

## Estudio comparativo de la bioacumulación del plomo y cadmio en cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 bajo condiciones de laboratorio

### Comparative study on bioaccumulation of lead and cadmium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under laboratory conditions

KKIU Arunakumara\*<sup>1,2</sup>, Z Xuecheng<sup>1</sup>, X Song<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, People's Republic of China.

\* E-mail: kkiuaruna@yahoo.com

<sup>2</sup> Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, University of Ruhuna, Kamburupitiya, Sri Lanka.

#### Resumen

Con el objeto de limpiar cuerpos de agua que han sufrido contaminación por metales pesados, se han desarrollado técnicas de biorremoción. En el presente estudio de laboratorio, se evaluó la bioacumulación de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ . Se utilizaron cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803, organismo modelo que ha sido utilizado ampliamente en estudios genéticos, fisiológicos y morfológicos. El crecimiento fue medido mediante el conteo de células, revelando que a bajas concentraciones de  $Pb^{2+}$  ( $0.5$  y  $1 \mu g mL^{-1}$ ) su influencia es positiva en *Synechocystis* sp. PCC 6803 resultando en una ligera estimulación del crecimiento. Sin embargo, la especie no pudo resistir periodos largos expuesta a concentraciones altas de ambos metales ( $2$ ,  $4$ ,  $6$  y  $8 \mu g mL^{-1}$ ). Las inhibiciones más altas registradas después del periodo de incubación de 6 días fueron de  $53.14\%$  y  $70.07\%$  para  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  respectivamente a una concentración de  $8 \mu g mL^{-1}$ . Se observó una rápida remoción de los metales durante los dos primeros días de incubación, seguida por una reducción gradual. Sin embargo, sólo se pudo encontrar una pequeña diferencia en la cantidad acumulada, ya que el porcentaje de  $Pb^{2+}$  removido de la solución fue mayor que el del  $Cd^{2+}$  en todos los tratamientos. Aunque las diferencias entre las cantidades acumuladas de los dos metales son muy reducidas, el porcentaje de  $Pb^{2+}$  removido de la solución fue más alto que el de  $Cd^{2+}$  en el transcurso de incubación. Las cantidades de metal acumulado aumentaron en una relación dependiente de la dosis para ambos metales. Las máximas acumulaciones ( $155.63$  y  $199.83 mg g^{-1}$  de peso seco, respectivamente para  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ ) se registraron después de 6 días. La especie resultó ser un buen acumulador de metales con altos factores de bioconcentración, de  $20\ 657$  y  $24\ 980$  respectivamente para  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ .

*Palabras clave:* *Synechocystis* sp. PCC 6803, crecimiento, cantidades acumuladas, factor de bioconcentración.

#### Abstract

Bioremoval techniques have been employed in cleaning water bodies that suffer from detrimental effects of heavy metal pollution. In the present laboratory study, bioaccumulation of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  was assessed using the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, a model organism widely used in genetic, physiological and morphological studies. Growth was measured as cell counts and showed that  $Pb^{2+}$ , at low exposure concentrations ( $0.5$  and  $1 \mu g mL^{-1}$ ), had a positive influence on *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in slight growth stimulations; however, the species could not withstand long periods of exposure to both metals at higher concentrations ( $2$ ,  $4$ ,  $6$  and  $8 \mu g mL^{-1}$ ). The highest inhibitions ( $53.14\%$  and  $70.07\%$  for  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ , respectively, at  $8 \mu g mL^{-1}$ ) were recorded after six days. Rapid metal removal was observed during the first two days of incubation, followed by a gradual reduction. Though the differences in accumulated amounts seemed to be narrow, the percentage of  $Pb^{2+}$  removed from the solution was always higher than that of  $Cd^{2+}$  in all the treatments. Accumulated amounts increased in a dose-dependent manner for both metals. The maximum accumulations ( $155.63$  and  $199.83 mg g^{-1}$  dry weight for  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ , respectively) were recorded at the end of six days. The species can be considered a good accumulator of metals, with high bioconcentration factor values of  $20\ 657$  and  $24\ 980$  for  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ , respectively.

*Key words:* *Synechocystis* sp. PCC 6803, growth, accumulated amount, bioconcentration factor.

#### Introducción

La contaminación del ambiente acuático con metales pesados es un tema de constante preocupación (Srivastava y Purnima 1998). La biodegradación lenta de metales pesados crea riesgos a todos los organismos (Sresty y Rao 1999), en particular, su bioacumulación en la cadena alimentaria acuática

#### Introduction

Contamination of aquatic environments by heavy metals is a subject of constant concern (Srivastava and Purnima 1998). The biodegradation of heavy metals is hazardous for all organisms (Sresty and Rao 1999), and in particular, bioaccumulation in the aquatic food chain is highly dangerous (Sanita-di-Toppi

es muy peligrosa (Sanita-di-Toppi y Gabbrielli 1999). La bioremediación, definida como la acumulación y concentración de contaminantes presentes en soluciones acuosas mediante materiales biológicos (Sag y Kutsal 1997), es una alternativa potencial a métodos convencionales para eliminar metales pesados (Veglio *et al.* 1995). En este contexto han llamado la atención algunas especies de plantas que son capaces de procesar metales pesados, debido a su eficiencia y eficacia ecológica (Srivastava y Purnima 1998). Plantas y microorganismos acuáticos son capaces de remover metales del agua mediante procesos de bioabsorción y bioacumulación asociadas al metabolismo (Wang *et al.* 1998); tal es el caso de la fanerógama marina *Cymodocea nodosa* en la que Marín-Guirao *et al.* (2005) estudiaron la bioacumulación de metales como parte de una evaluación de la contaminación en la laguna costera del Mar Menor (SE de España).

Debido a su amplia presencia en la naturaleza y su asimilación metabólica con crecimiento continuo, las microalgas son consideradas candidatas ideales para realizar estudios de bioacumulación de metales (Sobhan y Sternberg 1999). Ya se han hecho estudios y se ha documentado sobre varios aspectos de la eliminación de metales por medio de algas (Sudhakar *et al.* 1991, Holan y Volesky 1994, deCarvalho *et al.* 1995).

