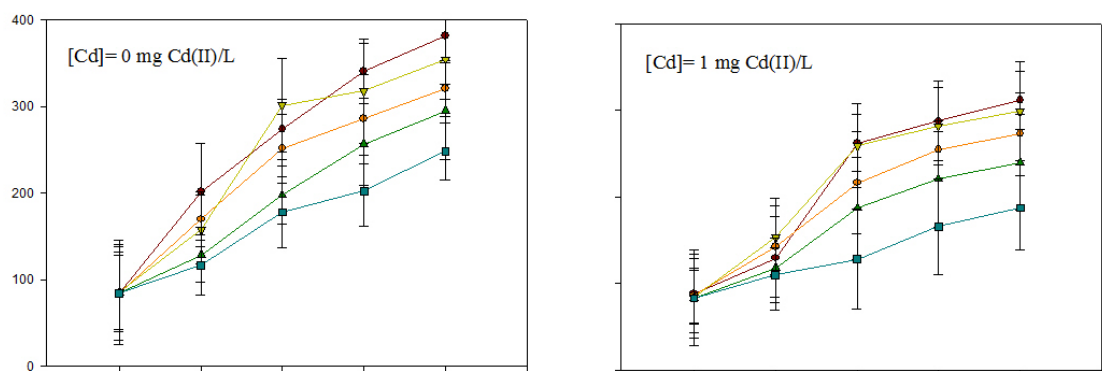


Fig. 17. Gráfica del pigmento clorofila *b* en función de la concentración de molibdeno para las diferentes concentraciones de cadmio.



