



**BENEMÉRITA Y CENTENARIA UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA
FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA
DPTO. DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**ADAPTACIÓN Y RESPUESTA DE UNA CEPA
DE *Dictyosphaerium chlorelloides* RESISTENTE A CADMIO
BAJO VARIACIONES AMBIENTALES E INTERACCIÓN CON
OTROS METALES TÓXICOS**

TESIS DOCTORAL

P R E S E N T A :

M.C. ALONDRA AELIE CORTÉS TÉLLEZ

**PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

ASESORÍA: D.C. MARÍA CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO
CO-ASESORÍA: D.C. SEBASTIÁN SÁNCHEZ-FORTÚN RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL:

D.C. LUIS CHACÓN GARCÍA
D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
D.C. MARÍA GUADALUPE GARNICA ROMO

Morelia, Michoacán; febrero del 2020



ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO	
ACRÓNIMOS Y SIGLAS.....	
RESUMEN.....	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
METAS	7
TAREAS	7
ESTRATEGIA METODOLÓGICA	9
SECCIÓN I.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	13
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	13
1. MARCO TEÓRICO	14
1.0.1. CONTAMINACIÓN ACUÁTICA POR CADMIO: COMPORTAMIENTO Y RESPUESTAS TÓXICAS.....	14
1.0.2. DINÁMICA DE POBLACIÓN: TOLERANCIA, RESISTENCIA Y ADAPTACIÓN.....	22
1.0.2.1. Estudios sobre la resistencia de metales en microalgas.....	29
1.0.3. PHYLUM CHLOROPHYTA: GÉNERO <i>Dictyosphaerium</i>	33
1.0.3.1. Descripción del género <i>Dictyosphaerium Nägeli</i>	33
1.0.4. ECOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> (NAUMAN) (KOMÁREK & PERMAN, 1978)	36
1.1. MATERIAL Y MÉTODOS	39
1.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	39
1.1.2. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN DC1M ^{WT} EXPUESTA A Cd.....	39
1.1.3. OBTENCIÓN DE LA CEPA Cd-RESISTENTE DE <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	40
1.1.4. ESTIMACIÓN DEL PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA.....	41
1.1.5. ESTIMACIÓN DE DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN LA CEPA Cd-RESISTENTE VS. CEPA TIPO SALVAJE DE <i>D. chlorelloides</i>	42
1.2. ANÁLISIS DE DATOS	44
1.3. RESULTADOS	45
1.3.1. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN LA CEPA TIPO CONTROL DE <i>D. chlorelloides</i>	45
1.3.2. EFICACIA BIOLÓGICA (M) DE LA CEPA Cd-RESISTENTE (DC ^{RCd100}) COMPARADA CON LA CEPA CONTROL (DC1M ^{WT})	46

1.3.3.	MORFOLOGÍA CELULAR DE Dc^{RCd100} COMPARADA CON $Dc1M^{WT}$	47
1.4.	DISCUSIÓN	48
1.5.	CONCLUSIONES.....	50
1.6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
SECCIÓN II		57
CONTENIDO		58
	ÍNDICE DE TABLAS	59
	ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	59
	ÍNDICE DE FIGURAS	59
	ÍNDICE DE ECUACIONES.....	61
2.	MARCO TEÓRICO	133
2.0.1.	FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA EN MICROALGAS	133
2.0.2.	FASE LUMÍNICA: UNIDADES FOTOSINTÉTICAS	133
2.0.3.	FOTOFOSFORILACIÓN NO CÍCLICA EN CLOROPLASTOS.....	142
2.0.4.	FASE BIOQUÍMICA EN LA FIJACIÓN DE CO_2 : CICLO DE CALVIN-BENSON-BASSHAM (CBB)	143
2.0.4.1.	<i>Regulación del Ciclo de Calvin-Benson-Bassham.....</i>	<i>147</i>
2.0.5.	RUBISCO: ESTRUCTURA, ACTIVIDAD Y REGULACIÓN	148
2.0.6.	ANHIDRASA CARBÓNICA (AC): ACTIVIDAD Y REGULACIÓN.....	151
2.0.7.	FIJACIÓN DEL O_2 POR LA RUBISCO OXIGENASA: FOTORRESPIRACIÓN O CICLO C_2	155
2.0.8.	FACTORES QUE MODIFICAN LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA	158
2.0.8.1.	<i>Concentración de CO_2/O_2.....</i>	<i>159</i>
2.0.8.2.	<i>Intensidad lumínica.....</i>	<i>159</i>
2.0.9.	MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN.....	163
2.0.10.	ADAPTACIÓN A FLUCTUACIONES LUMÍNICAS	166
2.0.11.	TEMPERATURA.....	168
2.0.12.	ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN A FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA	171
2.1.	MATERIAL Y MÉTODOS	175
2.1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR.....	175
2.1.2.	ESTIMACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO FOTOSINTÉTICO SOBRE AMBAS CEPAS DE <i>D. CHLORELLOIDES</i> 175	
2.1.3.	ESTIMACIÓN DEL BALANCE DE OXÍGENO	176
2.1.4.	EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA DEBIDO A VARIACIONES EN LA INTENSIDAD FOTÓNICA	177
2.1.5.	EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA POR BALANCE DE OXÍGENO BAJO EL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO POR FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA.....	177
2.2.	ANÁLISIS DE DATOS	178
2.3.	RESULTADOS	179
2.3.1.	RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL PSII (Φ_{PSII}) EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	179
2.3.2.	EVALUACIÓN DEL BALANCE DE OXÍGENO EN Dc^{RCd100} Y CEPA CONTROL $Dc1M^{WT}$	180
2.3.3.	EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA BAJO FLUCTUACIONES EN INCIDENCIA FOTÓNICA	181
2.3.4.	EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA BAJO EL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO Y A FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA.....	183
2.4.	DISCUSIÓN	186
2.5.	CONCLUSIONES.....	190
2.6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

SECCIÓN III.....	201
ÍNDICE DE TABLAS.....	203
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	203
ÍNDICE DE FIGURAS.....	203
ÍNDICE DE ECUACIONES	203
3. MARCO TEÓRICO	134
3.0.1. INFLUENCIA DEL pH EN MICROALGAS	134
3.0.2. MECANISMOS DE TOLERANCIA Y ADAPTACIÓN EN CONDICIONES EXTREMAS DE pH	138
3.1. MATERIAL Y MÉTODOS	142
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	142
3.1.2. EFECTO DEL pH SOBRE LA TASA CRECIMIENTO: PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA ..	142
3.2. ANÁLISIS DE DATOS	144
3.3. RESULTADOS	145
3.4. DISCUSIÓN	148
3.5. CONCLUSIONES.....	151
3.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
SECCIÓN IV	157
CONTENIDO	158
ÍNDICE DE TABLAS	159
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	159
ÍNDICE DE FIGURAS	159
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	160
4. MARCO TEÓRICO	161
4.0.1. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA AL Cd EN MICROALGAS.....	161
4.0.2. EXPRESIÓN DE LAS METALOTIONEÍNAS (Mt(III))	163
4.0.3. TRANSPORTADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DEL Cd EN MICROALGAS	165
4.0.4. MECANISMOS MOLECULARES COMPLEMENTARIOS LIGADOS A LA RESISTENCIA	168
4.0.5. MECANISMOS DE FORMA INDIVIDUAL DE METALES ESENCIALES.....	171
4.0.5.1. Cobre	173
4.0.5.2. Hierro	174
4.0.5.3. Zinc	176
4.0.5.4. Níquel.....	176
4.0.5.5. Cromo	177
4.0.5.6. Cobalto	178
4.0.5.7. Mercurio	179
4.0.5.8. Plata.....	181
4.0.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA CRUZADA E INTERACCIÓN METÁLICA CON Cd	182
4.1. MATERIAL Y MÉTODOS	185
4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR.....	185
4.1.2. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LOS COMPUESTOS METÁLICOS DE FORMA INDIVIDUAL	185
4.1.3. INTERACCIÓN METÁLICA Y RESISTENCIA CRUZADA/MÚLTIPLE DEL Cd CON EN DC^{RCd100} vs. $DC1M^{WT}$..	187
4.2. ANÁLISIS DE DATOS	188

4.3. RESULTADOS 189

4.3.1. INTERACCIÓN CON METALES DE CARÁCTER ESENCIAL 189

4.3.1.1. Respuesta de forma individual en inhibición de crecimiento poblacional en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ 189

4.3.1.2. Interacción metálica en mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ 191

4.3.2. INTERACCIÓN CON METALES DE CARÁCTER TÓXICO 200

4.3.2.1. Respuesta de forma individual en inhibición de crecimiento poblacional en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ 200

4.3.2.2. Interacción metálica en mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ 202

4.4. DISCUSIÓN 211

4.5. CONCLUSIONES..... 220

4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 221

ALCANCES PERSPECTIVAS 234

ANEXOS..... 235

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA 235

GLOSARIO

Absorción (biológica). Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías.

Acumulación. Sucesivas retenciones de una sustancia por un organismo diana, un órgano o una parte del medio ambiente, que conducen a un aumento de la cantidad o la concentración de la sustancia en los mismos.

Adaptación biológica. Los mecanismos por los cuales la selección natural ajusta la frecuencia de los genes que codifican para rasgos que afectan el número de descendientes que sobreviven en generaciones sucesivas (la aptitud). Resultado de mutaciones y recombinación. Puede producirse muy rápidamente en ambientes extremos o en ambientes modificados de forma antropogénica con grandes presiones selectivas.

Adición. La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es la suma aritmética de las respuestas individuales esperadas.

Adsorción. proceso por el cual iones son retenidos en la superficie celular, a través de diferentes grupos funcionales.

Aducto. Productos formados entre un xenobiótico, o sus metabolitos activos, y una macromolécula biológica, por ejemplo, ADN.

Antagonismo. La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es menor que la suma de las respuestas individuales esperadas. (a) Funcional: se produce cuando dos productos químicos se contrarrestan entre sí produciendo efectos opuestos sobre la misma función fisiológica. (b) Químico: reacción entre dos compuestos que generan un producto menos tóxico. (c) Disposicional: se produce cuando el ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) de una sustancia química se altera de forma que la concentración y/o la duración de la sustancia en el órgano diana se ven disminuidos. (d) Receptorial: ocurre cuando dos sustancias se unen al mismo receptor produciendo un efecto menor que cuando son administrados de forma individual, o una antagoniza la acción del otro.

Aptitud o eficacia biológica. La capacidad de un genotipo determinado para dejar descendientes en la siguiente generación en relación con la capacidad de otros genotipos de hacerlo. Incluye su capacidad de sobrevivir, reproducirse, producir descendientes y, en última instancia, dejar sus genes en la siguiente generación.

Bioacumulación. Aumento progresivo de la cantidad de una sustancia en un organismo o parte de él, como consecuencia de que el ritmo de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia. Las sustancias bioacumulables alcanzan concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico.

Biomagnificación. Secuencia de procesos que conducen a aumentar la concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la del medio que se lo ha aportado. Acumulándose de forma creciente a lo largo de la cadena trófica. Se suele aplicar a los ecosistemas más que a los individuos.

Coeficiente de selección (s). Tasa de cambio que tiene un fenotipo particular dentro de una población, esto permite comparar la calidad del genotipo de una población.

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). Concentración de un compuesto necesaria para reducir el crecimiento al 50% de una población de organismos, *in vitro*.

Concentración Máxima sin Efecto Observable (NOEC). La máxima concentración o nivel de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que no causa alteraciones adversas detectables en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos de estudio bajo condiciones definidas de exposición.

Ecotoxicología. Detección y valoración del impacto sobre las poblaciones, comunidades y ecosistemas de sustancias químicas vertidas como consecuencia de actividades antropogénicas. Se ocupa del origen, la naturaleza y efectos ambientales de los contaminantes en agua, aire, y suelo. Integra los efectos de los contaminantes a través de todos los niveles de organización desde escala molecular hasta las comunidades y ecosistemas.