Se sabe que los cuerpos intracelulares de polifosfatos de las algas vivas son los responsables del secuestro de metales (Zhang y Majidi 1994). Además, componentes de la pared celular de microorganismos tales como polisacáridos, proteínas y lípidos, ofrecen muchos grupos funcionales que pueden ligar iones metálicos (Ari *et al.* 1999). Las cianobacterias, un numeroso y diverso grupo de procariontes fotosintéticos, se han empleado ampliamente en evaluaciones de exposición con metales. La cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 es un organismo modelo que presenta una combinación única de características moleculares, genéticas, fisiológicas y morfológicas, y ha sido utilizada en varios estudios sobre procesos fotosintéticos, reacciones de transferencia de electrones involucradas en la fotosíntesis y el desarrollo de los cloroplastos (Kashino *et al.* 2002, Roose y Pakrasi 2004). Se demostró que las cepas de *Synechocystis* sp. desarrollan un cáliz grueso cuando crecen expuestas a estrés con cobre (Gardea-Torresdey *et al.* 1996). El presente estudio estuvo enfocado en la bioacumulación de plomo y cadmio en las cianobacterias unicelulares *Synechocystis* sp. PCC 6803 en condiciones de laboratorio.

## Materiales y Métodos

### Cepa experimental

Se tomó *Synechocystis* sp. PCC 6803 del stock de algas cultivadas y preservadas en el laboratorio del Colegio de Ciencias de la Vida Marina, de la Universidad del Océano, de China. La cepa experimental fue cultivada en medio BG11 (Rippka *et al.* 1979) ajustado a pH 7.0 y a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , agitada suavemente e iluminada con luz blanca fluorescente a una

and Gabbrielli 1999). Bioremediation, defined as the accumulation and concentration of pollutants from aqueous solutions by the use of biological material (Sag and Kutsal 1997), is a potential alternative to conventional methods of heavy metal removal (Veglio *et al.* 1995). In this context, plant species that can process heavy metals have drawn considerable attention due to their efficient and ecologically sound approach (Srivastava and Purnima 1998). Aquatic plants and microorganisms are able to remove metals from water through the processes of biosorption and metabolism-dependent bioaccumulation (Wang *et al.* 1998). Such is the case of the seagrass *Cymodocea nodosa* in which Marín-Guirao *et al.* (2005) analyzed metal bioaccumulation as part of a pollution assessment in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain).

Due to their ubiquitous occurrence in nature and metabolic uptake with continuous growth, microalgae are considered ideal candidates for metal bioaccumulation studies (Sobhan and Sternberg 1999). Several aspects of metal removal by algae have been researched and well documented (Sudhakar *et al.* 1991, Holan and Volesky 1994, deCarvalho *et al.* 1995).

The intracellular polyphosphate bodies of living algae are known to be responsible for metal sequestration (Zhang and Majidi 1994). Moreover, the cell wall components of microorganisms, such as polysaccharides, proteins and lipids, could offer many functional groups that can bind metal ions (Ari *et al.* 1999). Cyanobacteria, a numerous and diverse group of photosynthetic prokaryotes, have been employed extensively in metal exposure assessments. The unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a model organism that displays a unique combination of highly desirable molecular, genetic, physiological and morphological characteristics. This species has thus been used in several studies regarding photosynthetic processes, assembly pathways, electron transfer reactions involved in photosynthesis and chloroplast evolution (Kashino *et al.* 2002, Roose and Pakrasi 2004). Strains of *Synechocystis* sp. have shown to develop a thickened calyx when exposed to copper-stressed growth conditions (Gardea-Torresdey *et al.* 1996). The present study focused on the bioaccumulation of lead and cadmium by the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under laboratory conditions.

## Material and methods

### Experimental strain

The strain *Synechocystis* sp. PCC 6803 was taken from the axenic stock cultures preserved in our laboratory at the College of Marine Life Sciences, Ocean University of China. The cultures were grown in BG11 medium (Rippka *et al.* 1979) adjusted to pH 7.0 at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . They were gently stirred and illuminated with white light produced by neon tubes at an intensity of  $50 \text{ mmol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  under a 14:10-h light/dark cycle. At the late exponential growth phase, cultures were centrifuged at  $4000 \text{ g}$  for 10 min and the pellets were

intensidad de 50 fotón  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un ciclo luz:oscuridad 14:10 h. En la fase de crecimiento exponencial tardío, los cultivos fueron centrifugados en 4000 g durante 10 min y las células fueron resuspendidas en medio BG11 fresco antes de ser usados en los respectivos tratamientos con metales.

#### *Aparatos, productos químicos y métodos analíticos*

Se utilizaron productos químicos de grado analítico sin purificación adicional. En todos los experimentos el agua fue ionizada mediante el sistema Millipore Milli-Q. La concentración de las soluciones de plomo y cadmio fue de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{CdCl}_2$ , respectivamente, a partir de solución madre. Para determinar la concentración de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  en el medio se utilizó espectrofotometría de absorción atómica (PGeneral, TAS-986), mientras que la densidad óptica fue medida usando un espectrofotómetro UV-2102. Todas las mediciones de peso se realizaron en una báscula digital (Sartorius, BS 210S) y el pH del medio fue medido con un aparato pH/ISE modelo 868.

#### *Análisis de bioacumulación*

Los análisis de bioacumulación se llevaron a cabo por separado para los dos metales utilizando frascos simples de 150 mL de capacidad con 100 mL de suspensión algal ( $\text{OD}_{750}$  inicial = 0.1). Las suspensión algal fue tratada inicialmente con varias concentraciones de metal (0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y homogeneizada continuamente en una coctelera rotatoria de 100 rpm. La incubación fue realizada durante 6 días en las condiciones anteriormente mencionadas. Cada dos días se tomaron alícuotas de 5 mL de cada suspensión, las cuales fueron centrifugadas a 15,000 rpm por 10 min separando el sobrenadante para determinar las concentraciones metálicas en el medio. Se calculó la cantidad acumulada ( $q$ ) de metal ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) usando el método diferencial de concentración simple (Volesky y Holan 1995):

$$q = (C_0 - C_t)V/W$$

donde  $C_0$  es la concentración inicial del metal en el medio ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_t$  es la concentración del metal al tiempo  $t$  de incubación ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $V$  es el volumen total (L) y  $W$  es el peso seco del alga (g).

Para calcular el factor de bioconcentración (BCF) se utilizó la proporción entre la cantidad acumulada, que incluía el metal contenido en el precipitado adherido a la pared celular y el acumulado en las células, y la concentración de metal en la solución. [El grado al que un contaminante se concentrará en un organismo es expresado como BCF; así, un BCF de 100 significa que el organismo concentra la sustancia química 100 veces más que los medios circundantes.] Se monitoreó el crecimiento de las algas registrando la densidad óptica a 750 nm y mediante el conteo directo de las células (XB-K-25, Shanghai, 0.1 mm de hondo) al microscopio (Olimpo, Transmisión, LM).

resuspendido en fresco BG11 medium in order to be used in the metal treatments.

