

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.  
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).  
TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(1): 40-52, 2018.  
DOI: 10.1016/j.recqb.2017.08.005

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES TÓXICOS (Cd) BAJO VARIACIONES ABIÓTICAS EN MICROALGAS

Alondra A. Cortés Téllez<sup>1</sup>, Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez<sup>2</sup>  
y Ma. Carmen Bartolomé Camacho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, #403 c/Santiago Tapia C.P. 58000 Morelia, Michoacán, México. <sup>2</sup>Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, España. E-mails: aact886@hotmail.com, carbarcam@hotmail.com

### RESUMEN

En los ecosistemas acuáticos, la presencia de ciertos metales (Cu, Zn, Fe) a concentraciones traza son esenciales para distintas actividades biológicas. Sin embargo, otros metales como el Cd y Pb son considerados tóxicos a concentraciones muy bajas y no participan como micronutrientes. Estos metales interactúan con componentes esenciales a través de enlaces iónicos y covalentes induciendo estrés oxidativo, reemplazo de cationes esenciales, etc. Asimismo, presentan la capacidad de acumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica, promoviendo alta sensibilidad en la mayoría de los organismos acuáticos, mientras que otros como las microalgas, han desarrollado una gran variedad de estrategias de detoxificación para minimizar los efectos tóxicos de los metales a través de la inducción de mecanismos de adaptación y resistencia que les permiten la supervivencia a esos ambientes extremos. Por ende, es indispensable conocer la gama de mecanismos de resistencia que estos organismos presentan a la exposición de metales tóxicos presentes en el ecosistema acuático. Así, los objetivos de esta revisión son: identificar y describir los principales mecanismos moleculares actualmente descritos en microalgas verdes implicados en la resistencia a metales tóxicos en relación específica con el cadmio; dar a conocer la influencia de distintos factores ambientales sobre esta respuesta y los episodios de co-resistencia hacia otros metales de carácter tóxico.

**Palabras Clave:** cadmio, factores ambientales, interacción metálica, microalgas verdes, resistencia a metales.

### Resistance mechanisms to toxic metals (Cd) under abiotic variations in microalgae

### ABSTRACT

In aquatic ecosystems, the presence of certain metals (Cu, Zn, and Fe) at trace concentrations are essential for different biological activities. However, other metals such as Cd and Pb considered toxic at very low concentrations and do not participate as micronutrients. These metals interact with essential components through ionic and covalent bonds inducing oxidative stress, replacement of essential cations, etc. Likewise, these metals have the capacity to accumulate and biomagnified along the trophic chain, promoting high sensitivity in most aquatic organisms, while others, such as microalgae have developed a variety of detoxification strategies to minimize the toxic effects of metals through the induction of adaptation mechanisms, and resistance that allow them to survive in these extreme environments. Therefore, it is essential to know the range of resistance mechanisms that these organisms present to the exposure of different toxic metals present in the aquatic ecosystem. Thus, the aim of this review is to identify and describe the main molecular mechanisms currently described in green microalgae involved in the toxic metals resistance in specific relation with cadmium; to report the influence that different environmental factors have on this response and episodes of co-resistance to other toxic metals.

**Key Words:** cadmium, environmental factors, metallic interaction, green microalgae, metal resistance.

## INTRODUCCIÓN

**E**n los diferentes ecosistemas acuáticos, metales como el calcio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, sodio y zinc (Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Zn) son esenciales a concentraciones traza. Mientras que, otros como el arsénico, cadmio, mercurio, plomo, etc., (As, Cd, Hg, Pb), provenientes de vertidos industriales y agrícolas se comportan como tóxicos a concentraciones muy bajas, por lo que no tienen un rol biológico benéfico para la biota (Bruins *et al.*, 2000; Canli & Atli, 2003).

Dentro de esta clasificación, el cadmio como metal tóxico, persistente y bioacumulable genera estrés abiótico en los organismos acuáticos (Ivanina *et al.*, 2008). Clasificado como carcinógeno humano en el grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993), cuando este metal entra al ecosistema acuático es potencialmente tóxico y es transferido a lo largo de la cadena trófica (Wright, 1994; Ruangsomborn & Wongrat, 2006). Entre las respuestas tóxicas el Cd presenta en primer lugar la alteración y competencia por los sitios de unión con metales esenciales especialmente el Zn, Fe, Cu y Ca, desplazándolos para unirse a los grupos tiol con la consecuente depleción de proteínas, enzimas (ej. glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa) y factores de transcripción (Mera *et al.*, 2016). Aunque el Cd carece de actividad redox, indirectamente induce estrés oxidativo (Cailliatte *et al.*, 2009), y se presenta tanto como un ión hidratado como en complejos iónicos orgánicos e inorgánicos. Las formas solubles del metal (en asociación con cloruros, sulfhidrilo, hidroxilo y grupos tiol) gobiernan en gran medida la actividad biológica del Cd; mientras que las formas insolubles en unión a sulfatos e hidróxido son inmóviles y absorbidas por el sedimento al depositarse en él (Vig, 2003; Faroon *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la concentración total disuelta del Cd tiende a incrementarse si se encuentra en forma iónica y varía con la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) (Fotovat & Naidu, 1998; Vig, 2003). En este contexto, las microalgas unicelulares son un componente fundamental de los distintos ecosistemas acuáticos, puesto que constituyen el primer eslabón que soporta a la cadena trófica acuática, representando la base de la producción fotosintética de gran parte del O<sub>2</sub> y fijación de CO<sub>2</sub> del planeta. De esta manera, cualquier alteración sobre el fitoplancton produciría un desequilibrio potencial en los niveles tróficos superiores con consecuencias negativas para la estabilidad del ecosistema (Franklin *et al.*, 2000). En este contexto, los metales tóxicos al afectar a las comunidades planctónicas, provocan alteraciones en la fotosíntesis, crecimiento, inhibición de la actividad enzimática y la respiración (Yan & Pan, 2002). No obstante, la propiedad de persistencia y acumulación de los metales genera que algunas especies fotosintéticas sean sensibles, mientras que en otras se induzcan respuestas de bioacumulación, adaptación y resistencia (Gupta & Sandalio, 2012). En general, los niveles elevados de metales inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); por tanto, como respuesta a ese estrés, la célula

presenta mecanismos antioxidantes enzimáticos que incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), ascorbato y compuestos fenólicos (Xu *et al.*, 2010).

De acuerdo con Macfie & Welbourn, (2014), entre los mecanismos principales que presentan las células fotosintéticas para mantener las concentraciones de iones metálicos libres en niveles que no superen las necesidades celulares se incluyen: (1) unión en la pared celular, (2) cambios en la permeabilidad de iones, (3) exclusión activa (ej. sistemas de eflujo), (4) biotransformación, (5) quelación extra e intracelular, y (6) compartimentación del metal. A partir de estos antecedentes, se ha propuesto que la capacidad de los metales de acumularse en las células microalgales por exposiciones continuas del contaminante metálico, daría lugar a mecanismos de resistencia a través de procesos adaptativos fisiológicos estimulados por cambios en la expresión genética y estructural (Belfiore & Anderson, 2001). No obstante, existe muy poca información sobre el comportamiento de la resistencia de los microorganismos fotosintéticos, especialmente en especies eucariotas de microalgas verdes a ambientes extremos, como la acidificación del hábitat, la presencia de altas concentraciones de otros metales y variaciones en la temperatura.

Por lo tanto, en esta revisión se examinan los principales mecanismos moleculares hasta el momento descritos que pueden estar involucrados en la resistencia de las microalgas a metales tóxicos, específicamente el cadmio; además de proporcionar una visión general sobre la influencia de distintos factores ambientales a esta respuesta, en episodios de coresistencia hacia otros metales de carácter tóxico y el conocimiento de los eventos moleculares por los que el Cd es absorbido por las microalgas con los mecanismos de resistencia que podrían proporcionar *a posteriori* los parámetros básicos, para el desarrollo de un sistema de monitoreo del grado de concentración del Cd, su biodisponibilidad y el comportamiento específico en interacción con otros metales en distintos ecosistemas acuáticos.

## RESPUESTAS MOLECULARES DE RESISTENCIA

Las microalgas expuestas al cadmio y bajo estrés provocado por éste, exhiben una diversidad de estrategias para mitigar los efectos adversos del metal (Zouari *et al.*, 2016). Precisamente, existe información previa sobre la aparición de varios géneros de microalgas (*Stigeoclonium*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* y *Scenedesmus*), resistentes a la exposición de distintos metales de carácter tóxico (ej. Cd, Pb, Cr) (Nishikawa & Tominaga, 2001; Pawlik-Skowrońska, 2001; Rehman & Shakoori, 2001; Baos *et al.*, 2002; Lavoie *et al.*, 2014). En otros estudios, se evaluó la sensibilidad de *Dictyosphaerium chlorelloides* por exposición al cromo como Cr(VI), evidenciando una destrucción masiva celular en la mayoría de la población, no obstante, se encontraron algunas cepas variantes resistentes con viabilidad

a los ambientes contaminados con Cr(III) (Sánchez-Fortún *et al.*, 2009; D'ors *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014). Dentro de los mecanismos básicos que se inducen por la exposición al Cd, se presenta la quelación intracelular a través de polipéptidos como las Metalotioneínas de clase III (Mt[III]), descrita a continuación.