Efecto. Manifestación de la acción de una sustancia que modifica algún mecanismo bioquímico o fisiológico. Este cambio debido a la interacción a nivel molecular entre el xenobiótico y constituyentes biológicos puede no ser evidente (efecto subclínico) o manifiesto (efecto clínico).

Eficacia. Medida de la capacidad intrínseca de una sustancia para producir una respuesta. Se estima midiendo la altura máxima de la curva Concentración-Respuesta.

Hormesis. 1. Fenómeno de dosis-respuesta que se caracteriza por una estimulación a baja dosis y una inhibición a dosis altas. 2. Un contaminante a bajas dosis presenta el efecto contrario al que tiene en dosis elevadas. La forma de la curva es en “U” o “J”.

Límite Máximo Permisible (LMP). Valor establecido normalmente como combinación de concentración y tiempo, para agentes químicos y toxico ambientales, por encima del cual la exposición es nociva para la salud pública y el ecosistema.

Peligro. Capacidad de que se produzca un efecto adverso. Posibilidad de que la toxicidad sea efectiva en un contexto determinado.

Potencia. Rango de concentración dentro del cual una sustancia produce respuestas crecientes.

Potenciación. Ocurre cuando una sustancia A no tiene efecto tóxico en un determinado tejido o sistema, no obstante, cuando se adiciona con una sustancia B tóxica, hace que esta sust. B presente una toxicidad mucho mayor que de forma individual.

Potencial de toxicidad (pT): Representa el potencial o toxicidad inherente de una sustancia, expresada para determinadas condiciones, vías de administración y especie.

Relación Concentración-Respuesta. Relación entre la concentración y el porcentaje de individuos (población) que presentan una determinada respuesta. Al incrementarse la concentración, aumenta la cantidad de individuos afectados en la población expuesta.

Resistencia cruzada. Resultado de la resistencia a dos o más xenobióticos o tóxicos debido a la presencia de un mecanismo similar de acción (ver *resistencia*).

Resistencia múltiple. Resistencia a varios xenobióticos o tóxicos con dos o más mecanismos distintos de acción (ver *resistencia*).

Resistencia. Surge como resultado de la selección ejercida por el uso repetido de contaminante que comparten el mismo mecanismo de acción y/o la misma ruta de degradación metabólica o incluso que tengan en común algún proceso que impida su acumulación en el sitio activo. Es el resultado de mutaciones espontáneas que se dan al azar (no son inducidas por los contaminantes), es decir, los genes que determinan la resistencia a un contaminante pueden estar presentes en una especie aún antes que ese principio activo sea introducido. El agente los selecciona eliminando a los individuos susceptibles y permitiendo que los resistentes sobrevivan.

Respuesta. Designa el porcentaje de población en que se manifiesta un efecto (ver definición *efecto*).

Riesgo: Probabilidad de que se produzca un efecto adverso específico. Suele expresarse como el porcentaje de casos de una población dada durante un determinado periodo de tiempo. Puede basarse en casos reales o en una proyección de casos futuros a través de extrapolaciones.

Seguridad química. Garantía práctica de que los organismos no están expuestos a cantidades tóxicas de sustancias químicas; esto implica conseguir un riesgo aceptablemente bajo de exposición a sustancias potencialmente tóxicas.

Sensibilidad especie-específica. Características cualitativas y cuantitativas de respuesta a sustancias potencialmente tóxicas que son distintivas de especies particulares de organismos.

Sinergismo. Palabra griega que significa la “*cooperación de dos agentes a un mismo fin*”; resulta un efecto aún mayor que de forma individual. Es decir, los efectos combinados de 2 sustancias son mucho mayores que la suma matemática de los efectos de forma individual.

Tasa de crecimiento poblacional. Aumento de la población por unidad de tiempo dividido entre el número de individuos de la población.

Tolerancia. Capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse luego de la aplicación de tal principio activo. La particularidad de las especies tolerantes es que nunca antes fueron controladas por el agente o contaminante.

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la concentración y de las circunstancias individuales y ambientales.

Trinquete de Muller. En honor a Hermann Joseph Muller. Proceso por el que los genomas de una población asexual acumulan mutaciones perjudiciales de forma irreversible.

Xenobiótico. En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales (sustancia exógena). Es decir, son sustancias sintetizadas químicamente produciendo un efecto adverso sobre el organismo.

ACRÓNIMOS Y SIGLAS

72h-NOEC. Concentración Máxima sin Efecto Observado a las 72h de exposición

AC. Anhidrasa Carbónica

APX. Ascorbato peroxidasa

ATP. Adenosine Triphosphate (Adenosín Trifosfato)

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades).

BG-11. Blue-Green Medium. Medio de enriquecimiento para microalgas de agua dulce y protozoarios

CAT. Catalasa

CBB. Ciclo de Calvin-Benson Bassham, Fase Bioquímica en la fijación de CO₂

CCM. CO₂ Concentration Mechanisms (Mecanismos de Concentración de CO₂)

CDK. Quinasa dependiente de ciclina

Chl. Clorofila

CI₅₀₍₇₂₎. Concentración que causa el 50% de inhibición sobre el crecimiento poblacional de a las 72 de exposición

Dc1M^{wt}. Cepa tipo salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides*

Dc^{RCd100}. Cepa resistente a 100 µM de Cd²⁺ de *Dictyosphaerium chlorelloides*

DOC. Dissolved Organic Carbon (Carbono Orgánico Disuelto)

EPS. Exopolisacáridos

Fa. Fracción afectada

Fd. Ferredoxina

FNR. Ferredoxina NADP-reductasa

Fre. Ferrireductasas

GOX. Glicolato oxidasa

GSH, GSSG. Glutation reducido, Glutation oxidado

Hsps. Heat-shock proteins (Proteínas de choque térmico)

IARC. International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer).

IC. Índice de Combinación

ICdA. International Cadmium Association (Asociación Internacional del Cadmio)

IPCS. International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional de Seguridad Química)

IPS. Polisacáridos intracelulares

LCHII, LCHI. Light Harvesting Complex of PSII and PSI (Centros Colectores de luz del PSII y PSI)

Mt(III). Metalotioneínas de clase III

NADPH⁺. Dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

NCM. Nordic Council of Ministers (Consejo Nórdico de Ministros)

NOM-001-ECOL-1996. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

NOM-002-ECOL-1996. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Norma Oficial Mexicana. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

NOM-127-SSA1-1994. Secretaría de Salud. Salud Ambiental. Norma Oficial Mexicana. Que establece los Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

NPQ. No PhotoChemical Quenching (procesos no fotoquímicos)

OECD. Oxygen Evolution Complex (Complejo de Evolución del Oxígeno)

OECD. The Organization for Economic Co-operation and Development (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico)

PAR, PPFD. Photosynthetically Active Radiation or Photosynthetic Photonic Flow Density (Radiación Fotosintéticamente Activa o Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético)

PC. Plastocianina

PCs. Fitoquelatinas (metalotioneínas en plantas superiores)

PEM. Principio de Efecto Medio

Pg. Gross Photosynthesis (Fotosíntesis Bruta)

Pheo. Feofitina

P_i. Ortofosfato

Pn. Net Photosynthesis (Fotosíntesis Neta, fijación neta de CO₂)

POD. Peroxidasa

PP_i. Pirofosfato

PQ. Plastoquinona

PQH₂. Plastoquinona reducida o Plastohidroquinona

PSI. Fotosistema I asociado a clorofila que absorbe a longitudes de onda de 700nm (P700)

PSII. Fotosistema II asociado a clorofila que absorbe a longitudes de onda de 680nm (P680)

PSIIRC, PSIRC. Reaction Centers of PSII and PSI (Centros de Reacción del PSII y PSI)

PSU. Photosynthetic Units (Unidades fotosintéticas)

Q_A, Q_B. Quinonas A y B

R. Respiración

Rca. RuBisCO activasa

ROS. Reactive Oxygen Species. Especies Reactivas de Oxígeno

RuBisCO. Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa

RuBP. Ribulosa 1,5-bifosfato

SOD. Superóxido dismutasa

U.S. EPA. United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América)

VET3. Metiltransferasa

WHO. World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

ΦPSII. Quantum yield of photosystem II-PSII (Rendimiento cuántico fotosintético del fotosistema II)

RESUMEN

Los metales presentes en el ecosistema acuático poseen un carácter tóxico con capacidad de bioacumularse y por consecuencia biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica acuática. Estos contaminantes metálicos inducen alta sensibilidad en la mayoría de los organismos acuáticos, mientras que otros como algunas especies de microalgas se vuelven resistentes. El objetivo del presente proyecto de tesis doctoral fue determinar el efecto tóxico que presenta el cadmio sobre una cepa de microalga de agua dulce con distribución cosmopolita tipo salvaje *Dictyosphaerium chlorelloides*, obtener una cepa resistente a partir de sus cambios genéticos y/o estructurales expuesta a altas concentraciones de cadmio, así como el comportamiento bajo fluctuaciones de factores ambientales e interacción de la cepa Cd-resistente con otros metales, en términos de multi-resistencia.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se evaluó la aptitud biológica y coeficiente de selección en ausencia del agente selectivo, con una reducción del 34.78% (coeficiente de selección) en la supervivencia y dejar descendientes con la capacidad de resistencia con un valor de m de 1.65 ± 0.33 comparada con Dc1M^{wt} de 2.53 ± 0.55 . Además, Dc^{RCd100} presentó reducción en el volumen y superficie celular del 75 y 61%, respectivamente, que se refleja como un costo en la aptitud de la cepa Cd-resistente en ausencia del metal, posiblemente con modificaciones fenotípicas. En fotosíntesis, Dc^{RCd100} (Φ_{PSII}), exhibió 20% de reducción en la actividad del PSII con modificaciones en el aparato fotosintético. En balance de oxígeno, Dc^{RCd100} resultó en una inhibición del $29.95 \pm 3.91\%$ de productividad primaria bruta (Pg). Durante fluctuaciones en incidencia fotónica se reportó una eficiencia neta (Pn) de $42.73 \pm 18.27\%$ a bajas incidencias de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, en el punto de saturación lumínico se presentó a los $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ del $96.32 \pm 3.63\%$ para Dc^{RCd100} y de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con $97.72 \pm 2.99\%$ para Dc1M^{wt} sin diferencias entre ambas cepas.

Palabras clave: aptitud biológica; cadmio; *Dictyosphaerium chlorelloides*; intensidad lumínica; interacción metálica; productividad fotosintética; pH; resistencia; temperatura

ABSTRACT

The metals present in the aquatic ecosystem have a toxic profile with the ability to bioaccumulate and consequently biomagnifies along the aquatic trophic chain. These metal pollutants induce high sensitivity in most aquatic organisms, while others such as some species of microalgae become resistant. The aim of this doctoral thesis project was to determine the toxic effect that cadmium has on a freshwater microalgae strain with cosmopolitan distribution *Dictyosphaerium chlorelloides*, to obtain a resistant strain from its genetic and/or structural changes exposed to high cadmium concentrations, as well as the behavior under fluctuations of environmental factors and interaction of the Cd-resistant strain with other metals, in relationship to multi-resistance.

According to the results obtained, the biological fitness and selection coefficient were evaluated in the absence of the selective agent, with a reduction of 34.78% (selection coefficient) in survival and leaving descendants with the resistance capacity with a value of m of 1.65 ± 0.33 compared to Dc1M^{wt} of 2.53 ± 0.55 . In addition, Dc^{RCd100} showed a reduction in cell volume and surface area of 75 and 61%, respectively, which is reflected as a fitness cost in of the Cd-resistant strain in the absence of the metal, probably with phenotypic changes. In photosynthesis, Dc^{RCd100} (Φ PSII) exhibited a 20% reduction in PSII activity with modifications in the photosynthetic apparatus. In oxygen balance, resulted in an inhibition of $29.95 \pm 3.91\%$ of gross primary productivity (Pg). During fluctuations in photonic incidence a net efficiency (Pn) of $42.73 \pm 18.27\%$ was reported at low incidences of $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. However, at the light saturation threshold it was presented at $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of $96.32 \pm 3.63\%$ for Dc^{RCd100} and $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with $97.72 \pm 2.99\%$ for Dc1M^{wt} without differences between both strains.