#### *Apparatus, chemical products and analytical methods*

The chemicals were of analytical grade and used without further purification. Deionized water from a Millipore Milli-Q system was used throughout the experiment. Lead and cadmium stock solutions of 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared using  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{CdCl}_2$ , respectively, and all working solutions were prepared by properly diluting the stock solutions. An atomic absorption spectrophotometer (PGeneral, TAS-986) was used to determine  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations in the medium, and optical density was measured using a spectrophotometer (UV-2102). All measurements of weight were performed using a digital balance (Sartorius, BS 210S), and pH of the medium was measured with a pH/ISE meter (model 868).

#### *Bioaccumulation*

Bioaccumulation studies were carried out separately for two metals using 150-mL elementary flasks that contained 100 mL of algal suspensions (initial  $\text{OD}_{750} = 0.1$ ). The algal suspensions were treated with several initial metal concentrations (0, 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and homogenized continuously in a rotary shaker at 100 rpm. The incubation was carried out for six days under the conditions described above. From each suspension, 5-mL aliquots were withdrawn once every two days, centrifuged at 15,000 rpm for 10 min and the supernatant was separated for determinations of total dissolved metal concentration in the medium. The accumulated amount ( $q$ ) of metal ( $\text{mg g}^{-1}$  dry weight) was calculated using the simple concentration difference method (Volesky and Holan 1995):

$$q = (C_0 - C_t)V/W$$

where  $C_0$  is the initial metal concentration in the medium ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_t$  is the metal concentration at time  $t$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $V$  is the total volume of suspension (L) and  $W$  is the dry weight of the alga (g).

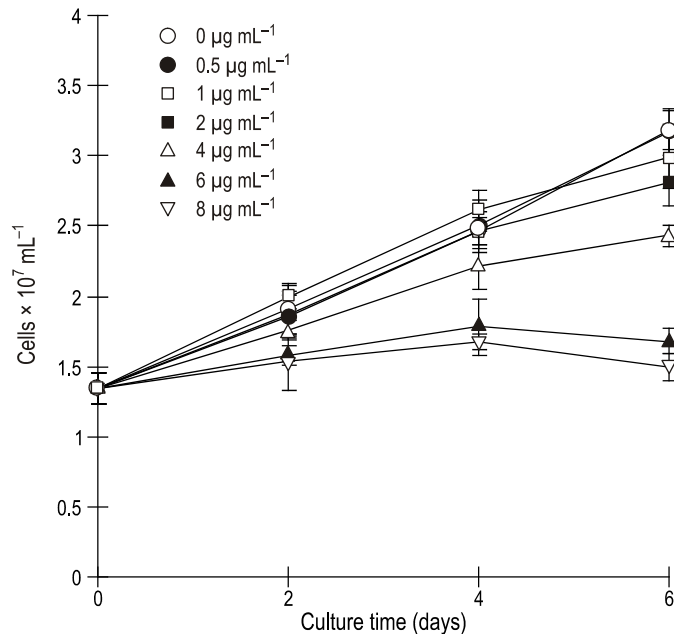
The ratio between the accumulated amount, which included metal bound in cell-wall adhering precipitate plus that accumulated in the cells, and the metal concentration in the solution was used to calculate the bioconcentration factor (BCF). [The degree to which a contaminant will concentrate in an organism is expressed as BCF; thus, a BCF of 100 means that the organism concentrates the chemical to a concentration 100 times greater than in the surrounding media.] Algal growth was monitored by recording optical density at 750 nm and direct cell counts (XB-K-25, Shanghai, 0.1 mm deep) under a light microscope (Olympus, Transmission, LM). The linear relationship, dry weight ( $\text{g L}^{-1}$ ) =  $0.3574 \times \text{OD}_{750}$  nm ( $r = 0.9923$ ), derived in this study was used to estimate the algal dry weight at relevant OD values. To measure the algal dry weight, cells

Se utilizó la relación lineal encontrada en el presente estudio [peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) =  $0.3574 \times \text{OD}_{750 \text{ nm}}$  ( $r = 0.9923$ )] para estimar el peso seco de algas en valores de OD relevantes. A fin de medir el peso seco de algas, las células fueron filtradas a través de una membrana de  $0.22 \mu\text{m}$ , y luego secadas a  $103^\circ\text{C}$  por 2 h. Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones asépticas y los resultados fueron obtenidos por triplicado en cada una de las muestras de cultivo.

## Resultados

### Crecimiento

El resultado del crecimiento en las células expuestas a  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  es ilustrado en las figuras 1 y 2 respectivamente. Las concentraciones bajas de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $0.5$  y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) podrían influir positivamente en *Synechocystis* sp. PCC 6803, resultando leves estímulos en su crecimiento (2.69% y 6.99% después de dos días); sin embargo, la especie no pudo resistir por tiempos prolongados concentraciones  $>2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$ . Por otra parte, el  $\text{Cd}^{2+}$  pareció afectar adversamente el crecimiento aun a concentraciones muy bajas (13.95% de inhibición a  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Además, las inhibiciones causadas por el  $\text{Cd}^{2+}$  resultaron considerablemente mayores que las causadas por el  $\text{Pb}^{2+}$  en todas las concentraciones. Las mayores inhibiciones (53.14% y 70.07% respectivamente para  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  a  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se observaron luego de 6 días.



**Figura 1.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en el crecimiento (por conteo de células) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivada en medio BG11 (pH 7.0) bajo iluminación de  $50 \text{ mmol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

**Figure 1.** Effect of different concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) on the growth (by cell counts) of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultured in BG11 medium (pH 7.0) under illumination of  $50 \text{ mmol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

were filtered through a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  membrane and dried at  $103^\circ\text{C}$  for 2 h. All procedures were performed in triplicate under aseptic conditions.

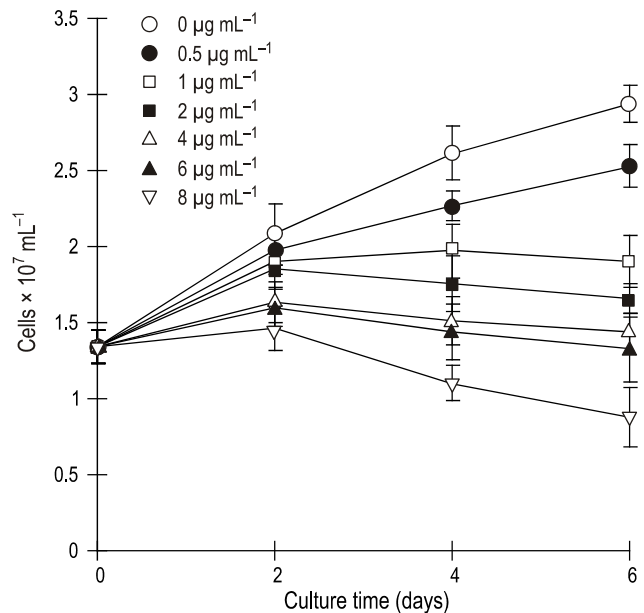
## Results

### Growth

Growth measured as cell counts is illustrated in figures 1 and 2 for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  exposure, respectively. Low concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  ( $0.5$  and  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) had a positive influence on *Synechocystis* sp. PCC 6803, producing slight growth stimulations (2.69% and 6.99% after two days); however, at concentrations higher than  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  the species could no longer withstand exposure to  $\text{Pb}^{2+}$ . On the other hand,  $\text{Cd}^{2+}$  had an adverse effect on growth even at very low concentrations (13.95% inhibition at  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Furthermore, inhibitions caused by  $\text{Cd}^{2+}$  were considerably higher than those of  $\text{Pb}^{2+}$  at all concentrations. The highest inhibitions (53.14% and 70.07% for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , respectively, at  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were observed after six days.