### EXPRESIÓN DE Mt(III)

Uno de los mecanismos que se han definido mejor en protistas, plantas, algas y algunos hongos sobre el proceso de detoxificación por metales tóxicos, es a través de la quelación de metales vía inducción del glutatión reducido (GSH) (Pantoja Muñoz *et al.*, 2016) y en la síntesis de Metalotioneínas de clase III (Mt[III]) a través de la fitoquelatina sintasa (PCS) enzima originalmente descubierta y caracterizada en la planta *Silene cucubalus* por Grill *et al.*, (1989), siendo el Cd el mayor inductor de este sistema (activado también por Ag, Pb, Cu, Hg, Au, Zn) (Gekeler *et al.*, 1988; Cobbett, 2000; Pawlik-Skowrońska, 2001; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). En 1992, Howe & Merchant revelaron que en *Chlamydomonas reinhardtii* la capacidad de quelación es a través de la expresión de Mt(III) al asimilar un 70% de Cd. Anteriormente, las metalotioneínas de clase III (MtIII), comúnmente denominadas fitoquelatinas (PCs) recibieron este nombre, al ser aisladas por primera vez de una planta superior (*Rauvolfia serpentina*) descubriéndose su capacidad de unirse a iones cadmio (Grill *et al.*, 1985; Perales-Vela *et al.*, 2006). La estructura general de las Mt(III) es  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , donde la longitud de la cadena “n” fluctúa entre 2 a 11 unidades con un peso molecular entre 2,000 a 10,000 Da (Grill *et al.*, 1985; Steffens, 1990). Los primeros estudios sobre la identificación de isoformas de Mt(III) en microalgas lo llevaron a cabo en 1977 Stokes *et al.*, en la clorofícea *Scenedesmus acutiformis*. Posteriormente, se han identificado estas Mt(III) en otras especies de microalgas del género *Stichococcus* y en diatomeas como en *Thalassiosira* (Knauer *et al.*, 1998; Pawlik-Skowrońska *et al.*, 2004). Estas proteínas se pueden unir a una gran variedad de metales en el citosol y, dependiendo del organismo, los complejos Mt(III)-metal y GSH-metal son transportados en forma activa dentro de la vacuola como se observó por primera vez en la microalga *Dunaliella bioculata* (Heuillet *et al.*, 1986; Clemens, 2001). Al igual que otras metalotioneínas (ej. Mt(II)), las fitoquelatinas funcionan como apoenzimas con la consecuente activación con cofactores de iones metálicos esenciales e intervienen en la detoxificación de metales tóxicos (Thumann *et al.*, 1991), como se observa en la Figura 1. Los complejos de Mt(III) de acuerdo a la inclusión de iones sulfuro se dividen en dos categorías: (I) la forma de bajo peso molecular (LMW) donde el metal tiene preferencia por su unión con grupos tiol (-SH) y (II) el complejo de alto peso molecular (HMW) donde iones de sulfuro inorgánico ( $S^{2-}$ ) están incorporados para formar nanopartículas (biomineralización) (Morelli & Scarano, 2001; Perales-Vela *et al.*, 2006).

Así, la formación de las Mt(III) puede realizarse principalmente por 3 procesos (Perales-Vela *et al.*, 2006): (1) las Mt(III) se sintetizan en el citosol donde secuestran al Cd(II), los complejos Cd-Mt(III) son transportados posteriormente al cloroplasto y a las mitocondrias formando complejos de LMW; (2) las Mt(III) se sintetizan dentro de la vacuola donde se unen al Cd el cual es transportado como ion libre para formar complejos HMW y (3) ambos procesos co-existen y las Mt(III) se sintetizan en los tres compartimentos celulares (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Anteriormente, se ha demostrado que la síntesis de Mt(III) está relacionada con el mecanismo de resistencia al cadmio y un aumento en su acumulación en protistas fotosintéticos como *Euglena gracilis* (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002). En estudios genéticos previos, como el realizado por Ha *et al.*, (1999), se demostró que mutantes PC-deficientes de crucíferas del género *Arabidopsis*, se comportan como hipersensibles al Cd. Sin embargo, se ha confirmado que no se induce la síntesis de Mt(III), bajo tratamientos con calor, frío, radiación ultravioleta (UV), anoxia y estrés oxidativo (Steffens, 1990).

Por otra parte, la entrada y la acumulación de iones metálicos por microorganismos, generalmente ocurre en dos etapas (Monteiro *et al.*, 2012): (1) primero ocurre una adsorción inicial rápida, reversible y pasiva sobre la superficie celular donde los iones metálicos se adsorben a través de interacciones electrostáticas a grupos funcionales de la pared celular ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{RNH}_2^-$ ,  $\text{RS}^-$  y  $\text{RO}^-$ ) (Figura 2); (2) Seguido por un proceso mucho más lento, irreversible, que implica el transporte activo de cationes metálicos a través de la membrana celular en el citoplasma, con la posterior unión a biomoléculas intracelulares (Perales-Vela *et al.*, 2006; Zeraatkar *et al.*, 2016).

### TRANSPORTADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA AL Cd

Es sabido que la captación (adsorción y absorción) de iones metálicos a través de la superficie de las microalgas se da por enlaces covalentes a través de grupos amino, carbonilo, carboxilo y sulfato (Perales-Vela *et al.*, 2006). De igual forma, anteriormente ya se tenía conocimiento de que polisacáridos y proteínas presentes en las paredes celulares eran los principales responsables en el transporte de iones metálicos hacia el interior de la célula (Crist *et al.*, 1981; Trevors *et al.*, 1986). Como se menciona en el apartado anterior, en células de plantas, levaduras y microalgas, se conocen 5 familias de proteínas implicadas en el transporte activo de Cd a través de la membrana al interior de la célula: (1) antitransportador de  $M^+/H^+$ ; (2) del tipo CPx ATPasas; (3) Facilitadores de difusión de cationes (CDF) que expulsan sustratos hacia el espacio periplásmico también denominado “familia de flujo de salida de cationes”; (4) los tipo Nramp su nombre proviene de proteínas asociadas a la resistencia de macrófagos (por sus siglas en inglés “Natural resistance associated macrophage proteins”); y (5) proteínas ZIP como ZRT-IRT (Guerinot, 2000; Williams *et al.*, 2000). En levaduras, los transportadores Nramp, CDF y ZIP participan en