Keywords: biological fitness; cadmium; *Dictyosphaerium chlorelloides*; photonic intensity; metallic interaction; photosynthetic productivity; pH; resistance; temperature

INTRODUCCIÓN

La contaminación acuática por la presencia de altas concentraciones de metales con origen antropogénico presenta implicaciones ambientales graves, con una elevada acumulación tanto en sedimentos como en la biota, con alteraciones estructurales en las poblaciones y comunidades biológicas que dan como resultado consecuencias evolutivas. Esto involucra que, la mayoría de la biota sea altamente sensible a estos contaminantes, mientras que algunos biotipos se vuelvan tolerantes con capacidad de generar resistencia a contaminantes metálicos.

Entre los metales de carácter puramente tóxico, de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S. EPA), el cadmio (Cd) se encuentra clasificado como un contaminante prioritario ambiental en conjunto con el plomo y mercurio (U.S. EPA, 2012). Este metal cuando entra al ecosistema acuático es potencialmente tóxico, con tasas altas de bioacumulación y se biomagnifica a lo largo de la cadena trófica acuática. Es un carcinógeno humano grado 1 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993). Otro de los inconvenientes del cadmio, es su especiación acuática, es decir, se encuentra formando complejos tanto inorgánicos, como complejos orgánicos con una afinidad intermedia entre grupos funcionales que tengan S, N y O, o en forma iónica en condiciones ácidas. Además, este metal genera un intercambio iónico con metales esenciales como el Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , o utilizando los transportadores de estos metales mimetizando su unión, y potenciando o antagonizando la actividad de los mismos.

En los ecosistemas acuáticos, las microalgas son pieza esencial, pues como productores primarios proporcionan el oxígeno y la transferencia energética a lo largo de la cadena trófica acuática. Las microalgas presentan una alta plasticidad ya que evolucionan a una adaptación en ecosistemas altamente contaminados, pero su selección se realiza en ambientes donde no se encuentra la presencia de contaminantes a través de mutaciones pre-adaptativas. Esto es particularmente importante, ya que presentan diversos mecanismos a través de alteraciones estructurales y genéticas para mantener las concentraciones de iones metálicos libres en niveles que no superen las necesidades celulares. Estos mecanismos incluyen: síntesis *de novo* de proteínas encargadas de incrementar la captación y quelación metálica, mayor adsorción de cationes en la superficie celular, cambios en la permeabilidad iónica, exclusión activa, biotransformación, quelación extra e

intracelular, compartimentalización metálica, y mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Además, el comportamiento de cepas de clorofíceas de agua dulce como *Dictyosphaerium chlorelloides* metalo-resistentes bajo fluctuaciones de factores ambientales como temperatura, pH, intensidad lumínica que son condicionantes directas de la actividad fotosintética y aptitud biológica, no ha sido evaluado. Conjuntamente, no existen en la literatura científica, respuestas de interacciones con otros metales que puedan dar lugar a respuestas antagónicas en términos de resistencias múltiples o cruzadas, por el contrario, se incrementa la toxicidad a través de la potenciación o adición en sus respuestas en interacción que incrementa la sensibilidad del genotipo resistente y la comparación de la tolerancia en un alelo tipo salvaje. Utilizando esta ventaja, en un futuro se podrá determinar la concentración del elemento metálico en ambientes acuáticos dulces, su disponibilidad relativa a otros metales, el transporte y su mecanismo de toxicidad sobre la eficiencia fotosintética.

Por consiguiente, en el presente escrito doctoral el objetivo fue evaluar la respuesta tóxica que presenta el cadmio sobre *Dictyosphaerium chlorelloides*, obtener una cepa resistente a partir de sus cambios genéticos y/o estructurales a través de la selección de mutaciones pre-adaptativas, y determinar los mecanismos de alteración sobre la actividad fotosintética ante variaciones de factores ambientales e interacción con otros metales en la tasa crecimiento.

Para facilitar la comprensión de este trabajo de doctorado, dada su complejidad inherente, el escrito se ha esbozado por secciones, cada uno con los respectivos apartados.

JUSTIFICACIÓN

En el territorio nacional, el suministro de agua se da principalmente a través del aprovechamiento de aguas subterráneas y cuerpos de agua superficiales. No obstante, el grave problema es la elevada contaminación por metales tóxicos y otras sustancias de carácter tóxico debido a las actividades industriales, y efluentes y/o lixiviados agrícolas y urbanos. Resulta dar prioridad a la gestión de las sustancias metálicas, que de acuerdo con la legislación del país están consideradas dentro clasificación nivel 2, como tóxicas, persistentes, bioacumulables y biomagnificables, y que por estas características reúnan las condiciones de exposición (concentración y duración) haciéndolos de muy alto riesgo para el ecosistema acuático y por ende a la salud pública. La situación actual sobre la evaluación de la toxicidad de metales tóxicos en el ecosistema acuático es de gran importancia para mantener la seguridad y garantizar la integridad de este hábitat. Por su parte, predecir el impacto de metales como el cadmio sobre el ecosistema acuático se complica por las diferentes formas químicas que éste puede optar en aguas dulces, es decir, el Cd^{2+} , la formación de complejos orgánicos e inorgánicos, y los complejos insolubles de CdOH^+ y CdS .

Es bien sabido, que la interacción de factores ambientales como variaciones en temperatura, luz, pH, entre otros intervienen en el proceso tóxico de xenobióticos y metales presentes en el ecosistema acuático. Sin embargo, la correlación entre la resistencia a metales y la adaptación bajo fluctuaciones de parámetros ambientales no se ha explorado a fondo y, por otra parte, no se ha conseguido proporcionar datos sobre su biodisponibilidad, y su comportamiento en mezclas sobre cepas de microalgas resistentes. Como respuesta a estas necesidades, precisamente el uso de microalgas es de gran interés ecotoxicológico porque representan al primer nivel trófico acuático, generando respuestas rápidas a distintos índices de toxicidad y son el blanco de numerosas sustancias tóxicas. Sin embargo, existe una baja especificidad en la respuesta de cuantificación de determinados elementos metálicos. La utilización de clorofíceas de distribución cosmopolita como *Dictyosphaerium chlorelloides* a través de la exposición al cadmio provocará la aparición de mutantes resistentes. Utilizando esta ventaja, se determinará la concentración del elemento en el agua a través del desarrollo *a posteriori* de un posible sistema de monitoreo *in situ* del Cd en aguas, su disponibilidad relativa, el transporte y su mecanismo de toxicidad sobre la actividad fotosintética, y su comportamiento debido a la interacción con otros metales.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Una vez obtenida la cepa resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides*, ¿Qué transformaciones ocurren sobre la cepa resistente a Cd en la actividad fotosintética y balance de oxígeno comparada con la tipo salvaje (Dc1M^{wt})?

¿Cómo influyen los factores ambientales (fluctuaciones de pH, temperatura e intensidad lumínica) en la actividad fotosintética en la cepa resistente al Cd y la tipo salvaje? Asimismo, ¿qué comportamientos surgirían de la interacción del Cd con otros metales de carácter tóxico bajo estas variaciones ambientales?

HIPÓTESIS

La exposición a cadmio en la clorofícea *Dictyosphaerium chlorelloides* provoca la presencia y selección de cepas Cd-resistentes. Esta capacidad induce transformaciones sobre la actividad fotosintética y el balance de oxígeno de la cepa Cd-resistente con diferencias comparadas con la cepa tipo salvaje (Dc1M^{wt}).

Conjuntamente factores ambientales tales como variaciones en el pH, temperatura, intensidad lumínica y la interacción con otros metales tóxicos modifican el proceso fotosintético y en tasa de crecimiento poblacional.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tóxico que presenta el cadmio sobre *Dictyosphaerium chlorelloides*, obtener una cepa resistente a partir de sus cambios genéticos y/o estructurales a altas concentraciones de cadmio, y determinar los mecanismos de alteración sobre la actividad fotosintética ante variaciones de factores ambientales e interacción con otros metales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener la cepa resistente a Cd de *Dictyosphaerium chlorelloides*
- Evidenciar las modificaciones morfológicas (volumen y superficie celular) de ambas cepas
- Estimar la eficacia biológica a través de la inhibición de crecimiento poblacional en ambas cepas de *D. chlorelloides*
- Determinar las alteraciones sobre la actividad fotosintética por la exposición al Cd sobre *D. chlorelloides* sensible y la variante resistente.
- Evaluar el balance de oxígeno en su comparación en ambas cepas de *D. chlorelloides*
- Determinar la aptitud biológica bajo variaciones del pH entre las 2 cepas de *D. chlorelloides*.
- Estimar las variaciones de temperatura del medio y la efectividad fotosintética dependiente de la intensidad lumínica entre las dos cepas de la microalga en balance de oxígeno.
- Examinar la interacción de la cepa resistente de *D. chlorelloides* expuesta a otros metales, a través de la inhibición de crecimiento poblacional.

METAS

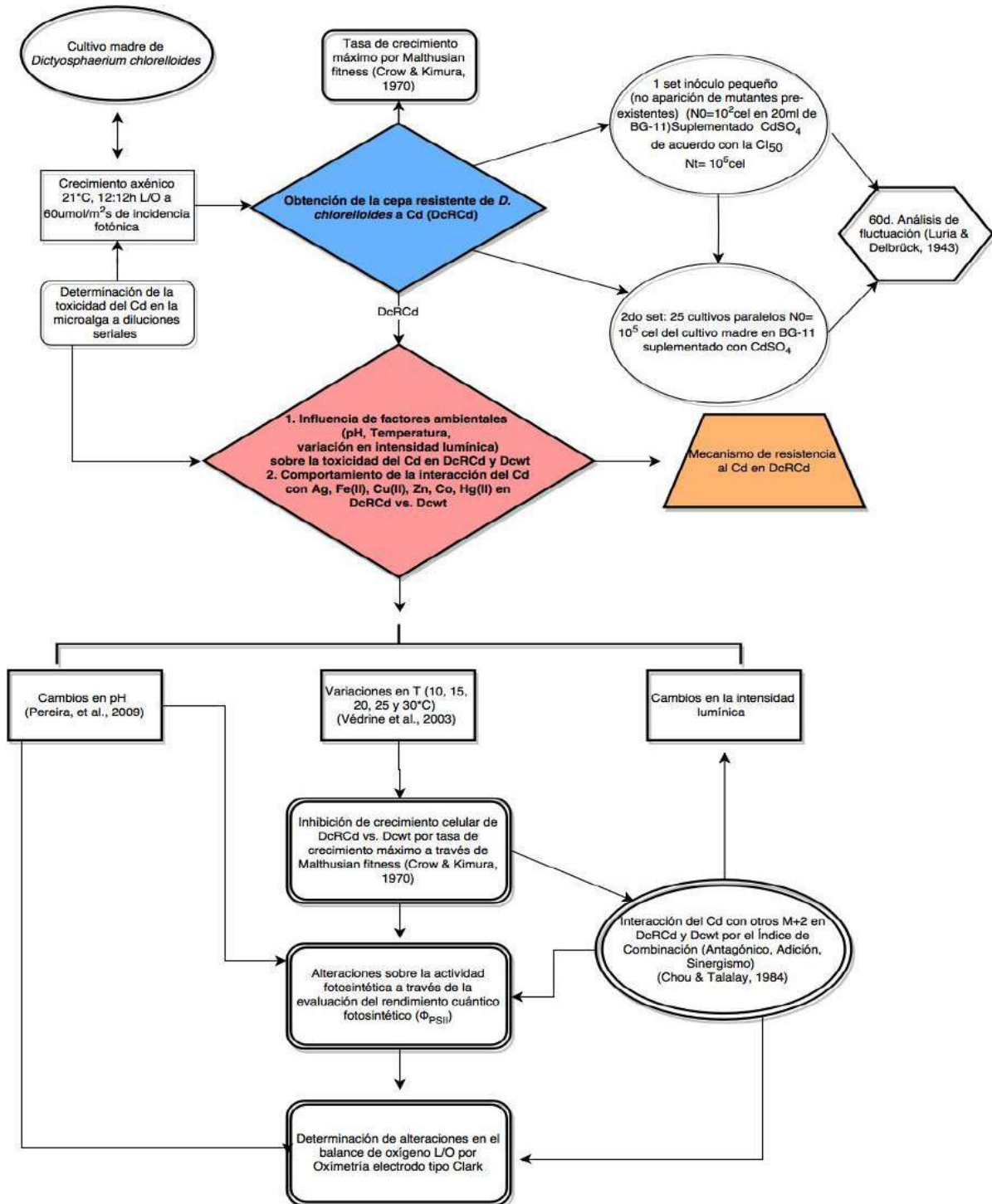
- Establecer cultivos de *Dictyosphaerium chlorelloides* expuestas a concentraciones continuas de cadmio
- Aislar los biotipos resistentes al Cd de *Dictyosphaerium chlorelloides* a partir de concentraciones umbrales
- Comprobar la capacidad de resistencia a altas concentraciones del metal a corto plazo y el conocimiento a través de esas modificaciones estructurales que permitirán tal capacidad.
- Establecer los mecanismos específicos sobre actividad fotosintética y balance de oxígeno por los que se rige la cepa Cd-resistente y su diferencia comparada con la tipo salvaje de *D. chlorelloides*
- Determinar la interacción con otros metales sobre la cepa resistente comparada con el metal de estudio.
- Evaluar capacidad de resistencia cruzada del Cd con otros metales sobre la cepa resistente de *D. chlorelloides*
- El impacto de variaciones de factores ambientales determinará la especificidad y sensibilidad al Cd de la cepa resistente en comparación con la cepa tipo salvaje.