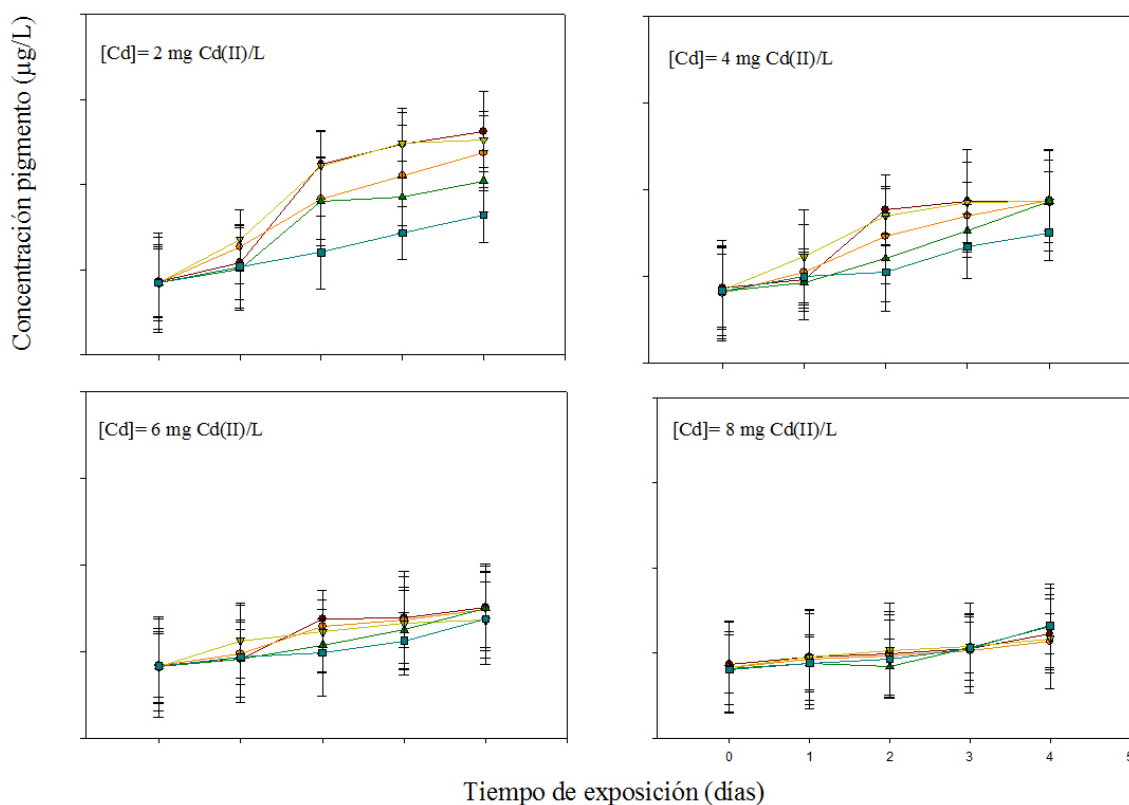


Fig. 18. Gráfica del pigmento carotenoides totales en función de la concentración de molibdeno para las diferentes concentraciones de cadmio.

Por último se exponen los resultados obtenidos a partir de los análisis estadísticos mediante ANOVA de dos factores para el crecimiento celular (Tablas 2 y 3) y los pigmentos fotosintéticos (Tablas 4 a 9).

Tabla 2. ANOVA de dos factores para comprobar interacción del crecimiento entre cobalto y cadmio.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	473851	1	13846,14	$< 2,2 \times 10^{-16}$	42,7
Cd	323004	5	1887,67	$< 2,2 \times 10^{-16}$	29,2
Co	161349	4	1178,67	$< 2,2 \times 10^{-16}$	14,5
Cd:Co	143679	20	209,92	$< 2,2 \times 10^{-16}$	12,9
Residuos	7187	210			0,7
Total corregido	1109070				100

Se observa que la interacción Cd:Co es estadísticamente significativa para un nivel de significación $\alpha=0,05$. Por lo tanto existe una evidencia estadística ante los datos obtenidos de que existe relación entre los efectos del cobalto y el cadmio.

Tabla 3. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción del crecimiento entre molibdeno y cadmio.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	216482	1	9754,58	$< 2,2 \times 10^{-16}$	65,5

Cd	74978	4	675,69	$< 2,2 \times 10^{-16}$	22,7
Mo	14259	5	160,62	$< 2,2 \times 10^{-16}$	4,3
Cd:Mo	20267	20	45,66	$< 2,2 \times 10^{-16}$	6,1
Residuos	4660	210			1,4
Total corregido	330646				100

En este segundo caso, para el molibdeno, también se observa una interacción estadísticamente significativa para un nivel de significación $\alpha=0,05$, lo que sugiere la relación existente entre el molibdeno y el cadmio.

Además, en el tamaño de los efectos se puede observar que el efecto de la toxicidad del cadmio es mayor que el efecto beneficioso de los dos metales esenciales. También se puede observar que existe una interacción mayor entre el cadmio y el cobalto que entre el cadmio y el molibdeno.

En el caso de los pigmentos fotosintéticos, se realizaron los análisis para cada uno de los pigmentos dando en todos ellos un resultado estadísticamente significativo. Por lo que hay interacción entre el cobalto y el cadmio (Tablas 4-6), como entre el molibdeno y el cadmio (Tablas 7-9). El ANOVA que se ha utilizado tiene unos p-valores muy bajos lo que nos indica que el análisis es estadísticamente fiable, con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Se observa que el efecto de la interacción es mayor para el caso del cobalto que para el molibdeno, con casi aproximadamente el doble.

Tabla 4. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el cobalto y el cadmio sobre el contenido de clorofila *a*.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	8125492	1	12371,09	$< 2,2 \times 10^{-16}$	43,1
Cd	5484576	5	1670,06	$< 2,2 \times 10^{-16}$	29,1
Mo	2738586	4	1042,38	$< 2,2 \times 10^{-16}$	14,5
Cd:Mo	2467375	20	187,83	$< 2,2 \times 10^{-16}$	13,1
Residuos	39409	60			0,2
Total corregido	18855438				100