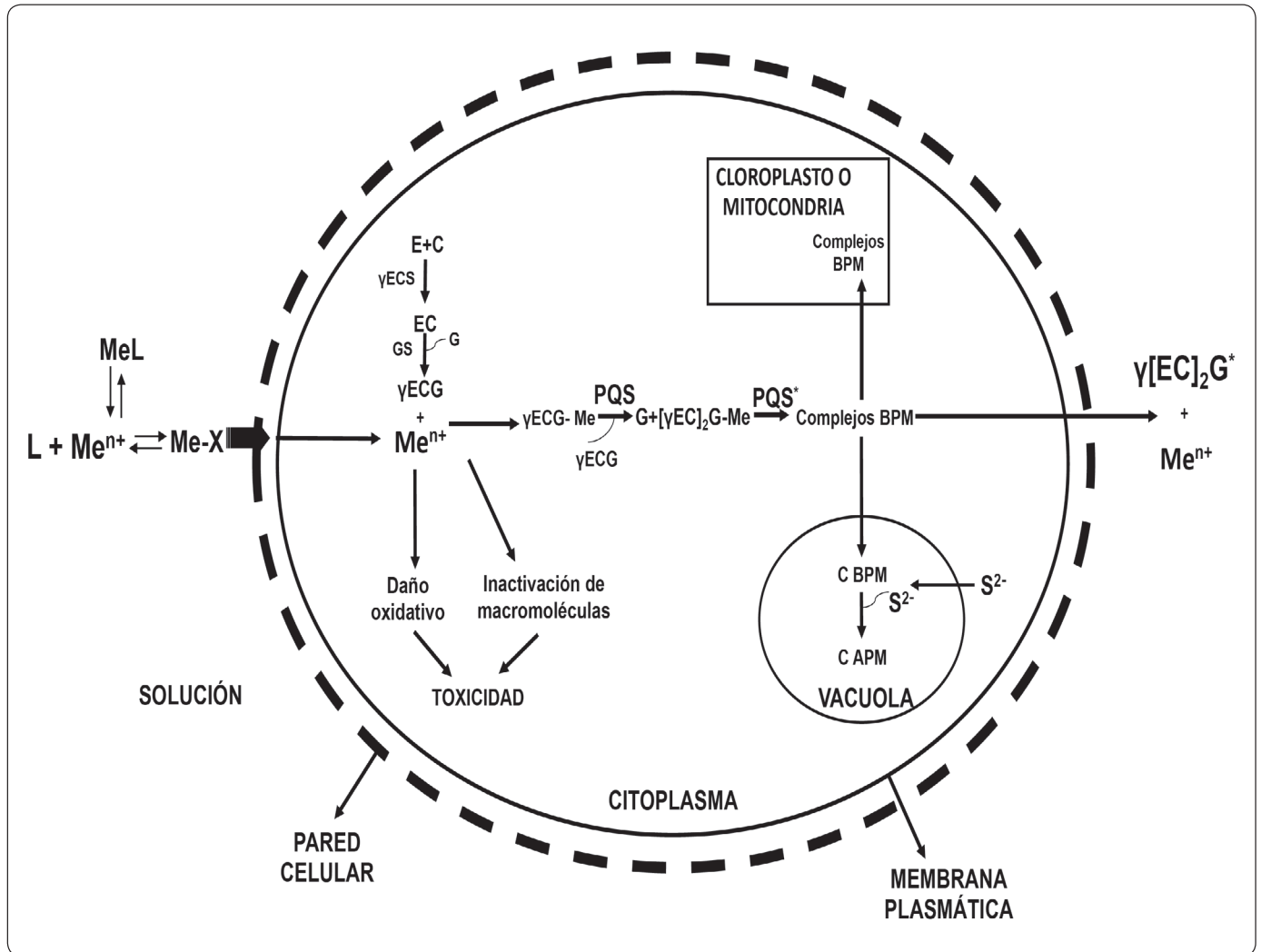
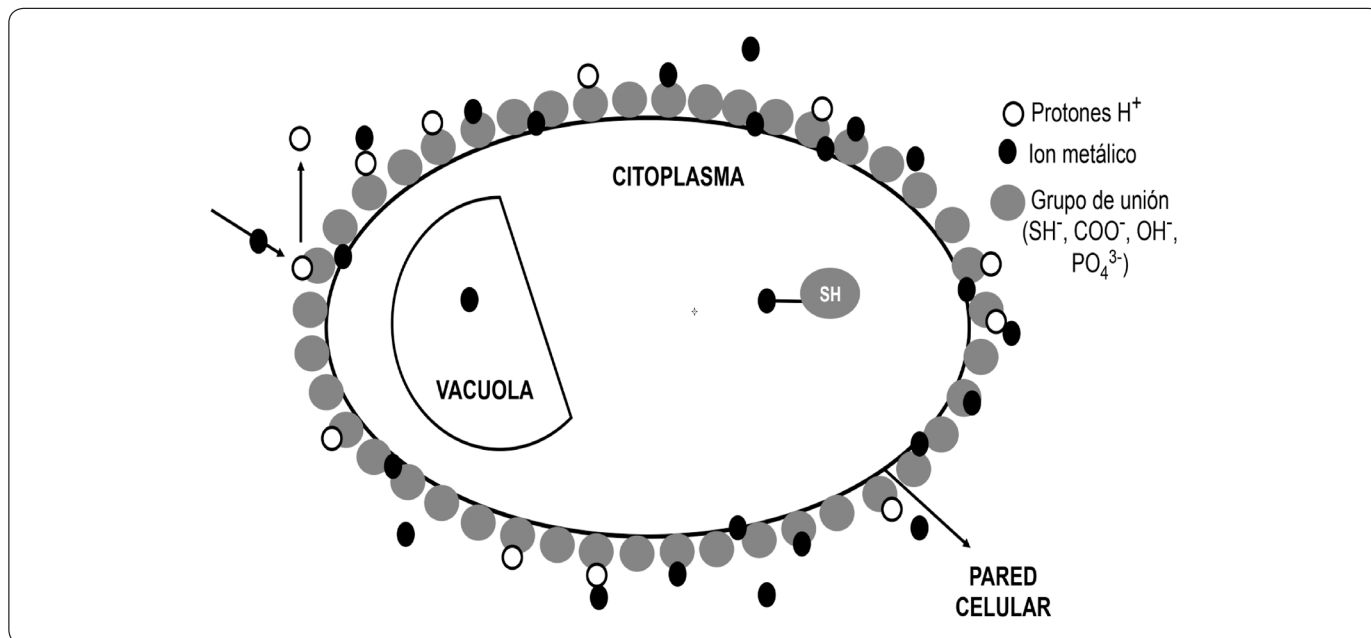


Figura 1. Mecanismo general de detoxificación de metales mediado por metalotioneínas de clase III (Mt(III)) en microalgas. Complejo metálico en solución (MeL), ion metálico libre ( $Me^{n+}$ ), ligando biótico extracelular (X), ácido glutámico (E), cisteína (C), glicina (G), Glutatión sintetasa (GS), gamma glutamilcisteína ( $\gamma EC$ ), Glutatión ( $\gamma ECG$ ), Metalotioneína n=2 ( $\gamma [EC]_2G$ ), Complejos de Bajo Peso Molecular (CBPM), Complejos de Alto Peso Molecular (CAPM), fitoquelatina sintetasa (PQS), gamma glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma ECS$ ) (Perales-Vela *et al.*, 2006).

el tráfico del ion Cd(II) entre el citosol y la vacuola (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). En las microalgas existe poca información de los transportadores involucrados en la movilización y en la capacidad de resistencia a cationes metálicos tanto esenciales como los utilizados por los no esenciales (Cd, Pb, As, Hg), creciendo en los últimos años el interés sobre su identificación y caracterización sobre estos organismos (ej. *Chlamydomonas*). Así, los transportadores Nramp de *Chlamydomonas* del tipo D2MT1 presentan amplia especificidad en el transporte de  $Mg > Mn > Cd > Cu > Fe$ , pero no a Zn (Rosakis & Köster, 2005). Page *et al.*, (2009), identificaron a 2 transportadores con alta afinidad para Cu(II) y posiblemente para Cd(II) también sobre *Chlamydomonas reinhardtii* CTR1 y CTR2. Asimismo, se ha registrado un incremento en la transcripción de genes (EST2960

y EST2822) para la expresión de transportadores de sulfato en la membrana plasmática (por sus siglas en inglés PMST: EgPMST1, EgPMST2 y EgPMST3) en protistas fotosintéticos (*Euglena gracilis*) y microalgas que participan en la acumulación de metales tóxicos (García-García *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, se ha propuesto que en las células fotosintéticas, el Cd induce el efecto conocido como “caballo de Troya”, ya que utiliza a los transportadores de los metales esenciales (ej. IRT1, transportador regulado de hierro tipo 1, o HMA4 transportador de Zn/Cd de tipo ATPasa) para internalizarse en la célula vegetal y provocar su respuesta tóxica (Cailliatte *et al.*, 2009). Entre de los transportadores que utiliza el Cd destaca uno específico de calcio LCT1 de levaduras y



**Figura 2.** Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH<sup>-</sup>, COO<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, etc.) (Zeraatkar *et al.*, 2016).

CAX (H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) en *Arabidopsis* (Clemens *et al.*, 1998). Una vez dentro en la célula fotosintética, el Cd se acumula en la vacuola a través de un antitransportador de M<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ubicado en el tonoplasto (Salt & Wagner, 1993).

Conjuntamente, la biosorción, acumulación, toxicidad, y la adaptación a cationes de metales tóxicos por las microalgas pueden verse afectadas por varios factores que incluyen: (1) la concentración de iones metálicos, (2) la biomasa celular, (3) el pH, (4) la temperatura, y (5) la presencia de otros iones competidores (Zeraatkar *et al.*, 2016).

### RESPUESTA DE ESTRÉS A LAS FLUCTUACIONES DEL pH

Distintos factores ambientales afectan la toxicidad y la acumulación del cadmio en las microalgas. Uno de los parámetros esenciales que determina el comportamiento de los metales es el pH, modificando la especiación y biodisponibilidad de los mismos. Está claro que las propiedades fisicoquímicas del metal y del medio fijan la forma química en que éste puede presentarse (Vymazal, 1987; Canli & Atli, 2003). Asimismo, existe una gran cantidad de estudios que han demostrado que la toxicidad y la biodisponibilidad del Cd están determinadas por la concentración de la forma libre del metal (Allen *et al.*, 1980; Campbel & Stokes, 1985; Franklin *et al.*, 2000). La mayoría de los grupos de unión a metales en las microalgas son ácidos (por ejemplo, -COOH); estos grupos generan una superficie cargada negativamente a pH ácido, y en conjunto con las interacciones electrostáticas entre especies catiónicas y la superficie de la célula determinan en gran medida la biosorción del metal

(Mehta & Gaur, 2005). Una disminución de la absorción de metales por las microalgas se ha observado con frecuencia a un pH extremadamente ácido (<2) debido a que probablemente la alta concentración de iones H<sup>+</sup> generan la exclusión competitiva de la unión a los ligandos en la superficie celular (Campbel & Stokes, 1985; Gupta & Rastogi, 2008). En estudios previos realizados por Gipps & Coller, (1980) sobre la cloroficea *Chlorella pyrenoidosa* se encontró que, la absorción de Cd fue mayor a un pH de 8 que a 6.5. Posteriormente, en *Scenedesmus obliquus*, se reportó que la absorción y acumulación intracelular del Cd se dio a un rango de pH de 5-9 (Starý & Kratzer, 1982) Posteriormente, Pereira *et al.*, (2013), revelaron que una cepa variante resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides* a Cr(VI) (Dc1M<sup>Cr(VI)</sup>R25) comparada con la variante tipo silvestre (Dc1M<sup>wt</sup>), se comportó más resistente a la exposición de Cr(VI) a pH de 4.5 que de 7.5 tanto en la inhibición del crecimiento como en la actividad fotosintética.