TAREAS

- Exposición de *Dictyosphaerium chlorelloides* a concentraciones umbrales de forma continua al Cd para el posterior aislamiento de los biotipos resistentes por el análisis de fluctuación metodología propuesta por Costas et al., (2001) y López-Rodas et al., (2001)
- Estimación de la inhibición de crecimiento poblacional ($CI_{50(72)}$) a través de la exposición de Cd sobre *Dictyosphaerium chlorelloides* tipo salvaje y en la cepa resistente a través de la tasa de crecimiento máxima por el parámetro maltusiano de eficacia biológica (m) mediante fluorescencia emitida por la clorofila.
- Determinación de las posibles alteraciones por medio de la cuantificación del rendimiento cuántico fotosintético (Φ_{PSII}) resultado de la exposición al Cd sobre ambas cepas de *Dictyosphaerium chlorelloides* para la comparación de estas modificaciones del PSII

- La evaluación del balance de oxígeno igualmente en ambas cepas de *D. chlorelloides* se estimará a través del método de oximetría por electrodo de Clark
- El análisis del grado de especificidad y resistencia cruzada exhibida por las cepas resistentes de *D. chlorelloides* expuestas a otros metales tóxicos se basará en su efecto sobre la inhibición de crecimiento en ambas
- Las respuestas de interacción según el caso, se basará utilizando farmacología aplicada a través de combinación del Cd con otros iones metálicos por la técnica del Índice de Combinación de Chou & Talalay, (1984).
- Determinación de aptitud biológica bajo variaciones de pH entre las dos cepas de *D. chlorelloides*.
- Evaluación de variaciones en la intensidad lumínica y temperatura en efectividad fotosintética a través del balance de oxígeno en ambas cepas de *D. chlorelloides*.

ESTRATEGIA METODOLÓGICA





SECCIÓN I

CADMIO Y EVOLUCIÓN DE METALORESISTENCIA EN *Dictyosphaerium chlorelloides*



CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	13
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	13
MARCO TEÓRICO	14
CONTAMINACIÓN ACUÁTICA POR CADMIO: COMPORTAMIENTO Y RESPUESTAS TÓXICAS	14
DINÁMICA DE POBLACIÓN: TOLERANCIA, RESISTENCIA Y ADAPTACIÓN	22
Estudios sobre la resistencia de metales en microalgas.....	29
PHYLUM CHLOROPHYTA: GÉNERO <i>Dictyosphaerium</i>	33
Descripción del género <i>Dictyosphaerium Nägeli</i>	33
ECOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> (NAUMAN) (KOMÁREK & PERMAN, 1978).....	36
MATERIAL Y MÉTODOS	39
MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	39
INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN $Dc1M^{WT}$ EXPUESTA A Cd	39
OBTENCIÓN DE LA CEPA Cd-RESISTENTE DE <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	40
ESTIMACIÓN DEL PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA	41
ESTIMACIÓN DE DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN LA CEPA Cd-RESISTENTE VS. CEPA TIPO SALVAJE DE <i>D. chlorelloides</i>	42
ANÁLISIS DE DATOS	44
RESULTADOS	45
INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN LA CEPA TIPO CONTROL DE <i>D. chlorelloides</i>	45
EFICACIA BIOLÓGICA (M) DE LA CEPA Cd-RESISTENTE (Dc^{Rcd100}) COMPARADA CON LA CEPA CONTROL ($Dc1M^{WT}$)	46
MORFOLOGÍA CELULAR DE Dc^{Rcd100} COMPARADA CON $Dc1M^{WT}$	47
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

Índice de Tablas

TABLA 1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS TAXONÓMICOS DE MICROALGAS IMPLICADAS EN LA ADAPTACIÓN A HERBICIDAS (SIMAZINA). TOMADO DE HUERTAS ET AL., 2010.	31
TABLA 1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES</i> (NAUMAN) (KOMÁREK & PERMAN, 1978)	36
TABLA 1.1.1. MODELO GEOMÉTRICO ESFÉRICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN Y SUPERFICIE CELULAR EN D. CHLORELLOIDES TOMADO DE HILLEBRAND ET AL., 1999 Y SUN & LIU, 2003.....	43
TABLA 1.3.1. VALORES DE LA $CI_{50(72)}$ Y 72H-NOEC DEL $CdSO_4$ Y LA EQUIVALENCIA DEL ION Cd^{2+} EN $Dc1M^{WT}$ PREVIA A LA OBTENCIÓN DE LA CEPA CD-RESISTENTE. SE PRESENTAN LOS LÍMITES DE CONFIANZA AL 95%. $N=8$	45
TABLA 1.3.2. PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA (M) Y COEFICIENTE DE SELECCIÓN DE LA CEPA CD-RESISTENTE (Dc^{RCd100}) VS. LA CEPA CONTROL ($Dc1M^{WT}$). $N=6$	46
TABLA 1.3.3. VOLUMEN Y SUPERFICIE CELULAR DE Dc^{RCd100} COMPARADA CON $Dc1M^{WT}$. SE MUESTRA LA $M \pm DS$ Y SUS RESPECTIVOS LÍMITES DE CONFIANZA AL 95%. $N=50$ CÉLULAS.	47

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1.3.1. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DEL $CdSO_4$ A LAS 72H DE EXPOSICIÓN EN LA CEPA TIPO SALVAJE DE D. CHLORELLOIDES ($Dc1M^{WT}$).....	45
GRÁFICO 1.3.2. EFICACIA BIOLÓGICA (M) DE Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	46
GRÁFICO 1.3.3. VOLUMEN Y SUPERFICIE CELULAR DE Dc^{RCd100} CON RESPECTO A $Dc1M^{WT}$ ($P < 0.0001$).	47

Índice de Figuras

FIGURA 1.1. TOXICOLOGÍA DE LOS METALES. TOMADO DE TOKAR ET AL., 2015.	14
FIGURA 1.2. COMPORTAMIENTO DE LOS METALES EN EL ECOSISTEMA ACUÁTICO. TOMADO DE KRAMER & ALLEN, 1988.	15
FIGURA 1.3. ESQUEMA GENERAL DE LA ESPECIACIÓN METÁLICA EN SOLUCIÓN, Y EJEMPLOS DE FORMAS O ESPECIES METÁLICAS QUE SON DE IMPORTANCIA EN TOXICOLOGÍA AMBIENTAL. TOMADO DE TWISS ET AL., 2001.....	16
FIGURA 1.4. USOS GLOBALES DEL CADMIO. TOMADO DE ICdA, 2011.....	18
FIGURA 1.5. PRINCIPALES FUENTES DE EXPOSICIÓN AL Cd. TOMADO DE ICdA, 2011.	18
FIGURA 1.6. PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES DONDE SE UNEN LOS IONES METÁLICOS (Cd^{2+}). TOMADO DE MANAHAN, 2003.....	21
FIGURA 1.7. POSIBLES RESPUESTAS DE LA POBLACIÓN EXPUESTA A CONTAMINANTES. TOMADO DE WALKER ET AL., 2012.....	22
FIGURA 1.8. CURVA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL. CUANDO LA DENSIDAD ES BAJA, LA TASA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL ASCIENDE EXPONENCIALMENTE (LADO IZQUIERDO DE LA CURVA). A MEDIDA QUE LA DENSIDAD DE POBLACIÓN SE ACERCA A LA CAPACIDAD DE CARGA (K), LA TASA DE CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN DISMINUYE (FASE ESTACIONARIA). TOMADO DE WALKER ET AL., 2012.	23
FIGURA 1.9. EFECTOS GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA RESPUESTA EN EL FITNESS O EFICACIA BIOLÓGICA DE UNA POBLACIÓN O INDIVIDUO. ORIGINAL DE ARNOLD, 1983.....	24
FIGURA 1.10. FLUCTUACIÓN EN LA TASA DE MUTACIONES DELETÉREAS Y MUTACIONES BENÉFICAS QUE INCREMENTEN LA SUPERVIVENCIA Y LA TRANSFERENCIA DE GENES A LA SIGUIENTE GENERACIÓN. MODIFICADO DE LURIA & DELBRÜCK, 1943.	25
FIGURA 1.11. RESPUESTA DE LA EFICACIA BIOLÓGICA CON FORMA DE DISTRIBUCIÓN GAUSSIANA DE LA SELECCIÓN DE LOS GENOTIPOS CON MAYOR APTITUD EN SITIOS NO CONTAMINADOS POR EL NÚMERO DE MUTACIONES QUE PUEDEN PRESENTARSE. TOMADO DE MARTIN & GANDON, 2010.....	26