### Metal removal

Removal of metals from the solution was high during the first two days of incubation, followed by a gradual reduction (table 1). Percentage removal of  $\text{Pb}^{2+}$  was higher than that of



**Figura 2.** Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en el crecimiento (por conteo de células) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivada en medio BG11 (pH 7.0) bajo iluminación de  $50 \text{ mmol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

**Figure 2.** Effect of different concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) on the growth (by cell counts) of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultured in BG11 medium (pH 7.0) under illumination of  $50 \text{ mmol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

**Tabla 1.** Cambios en la concentración de metal en el medio. Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .**Table 1.** Changes in metal concentration in the medium. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Metal	Treatment ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Residual metal concentration in the medium ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
		Period of incubation (days)		
		2	4	6
$\text{Pb}^{2+}$	0.5	$0.022 \pm 0.009$	$0.034 \pm 0.002$	$0.041 \pm 0.004$
	1.0	$0.133 \pm 0.008$	$0.133 \pm 0.005$	$0.120 \pm 0.006$
	2.0	$0.424 \pm 0.008$	$0.502 \pm 0.058$	$0.379 \pm 0.023$
	4.0	$0.763 \pm 0.009$	$0.758 \pm 0.015$	$0.728 \pm 0.017$
	6.0	$1.722 \pm 0.050$	$1.718 \pm 0.036$	$1.468 \pm 0.033$
	8.0	$2.860 \pm 0.018$	$2.842 \pm 0.047$	$2.034 \pm 0.061$
$\text{Cd}^{2+}$	0.5	$0.031 \pm 0.010$	$0.033 \pm 0.030$	$0.033 \pm 0.003$
	1.0	$0.138 \pm 0.120$	$0.242 \pm 0.013$	$0.248 \pm 0.060$
	2.0	$0.425 \pm 0.032$	$0.525 \pm 0.050$	$0.522 \pm 0.050$
	4.0	$1.781 \pm 0.157$	$1.748 \pm 0.153$	$1.658 \pm 0.119$
	6.0	$3.190 \pm 0.048$	$2.919 \pm 0.153$	$2.704 \pm 0.036$
	8.0	$4.271 \pm 0.020$	$4.000 \pm 0.021$	$3.541 \pm 0.146$

### Remoción de metal

La remoción de metal de la solución fue mayor durante los dos primeros días de la incubación, seguido de una reducción gradual (tabla 1). El porcentaje de  $\text{Pb}^{2+}$  removido resultó mayor que el de  $\text{Cd}^{2+}$  para todas las concentraciones a lo largo del periodo; sin embargo existen pocas diferencias entre las cantidades acumuladas de los dos metales. Las cantidades acumuladas de ambos metales aumentaron tanto con la concentración de metal en el medio como con el tiempo de exposición. Sin embargo, es posible ver algunas excepciones cuando los organismos fueron expuestos a menores concentraciones (por ejemplo, a 0.5 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  y a 0.5, 1, 2, 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\text{Pd}^{2+}$ ), donde las cantidades acumuladas disminuyeron conforme avanzó la incubación. Las acumulaciones máximas fueron 155.63 y 199.83  $\text{mg g}^{-1}$  peso seco para  $\text{Pd}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , respectivamente, a los 6 días (tabla 2).

### Factor de bioconcentración

Las figuras 3 y 4 (para  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , respectivamente) ilustran los cambios de BCF durante el periodo de 6 días. En bajas concentraciones (0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), el BCF de  $\text{Pb}^{2+}$  alcanzó un máximo en 2 días, seguido por una reducción gradual. A concentraciones bajas de  $\text{Cd}^{2+}$  (0.5 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) también se vió una tendencia semejante, mientras que a concentraciones altas el BCF continuó aumentado con el tiempo. Además, el BCF más alto después de 2 días se registró a la menor concentración (0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para ambos metales.

### Discusión

Como lo refleja el metabolismo de la célula, el crecimiento resultó ser un indicador clave de la toxicidad metálica en

$\text{Cd}^{2+}$  at all concentrations, though the differences in the accumulated amounts of both metals seemed to be narrow. Accumulated amounts of both metals increased with increased metal concentration in the medium and exposure time; however, some exceptions were observed at lower concentrations (e.g., 0.5 and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{2+}$ , and 0.5, 1, 2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $\text{Pd}^{2+}$ ), the accumulated amounts decreasing as the incubation progressed. The maximum accumulations were 155.63 and 199.83  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight for  $\text{Pd}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , respectively, after six days (table 2).

### Bioconcentration factor

Figures 3 and 4 show the changes in BCF for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , respectively, during the six-day period. At low concentrations (0.5, 1, 2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), the BCF of  $\text{Pb}^{2+}$  showed a peak at day 2, followed by a gradual decrease. A similar trend was observed at low concentrations (0.5 and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of  $\text{Cd}^{2+}$ , but at higher concentrations, the BCF continued to increase with time. Moreover, the highest BCF after two days exposure was recorded for the lowest concentration (0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of both metals.

### Discussion

As it reflects the metabolism of the cell, growth proved to be a key indicator of metal toxicity to microorganisms. Cell density has often been used as a growth parameter in assessing algal responses to metal toxicity (Carr *et al.* 1998). Heng *et al.* (2004) studied the effect of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on *Anabaena flosaquae* and concluded that  $\text{Cd}^{2+}$  is more toxic to cyanobacteria than  $\text{Pb}^{2+}$ . Our findings confirmed this view, since 14% growth inhibition was recorded at 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{2+}$ ,

**Tabla 2.** Cambios en la acumulación de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivadas en medio BG11 (pH 7.0) bajo iluminación de  $50 \text{ mmol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Media  $\pm$  DE,  $n = 3$ .