Otro de los mecanismos que se inducen debido a la presencia de fluctuaciones de pH, es la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp (por sus siglas en inglés "Heat-shock proteins"). Estas proteínas actúan en el plegamiento y ensamblaje de proteínas no nativas (desnaturalizadas), con actividad ATPasa, evitando la aglomeración de proteínas desnaturalizadas e incluso se ha demostrado que se expresan durante el estrés producido por metales tóxicos (Vierling, 1991; Jeffrey Morris, 2014). Asimismo, en estudios realizados por Bierkens *et al.*, (1998), demostraron la inducción de algunas isoformas de Hsp70 en la microalga *Raphidocelis subcapitata*, debido a la acidificación del

medio. Posteriormente, Gerloff-Elias *et al.*, (2006) comprobaron la inducción y acumulación de estas mismas isoformas (Hsp70) en el mecanismo de adaptación de *Chlamydomonas acidophila* a fluctuaciones de pH y temperatura dependientes de ambientes acuáticos contaminados con elevadas concentraciones de metales (Fe, Al, Mn, Cr, Ni). En conjunto, se ha identificado una mayor inducción de ciertas proteínas periplásmicas comparadas con las proteínas citoplásmicas a diferentes valores de pH (9.0, 7.5, 6.0 y 5.5) sobre *Synechocystis* PCC6803. Así, entre las proteínas ácido-base inducidas en esta cianobacteria, se identificaron a la anhidrasa carbónica y a la oxalato descarboxilasa encargadas de la homeostasis del pH (Kurian *et al.*, 2006). En el 2009, Zhang *et al.*, identificaron mediante análisis proteómico sobre esta misma cianobacteria, la expresión de 39 proteínas inducidas a estrés por pH elevados y un tercio de las cuales corresponden a transportadores tipo ABC (glicoproteínas P dependientes de ATP) incluyendo 3 transportadores de fosfato. Entre otras de las proteínas identificadas destacan: MinD implicada en la división celular, Cya2 que participan en la señalización celular, PsaF con función sobre la actividad fotosintética y CoxB que tiene actividad sobre la respiración.

#### RESISTENCIA AL ESTRÉS INDUCIDO POR VARIACIONES EN LA TEMPERATURA E IRRADIACIÓN

Las fluctuaciones de temperatura influyen directamente sobre la fluidez de la membrana celular, afectando el grado de saturación de los lípidos y la integración de proteínas transmembranales incrementando la salida de iones y otros solutos (Jeffrey Morris, 2014). De igual forma, las constantes de formación del complejo ligando-metal están regidas por la temperatura, y al aumentar en sus niveles por encima del rango óptimo en cultivos de microalgas no sólo se incrementa la capacidad de biosorción de los iones metálicos, sino también el número de sitios de unión implicados en la absorción metálica (Sarı & Tuzen, 2009; Khan *et al.*, 2012). Sin embargo, en otras investigaciones, se ha determinado que en las microalgas la absorción de iones metálicos es exotérmica, es decir, se incrementa la biosorción metálica cuando disminuye la temperatura (Gupta *et al.*, 2010).

La primera respuesta al estrés producido por elevadas temperaturas es la desnaturalización proteica que se traduce en pérdida de la actividad biológica, formación de agregados proteicos o en la inducción de la apoptosis celular. Para adaptarse a este estrés, las células fotosintéticas implican la inducción de chaperonas y proteasas como las Hsps para el repliegamiento y degradación de proteínas (Vierling, 1991; Slabas *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente, se ha identificado el incremento de la síntesis de Hsp70 en *Chlamydomonas acidophila* en correlación a concentraciones elevadas de metales-temperatura (20-39°C) dependiente (Gerloff-Elias *et al.*, 2006). La Hsp70 interviene en la degradación de proteínas defectuosas a través de la ruta del proteosoma (marcaje con ubiquitina por medio de la ubiquitina ligasa) (Lüders *et al.*, 2000). En cultivos celulares de plantas superiores (*Lycopersicon peruvianum*), también se

presentó la inducción de Hsp70 en respuesta al estrés producido por Cd (Neumann *et al.*, 1994). Estos mismos investigadores demostraron que la Hsp70 se encontraba presente en el núcleo, el citoplasma y en la membrana plasmática, sugiriendo que esta proteína está implicada en la protección celular contra la exposición al Cd y al calor. Hihara *et al.*, (2001) y posteriormente Summerfield & Sherman, (2008), identificaron a través de un análisis de microarreglos de DNA la expresión de una isoforma de HspA en la cianobacteria *Synechocystis* en respuesta a una alta intensidad lumínica, expuesta a elevadas temperaturas, en presencia de concentraciones salinas altas, estrés alcalino (pH 10), acidificación (pH 3) y exposición a la radiación UV.

A bajas temperaturas (por debajo de 20°C) las membranas se vuelven menos “fluidas” y la actividad de ciertas proteínas como las ATPasas se encuentra inhibida disminuyendo el transporte de solutos dentro y fuera de la célula (Jeffrey Morris, 2014). Los mecanismos que influyen en la adaptación de las cianobacterias y otras microalgas a bajas temperaturas son la expresión de proteínas de choque frío (CAPs), proteínas anticongelantes (Antifreeze proteins: AFPs) y la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en membranas de diatomeas, dinoflagelados y microalgas verdes (Henderson *et al.*, 1998; Mock & Kroon, 2002; Morgan-Kiss *et al.*, 2002; Morgan-Kiss *et al.*, 2006).

Napolitano & Shain (2004), encontraron que una de las estrategias de compensación adicional para el mantenimiento de las tasas de reacciones enzimáticas a temperaturas extremas en organismos fotosintéticos mesófilos y termófilos, consiste en elevar las tasas de producción de ATP (aumento de la fotofosforilación) y de adenilato total. Así, en la actividad fotosintética, cualquier estrés ambiental (ej. temperaturas bajas) que produzca una alteración entre la energía absorbida y la energía utilizada se detecta mediante el proceso redox a través del sistema de transporte de electrones y la acumulación de protones en las membranas de los tilacoides (Jeffrey Morris, 2014). De esta manera, el desequilibrio energético es corregido a través de la modulación a nivel de absorción de luz en el PSII (ej. disipación del exceso de energía en forma de calor NPQ) o a nivel de la energía utilizada a través de modulaciones de la actividad enzimática durante el ciclo de Calvin (Figura 3) y por medio de la regulación transcripcional traduciéndose a la adaptación a temperaturas extremas (Morgan-Kiss *et al.*, 2006). Anteriormente, Lomas & Glibert, (1999), han propuesto que a bajas temperaturas y cuando la absorción de la luz excede los requerimientos energéticos del metabolismo, las poblaciones de diatomeas exhiben tasas relativamente elevadas en la absorción de NO<sub>3</sub> para modular el balance energético entre la producción y el requerimiento mismo.