FIGURA 1.12. CURVAS DE COMPENSACIÓN (TRADE-OFF) O SUPERVIVENCIA EN: A: AMBIENTES CONTAMINADOS. B: AMBIENTES NO CONTAMINADOS. TOMADO DE WALKER ET AL., 2012.	27
FIGURA 1.13. RESPUESTAS DE TOLERANCIA Y ADAPTACIÓN DE ORGANISMOS FOTOAUTÓTROFOS EXPUESTOS A METALES Y LA SELECCIÓN DE LOS GENOTIPOS TOLERANTES. TOMADO DE ERNST, 2006.	28
FIGURA 1.14. COLONIA DE <i>DICTYOSPHAERIUM PULCHELUM</i> . LAS CONEXIONES INTERCELULARES DE LOS RESTOS DE LA PARED CELULAR PARENTAL SON EVIDENTES A PARTIR DE LOS EXTREMOS DE LOS TALLOS DE MUCÍLAGO. TOMADO DE GUIRY & GUIRY, 2019.	34
FIGURA 1.15. ULTRAESTRUCTURA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE: A CÉLULA DE <i>DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES</i> , EL ASTERISCO (*) INDICA LA LOCALIZACIÓN DEL PIRENOIDE. MAGNIFICACIÓN A 15,000X. TOMADO DE D'ORS ET AL., 2010. B CÉLULA DE <i>DICTYOSPHAERIUM</i> SP. CW: PARED CELULAR, S: GRÁNULOS DE ALMIDÓN, P: PIRENOIDE, T: TILACOIDES. TOMADO DE CHENG ET AL., 2019.	34
FIGURA 1.16. MICROFOTOGRAFÍA DE UNA CEPA DE <i>DICTYOSPHAERIUM LIBERTATIS</i> (CCAP 222/92) RODEADA DE MUCÍLAGO. TOMADO DE BOCK ET AL., 2011.	35
FIGURA 1.17. CÉLULAS DE <i>DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES</i> (NAUMAN) (KOMÁREK & PERMAN, 1978). TOMADO DE GUIRY & GUIRY, 2019.	37
FIGURA 1.3.1. DIFERENCIAS EN VOLUMEN Y SUPERFICIE CELULAR DE: A) DC1M ^{WT} , Y B) DC ^{RCd100} EN AUSENCIA DEL CD. N= 50 CÉLULAS.	47

Índice de Ecuaciones

ECUACIÓN 1.1. PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA (CROW & KIMURA, 1970)	24
ECUACIÓN 1.1.1. PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA (CROW & KIMURA, 1970).....	41
ECUACIÓN 1.1.2. COEFICIENTE DE SELECCIÓN DE TASA MÁXIMA DE CRECIMIENTO EN LAS CEPAS CD-RESISTENTE Y TIPO SALVAJE DE <i>D. CHLORELLOIDES</i> (COSTAS ET AL., 2001 Y LÓPEZ-RODAS ET AL., 2001).....	42
ECUACIÓN 1.1.3. CÁLCULO DEL VOLUMEN (V) Y SUPERFICIE CELULAR (A) DE ACUERDO CON EL MODELO ESFÉRICO (1H) (HILLEBRAND ET AL., 1999 Y SUN & LIU, 2003).	42

Índice de Diagramas

DIAGRAMA 1.1.1. ANÁLISIS DE FLUCTUACIÓN DE MUTANTES EN MICROALGAS. TOMADO DE COSTAS ET AL., 2001 Y LÓPEZ-RODAS ET AL., 2001.	41

1. MARCO TEÓRICO

1.0.1. Contaminación acuática por Cadmio: comportamiento y respuestas tóxicas

La contaminación acuática por metales es un problema a nivel mundial, debido al elevado potencial de toxicidad que presentan, alta persistencia en el ambiente, acumulación y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica acuática (Sikder et al., 2013). La presencia de elevadas concentraciones de metales en los distintos ecosistemas acuáticos, se debe a las fuentes principales derivadas de distintas actividades antropogénicas como la industria, metalurgia, minería y agricultura (el uso de fertilizantes inorgánicos como derivados fosfatados) en la eliminación y vertidos de efluentes no tratados de metales tóxicos en los diferentes cuerpos de agua superficial (Figura 1.1), con consecuencias graves sobre el equilibrio del ecosistema, y finalmente en la salud pública (Varol & Şen, 2012; Wongsasuluk et al., 2014; Poshtegal & Mirbagheri, 2019).

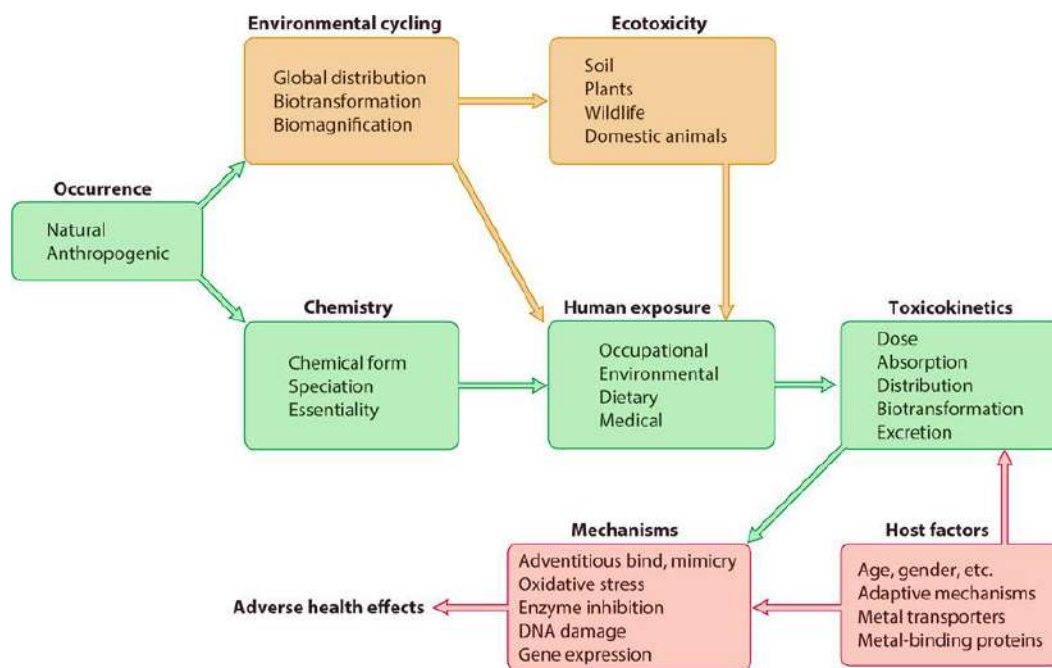
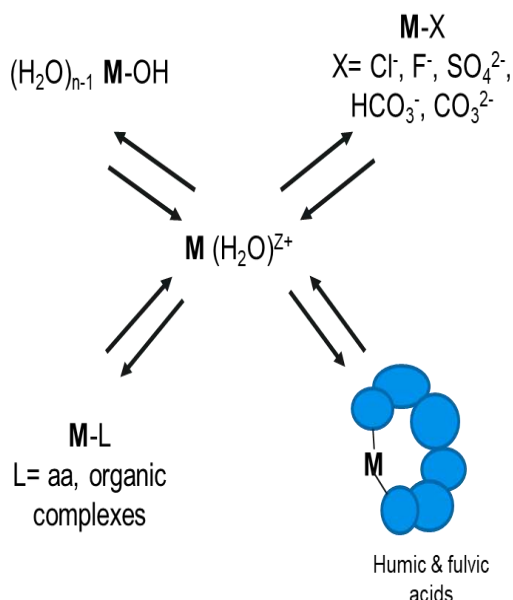


Figura 1.1. Toxicología de los metales. Tomado de Tokar et al., 2015.



15



Metal form (A → E in Figure 1)	Examples
A. Free metal ion	$\text{Al}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6$ $\text{Cu}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$
B. Hydroxo-metal complexes	$\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^{1+}$, $\text{Al}(\text{OH})_4^{1-}$ $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^{1+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^{1-}$ $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$
C. Simple inorganic complexes	AlF_2^{2+} , AlF_2^{1+} CdCl^{1+} , CdCl_2^0 , CdCl_3^{1-} HgCl_2 , HgOHCl^0 CuCO_3^0 CdSO_4^0
D. Simple organic complexes:	
i) synthetic	Cu-EDTA^{2-} Cd-NTA^{1-}
ii) natural	Cd-alanine Cd-citrate Fe-siderophore
E. Polymeric organic complexes	$\text{Al, Fe, Cu, Pb or Hg - fulvic or humic acid}$

Figura 1.3. Esquema general de la especiación metálica en solución, y ejemplos de formas o especies metálicas que son de importancia en toxicología ambiental. Tomado de Twiss et al., 2001.

Dentro de esta clasificación, el cadmio (Cd) es un contaminante prioritario ambiental en conjunto con el mercurio y el plomo, con graves consecuencias para la salud humana, está clasificado como carcinógeno humano en el grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1993). Además, presenta alteraciones sobre el sistema nervioso, sistema reproductivo, es un irritante del tracto respiratorio y genera edema pulmonar cuando es inhalado (CdO), induce daños renales a través de la acumulación de Cd (del 30 al 50% de la carga total de Cd) por las metalotioneínas en la corteza renal, túbulo renales, hipercalcemia y formación de cálculos renales, acumulación; alteraciones hepáticas por su unión a grupos tiol con la inhibición de enzimas y proteínas clave; complicaciones óseas por el reemplazo y perturbación del metabolismo del Ca^{2+} ocasionando osteomalacia u osteoporosis e interacciones morfogénicas. Es carcinogénico por inhibición en la síntesis del sistema de reparación del ADN y formación de aductos, estrés oxidativo. También, el cadmio puede comportarse como una metalohormona y disruptor endocrino. Este metal tiene una vida media en el cuerpo humano de 10 a 33 años (WHO, 2011; ATSDR, 2012; Idrees et al., 2018).

Este metal fue el causante de uno de los mayores desastres medioambientales conocidos, que afectó de forma grave a los habitantes (en particular a mujeres mayores de 50 años) de la cuenca del río

Jinzū, en la prefectura de Toyama en Japón, a través del riego de los campos de arroz desde 1910 hasta 1960 con aguas contaminadas con metales tóxicos procedentes de minas cercanas. La intoxicación se le denominó “*itai-itai*” ya que se caracteriza de dolores agudos en articulaciones, osteomalacia y alteraciones renales.

En la biósfera, produce transformaciones sobre el mantenimiento de la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos afectados, el cual es un metal altamente tóxico, persistente y bioacumulable con capacidad para producir estrés abiótico en los organismos acuáticos (Ivanina et al., 2008; Zhou et al., 2008).

El Cd se localiza en la serie de los metales de transición, en el grupo 12 bloque d, con número atómico de 48 y un peso molecular de $112.41 \text{ g mol}^{-1}$, con una densidad de 8.64 g cm^{-3} . Es químicamente similar al Zn, y ocurre naturalmente en minerales de sulfuro y carbonatos de Zn (0.1 a 0.3% de Cd), Cu y Pb. El comportamiento químico del cadmio se asemeja al zinc, pero con mayor afinidad al azufre y más móvil en ambientes ácidos. En la naturaleza el cadmio se encuentra con valencia 2+, por lo que en solución forma especies químicas tales como CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^+ , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ y $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ y quelatos orgánicos (Thornton & Webb, 1980).

De acuerdo con la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), bajo condiciones extremas de oxidación, durante su refinado y fundición, el cadmio da lugar a óxido de cadmio (CdO), que también constituye un significativo peligro cuando es inhalado. Además, puede encontrarse en la atmósfera como cloruro o sulfato en forma de partículas o vapores para ser depositados sobre la superficie del suelo o en el agua (ATSDR, 2012).

Los principales usos del Cd de acuerdo con la Asociación Internacional del Cadmio (ICdA), se emplea como metal anticorrosivo, en electro chapado sobre acero. El sulfuro y seleniuro de cadmio (No. CAS: 8048-07-5 y 58339-34-7, respectivamente) se usan comúnmente como pigmentos amarillo y rojo en plásticos tipo acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), policarbonato (PC), polietileno de alta densidad (HDP), siliconas y otros termoplásticos en un porcentaje de 0.01 a 0.75% de peso. Simultáneamente, el estearato de cadmio se emplea como estabilizante del PVC entre el 1 y 15% de Cd. Otro de los compuestos más utilizados aproximadamente en un 80% es el hidróxido de cadmio en baterías eléctricas recargables de Ni-Cd ($2\text{Ni}(\text{OH})_2 + \text{Cd}(\text{OH})_2 \leftarrow \text{carga/descarga} \rightarrow 2\text{NiO} \text{ OH} + \text{Cd} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Figura 1.4). El telurio de cadmio se maneja en componentes electrónicos, en barras de control de reactores nucleares. Además, los fertilizantes

producidos a partir de minerales de fosfato constituyen una de las fuentes importantes de contaminación difusa de cadmio (Figura 1.4 y Figura 1.5) (ICdA, 2011; WHO, 2011).