**Table 2.** Changes in the accumulation of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  in cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultured in BG11 medium (pH 7.0) under illumination of  $50 \text{ mmol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

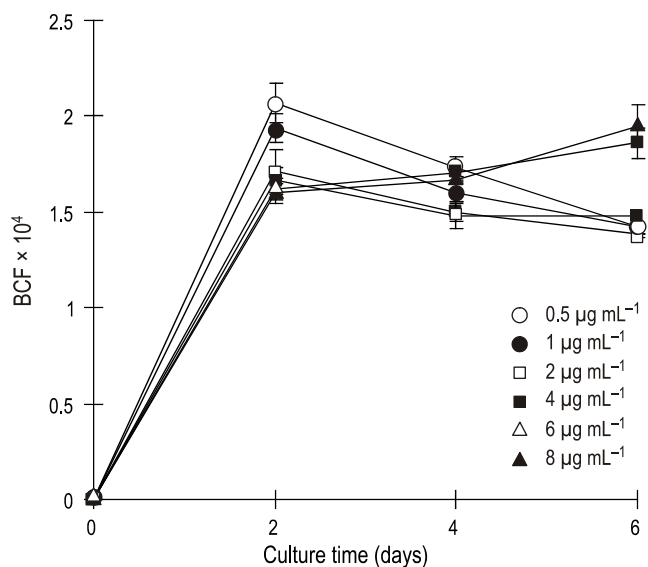
Metal	Treatment ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Accumulated amount* ( $\text{mg g}^{-1}$ dry weight)		
		Period of incubation (days)		
		2	4	6
$Pb^{2+}$	0.5	$10.35 \pm 0.49$	$8.54 \pm 0.36$	$6.85 \pm 0.14$
	1.0	$19.42 \pm 0.74$	$15.38 \pm 0.51$	$13.12 \pm 0.25$
	2.0	$34.19 \pm 2.08$	$28.06 \pm 0.81$	$24.21 \pm 0.66$
	4.0	$68.96 \pm 2.76$	$55.79 \pm 2.96$	$59.49 \pm 0.31$
	6.0	$107.33 \pm 5.10$	$98.23 \pm 0.66$	$111.39 \pm 4.63$
	8.0	$137.18 \pm 4.38$	$129.81 \pm 3.65$	$155.63 \pm 8.97$
$Cd^{2+}$	0.5	$9.76 \pm 0.19$	$8.60 \pm 0.28$	$7.70 \pm 0.31$
	1.0	$18.07 \pm 0.12$	$16.85 \pm 0.09$	$16.45 \pm 0.97$
	2.0	$32.81 \pm 0.07$	$34.54 \pm 0.76$	$37.52 \pm 0.75$
	4.0	$53.23 \pm 3.16$	$60.30 \pm 3.30$	$63.86 \pm 1.82$
	6.0	$70.24 \pm 1.18$	$83.30 \pm 1.01$	$89.09 \pm 1.84$
	8.0	$93.17 \pm 0.50$	$144.64 \pm 3.14$	$199.83 \pm 11.36$

\* Accumulated amount refers to the metal bound in cell-wall adhering precipitate plus that accumulated in the cells.

microorganismos. La densidad de células a menudo es usada como un parámetro de crecimiento en la evaluación de la respuesta de las algas a la toxicidad metálica (Carr *et al.* 1998). Heng *et al.* (2004) estudiaron el efecto del  $Cd^{2+}$  y el  $Pb^{2+}$  en *Anabaena flosaquae* y concluyeron que el  $Cd^{2+}$  es más tóxico para las cianobacterias que el  $Pb^{2+}$ . Nuestras conclusiones confirmaron su punto de vista, dado que el 14% de inhibición del crecimiento se registró a  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $Cd^{2+}$  mientras que a la misma concentración de  $Pb^{2+}$  no se registró ninguna inhibición considerable. La alta toxicidad de  $Cd^{2+}$  en muy bajas concentraciones fue confirmada por Lasheen (1990), quien reportó una inhibición del crecimiento de algas hasta  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Entre las especies de algas sumamente sensibles al  $Cd^{2+}$  están *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Skeletonema costatum*, *Asterionella formosa* y *Selenastrum capricornutum*, las cuales han mostrado inhibiciones del crecimiento a  $0.06$ ,  $0.11$ ,  $0.05$ ,  $0.01$  y  $0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $Cd^{2+}$ , respectivamente (Bartlett *et al.* 1974, Bertand *et al.* 1977, Rosko y Rachlin 1977, Conway 1978, Rachlin *et al.* 1982). Observamos un leve estímulo al crecimiento con concentraciones bajas de  $Pb^{2+}$ , lo que coincide con El-Enany e Issa (2000), quienes observaron también un estímulo en el crecimiento de *Nostoc linckia* y *Nostoc rivularis* a  $0.4$  y  $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , de  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  respectivamente. Fathi *et al.* (2000) y Fathi (2002) observaron una reducción dependiente de la concentración, en el número de células de *Scenedesmus bijuga* y *Anabaena spiroides*. Fargasova (1999) estudió los efectos del  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  en el alga verde de *Scenedesmus quadricauda* y

whereas no considerable inhibition was recorded at the same concentration of  $Pb^{2+}$ . The high toxicity of  $Cd^{2+}$  at very low concentrations was further confirmed by Lasheen (1990), who reported algal growth inhibition even at  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Other algal species that are highly sensitive to  $Cd^{2+}$  include *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila*, *Skeletonema costatum*, *Asterionella formosa* and *Selenastrum capricornutum*, which showed growth inhibitions at  $0.06$ ,  $0.11$ ,  $0.05$ ,  $0.01$  and  $0.08 \mu\text{g mL}^{-1}$  of  $Cd^{2+}$ , respectively (Bartlett *et al.* 1974, Bertand *et al.* 1977, Rosko and Rachlin 1977, Conway 1978, Rachlin *et al.* 1982). We observed slight growth stimulations at low concentrations of  $Pb^{2+}$ , which is in agreement with El-Enany and Issa (2000), who also observed growth stimulations in *Nostoc linckia* and *Nostoc rivularis* at  $0.4$  and  $1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  of  $Cd^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , respectively. Fathi *et al.* (2000) and Fathi (2002) reported a concentration-dependent reduction in cell counts of *Anabaena spiroides* and *Scenedesmus bijuga*. Fargasova (1999) studied the effects of  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Fe^{2+}$  on the green alga *Scenedesmus quadricauda* and concluded that toxicity for all the metals tested increased with increased metal concentration. All these reports confirm the dose-dependent growth inhibition observed in the present study.