Tabla 5. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el cobalto y el cadmio sobre el contenido de clorofila *b*.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	1184278	1	7348,61	$< 2,2 \times 10^{-16}$	44,2
Cd	788758	5	978,87	$< 2,2 \times 10^{-16}$	29,5
Mo	377096	4	584,98	$< 2,2 \times 10^{-16}$	14,1
Cd:Mo	317269	20	98,44	$< 2,2 \times 10^{-16}$	11,9
Residuos	9669	60			0,4

Total corregido	2677070	100
-----------------	---------	-----

Tabla 6. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el cobalto y el cadmio sobre el contenido de carotenoides.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	2361888	1	19877,44	$< 2,2 \times 10^{-16}$	45,3
Cd	1556377	5	2619,67	$< 2,2 \times 10^{-16}$	29,8
Mo	668818	4	1407,18	$< 2,2 \times 10^{-16}$	12,8
Cd:Mo	621902	20	261,69	$< 2,2 \times 10^{-16}$	11,9
Residuos	7129	60			0,1
Total corregido	5216114				100

Tabla 7. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el molibdeno y el cadmio sobre el contenido de clorofila *a*.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	2260144	1	17028,18	$< 2,2 \times 10^{-16}$	65,6
Cd	798077	5	1201,86	$< 2,2 \times 10^{-16}$	23,1
Mo	157788	4	297,02	$< 2,2 \times 10^{-16}$	4,6
Cd:Mo	223620	20	84,19	$< 2,2 \times 10^{-16}$	6,5
Residuos	7968	60			0,2
Total corregido	3447597				100

Tabla 8. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el molibdeno y el cadmio sobre el contenido de clorofila *b*.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	264187	1	15359,90	$< 2,2 \times 10^{-16}$	66,5
Cd	95654	5	1112,26	$< 2,2 \times 10^{-16}$	24,1
Mo	15777	4	229,31	$< 2,2 \times 10^{-16}$	4,0
Cd:Mo	20727	20	60,26	$< 2,2 \times 10^{-16}$	5,2
Residuos	1032	60			0,3
Total corregido	397377				100

Tabla 9. ANOVA de dos factores para comprobar la interacción entre el molibdeno y el cadmio sobre el contenido de carotenoides.

Variable	Suma cuadrados	Grados Libertad	Valor F	p-valor	Tamaño de efecto (%)
(Intercepto)	456966	1	3257,46	$< 2,2 \times 10^{-16}$	63,3
Cd	157451	5	224,48	$< 2,2 \times 10^{-16}$	21,8

Mo	50337	4	89,71	$< 2,2 \times 10^{-16}$	7,0
Cd:Mo	49087	20	17,50	$< 2,2 \times 10^{-16}$	6,8
Residuos	8417	60			1,2
Total corregido	722258				100

4. Discusión

Una vez realizada la exposición de los resultados, se observa que a concentraciones bajas del metal tóxico no se muestra un efecto tóxico tan severo, sino simplemente una reducción en el crecimiento. Esto es debido a un parámetro muy utilizado en toxicidad que es lo que se denomina concentración efectiva 50 (EC₅₀) y es diferente para cada especie. Ésta se podría definir como la concentración que, administrada en el medio ambiente de la población de las especies en estudio, reduce la población en un 50% con respecto a un control. Este parámetro se suele expresar en mg de sustancia por volumen unitario de aire o de agua y un tiempo determinado de exposición (horas).

En el caso del cadmio, para las especies de microalgas dulceacuícolas como es el caso de nuestra alga de estudio, su valor se sitúa alrededor de 4,5 mg Cd(II)/L (Mera *et al.*, 2013), lo que concuerda con los datos obtenidos, ya que a partir del valor ensayado de 4 mg Cd(II)/L se observa un descenso muy drástico tanto en el crecimiento como en la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos.