Con respecto a la respuesta generada por fluctuaciones en intensidad lumínica sobre las microalgas, la energía lumínica excesiva puede incrementar los niveles de moléculas a un estado excitado, como la clorofila triplete y el oxígeno singulete

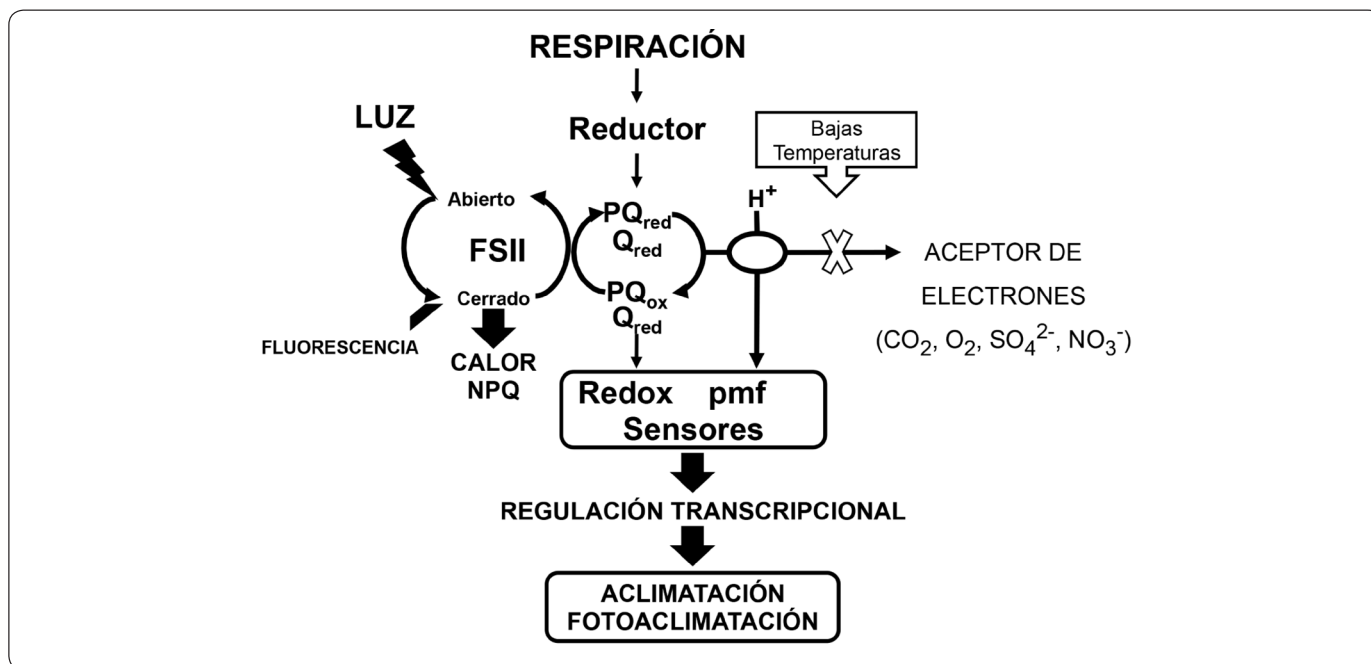


Figura 3. Sistema de transporte de electrones con actividad redox bajo variaciones en temperatura e intensidad lumínica. Fotosistema II (FSII), Procesos no fotoquímicos (NPQ-Calor), Plastoquinona reducida (PQ<sub>red</sub>), Quinona reducida (Q<sub>red</sub>), Plastoquinona oxidada (PQ<sub>ox</sub>), Quinona reducida (Q<sub>ox</sub>), fuerza protón-motriz (pmf) (Morgan-Kiss *et al.*, 2006).

(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Okamoto *et al.*, 2001). En adición, el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) se genera durante la reducción del O<sub>2</sub> en el PSI, la SOD (superóxido dismutasa) dismuta el O<sub>2</sub><sup>-</sup> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y éste último tiene la capacidad de reaccionar con iones metálicos (ej., Cu(II), Fe(III)) produciendo el radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>), un oxidante fuerte que puede reaccionar y generar estrés oxidativo sobre proteínas, enzimas clave (ej. RUBISCO en la fijación de CO<sub>2</sub>), peroxidación lipídica y alteraciones sobre el DNA; de la misma forma disminuye el rendimiento cuántico fotosintético, inhibición del crecimiento poblacional y la supervivencia de las microalgas (Takeda *et al.*, 1995; Glatz *et al.*, 1999). Ciertas cianobacterias y microalgas utilizan diferentes estrategias para contrarrestar la foto-oxidación de los rayos UV como son: (1) la evasión a través de la migración hacia zonas de bajo flujo de rayos UV (ej. *Spirulina subsala*); (2) la síntesis de pigmentos absorbentes de radiación UV (ej. escitonemina-370 nm), síntesis de metabolitos secundarios como aminoácidos tipo micosporina por vía del shikimato con una absorción máxima de 310 a 360 nm, antioxidantes (ej. síntesis de carotenoides,  $\alpha$ -tocoferoles, ascorbato) y polisacáridos extracelulares (ej. producción de glicano extracelular en *Nostoc commune*) (Scherer *et al.*, 1988; Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Quesada & Vincent, 1997); (3) mecanismos de reparación del DNA (ej. fotoreparación y reparación por escisión por el sistema SOS y el gen RecA identificado en cianobacterias) (Geoghegan & Houghton, 1987); (4) re-síntesis de proteínas sensibles a UV, por ejemplo, se ha detectado un aumento del recambio de las proteínas D1 y D2 del centro de reacción del PSII en

*Synechocystis sp.* PCC6803 en respuesta a la irradiación UV-B (Sass *et al.*, 1997); (5) Síntesis de Hsps y (6) la generación de NADPH (Ehling-Schulz & Scherer, 1999; Jeffrey Morris, 2014).

#### COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS RESISTENTES EN LA INTERACCIÓN CON OTROS METALES

Otra de las variables a considerar sobre la resistencia al Cd en microalgas es, la interacción con otros metales. Esto es indispensable en el caso de resistencias cruzadas, cuando una especie o población es resistente a más de un metal al mismo tiempo (Gupta & Sandalio, 2012). Algunos autores sugieren que la existencia de diferencias en la sensibilidad de distintas especies de fitoplancton a la exposición de contaminantes metálicos, se deben a algún efecto estimulante sobre el crecimiento celular asociado con bajas concentraciones de Zn, Fe y Cu (Morelli & Scarano, 2001). Por otra parte, el comportamiento sinérgico que pudiera surgir debido a la interacción de distintos metales, podría aumentar el riesgo ambiental de bioacumulación (Baos *et al.*, 2002). Por el contrario, la presencia de otros cationes metálicos en solución puede antagonizar la toxicidad del Cd (Torres *et al.*, 1997). En el ambiente acuático, los metales Zn y Cd poseen la misma carga electrónica y una configuración electrónica similar, exhibiendo propiedades físicas y bioquímicas semejantes. Asimismo, comparten una afinidad equivalente a ligandos de S, N y O (Nieboer & Richardson, 1980; Newman & McCloskey, 1996) y en organismos acuáticos compiten con frecuencia por los mismos canales y transportadores, inhibiendo

la unión y entrada de Ca y Mn (Wright, 1994; Barron & Albeke, 2000; Poteat *et al.*, 2012). En contraste, el Ca ha demostrado ser altamente protector contra la absorción de Zn y Cd en organismos acuáticos (Barron & Albeke, 2000). De igual forma, las formas oxidadas del Mn ( $MnO_3$ ) son muy reactivas con otros metales en su forma reducida (ej. Fe(II)) incluyendo al Cd modificando su biodisponibilidad y la posterior acumulación en sedimentos (Dong *et al.*, 2000; Trivedi & Axe, 2000).

Poco se sabe de la interacción y el comportamiento molecular en la resistencia de las microalgas a diferentes metales tóxicos. En investigaciones realizadas por Navarro *et al.*, (1997) y posteriormente por Avilés *et al.*, (2003), demostraron que células de *Euglena gracilis* pretratadas con Hg(II) por 60 generaciones, mostraron mayor resistencia y acumulación al Cd después de 4 días de exposición, comparadas con las cepas tipo silvestre. Del mismo modo, Pawlik-Skowrońska (2003) reportó que una variante resistente de la microalga verde *Stigeoclonium tenue* aislada de aguas contaminadas por Zn presentó mayor tasa de acumulación de Pb y Zn comparado con la variante sensible. En bioensayos previos, Morsi Abd-El-Monem *et al.*, (1998) demostraron que *Scenedesmus acutus* resistente al Cr(VI) también presentó una tasa de crecimiento máximo a concentraciones de Cu de  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ , concluyendo que la variante es co-resistente a la exposición a otros metales. Asimismo, explicaron que la co-resistencia se debe a posibles mecanismos de exclusión celular y formación de complejos cúpricos con lo que se reduce la biodisponibilidad del metal en la célula. En investigaciones recientes, D'ors *et al.*, (2016) estudiaron la interferencia de cationes metálicos tóxicos (Cd, Zn, Cr(III), Hg(II), Co, Fe(III) y Ag) sobre la respuesta fotosintética en una cepa resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides* ( $Dc^{Cr(VI)R25}$ ) al Cr(VI), los resultados mostraron que el Zn fue el único metal con capacidad de interferencia en la actividad fotosintética de la cepa  $Dc^{Cr(VI)R25}$ , mientras que los otros iones metálicos en mezclas binarias con el Zn mostraron una respuesta levemente antagónica.