Heavy metals that penetrate into the algal cell eventually compete for the protein-binding sites, active enzymes and several biological reactive groups, interrupting the routine metabolic processes (Visviki and Rashin 1991). In the case of  $Pb^{2+}$ , membrane damage (in particular thylakoids) causing poor carbon assimilation seemed to be a major contributor to growth



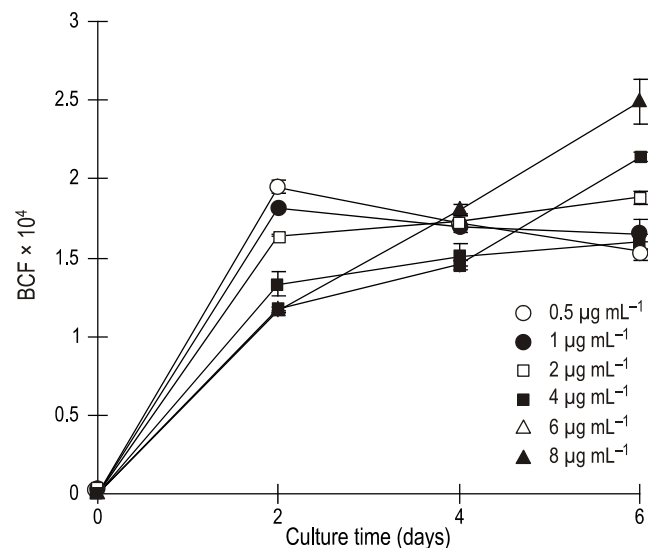
**Figura 3.** Cambios del factor de bioconcentración (BCF) de Pb<sup>2+</sup> para *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivada en medio BG11 (pH 7.0) bajo iluminación de 50 mmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a 25 ± 1°C. El BCF se refiere a la proporción entre la cantidad acumulada de Pb<sup>2+</sup> y la concentración de Pb<sup>2+</sup> en la solución. Media ± DE, n = 3.

**Figure 3.** Changes in the bioconcentration factor (BCF) of Pb<sup>2+</sup> for *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultured in BG11 medium (pH 7.0) under illumination of 50 mmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 25 ± 1°C. The BCF refers to the ratio between the amount of Pb<sup>2+</sup> accumulated and the concentration of Pb<sup>2+</sup> in the solution. Mean ± SD, n = 3.

concluyó que la toxicidad aumentó con el aumento en la concentración de todos estos metales. Todos estos reportes confirman que la inhibición de crecimiento es dependiente de la dosis, tal y como se observó en el presente estudio.

Los metales pesados que penetran en las células de las algas eventualmente compiten por los sitios que ligan a las proteínas, las enzimas activas y varios grupos biorreactivos, interrumpiendo procesos metabólicos de rutina (Visviki y Rashin 1991). En el caso de Pb<sup>2+</sup>, el daño a la membrana (en particular, thylakoids) que causa una pobre asimilación del carbono pareció ser la principal causa de la inhibición del crecimiento. Sin embargo, según un reporte realizado por Vymazal (1995), las interacciones del Pb<sup>2+</sup> con polifosfatos también podrían influir negativamente en el crecimiento debido a la precipitación del fosfato. Por otra parte, la inhibición del crecimiento causada por el Cd<sup>2+</sup> puede llevar a la interrupción de procesos metabólicos dado que el Cd<sup>2+</sup> podría interactuar con los tiocomponentes de las cianobacterias (Mushrifah y Peterson 1990) y el metabolismo N<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Mallick y Rai 1994).

La remoción de metales en solución por las algas puede ser descrito básicamente como un fenómeno de dos fases, a saber: intercambio independiente de la energía del ión metálico por los iones presentes en la pared celular y asimilación activa dependiente de la energía. En el caso de las cianobacterias, se sabe que la acumulación de metales en la superficie de la célula



**Figura 4.** Cambios del factor de bioconcentración (BCF) de Cd<sup>2+</sup> para *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivada en medio BG11 (pH 7.0) bajo iluminación de 50 mmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> a 25 ± 1°C. El BCF se refiere a la proporción entre la cantidad acumulada de Cd<sup>2+</sup> y la concentración de Cd<sup>2+</sup> en la solución. Media ± DE, n = 3.

**Figure 4.** Changes in the bioconcentration factor (BCF) of Cd<sup>2+</sup> for *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultured in BG11 medium (pH 7.0) under illumination of 50 mmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 25 ± 1°C. The BCF refers to the ratio between the amount of Cd<sup>2+</sup> accumulated and the concentration of Cd<sup>2+</sup> in the solution. Mean ± SD, n = 3.

inhibition. However, as reported by Vymazal (1995), the interactions of Pb<sup>2+</sup> with polyphosphates may also negatively influence growth as a result of phosphate precipitation. On the other hand, growth inhibition caused by Cd<sup>2+</sup> may link to interrupted metabolic processes, since Cd<sup>2+</sup> could interact with the thio components of cyanobacteria (Mushrifah and Peterson 1990) and N<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> metabolism (Mallick and Rai 1994).

Algal removal of metals from a solution can basically be described as a biphasic phenomenon, namely energy-independent metal ion exchange with the ions present in the cell wall and energy-dependent active uptake. In the case of cyanobacteria, metal binding onto the cell surface or cell wall is known to be the major mechanism (Mahan *et al.* 1989). This was further confirmed by Chojnacka and Mowoyta (2001), who studied the mechanism of heavy metal removal by *Spirulina* spp. The rapid metal removal we observed during the first two days of incubation could be the first adsorption stage as reported by Sloof *et al.* (1995) for cadmium uptake by living *Selenastrum capricornutum*. The continued slow removal after the second day may be the physiological metabolic stage. In fact, living microorganisms have the ability to regenerate themselves and thus could continue to be effective in removing metals as incubation progressed. The accumulated amount of metals increases with the exposure time and metal concentration in the medium (Lamaia *et al.* 2005). This dose-dependent accumulation pattern was also observed in *Chlorella*

o pared celular es el mecanismo principal (Mahan *et al.* 1989). Esto fue reconfirmado por Chojnacka y Mowoyta (2001), quienes estudiaron el mecanismo de eliminación de metales pesados por *Spirulina* spp. La eliminación rápida del metal que observamos durante los primeros dos días de incubación podría ser la primera etapa de adsorción reportada por Sloof *et al.* (1995) para la asimilación del cadmio por *Selenastrum capricornutum*. La posterior remoción lenta, del segundo día en adelante, podría ser la etapa metabólica fisiológica. De hecho, los microorganismos vivos tienen la capacidad de regenerarse a sí mismos y así continuar eliminando metales efectivamente conforme avanza la incubación. La cantidad acumulada de metales aumenta con el tiempo de exposición y la concentración de metal en el medio (Lamaia *et al.* 2005). Esta pauta dependiente de la dosis en la acumulación se observó también en *Chlorella* para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Costa y Leite 1990) y *Stichococcus bacillaris* para  $\text{Pb}^{2+}$  (Pawlik 2000). Los cambios en las cantidades acumuladas en el presente estudio están de acuerdo con los reportes anteriormente mencionados; sin embargo, cuando las cianobacterias fueron expuestas a concentraciones muy bajas los resultados fueron un poco diferentes.