A parte de utilizar el cadmio como elemento tóxico para los ensayos, se han modificado otros dos elementos, que en este caso son esenciales para la microalga *C. moewusii*. Estos dos elementos son el cobalto y el molibdeno, clasificados según el criterio de nutrición de las microalgas como micronutrientes, ya que son requeridos en cantidades muy pequeñas, con un rango de concentraciones de micro a miligramos por litro de medio de cultivo. Además, ya hemos mencionado que estos dos micronutrientes son esenciales, debido a que siguen una serie de criterios de esencialidad que son: 1- deben de ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento total, 2- deben ejercer un efecto fisiológico directo sobre la microalga, 3- no puede ser reemplazado por otro elemento para su función, 4- la deficiencia debería ser reversible y 5- la respuesta debe observarse en un número representativo de especies (Miranda and Esquer, 1999). Como los dos elementos cumplen estos criterios se dice que actúan como micronutrientes esenciales de la microalga.

Los dos parámetros estudiados, tanto el crecimiento celular como los pigmentos fotosintéticos tienen relación, ya que una reducción en los nutrientes esenciales provoca efectos como puede ser la deficiencia en el crecimiento y por lo tanto una inhibición de la formación de pigmentos fotosintéticos.

Estos micronutrientes suelen ser utilizados como cofactores de enzimas siendo muy importantes para las microalgas, ya que forman parte de reacciones enzimáticas vitales para su supervivencia.

Este punto es clave para llegar a la explicación más importante, en la que se contesta al objetivo principal del ensayo, el efecto en el crecimiento y pigmentos fotosintéticos del cobalto, molibdeno cuando está presente un metal tóxico como el cadmio.

Existe un efecto de interacción aceptado estadísticamente entre, por un lado, el cobalto y el cadmio y, por otro lado, el molibdeno y el cadmio. Esto se puede explicar partiendo de la función en las reacciones enzimáticas de los nutrientes. El cadmio, cuando se encuentra en el ambiente extracelular, intenta penetrar en las células microalgales compitiendo activamente con los nutrientes. En condiciones normales, actúan los micronutrientes y el funcionamiento celular es normal, cuando se aumenta la cantidad de cadmio, hay más cadmio en ese medio extracelular y por lo tanto hay más probabilidades de que una mayor concentración de cadmio entre a la célula y por lo tanto la concentración en el interior sea mayor, habrá una mayor toxicidad con una reducción en el crecimiento y en los pigmentos.

Algo parecido ocurre con el cobalto y el molibdeno, si se disminuye su concentración, como hemos hecho, no hay suficiente y por lo tanto el cadmio compite mejor y se produce la reducción de los parámetros estudiados y cuando se aumenta la concentración de nutrientes, llegan al punto en el que son tóxicos por su elevada concentración y también se reduce el crecimiento.

Esta interacción que existe entre los elementos, es mayor entre el cadmio y el cobalto que entre el cadmio y el molibdeno. Esto es debido a la estructura que presentan estos elementos. El cobalto se encuentra en forma de Co^{2+} (El-Sheekh *et al.*, 2003), muy parecido a la estructura del cadmio, que es Cd^{2+} . Por otro lado el molibdeno se encuentra en forma de molibdato MoO_4^{2-} , lo que le resulta más difícil la competitividad con el cadmio y por eso la interacción entre estos dos elementos es menor que en el otro caso.

Esta explicación se produce también en otros organismos y con otros elementos nutricionales, así por ejemplo, la absorción competitiva que se produce entre plomo, cobre, cadmio y arsénico (Sulaymon *et al.*, 2013), el zinc y el cadmio compiten con el manganeso en diatomeas y clorófitas (Hart *et al.*, 1979; Sunda and Huntsman, 1995; Iniesta and Blanco, 2005; Töpferwien *et al.*, 2007), unión competitiva de protones, calcio cadmio y zinc en *Rhodococcus erythropolis* (Plette *et al.*, 1996).