### MECANISMOS COMPLEMENTARIOS A LA RESISTENCIA DE METALES

Uno de los mecanismos complementarios a la síntesis de Mt(III) es a través de la exclusión como una de las alternativas que han desarrollado las microalgas para mantener la homeostasis con metales presentes en el ecosistema (Perales-Vela *et al.*, 2006). En varios estudios realizados en clorofíceas (*Scenedesmus acutus*), diatomeas y dinoflagelados, se demostró que este grupo de microalgas son más resistentes a la exposición a metales tóxicos, debido a la producción de exudados como polisacáridos extracelulares (aleloquímica) proporcionando una barrera para evitar la adsorción de varios cationes metálicos (Cr(VI), Cd y Cu(II)) (Corradi *et al.*, 1998; Pistocchi *et al.*, 2000). Por otro lado, Lavoie *et al.*, (2009) encontraron en *Chlamydomonas reinhardtii* una acumulación de Cd de 2 a 4 veces mayor que en *Pseudokirchneriella subcapitata*. Asimismo, *C. reinhardtii*

fue más resistente con una  $CE_{50}$  de 273nM comparada con el valor mostrado en *P. subcapitata* de 127nM. De igual forma, estos mismos investigadores demostraron que *C. reinhardtii* mostró mayor proporción de gránulos de Cd en cloroplastos y síntesis de altos niveles de PCs con oligómeros más largos y con mayor número de grupos tiol, con respecto a *P. subcapitata*, demostrando así las diferencias en estrategias de detoxificación del Cd y otros metales en varias especies de microalgas de agua dulce. En otros estudios utilizando rayos X, se ha documentado la presencia de gránulos compuestos por cadenas lineales de polifosfatos (poly-P) en el citoplasma y en vacuolas de varias especies de microalgas (ej. *Dunaliella minuta*) (Visviki & Rachlin, 1992; Nishikawa *et al.*, 2006). Estas estructuras podrían participar en la desintoxicación de metales debido a la alta afinidad del fosfato a cationes metálicos y la baja solubilidad de los complejos de metal-fosfato (Lavoie *et al.*, 2009).

Se ha confirmado que metales como el Cr(VI), induce la gametogénesis en *Scenedesmus acutus* produciendo cuatro células desprovistas de una pared celular propia, pero se observó que estas células compartían una envoltura común “madre” como un mecanismo de protección, ya que cada célula se encontraba delimitada por una membrana plasmática (Corradi *et al.*, 1995). Igualmente, Rijstenbil, (2002) encontró un aumento en la reproducción sexual en la diatomea *Ditylum brightwellii* debido a la exposición al cobre ( $Cu^{2+}$ ). Por su parte, *Scenedesmus incrassatulus* exhibió una respuesta de plasticidad fenotípica como un evento de resistencia al Cd y Cu, creciendo en forma unicelular en presencia de estos cationes divalentes (con respecto al Cu(II)), mientras que cuando esta misma microalga fue expuesta al Cr(VI) se formaron coenobios irregulares correspondientes a las diversas etapas de la formación de autoesporas. No obstante, estos cambios fueron reversibles al retirar el Cu, pero no el Cd, debido a alteraciones irreversibles producidas por este metal. Estos resultados indicaron que los metales disminuyen la disponibilidad de energía en las microalgas a través de varios mecanismos, incluyendo el daño fotosintético mediante la producción de radicales libres, generando la reducción de la dominancia del coenobio de cuatro células en *S. incrassatulus*, y modificaciones sobre la cementación vacuolar en la formación del coenobio por estrés al Cd y Cu (Peña-Castro *et al.*, 2004).

De forma simultánea a los mecanismos descritos que participan en la resistencia a metales, en investigaciones recientes se ha indicado una estrategia alternativa en la síntesis de aminoácidos como la prolina. En estos estudios, se ha demostrado en una cepa transgénica de *Chlamydomonas reinhardtii*, la expresión del gen de la enzima D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa con una producción de niveles elevados por encima del 80% de prolina, lo que resulta en una mayor capacidad de crecimiento a concentraciones altas de  $100\mu\text{M}$  de Cd específicamente,



lo que representa mayor resistencia en el orden de 4 veces mayor comparada con la del tipo silvestre (Mehta & Gaur, 1999; Siripornadulsil, 2002; Sharma & Dietz, 2006; Jamers *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

La presencia de elevadas concentraciones de metales tóxicos como el Cd en los diferentes ecosistemas acuáticos debido a las actividades industriales y agrícolas, supone un riesgo potencial en condiciones que favorecen su bioacumulación y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. No obstante, al afectar a los primeros niveles tróficos acuáticos, también representa una presión selectiva sobre la generación de microalgas variantes resistentes con alta capacidad de supervivencia en ambientes contaminados por metales tóxicos. Esta selección de variantes resistentes condiciona y determina los diferentes mecanismos moleculares por los que se rige esa capacidad. A la vez establece los criterios por los cuales diferentes parámetros fisicoquímicos modifican la toxicidad, biodisponibilidad, solubilidad, adsorción y absorción, interacción con biomoléculas, y modificaciones genéticas que intervienen en las cepas resistentes. De igual forma, complejas interacciones se han puesto de manifiesto cuando varios metales y otras sustancias actúan de forma simultánea produciendo respuestas sinérgicas, antagónicas o aditivas.

Por consiguiente, el conocimiento de los mecanismos específicos del Cd sobre la actividad fotosintética, el balance de oxígeno, el comportamiento en la respiración e interacción con otros metales de carácter tóxico en microalgas eucariotas del phylum *Chlorophyta*, sigue siendo poco estudiado y marca el punto de partida para nuevas investigaciones enfocadas en el aislamiento de cepas de microalgas resistentes, para utilizarse como modelos biológicos en la identificación y posterior elucidación de los eventos genéticos y moleculares específicos, que determinan la resistencia en estas especies de microalgas. Esto mismo, establecerá en un futuro los principios básicos en el desarrollo biotecnológico de sistemas de monitoreo *in situ* para la rápida detección de concentraciones de Cd y otros metales tóxicos, a través de la tecnología de biosensores. Así como la implementación de métodos de biorremediación (ficorremediación) de cuerpos de agua contaminados por metales, utilizando a variantes resistentes de microalgas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Coordinación de Investigación Científica (CIC), U.M.S.N.H. (PI 26.8).

## REFERENCIAS

Allen, H.E., Hall, R.H. & Brisbin, T.D. (1980). Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, **14**(4) 441–443. DOI:10.1021/es60164a002

Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N. & Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating

phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.*, **180**(1), 1–10. DOI:10.1007/s00203-003-0547-2

Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F. & Costas, E. (2002). Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcóllar mine spill. *Eur. J. Phycol.*, **37**(4), 593–600. DOI: 10.1017/S096702620200392X

Barron, M.G. & Albeke, S. (2000). Calcium control of zinc uptake in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, **50**(3), 257–264. DOI: 10.1016/S0166-445X(99)00099-5

Belfiore, N.M. & Anderson, S.L., (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.*, **489**(2-3), 97–122. DOI:10.1007/s002440010122

Bierkens, J., Van de Perre, W. & Maes, J. (1998). Effect of different environmental variables on the synthesis of Hsp70 in *Raphidocelis subcapitata*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **120**(1), 29–34. DOI: 10.1016/S1095-6433(98)10006-5

Bruins, M.R., Kapil, S. & Oehme, F.W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**(3), 198–207. DOI:10.1006/eesa.1999.1860

Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S. & Curie, C. (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem. J.*, **422**(2), 217–228. DOI: 10.1042/BJ20090655

Campbel, P.G.C. & Stokes, P.M. (1985). Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**(12), 2034–2049. DOI: 10.1139/f85-251

Canli, M. & Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.*, **121**(1), 129–136. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00194-X

Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, **212**(4), 475–486. DOI: 10.1007/s004250000458

Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P. & Schroeder, J.I. (1998). The plant cDNALCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**(20), 12043–12048. DOI:10.1073/pnas.95.20.12043

Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.*, **123**(3), 825–832. DOI:10.1104/pp.123.3.825

Corradi, M.G., Gorbi, G. & Bassi, M. (1995). Hexavalent Chromium Induces Gametogenesis in the Freshwater Alga *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **30**(2), 106–110. DOI:10.1006/eesa.1995.1012

Corradi, M.G., Orbi, G., Morsi Abd-El-Monem, H., Torelli, A. & Bassi, M. (1998). Proceedings of the international symposium on integrated ecotoxicology from molecules/organisms to ecosystems Exudates from the wild type and a CR-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr (VI) toxicity to algae. *Chemosphere*, **37**(14), 3019–3025. DOI: 10.1016/S0045-6535(98)00343-9

Crist, R.H., Oberholser, K., Shank, N. & Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.*, **15**(10), 1212–1217. DOI: 10.1021/es00092a010

Dong, D., Nelson, Y.M., Lion, L.W., Shuler, M.L. & Ghiorse, W.C., (2000). Adsorption of Pb and Cd onto metal oxides and organic material in natural surface coatings as determined by selective extractions: new evidence for the importance of Mn and Fe oxides. *Water Res.*, **34**(2), 427–436. DOI: 10.1016/S0043-