En general, las cantidades acumuladas de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  resultaron elevadas. Lamaia *et al.* (2005) reportaron que *C. fracta* acumuló  $61,400 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  al exponerse a  $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que al exponerse a  $8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  la acumulación fue de  $4,090 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ . *Anabaena flos-aquae* acumuló  $70 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $26 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  al exponerse respectivamente a 1 y  $0.15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (Heng *et al.* 2004). La mayor cantidad acumulada de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  en el estudio presente fue de 156 y  $200 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente, después de la exposición a  $8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Diversos informes de la capacidad de acumulación indican claramente que esta depende de la respuesta específica a la exposición a metales pesados; además de que la acumulación metálica por las algas está influenciada por varios factores abióticos (e.g., pH, agentes quelantes, potencial redox, temperatura, luz) y bióticos (e.g., actividad celular, concentraciones de biomasa de algas, productos extracelulares) (Fathi y Omair 2006).

El BCF ha sido ampliamente utilizado para comparar especies en cuanto a su capacidad de acumulación de metales (Raskin *et al.* 1994). Los valores de BCF registrados al segundo día del presente estudio concuerdan con Lamaia *et al.* (2005) quienes publicaron valores considerablemente más altos de BCF para  $\text{Pb}^{2+}$  que para  $\text{Cd}^{2+}$  para todas las concentraciones probadas con *C. fracta*; sin embargo, al avanzar la incubación progresó, el  $\text{Cd}^{2+}$  pareció generar valores de BCF más altos que el  $\text{Pb}^{2+}$ . La disminución gradual encontrada en los valores de BCF cuando el  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  aumentan es también similar a lo reportado por Lamaia *et al.* (2005). Nuestras conclusiones también confirman lo reportado por Rai y Chandra (1992) quienes afirmaron que la concentración de metales en el ambiente es el principal factor que influye en la eficacia en la asimilación de metales y, en consecuencia, en el incremento en los valores de BCF. Desde el punto de vista de la

for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  uptake (Costa and Leite 1990) and in *Stichococcus bacillaris* for  $\text{Pb}^{2+}$  (Pawlik 2000). The changes in the accumulated amounts of the present study concur with the above reports; however, when exposed to very low concentrations, the results were slightly different.

In general, the accumulated amounts of  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  were high. Lamaia *et al.* (2005) reported that *Cladophora fracta* could accumulate  $61,400 \text{ mg g}^{-1}$  of  $\text{Pb}^{2+}$  when exposed to  $80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , and  $4,090 \text{ mg g}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{2+}$  when exposed to  $8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . *Anabaena flos-aquae* was able to accumulate  $70 \text{ mg g}^{-1}$  of  $\text{Pb}^{2+}$  and  $26 \text{ mg g}^{-1}$  of  $\text{Cd}^{2+}$  at the respective exposures of 1 and  $0.15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (Heng *et al.* 2004). The maximum accumulated amounts of  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  in the present study were 156 and  $200 \text{ mg g}^{-1}$ , respectively, when exposed to  $8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . The diverse reports on accumulation ability are clear indications of the species-dependent manner of responses to heavy metal exposure. Moreover, metal accumulation by algae is influenced by a number of abiotic (e.g., pH, chelating agents, redox potential, temperature, light) and biotic (e.g., cellular activity, algal biomass concentrations, extra cellular products) factors (Fathi and Omair 2006).

The BCF has been widely used to compare the metal accumulation capacity of species (Raskin *et al.* 1994). Lamaia *et al.* (2005) reported that the BCF values of  $\text{Pb}^{2+}$  were significantly higher than those of  $\text{Cd}^{2+}$ . In this study, a similar trend was observed on day 2, but as incubation progressed, the BCF values for  $\text{Cd}^{2+}$  were higher than those for  $\text{Pb}^{2+}$ . The decreased BCF values with increased metal concentrations are also similar to the findings of Lamaia *et al.* (2005). Our results also confirmed the views of Rai and Chandra (1992), who stated that ambient metal concentration is the major factor influencing metal uptake efficiency and concomitantly the BCF values. To be an ideal candidate for phytoremediation, a good accumulator should possess a BCF of more than 1000 (Zayed *et al.* 1998). Based on this criterion, *Synechocystis* sp. PCC 6803 proved to be a good accumulator, with high BCF values of 20,657 and 24,980 for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ , respectively. In conclusion, *Synechocystis* sp. PCC 6803 seemed to be more sensitive to  $\text{Cd}^{2+}$  than to  $\text{Pb}^{2+}$ ; however, no marked differences were found between the two metals in terms of accumulated amounts. Though the species showed its potential to be used in cleaning contaminated waters, practical viability must be confirmed by studies performed under field conditions.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support for this study from the Chinese Scholarship Council. We also thank G Gomez for the language editing and all the colleagues in our laboratory who helped in one way or another.

---

Gardea-Torresdey JL, Cano-Aguilera A, Webb R, Tiemann K, Gutierrez-Corona F. 1996. Copper adsorption by inactivated cells of *Mucor roxii*: Effect of esterification of carboxyl groups. J. Hazard. Mat. 48: 171–180.



fitoremediación, un buen bioacumulador debería poseer un BCF de más de 1000 (Zayed *et al.* 1998) y sobre la base de este criterio, *Synechocystis* sp. PCC 6803 mostró ser un buen bioacumulador de metales, con altos valores de BCF: 20,657 y 24,980 para  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , respectivamente. Para concluir, a pesar de que el  $Cd^{2+}$  fue encontrado más tóxico para *Synechocystis* sp. PCC 6803 que el  $Pb^{2+}$ , sólo se encontraron leves diferencias entre las cantidades acumuladas de los dos metales. Aunque la especie resultó tener buen potencial para ser usada en la limpieza de aguas contaminadas, la viabilidad práctica de este procedimiento debe ser confirmada mediante estudios realizados en condiciones de campo.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del Consejo Chino de Becas a este estudio, así como a G Gómez su ayuda en la edición del lenguaje y a todos los colegas de nuestro laboratorio por su ayuda.