5. Conclusiones

El estudio de la interacción entre el cobalto y molibdeno con cadmio nos indica que esa interacción es estadísticamente significativa y viene dada por una competencia entre los elementos. Además también se pudo comprobar que el cadmio es un elemento tóxico muy fuerte y cuanto mayor es la concentración de este metal, mayor es la toxicidad de éste. Por último también se comprobó el efecto que tienen tanto el cobalto como el molibdeno como micronutrientes, ya que a concentraciones más altas o bajas descendían su productividad en los dos parámetros estudiados.

5. Conclusions

The study of the interaction between cobalt and molybdenum with cadmium indicates that such interaction is statistically significant and is given by a competition between elements. In addition, also failed to verify that cadmium is a very strong toxic element and the higher is the concentration of this metal, the greater the toxicity of this. Finally also found the effect that both cobalt and molybdenum as micronutrients, since concentrations higher or lower descended its productivity in the two parameters studied.

6. Bibliografía

Aguilera A and Amils R. 2005. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River SW, Spain). *Aquatic Toxicology*. 75: 316-329.

Baścik-Remisiewicz A, Aksmann A, Zak A, Kowalska M and Tukaj Z. 2011. Toxicity of cadmium, anthracene, and their mixture to *Desmodesmus subspicatus* estimated by algal growth-inhibition ISO standard test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60,610–617.

Battah MG. 2010. Impact of Different Concentrations of Zinc and Cadmium Chloride on Micro Algae *Chroococcus Minutus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(12): 5739-5743.

Bednarz T and Warkowska-Dratnal H. 1985. Toxicity of zinc, cadmium, lead, copper, and their mixture for *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 25-26:389–400.

Carfagna S, Lanza N, Salbitani G, Basile A, Sorbo S and Vona V. 2013. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *Springer Plus*. 2: 147-154.

Deef HES. 2008. Effect of Cadmium and Zinc on Growth Parameters of Tomato Seedlings. *Academic Journal of Plant Sciences*. 1(1): 5-11.

Dominguez MJ, Facundo G, León R, Vílchez C, Vega JM and Vígara J. 2003. Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:828-832.

Dong J, Wu F and Zang G. 2005. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *Journal of Zhejiang Univeristy SCIENCE*. 6B(10): 974-980.

El-Sheekh MM, El-Naggar AH, Osman MEH and El-Mazaly E. 2003. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15(3): 159-166.

Faller P, Kienzler K and Krieger-Liszak A. 2005. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to essential Ca²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1706: 158-164.

Fernandez JM. Subcapítulo 1.3 Nutrientes y medios de cultivos de microalgas en capítulo 1 Cultivo de microalgas del curso *Ingeniería de procesos aplicada a la Biotecnología de Microalga* [en línea]. Universidad de Almería. [Fecha de consulta: 29 Junio 2015]. <<http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>>

Folgar S, Torres E, Pérez-Rama M, Cid A, Herrero C and Abalde J, 2009. *Dunaliella salina* as a marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *Journal of Hazardous Materials*. 165: 486–493.

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

Gholamioutimi A and Soltani S. 2014. Effects of cobalt on biological activities of green algae *Chara* sp. *International Journal of Current Life Sciences*. 4(8): 4730-4733.

Hart BA, Bertram PE and Scaife BD. 1979. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Research*. 18: 327-335.

Higueras PL, Oyarzum R and Maturana H. *Minería y su toxicología* [en línea]. Universidad de Castilla-La Mancha. [Fecha de consulta: 29 Junio 2015]. <http://www.uclm.es/users/higueras/MAM/Mineria_Toxicidad4.htm>

Iniesta R and Blanco J. (2005). Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia. *Revista Galega dos Recursos Mariños*. 2: 2-200.

Irfan M, Ahmad A and Hayat S. 2014. Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of *Brassica juncea*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21: 125-131.

Källqvist T. 2009. Effect of water hardness on the toxicity of cadmium to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in an artificial growth medium and nutrient-spiked natural lake waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 72: 277–283.