- 1354(99)00185-2
- D'ors, A., Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, A., Bartolomé, M.C. & Sánchez-Fortún, S. (2016). Interference of heavy metals on the photosynthetic response from a Cr(VI)-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain. *Ecotoxicology*, **25**(1), 15–21. DOI:10.1007/s10646-015-1561-2
- D'ors, A., Pereira, M., Bartolomé, M.C., López-Rodas, V., Costas, E. & Sánchez-Fortún, S. (2010). Toxic effects and specific chromium acquired resistance in selected strains of *Dictyosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere*, **81**(2), 282–287. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.05.051
- Ehling-Schulz, M. & Scherer, S. (1999). UV protection in cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.*, **34**(4), 329–338. DOI: 10.1080/09670269910001736392
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W. & Scherer, S. (1997). UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.*, **179**(6), 1940–1945.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L. & Rudisill, C. (2012). Toxicological Profile for Cadmium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), Atlanta (GA).
- Fotovát, A. & Naidu, R. (1998). Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma*, **84**(1-3), 213–234. DOI: 10.1016/S0016-7061(97)00130-4
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Markich, S.J. & Lim, R.P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.*, **48**(2), 275–289.
- García-García, J.D., Olin-Sandoval, V., Saavedra, E., Girard, L., Hernández, G. & Moreno-Sánchez, R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **1820**(10), 1567–1575. DOI:10.1016/j.bbagen.2012.05.002
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.*, **150**(2), 197–202. DOI: 10.1007/BF00425162
- Geoghegan, C.M. & Houghton, J.A. (1987). Molecular cloning and isolation of a cyanobacterial gene which increases the UV and methyl methanesulphonate survival of recA strains of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, **133**(1), 119–126. DOI: 10.1099/00221287-133-1-119
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A. & Spijkerman, E. (2006). Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*: Hsp accumulation in *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **56**(3), 345–354. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00078.x
- Gipps, J. & Collier, B. (1980). Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*. *Mar. Freshw. Res.*, **31**(6), 747–755.
- Glatz, A., Vass, I., Los, D.A. & Vígh, L. (1999). The Synechocystis model of stress: from molecular chaperones to membranes. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**(1), 1–12. DOI:10.1016/S0981-9428(99)80061-8
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. (1989). Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**(18), 6838–6842.
- Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. (1985). Phytochelatin: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science*. **230**(4726), 674–676. DOI:10.1126/science.230.4726.674
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **1465**(1-2), 190–198. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00138-3
- Gupta, V.K. & Rastogi, A. (2008). Equilibrium and kinetic modelling of cadmium (II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase. *J. Hazard. Mater.*, **153**(1-2), 759–766. DOI:10.1016/j.jhazmat.2007.09.021
- Gupta, D.K. & Sandalio, L.M. (2012). Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 275. DOI: 10.1007/978-3-642-22081-4
- Gupta, V.K., Rastogi, A. & Nayak, A. (2010). Biosorption of nickel onto treated alga (*Oedogonium hatei*): Application of isotherm and kinetic models. *J. Colloid Interface Sci.*, **342**(2), 533–539. DOI:10.1016/j.jcis.2009.10.074
- Ha, S.-B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B. & Cobbett, C.S. (1999). Phytochelatin Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, **11**(6), 1153–1163. DOI:10.1105/tpc.11.6.1153
- Henderson, R.J., Hegseth, E.N. & Park, M.T. (1998). Seasonal variation in lipid and fatty acid composition of ice algae from the Barents Sea. *Polar Biol.*, **20**(1), 48–55. DOI:10.1007/s003000050275
- Heuillet, E., Moreau, A. & Halpern, S. (1986). Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl<sub>2</sub>: Electron probe microanalysis. *Biology of the cell*, **58**(1), 79–86.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. & Ikeuchi, M. (2001). DNA Microarray Analysis of Cyanobacterial Gene Expression during Acclimation to High Light. *Plant Cell*, **13**(4), 793–806. DOI:10.1105/tpc.13.4.793
- Howe, G. & Merchant, S. (1992). Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLANT Physiol.*, **98**(1), 127–136. DOI:10.1104/pp.98.1.127
- IARC (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Working Group views and expert opinions, Lyon, 9-16 February 1993. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, World Health Organ. Int. Agency Res. Cancer **58**, 1–415.
- Ivanina, A.V., Cherkasov, A.S. & Sokolova, I.M. (2008). Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Biol.*, **211**(4), 577–586. DOI:10.1242/jeb.011262
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L. & Jones, O.A.H. (2013). An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.*, **126**, 355–364. DOI:10.1016/j.aquatox.2012.09.007
- Jeffrey Morris, J., 2014. A1 - Srivastava, A. K. , A1 - Rai, A. N. & A1 - Neilan, B. A. [Eds.] (2013). Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses. PB - CRC Press, Boca Raton, FL, 375 pp., \$159.95. *J. Phycol.*, **50**(4), 770–770. DOI:10.1111/jpy.12201
- Khan, M.A., Ngabura, M., Choong, T.S.Y., Masood, H. & Chuah,

- L.A. (2012). Biosorption and desorption of Nickel on oil cake: Batch and column studies. *Bioresour. Technol.*, **103**(1), 35–42. DOI:10.1016/j.biortech.2011.09.065
- Knauer, K., Ahner, B., Xue, H.B. & Sigg, L. (1998). Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**(12), 2444–2452. DOI:10.1002/etc.5620171210
- Kurian, D., Phadwal, K. & Mäenpää, P. (2006). Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PROTEOMICS*, **6**(12), 3614–3624. DOI:10.1002/pmic.200600033
- Lavoie, M., Campbell, P.G.C. & Fortin, C. (2014). Predicting Cadmium Accumulation and Toxicity in a Green Alga in the Presence of Varying Essential Element Concentrations Using a Biotic Ligand Model. *Environ. Sci. Technol.*, **48**(2), 1222–1229. DOI:10.1021/es402630z
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C. & Campbell, P.G.C. (2009). Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquat. Toxicol.*, **92**(2), 65–75. DOI:10.1016/j.aquatox.2008.12.007
- Lomas, M.W. & Glibert, P.M. (1999). Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, **44**(3), 556–572. DOI:10.4319/lo.1999.44.3.0556
- Lüders, J., Demand, J. & Höhfeld, J. (2000). The Ubiquitin-related BAG-1 Provides a Link between the Molecular Chaperones Hsc70/Hsp70 and the Proteasome. *J. Biol. Chem.*, **275**(7), 4613–4617. DOI:10.1074/jbc.275.7.4613
- Macfie, S.M. & Welbourn, P.M. (2014). The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**(4), 413–419. DOI:10.1007/s002440010122
- Mehta, S.K. & Gaur, J.P. (1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.*, **143**(2), 253–259. DOI:10.1046/j.1469-8137.1999.00447.x
- Mehta, S.K. & Gaur, J.P. (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **25**(3), 113–152. DOI:10.1080/07388550500248571
- Mendoza-Cózatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H. & Moreno-Sánchez, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.*, **115**(2), 276–283. DOI:10.1034/j.1399-3054.2002.1150214.x
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A. & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**(4), 653–671. DOI:10.1016/j.femsre.2004.09.004
- Mera, R., Torres, E. & Abalde, J. (2016). Influence of sulphate on the reduction of cadmium toxicity in the microalga *Chlamydomonas moewusii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **128**, 236–245. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.02.030
- Mock, T. & Kroon, B.M.A. (2002). Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—I: important role of lipids as structural modulators and energy sink under N-limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, **61**(1), 41–51. DOI:10.1016/S0031-9422(02)00216-9
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L. & Malcata, F.X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.*, **28**(2), 299–311. DOI:10.1002/btpr.1504
- Morelli, E. & Scarano, G. (2001). Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Environ. Res.*, **52**(4), 383–395. DOI:10.1016/S0141-1136(01)00093-9
- Morgan-Kiss, R., Ivanov, A.G., Williams, J., Khan, M. & Huner, N.P.A. (2002). Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **1561**(2), 251–265. DOI:10.1016/S0005-2736(02)00352-8
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L. & Huner, N.P.A. (2006). Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**(1), 222–252. DOI:10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006
- Morsi Abd-El-Monem, H., Corradi, M.G. & Gorbi, G. (1998). Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.*, **40**(1), 59–66. DOI:10.1016/S0098-8472(98)00021-5
- Napolitano, M.J. & Shain, D.H. (2004). Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extremophiles*, **9**(2), 93–98. DOI:10.1007/s00792-004-0424-1
- Navarro, L., Torres-Márquez, M.E., González-Moreno, S., Devars, S., Hernández, R. & Moreno-Sánchez, R. (1997). Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **116**(3), 265–272. DOI:10.1016/S0742-8413(96)00202-2
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K. & Nover, L. (1994). Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, **194**(3), 360–367. DOI:10.1007/BF00197536
- Newman, M.C. & McCloskey, J.T. (1996). Predicting relative toxicity and interactions of divalent metal ions: Microtox® bioluminescence assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**(3), 275–281. DOI:10.1002/etc.5620150308
- Nieboer, E. & Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B Chem. Phys.*, **1**(1), 3–26. DOI:10.1016/0143-148X(80)90017-8
- Nishikawa, K. & Tominaga, N. (2001). Isolation, Growth, Ultrastructure, and Metal Tolerance of the Green Alga, *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**(12), 2650–2656. DOI:10.1271/bbb.65.2650
- Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M. & Tominaga, N. (2006). Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. *Plant Sci.*, **170**(2), 307–313. DOI:10.1016/j.plantsci.2005.08.025
- Okamoto, O.K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H. & Colepicolo, P. (2001). Antioxidant Modulation in Response to Metal-Induced Oxidative Stress in Algal Chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**(1), 18–24. DOI:10.1007/s002440010144
- Page, M.D., Kropat, J., Hamel, P.P. & Merchant, S.S. (2009). Two *Chlamydomonas* CTR Copper Transporters with a Novel Cys-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. *Plant Cell.*, **21**(3), 928–943. DOI:10.1105/tpc.108.064907
- Pantoja Munoz, L., Purchase, D., Jones, H., Raab, A., Urgast, D., Feldmann, J. & Garelick, H. (2016). The mechanisms of