### Referencias

- Ari AB, Mel M, Hasan MA, Karim MIA. 1999. The kinetics and mechanism of lead (II) biosorption by powdered *Rhizopus oligosporus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 291–298.
- Bartlett L, Rabe FW, Funk WH. 1974. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 8: 179–185.
- Bertand BR, Bonin DJ, Guerin-Ancey LJ, Kaplov VI, Arlhac DP. 1977. Action de metaux lourds a des doses subletales sur les caracteristiques de la croissance chez la diatomee *Skeletonema costatum*. *Mar. Biol. (Bert.)* 42: 17–30.
- Carr HP, Carino FA, Yang MS, Wong MH. 1998. Characterization of cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 433–440.
- Chojnacka K, Mowoyta A. 2001. Mechanism of heavy metal ion biosorption by a blue-green alga *Spirulina* species. *Inzynieria Chemiczne Procesowa Poland* 22: 331–336.
- Conway HL. 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 286–294.
- Costa ACA, Leite SGF. 1990. Cadmium and zinc biosorption by *Chlorella homosphaera*. *Biotechnol. Lett.* 12: 941–944.
- deCarvalho RP, Chong KH, Volesky B. 1995. Evaluation of the Cd, Cu and Zn biosorption in two-metal systems using algal biosorbent. *Biotechnol. Prog.* 11: 39–44.
- El-Enany AE, Issa AA. 2000. Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water. *Environ. Toxicol. Phar.* 8: 95–101.
- Fargasova A. 1999. The green alga *Scenedesmus quadricauda*: A subject for the study of inhibitory effects of Cd, Cu, Zn, Pb and Fe. *Biologia* 54: 393–398.
- Fathi AA. 2002. Toxicological response of the green alga *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead. *Folia Microbiol.* 47: 667–671.
- Fathi AA, Al-Omair MA. 2006. Effects of pH on toxicity of cadmium, cobalt and copper to *Scenedesmus bijuga*. *Protistology* 4(3): 221–226.
- Fathi AA, Zaki FT, Fathy AA. 2000. Bioaccumulation of some heavy metals and their influence on the metabolism of *Scenedesmus bijuga* and *Anabaena spiroides*. *Egypt. J. Biotechnol.* 7: 293–307.
- Heng LY, Jusoh K, Ling CHM, Idris M. 2004. Toxicity of single and combinations of lead and cadmium to the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 373–379.
- Holan ZR, Volesky B. 1994. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1001–1009.
- Kashino Y, Lauber WM, Carroll JA, Wang Q, Whitmarsh J, Satoh K, Pakrasi HB. 2002. Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* 41: 8004–8012.
- Lamaia C, Kruatrachuea M, Pokethitiyooka P, Upathamb ES, Soonthornsarathool V. 2005. Toxicity and accumulation of lead and cadmium in the filamentous green alga *Cladophora fracta*: A laboratory study. *ScienceAsia* 31: 121–127.
- Lasheen MR. 1990. Effect of cadmium, copper and chromium (VI) on the growth of Nile algae. *Water Air Soil Pollut.* 50: 19–30.
- Mahan CA, Majidi V, Holcombe JA. 1989. Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Anal. Chem.* 61: 624–627.
- Mallick N, Rai LC. 1994. Kinetic studies of mineral uptake and enzyme activities of *Anabaena doliolum* under metal stress. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 123–133.
- Marín-Guirao L, Cesar A, Marín A, Vital R. 2005. Assessment of sediment metal contamination in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain): Metal distribution, toxicity, bioaccumulation and benthic community structure. *Cienc. Mar.* 31: 413–418.
- Mushrifah I, Peterson PJ. 1990. Toxicity of cadmium and tin to chlorophyll *a* and protein content of *Anabaena flos-aquae*. *Microbios Lett.* 45: 151–160.
- Pawlik B. 2000. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 50: 221–230.
- Rachlin JW, Warkentino B, Jensen TE. 1982. The growth responses of *Chlorella saccharophila*, *Navicula inserta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium. *Bull. Torrey Bot. Club* 109: 129–135.
- Rai UN, Chandra P. 1992. Accumulation of copper, lead, manganese and iron by field population of *Hydrodictyon reticulatum* (Linn) Lagerheim. *Sci. Total Environ.* 116: 203–211.
- Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt D. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 28: 115–126.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman MRY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11: 1–61.
- Roose JL, Pakrasi HB. 2004. Evidence that D1 processing is required for manganese binding and extrinsic protein assembly into photosystem II. *J. Biol. Chem.* 279: 45417–45422.
- Rosko JJ, Rachlin JW. 1977. The effects of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth and chlorophyll *a* content of the chlorophyte *Chlorella vulgaris*. *Bull. Torrey Bot. Club* 104: 776–783.
- Sag Y, Kutsal T. 1997. The simultaneous biosorption process of lead (II) and nickel (II) on *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 32: 591–597.
- Sanita-di-Toppi LS, Gabbriellini R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41: 105–130.
- Sloof JE, Viragh A, Van-Der-Veer B. 1995. Kinetics of cadmium uptake by green algae. *Water Air Soil Pollut.* 83: 105–122.
- Sobhan R, Sternberg SPK. 1999. Cadmium removal using *Cladophora*. *J. Environ. Sci. Health Part A* 34: 53–72.

- Sresty TVS, Rao KVM. 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeon pea. *Environ. Exp. Bot.* 41: 3–13.
- Srivastava AK, Purnima X. 1998. Phytoremediation for heavy metals, a land plant based sustainable strategy for environmental decontamination. *Proc. Natl. Acad. Sci. India. Sect. B Biol. Sci.* 68(3–5): 199–215.
- Sudhakar G, Jyothi B, Venkateswarlu V. 1991. Metal pollution and its impact on algae in flowing waters in India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 556–566.
- Veglio F, Beolchini F, Gasbarro A. 1995. Biosorption of toxic metals: An equilibrium study using free cells of *Arthrobacter* sp. *Process Biochem.* 32: 99–105.
- Visviki K, Rashin JW. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine algae *Dunalliella minuta* in both acute and chronic exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 271–275.
- Volesky B, Holan ZR. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* 11: 235–250.
- Vymazal J. 1995. *Algae and Element Cycles in Wetlands*. Lewis Publ., Florida, 689 pp.
- Wang TC, Weissman JC, Ramesh G, Varadarajan R, Benemann JR. 1998. Heavy metal binding and removal by *Phormidium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 739–744.
- Zayed A, Gowthman S, Terry N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J. Environ. Qual.* 27: 715–721.
- Zhang W, Majidi V. 1994. Monitoring the cellular response of *Stichococcus bacillaris* to exposure of several different metals using in vivo <sup>31</sup>P NMR and other spectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1577–1581.

*Recibido en enero de 2006;  
aceptado en mayo de 2007*