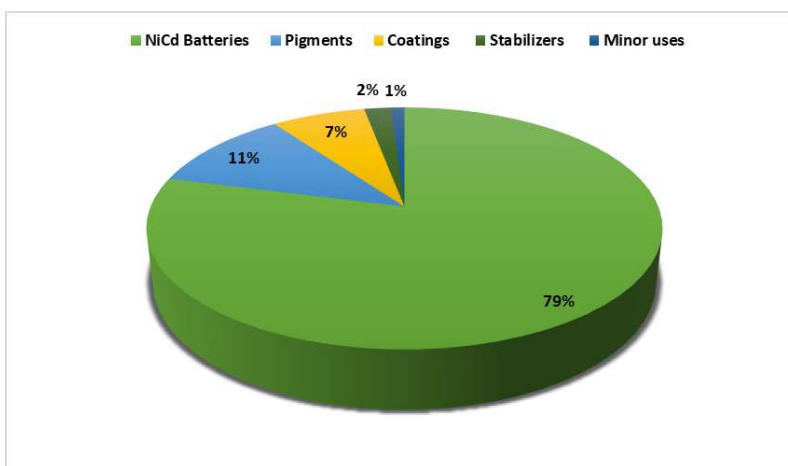


Figura 1.4. Usos globales del Cadmio. Tomado de ICdA, 2011.

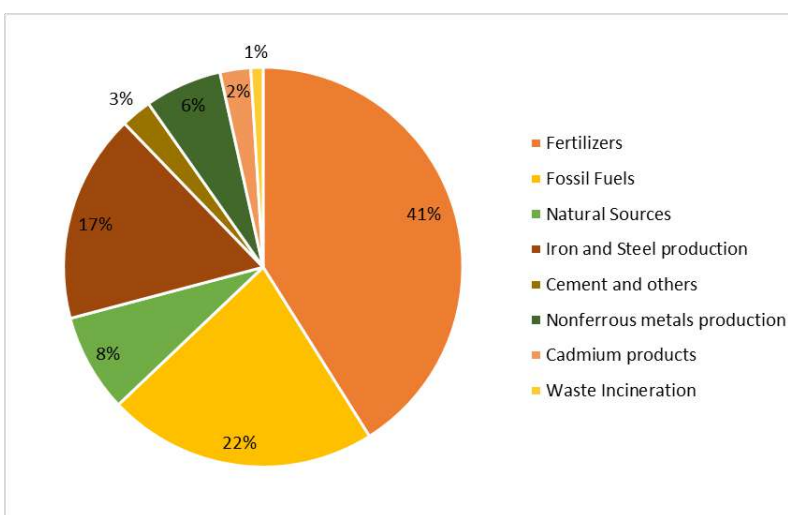


Figura 1.5. Principales fuentes de exposición al Cd. Tomado de ICdA, 2011.

La contribución directa global del Cd asciende de 2,500 a 15,500 toneladas por año con la deposición atmosférica como la fuente dominante, mientras que se supone que entre 7,500 y 29,500 toneladas adicionales son vertidos y depositados en forma de productos de desecho industrial (Nordic Council of Ministers, 2003). La presencia de cadmio como contaminante en agua potable puede proceder de las tuberías galvanizadas de zinc, soldaduras, calentadores de agua, grifos o bien

por la filtración de cadmio a las aguas subterráneas a partir de lodos que contengan óxidos de cadmio (Manahan, 2006).

Por otro lado, las concentraciones de cadmio en el aire de zonas rurales son de 0.001-0.005 $\mu\text{g m}^{-3}$ y de 0.050 a 0.060 $\mu\text{g m}^{-3}$ en áreas urbanas, mientras que en aire de áreas industriales puede llegar a alcanzar valores de 9.1 a 26.7 $\mu\text{g m}^{-3}$. En suelos, la concentración de cadmio es de 0.07 a 1.1 mg kg^{-1} . En suelos contaminados, se han detectado concentraciones entre 1 a 69 mg kg^{-1} . Por otro lado, la concentración de Cd en lodos contaminados se encuentra en valores de 300-400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se estima que la lixiviación promedio del Cd es de 2.56 $\text{g Cd ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ (Ramírez, 2002).

Normalmente, en aguas no contaminadas, la concentración de Cd se encuentra por debajo de 0.001 mg L^{-1} . Mientras que, en aguas superficiales contaminadas como ríos se puede encontrar una concentración entre 10 o incluso hasta 500 mg L^{-1} de Cd. Para zonas oceánicas la concentración de Cd se encuentra en un rango de 0.5 a 10 mg L^{-1} (WHO, 2011). A inicios del año 2000 se encontró un incremento de Cd en el hielo de Groenlandia alrededor de 2 pg g^{-1} (ICdA, 2011).

Sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S. EPA) establecen los Límites Máximos Permisibles (LMP) del Cd como ion Cd^{2+} en aguas para consumo humano en valores de 0.003 a 0.005 mg L^{-1} , respectivamente (U.S. EPA, 2012; WHO, 2017). En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 establece los LMP para metales contenidos en aguas para uso agrícola y urbano, así para el Cd se establece el rango de 0.1-0.2 mg L^{-1} . No obstante, para la Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que establece los límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, existen discrepancias con la NOM-001-ECOL-1996 respecto a los LMP del Cd en agua para uso y consumo humano a un valor de 0.005 mg L^{-1} equivalente a lo dictaminado por la U.S. EPA; para la NOM-002-ECOL-1996 que establece los LMP de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas alcantarillado urbano o municipal, se estima de Cd total un promedio mensual de 0.5 mg L^{-1} y un promedio diario de emisión a una concentración de 0.75 mg L^{-1} .

En lodos, la concentración de Cd se encuentra en un rango 0.21 a 11.80 mg Kg^{-1} .

A pesar de la baja concentración de Cd en aguas no contaminadas, su potencial de contaminación se debe a la alta persistencia del Cd en suelos que suele llegar hasta los 300 años con una lixiviación

importante en aguas subterráneas. Además, en los diferentes ecosistemas acuáticos su persistencia se encuentra entre los 4 a 10 años (U.S. EPA, 2016).

En la actualidad, las tendencias del uso del cadmio y sus compuestos se han visto sujetas a variaciones, debido a la incorporación de reglamentos más estrictos en materia ambiental y sanitaria, por su potencial de toxicidad. Justamente, en ciertos países han reducido las emisiones de cadmio, por ejemplo, en Finlandia, redujo su emisión de 6.3 toneladas a 1 tonelada entre 1990 y 1997 (ATSDR, 2012).

Cuando este metal entra al ecosistema acuático (en condiciones ácidas se incrementa la solubilidad del Cd) es potencialmente tóxico y es transferido a lo largo de la cadena trófica (Wright & Welbourn, 1994; Ruangsomboon & Wongrat, 2006). Entre las respuestas tóxicas en organismos fitoplanctónicos, 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 clave en la actividad fotosintética y en biodisponibilidad y captación del nitrógeno (ej. glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa SOD, RuBisCO, nitrato reductasa, nitrogenasa, entre otras) y factores de transcripción (Devriese et al., 2001; Sivakumar et al., 2010; Chia et al., 2015; 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 $M(H_2O)_x^{n+}$ como en complejos iónicos orgánicos e inorgánicos. Las formas solubles del metal (en asociación con cloruros, sulfhidrilo, hidroxilo y grupos tiol como se observa en la Figura 1.6) 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 et al., 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 et al., 2003).

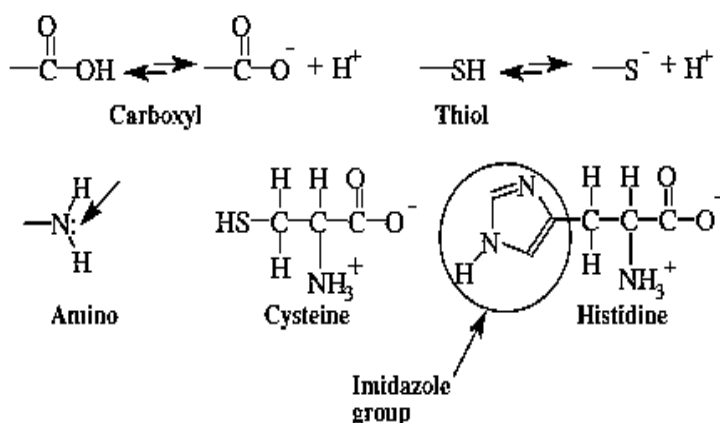


Figura 1.6. Principales grupos funcionales donde se unen los iones metálicos (Cd^{2+}). Tomado de Manahan, 2003.

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_2 y fijación de CO_2 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). Los metales tóxicos al afectar a las comunidades fitoplanctónicas, 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).

1.0.2. Dinámica de población: Tolerancia, resistencia y adaptación

Cuando los contaminantes ingresan a un ecosistema, las especies dentro de él pueden verse afectadas, es decir, el número de algunas especies disminuirá pudiendo llegar a 0 (curva i-Figura 1.7), por lo que la tasa de crecimiento disminuye de forma constante y se podría llegar a una extinción local. Como se muestra en la Figura 1.7, otra alternativa es que el número de población puede disminuir, pero a un nivel más bajo y la población puede persistir si la contaminación perdura (curva ii-contaminación crónica), por lo que la tasa de crecimiento es 0, en otras palabras se reduce inicialmente, pero después se estabiliza. Una tercera posibilidad es que el tamaño de la población aumente inicialmente y su tasa de crecimiento sea positiva (curva iii).

Si la contaminación es crónica, la evolución de las especies da lugar a la resistencia dentro de la población expuesta permitiendo que los números de población aumenten a un nuevo equilibrio (curva iv-Figura 1.7). Si, por el contrario, la contaminación es transitoria la población puede eventualmente recuperarse, ya sea elevándose del nivel al que estaba deprimida por la presencia de contaminantes (curva iv), o volviendo a través de la recolonización de la inmigración de especies si los contaminantes hubieran provocado que la población se extinguiera (curva v) (Walker et al., 2012).

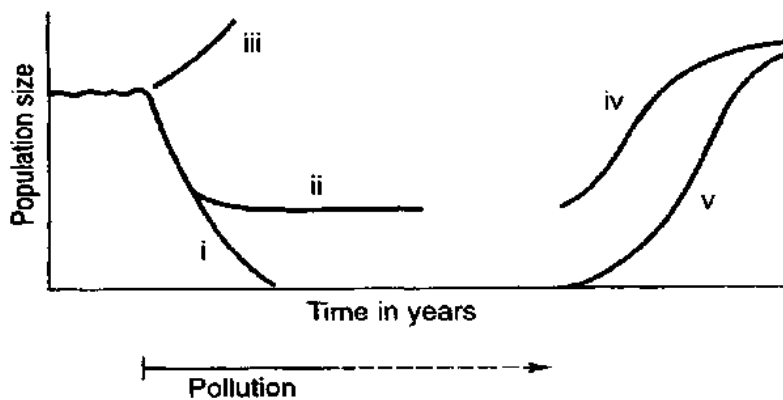


Figura 1.7. Posibles respuestas de la población expuesta a contaminantes. Tomado de Walker et al., 2012.