Kaplan D, Heimer YM, Abeliovich A and Goldsbrough PB. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Science*. 109: 129–137.

Kropat J, Hong-Hermesdorf A, Casero D, Ent P, Castruita M, Pellegrini M, Merchant SS and Malasarn D. 2011. A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 66: 770-780.

- Liu G, Chai X, Shao Y, Hu L, Xie Q and Wu H. 2011. Toxicity of copper, lead and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chuii*. *Journal of Environmental Sciences*. 23(2): 330-335.
- Magdaleno A, Gomez CE, Velez CG and Accorinti J. 1997. Preliminary toxicity tests using the green alga, *Ankistrodesmus falcatus*. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 12: 11–14.
- Manimaran K and Prabu VA. 2013. Effect of cadmium on growth, chlorophyll a and biomass production of *Tetraselmis* sp. *International Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. 2(4): 26-30.
- Mera R, Torres E and Abalde J. 2014. Sulphate, more than a nutrient, protects the microalga *Chlamydomonas moewusii* from cadmium toxicity. *Aquatic Toxicology*. 148: 92-103.
- Miranda JL and Esquer JC. 1999. *Nutrición de microalgas*. Tesis doctoral inédita. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas.
- Okamoto OK, Asano CS, 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.
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM and Cañizares-Villanueva RO. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 64: 1-10.
- Peralta-Perez MR, and Volke-Sepúlveda TL. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(1): 75-88.
- Pérez-Rama M, Torres E and Abalde J. 2006. Composition and production of thiol constituents induced by cadmium in the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 128–136.
- Plette ACC, Benedetti MF and van Riemsdijk WH. 1996. Competitive Binding of Protons, Calcium, Cadmium and Zinc to Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium. *Environmental Science and Technology*. 30(6): 1902-1910.
- Rachlin JW and Grosso A. 1993. The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 24: 16–20.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC and del Río LA. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52(364): 2115-2126.
- Schulze H and Brand JJ. 1978. Lead Toxicity and Phosphate Deficiency in *Chlamydomonas*. *Plant physiology*. 62: 727-730.

Shariati M and Yahyaabadi S. 2006. The effects of different concentrations of cadmium on the growth rate and beta-carotene synthesis in unicellular green algae *Dunaliella salina*. *Iranian Journal of Science & Technology*. 30(A1): 57-63.

Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F and Styring S. 2004. Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659: 19-31.

Suárez C, Torres E, Pérez-Rama M, Herrero C and Abalde J. 2010. Cadmium toxicity on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff: Biosynthesis of thiol compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(9): 2009-2015.

Sulaymon AH, Mohammed AA and Al-Musawi TJ. 2013. Competitive biosorption of lead, cadmium, copper and arsenic ions using algae. *Environmental Science and Pollution Research*. 20: 3011-3023.

Sunda WG and Huntsman SA. (1995). Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: biological and geochemical implications. *Limnology and Oceanography*. 40: 1404–1417.

Tejada-Jiménez M, Galván A and Fernández E. 2011. Algae and humans share a molybdate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(16): 6420-6425.

Töpperwien S, Behra R. and Sigg L. 2007. Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26: 483–490.

Turbak SC, Olson SB and Mcfeters GA. 1986. Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Research*. 20: 91–96.

Vega JM, Herrera J, Aparicio PJ, Paneque A and Losada M. 1971. Role of Molybdenum in Nitrate Reduction by *Chlorella*. *Plant Physiology*. 48: 294-299.

Wang S, Zhang D and Pan X. 2013. Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and protective role of cyclic electron flow. *Chemosphere*. 93:230-237.

Yap CK, Ismail A, Omar H and Tan SG. 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International*. 29: 1097–1104.

Zahalak M, Pratte B, Werth KJ and Thiel T. 2004. Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Molecular Microbiology*. 51(2): 539-549.

Zimmer W and Mendel R. 1999. Molybdenum Metabolism in Plants. *Plant Biology*. 1: 160-168.