- detoxification of As(III), dimethylarsinic acid (DMA) and As(V) in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.*, **175**, 56–72. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.02.020
- Pawlik-Skowrońska, B. (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquat. Toxicol.*, **52(3-4)**, 241–249. DOI: 10.1016/S0166-445X(00)00144-2
- Pawlik-Skowrońska, B. (2003). Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquat. Bot.*, **75(3)**, 189–198. DOI:10.1016/S0304-3770(02)00175-4
- Pawlik-Skowrońska, B., Pirszel, J., Kalinowska, R. & Skowroński, T. (2004). Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.*, **70(3)**, 201–212. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.09.003
- Peña-Castro, J.M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F. & Cañizares-Villanueva, R.O. (2004). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere*, **57(11)**, 1629–1636. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.06.041
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M. & Cañizares-Villanueva, R.O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, **64(1)**, 1–10. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.11.024
- Pereira, M., Bartolomé, M.C. & Sánchez-Fortún, S. (2013). Influence of pH on the survival of *Dictyosphaerium chlorelloides* populations living in aquatic environments highly contaminated with chromium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **98**, 82–87. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.020
- Pereira, M., Bartolomé, M.C. & Sánchez-Fortún, S. (2014). Photosynthetic activity and protein overexpression found in Cr(III)-tolerant cells of the green algae *Dictyosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere*, **108**, 274–280. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.052
- Pistocchi, R., Mormile, M.A., Guerrini, F., Isani, G. & Boni, L. (2000). Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.*, **12(3-5)**, 469–477. DOI: 10.1023/A:1008162812651
- Poteat, M.D., Diaz-Jaramillo, M. & Buchwalter, D.B. (2012). Divalent metal (Ca, Cd, Mn, Zn) uptake and interactions in the aquatic insect *Hydropsyche sparna*. *J. Exp. Biol.*, **215(9)**, 1575–1583. DOI:10.1242/jeb.063412
- Quesada, A. & Vincent, W.F. (1997). Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur. J. Phycol.*, **32(4)**, 335–342. DOI: 10.1080/09670269710001737269
- Rehman, A. & Shakoori, A.R. (2001). Heavy Metal Resistance *Chlorella* spp., Isolated from Tannery Effluents, and Their Role in Remediation of Hexavalent Chromium in Industrial Waste Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66(4)**, 542–547. DOI: 10.1007/s001280041
- Rijstenbil, J. (2002). Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat. Toxicol.*, **56(2)**, 115–131. DOI: 10.1016/S0166-445X(01)00188-6
- Rosakis, A. & Köster, W. (2005). Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *Biometals*, **18(1)**, 107–120. DOI: 10.1007/s10534-004-2481-4
- Ruangsomboon, S. & Wongrat, L. (2006). Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*. *Aquat. Toxicol.*, **78(1)**, 15–20. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.01.015
- Salt, D.E. & Wagner, G.J. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *J. Biol. Chem.*, **268(17)**, 12297–12302.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D. & Costas, E. (2009). Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.*, **28(9)**, 1901–1905. DOI:10.1897/08-489.1
- Sarı, A. & Tuzen, M. (2009). Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on aluminum biosorption from aqueous solution by brown algae (*Padina pavonica*) biomass. *J. Hazard. Mater.*, **171(1-3)**, 973–979. DOI:10.1016/j.jhazmat.2009.06.101
- Sass, L., Spetea, C., Máté, Z., Nagy, F. & Vass, I. (1997). Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction center subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.*, **54(1)**, 55–62. DOI: 10.1023/A:1005895924892
- Scherer, S., Chen, T.W. & Böger, P. (1988). A New UV-A/B Protecting Pigment in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiol.*, **88(4)**, 1055–1057.
- Sharma, S.S. & Dietz, K.-J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.*, **57(4)**, 711–726. DOI:10.1093/jxb/erj073
- Siripornadulsil, S. (2002). Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *PLANT CELL ONLINE*, **14(11)**, 2837–2847. DOI:10.1105/tpc.004853
- Slabas, A.R., Suzuki, I., Murata, N., Simon, W.J. & Hall, J.J. (2006). Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *PROTEOMICS*, **6(3)**, 845–864. DOI:10.1002/pmic.200500196
- Starý, J. & Kratzer, K. (1982). The Cumulation of Toxic Metals on Alga. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **12(1)**, 65–71. DOI:10.1080/03067318208071571
- Steffens, J.C. (1990). The Heavy Metal-Binding Peptides of Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41(1)**, 553–575. DOI:10.1146/annurev.pp.41.060190.003005
- Stokes, P.M., Maler, T. & Riordan, J.R. (1977). A low molecular weight copper binding protein in a copper tolerant strain of *Scenedesmus acutiformis* [Algae]. *Trace Subst. Environ. Health Conf.*, **3(1-4)**, 667–678. DOI: 10.1080/01904168109362869
- Summerfield, T.C. & Sherman, L.A. (2008). Global Transcriptional Response of the Alkali-Tolerant Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 to a pH 10 Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74(17)**, 5276–5284. DOI:10.1128/AEM.00883-08
- Takeda, T., Yokota, A. & Shigeoka, S. (1995). Resistance of Photosynthesis to Hydrogen Peroxide in Algae. *Plant Cell Physiol.*, **36(6)**, 1089–1095.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. (1991). Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin—metal complexes. *FEBS Lett.*, **284(1)**, 66–69. DOI: 10.1016/0014-

- 5793(91)80763-S
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. & Abalde, J. (1997). Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.*, **39(3)**, 231–246. DOI: 10.1016/S0166-445X(97)00034-9
- Trevors, J.T., Stratton, G.W. & Gadd, G.M. (1986). Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.*, **32(6)**, 447–464. DOI: 10.1139/m86-085
- Trivedi, P. & Axe, L. (2000). Modeling Cd and Zn Sorption to Hydrous Metal Oxides. *Environ. Sci. Technol.*, **34(11)**, 2215–2223. DOI:10.1021/es991110c
- Vierling, E. (1991). The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42(1)**, 579–620. DOI:10.1146/annurev.pp.42.060191.003051
- Vig, K. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv. Environ. Res.*, **8(1)**, 121–135. DOI:10.1016/S1093-0191(02)00135-1
- Visviki, I. & Rachlin, J.W. (1992). Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **23(4)**, 420–425. DOI: 10.1007/BF00203803
- Vymazal, J. (1987). Toxicity and accumulation of cadmium with respect to algae and cyanobacteria: A review. *Toxic. Assess.*, **2(4)**, 387–415. DOI:10.1002/tox.2540020403
- Williams, L.E., Pittman, J.K. & Hall, J.L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1465(1-2)**, 104–126.
- Wright, D.A. (University of M., Welbourn, P.M.) (1994). Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev. Doss. Environ. Can.*, **2(2)**, 187-214. DOI: 10.1139/a94-012
- Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Hou, X.-L. & Yao, Q.-H. (2010). Cyanobacteria MT gene SmtA enhance zinc tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Rep.*, **37(2)**, 1105–1110. DOI: 10.1007/s11033-009-9867-x
- Yan, H. & Pan, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, **49(5)**, 471–476. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00285-0
- Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R. & McHenry, M.P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *J. Environ. Manage.*, **181**, 817–831. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.06.059
- Zhang, L.-F., Yang, H.-M., Cui, S.-X., Hu, J., Wang, J., Kuang, T.-Y., Norling, B. & Huang, F. (2009). Proteomic Analysis of Plasma Membranes of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 in Response to High pH Stress. *J. Proteome Res.*, **8(6)**, 2892–2902. DOI: 10.1021/pr900024w
- Zouari, M., Ben Ahmed, C., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., Ben Rouina, B., Labrousse, P. & Ben Abdallah, F. (2016). Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **128**, 100–108. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.015