Entre los conceptos clave para comprender la dinámica de población en un ambiente contaminado, es la “**tasa de crecimiento poblacional**” que se define como el aumento de la población por unidad de tiempo dividido entre el número de individuos de la población. Este parámetro depende, además, de la densidad de población, es decir, un incremento del número de individuos de la población

reduce la tasa de crecimiento poblacional por lo que su valor es negativo, o por el contrario bajas densidades poblacionales incrementan la tasa de crecimiento, siendo un valor positivo (Figura 1.8). Si existe un equilibrio entre la densidad poblacional y la tasa de crecimiento poblacional, el valor neto es 0 a este equilibrio se le denomina “**capacidad de carga del medio ambiente (K)**”. Es decir, no solamente influyen factores bióticos sino factores ambientales (temperatura, intensidad lumínica, concentración de CO_2 , nutrientes como fosfatos, sulfatos, incremento de la concentración de oxígeno disuelto, presencia de contaminantes como metales, compuestos orgánicos, etc.), con influencia directa en la tasa de crecimiento poblacional de diferentes sistemas biológicos (por ejemplo, comunidades fitoplanctónicas) (Walker et al., 2012; Bertram & Masel, 2019).

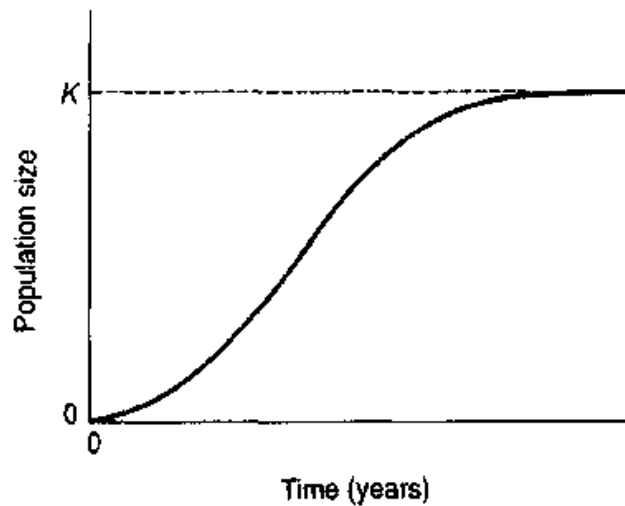


Figura 1.8. Curva de crecimiento poblacional. Cuando la densidad es baja, la tasa de crecimiento poblacional asciende exponencialmente (Lado izquierdo de la curva). A medida que la densidad de población se acerca a la capacidad de carga (K), la tasa de crecimiento de la población disminuye (fase estacionaria). Tomado de Walker et al., 2012.

Por otra parte, la tasa de crecimiento poblacional depende de características y capacidades de los individuos como el éxito reproductivo y de supervivencia en el ecosistema en que se encuentre, es decir, la “**eficacia, aptitud biológica o fitness**” describe la probabilidad de un genotipo determinado para dejar descendientes en la siguiente generación. En otras palabras, es la capacidad de un genotipo de sobrevivir, presentar mayor tasa de reproducción, producir descendientes y heredar sus genes a la siguiente generación (a través de *selección natural y sexual*). La aptitud biológica también puede entenderse como el resultado de la diferencia entre organismos en rasgos fenotípicos y, por lo tanto, en características genéticas, pero también de factores ambientales y la

co-interacción en comunidad, y varía entre 0 y 1 (Figura 1.9), (Darwin, 1859; Wallace, 1866; S. P., 1870; Grafen, 2007).

Para cuantificar la aptitud, el “*Parámetro maltusiano de eficacia biológica (m)*” mide la tasa máxima de crecimiento de un genotipo dentro de una población en un tiempo determinado (Crow & Kimura, 1970):

Ecuación 1.1. Parámetro maltusiano de eficacia biológica (Crow & Kimura, 1970)

$$m = \text{Log}_e \frac{(N_t/N_0)}{t}$$

Dónde m , corresponde al parámetro maltusiano de eficacia biológica, N_t corresponde al tamaño final de individuos de la población, N_0 es el tamaño inicial de población, y t es el tiempo necesario para finalizar los procesos del ciclo celular (secuencias de replicación y duplicación del ADN).

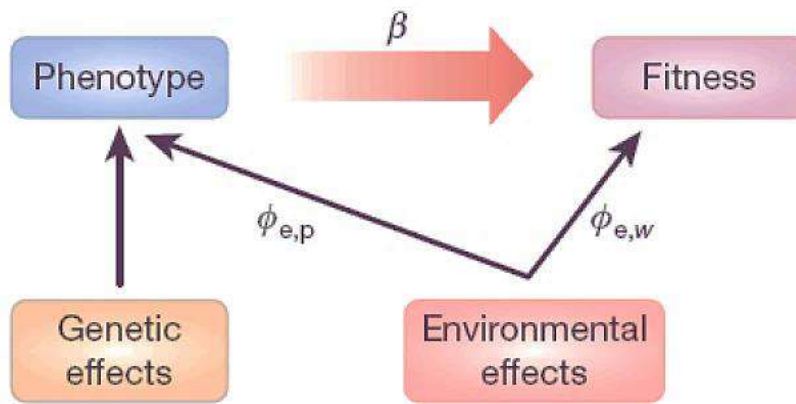


Figura 1.9. Efectos genéticos y ambientales en la respuesta en el fitness o eficacia biológica de una población o individuo. Original de Arnold, 1983.

En este sentido, el “*coeficiente de selección (s)*” calcula la tasa de cambio que tiene un fenotipo particular dentro de una población, esto permite comparar la calidad del genotipo de una población; por ejemplo, si un coeficiente de selección es igual a 100, se entiende que uno de cada 100 individuos presenta un error en la reproducción fenotípica y por tanto en la transmisión de los genes

a la siguiente generación. Esto permite la clasificación de mutaciones de acuerdo con su comportamiento evolutivo a largo plazo, por lo que las mutaciones perjudiciales se seleccionarán y no se fijarán en una población. De otra manera, las mutaciones neutrales se acumularán por deriva aleatoria como si no tuvieran ningún efecto sobre la aptitud, y las mutaciones benéficas o con funciones sobre la supervivencia se acumulan más rápido que los neutrales debido a una selección positiva como se exhibe en la Figura 1.10 (Jaffe, 2016).

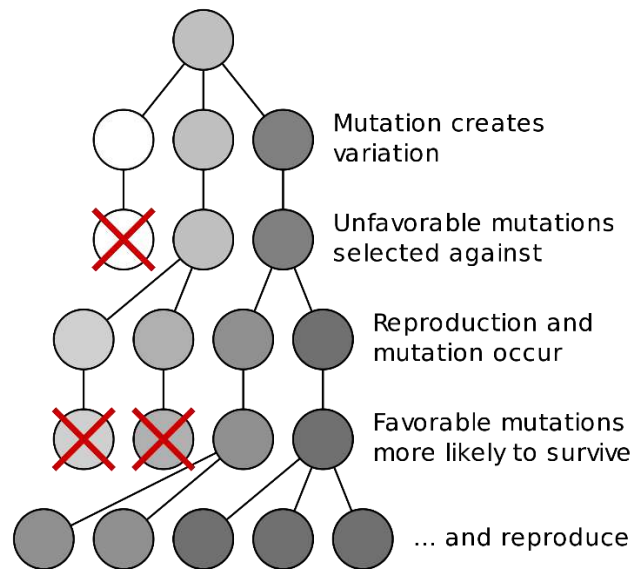


Figura 1.10. Fluctuación en la tasa de mutaciones deletéreas y mutaciones benéficas que incrementen la supervivencia y la transferencia de genes a la siguiente generación. Modificado de Luria & Delbrück, 1943.

Dentro del contexto, las mutaciones afectan la eficacia biológica de dos formas: 1) una porción de mutaciones deletéreas reduce o incluso inhiben totalmente la transmisión de los genes que son aptos; y 2) otra porción de mutaciones afecta la aptitud de manera continua al alterar los rasgos fenotípicos. Por lo tanto, en contraste con las mutaciones deletéreas, este segundo tipo de mutaciones tiene una probabilidad mayor de sobrevivir a la próxima generación, y pueden ser compensadas por una segunda mutación, si esta última mueve el genotipo hacia una mutación óptima para incrementar la aptitud del genotipo (Figura 1.11) (Martin & Gandon, 2010).

Nagel, (2007) indica que el mecanismo de las mutaciones puntuales se produce en lugares próximos a sitios de rotura del ADN, como consecuencia de la actividad de los sistemas de reparación que involucran proteínas de recombinación, la síntesis de ADN por polimerasas de baja

fidelidad, y la inducción de las respuestas celulares tipo SOS. Estas roturas en el ADN inducen la inestabilidad y los cambios genómicos.

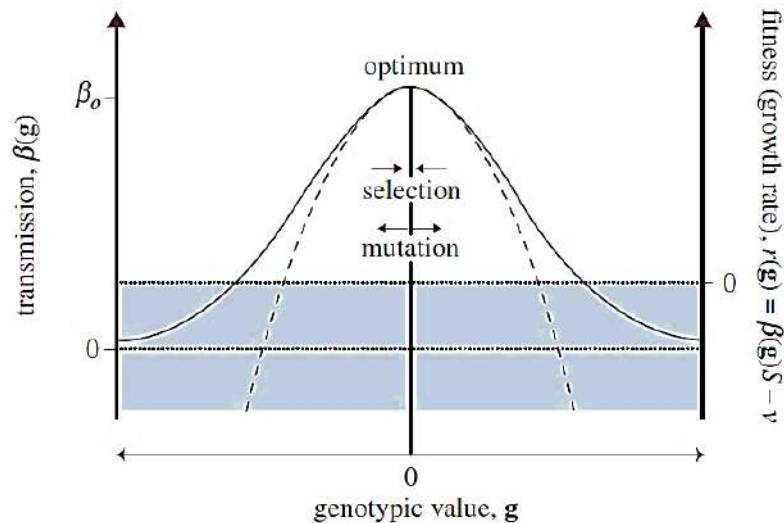


Figura 1.11. Respuesta de la eficacia biológica con forma de distribución Gaussiana de la selección de los genotipos con mayor aptitud en sitios no contaminados por el número de mutaciones que pueden presentarse. Tomado de Martin & Gandon, 2010.

En general, una contaminación crónica produce la expresión de genes de los cuales antes del cambio ambiental se encontraban silenciados o por mutaciones pre-adaptativas (mencionado anteriormente), expresando una mayor inducción enzimática o expresión de bombas de eflujo en procesos de detoxificación, etc. Así pues, la variación genética es de suma importancia ya que permite la distinción de sobrevivientes de los no sobrevivientes en un ecosistema altamente contaminado a través de la selección de las mutaciones benéficas (Figura 1.10 y Figura 1.11). Esta supervivencia, por tanto, dependerá de la presencia de genes principales (es decir, de alelos dominantes o de efectos grandes) que le permitan la resistencia a una gran cantidad de xenobióticos, igualmente de la tasa de mutaciones. Sin embargo, la resistencia conlleva un coste en la aptitud biológica del alelo o biotipo resistente, presentando una disminución en el crecimiento, reproducción, mayor gasto energético en el desarrollo de los mecanismos de adaptación en el ambiente en el cual no se desarrolló su resistencia (por ejemplo, la síntesis de prolina en la resistencia a Cd en microalgas exige que se gaste 1 ATP y 2 NADPH + H⁺ en el proceso, ver “*mecanismos moleculares de resistencia a metales*”) (Ernst, 2006).

En otras palabras, la presencia de alelos resistentes es favorecida en sitios contaminados o en presencia del o los agentes contaminantes, pero su selección se da en ambientes no contaminados, es decir, a través de la selección de genes pre-existentes y/o por mutaciones pre-adaptativas (Walker et al., 2012).

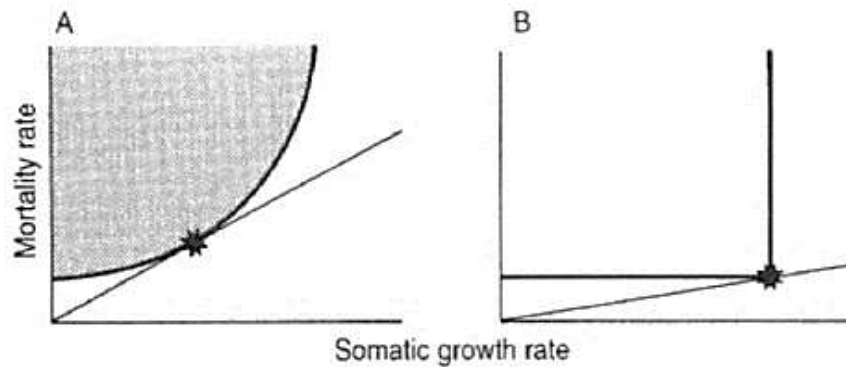


Figura 1.12. Curvas de compensación (trade-off) o supervivencia en: **A:** Ambientes contaminados. **B:** Ambientes no contaminados. Tomado de Walker et al., 2012.

En la Figura 1.12, si las curvas de compensación presentan diferentes formas, el resultado evolutivo (marcada con un asterisco*) implican mayores estrategias de defensa a través de diferentes mecanismos de resistencia en sitios contaminados.

De acuerdo con Ernst, (2006), la adaptación a metales y, por lo tanto, la evolución del metabolismo en sistemas biológicos fotoautótrofos como microalgas, se puede lograr aumentando la tolerancia de la población a niveles más altos de metales (Figura 1.13).

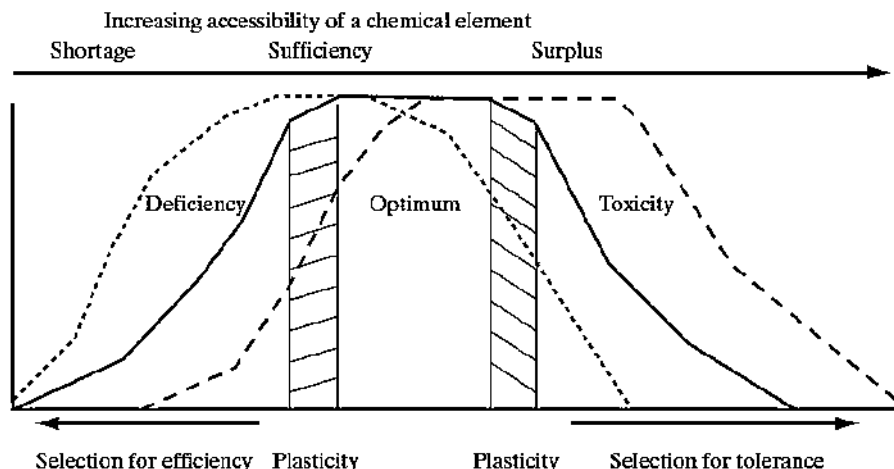


Figura 1.13. Respuestas de tolerancia y adaptación de organismos fotoautótrofos expuestos a metales y la selección de los genotipos tolerantes. Tomado de Ernst, 2006.

Dentro de estos mecanismos, la resistencia y tolerancia a metales en términos generales, son utilizadas para definir que algunos organismos autótrofos pueden sobrevivir y reproducirse a concentraciones elevadas de metales, y que en ocasiones estos contaminantes pueden causar la letalidad en organismos sensibles de la misma especie o de diferentes (Ernst et al., 2008). Sin embargo, la resistencia se alcanza mediante dos mecanismos básicos: “*evasión*” y la tolerancia. Dónde *evasión* indica que ciertas células fotosintéticas (por ejemplo, géneros de microalgas) en realidad no han sido expuestos a altas concentraciones metálicas y no presentan en sus tejidos ningún índice de dicha exposición. No obstante, la tolerancia como se ha mencionado anteriormente, la célula tiene la capacidad de sobrevivir a pesar de las elevadas concentraciones de metales incluso cuando se presenta la bioacumulación de los mismos. Por tanto, la resistencia se encuentra mediada por mecanismos genéticos mostrando esta respuesta heredable a la progenie (Baker, 1987).

Sin embargo, la principal diferencia entre tolerancia y resistencia de un genotipo se define a partir de que, la tolerancia es la capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación del agente selectivo (contaminante); además, la particularidad de una especie tolerante es que nunca antes estuvo expuesta al agente selectivo. Mientras que, la evolución de la resistencia surge como resultado de la selección inducida por el uso o aplicación continua del agente a partir de dichas mutaciones pre-adaptativas que ocurren al azar. Así pues, la aplicación o la exposición del agente actúa seleccionando y eliminando a los individuos susceptibles,

permitiendo la supervivencia de los individuos más aptos convirtiéndose en las especies predominantes (Walker et al., 2012).

Existen pocos estudios sobre una conexión directa entre las tasas de mutaciones. Sin contar que, las microalgas (cianobacterias y microalgas eucariotas) son organismos haploides, unicelulares y la mayoría de sus géneros presentan reproducción asexual (auto esporulación en los géneros de las clorofíceas *Scenedesmus*, *Dictyosphaerium*) con altas densidades poblacionales (Costas et al., 2001; López-Rodas et al., 2008). Además, es importante tener en cuenta que la aptitud de un alelo depende del entorno en el que viven sus portadores, es decir, si el entorno se altera, la aptitud del alelo puede cambiar. En estos términos, un alelo puede definirse como resistente si aumenta la aptitud en un ambiente contaminado. Por el contrario, si se afecta la tasa de mortalidad, pero no la tasa de producción, la selección actúa para minimizar la tasa de mortalidad. Es más probable que la resistencia evolucione si la tasa de mutación es alta, el coste de la aptitud de la resistencia sea bajo y la densidad de individuos sea alta (mayor número de especies en común en una población) (Walker et al., 2012). Esto supone que, las mutaciones o la activación de genes inducen una elevada presión sobre la selección de los genotipos, por ejemplo, se pueden inducir transformaciones en la estructura celular, ya sea una reducción en el volumen y superficie celular para incrementar la captación lumínica y reducir el gasto energético en microalgas (Belfiore & Anderson, 2001; López-Rodas et al., 2006).

1.0.2.1. Estudios sobre la resistencia de metales en microalgas

Varios informes científicos han puesto en evidencia la aparición de cepas de microalgas de agua dulce (géneros de *Stigeoclonium* y *Scenedesmus*) resistentes a la exposición de distintos metales (Pawlik-Skowrońska, 2001; Baos et al., 2002). En otros estudios sobre cepas de la clorofícea de agua dulce *Dictyosphaerium chlorelloides* se han hecho investigaciones sobre la sensibilidad en la cepa tipo salvaje ($Dc1M^{wt}$) debido a la exposición de Cr^{6+} , evidenciando una destrucción masiva celular de la mayoría de la población, no obstante, se encontraron algunas cepas variantes

resistentes con viabilidad sobre ambientes contaminados con este metal (Sánchez-Fortún et al., 2009; Pereira et al., 2009; D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2013).

A partir de estos antecedentes, la capacidad de los metales de acumularse en las células de microalgas que pudiera suscitarse a exposiciones continuas del contaminante metálico, provocaría esta resistencia debido a procesos adaptativos fisiológicos por estrés ambiental inducido por cambios en la expresión génica y estructural a través de la selección por mutaciones en el material genético formando genotipos resistentes al estrés abiótico (Belfiore & Anderson, 2001; López-Rodas et al., 2008; Sánchez-Fortún et al., 2009). Este argumento se encuentra sostenido de acuerdo con lo planteado por Baker, (1987), donde concentraciones de metales tóxicos actúan en ciertas poblaciones naturales de algunas especies fotosintéticas generando la selección de genotipos y variantes resistentes a metales. A pesar de esto, esta suposición conduce a “un cuello de botella” debido a que pocos individuos sobreviven para producir las siguientes generaciones resistentes por menor variabilidad genética (organismos con reproducción asexual-*trinquete de Müller*) (Gupta & Sandalio, 2012).

Así pues, los diferentes ecosistemas acuáticos, en especial los hábitats de agua dulce, suelen ser los receptores principales de una extensa variedad de contaminantes como herbicidas, sales metálicas, fertilizantes, plaguicidas, entre otros. Así, los organismos fitoplanctónicos son los sistemas biológicos que se encuentran más afectados de forma directa por los xenobióticos y mezcla de los mismos con diferentes respuestas de toxicidad, por lo que la evaluación de la resistencia y adaptación es de suma importancia en géneros de microalgas de agua dulce (Junghans et al., 2006).

De acuerdo con lo anterior, Huertas et al., (2010), estimaron la capacidad de diferentes grupos taxonómicos de microalgas (Chlorophyta, Cyanobacteria, Bacillariophyta, Haptophyta) en la tasa de adaptación a contaminantes como herbicidas (simazina), demostrando que, en relación con el grupo taxonómico, las clorofíceas *Scenedesmus intermedius*, *Dictyosphaerium chlorelloides* y *Tetraselmis suecica*, mostraron una mayor capacidad de adaptación a la simazina (270, 90 y 10 veces en incremento de adaptación, respectivamente), también se estimó que su tasa de división y crecimiento poblacional fueron altas (1 duplicación cada 3-4 días); mientras que la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* su tasa de mutaciones y de adaptación fueron bajas (tasa de adaptación 9 veces y 1 duplicación cada 4-5 días) como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1.1. Características de los diferentes grupos taxonómicos de microalgas implicadas en la adaptación a herbicidas (simazina). Tomado de Huertas et al., 2010.

Species	Adaptation increase (times)	Ploidy level	Cell division ¹	Habitat
Chlorophyta				
<i>Scenedesmus intermedius</i>	270	Haploid	Rapid	Continental
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	90	Haploid	Rapid	Continental
<i>Tetraselmis suecica</i>	10	Haploid	Rapid	Coastal
Cyanobacteria				
<i>Microcystis aeruginosa</i> (3D)	9	Haploid	Moderate	Continental
<i>M. aeruginosa</i> (6D)	9	Haploid	Moderate	Continental
<i>M. aeruginosa</i> (7D)	9	Haploid	Moderate	Continental
Bacillariophyta				
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4.5	Diploid	Rapid	Coastal
Haptophyta				
<i>Emiliania huxleyi</i> (CCMP373)	3	Haploid	Slow	Oceanic
<i>E. huxleyi</i> (CCMP371)	1.5	Haploid	Slow	Oceanic
<i>E. huxleyi</i> (CCMP372)	1.5	Haploid	Slow	Oceanic
<i>Isochrysis galbana</i>	1.5	Haploid	Moderate	Oceanic
<i>Monochrysis lutheri</i>	1.5	Haploid	Moderate	Oceanic
¹ Cell division: rapid, 1 doubling every 3-4 d; moderate, 1 doubling every 4-5 d; slow, 1 doubling every 5-7 d				

Estas diferencias en la adaptación, se deben a que los géneros de las microalgas clorofíceas (*Scenedesmus intermedius* y *Dictyosphaerium chlorelloides*) son de agua dulce (receptores principales de vertidos agrícolas e industriales), por lo que generalmente ya han estado expuestas a concentraciones de herbicidas y otros contaminantes, lo que justifica mayor tasa de mutaciones para la supervivencia, seguido de las microalgas costeras (*Tetraselmis suecica*). Por el contrario, el grupo más sensible estaba formado por microalgas oceánicas (sin exposición previa a simazina u otros contaminantes). Por lo tanto, Huertas et al., (2010) y López-Rodas et al., (2011), plantean que la capacidad de adaptación de los organismos fitoplanctónicos depende de una historia evolutiva previa.

Asimismo, las algas eucariotas (macro y microalgas) son un grupo único de organismos que muestran una amplia variedad de patrones reproductivos. Es decir, se pueden encontrar varios patrones asexuales desde la división simple en dos células, que es la fisión binaria, hasta la formación de cuatro y hasta varios miles de células hijas en un solo ciclo celular (por ejemplo, ciertos géneros de microalgas verdes se dividen por fisión múltiple y autoesporulación), o de forma

sexual por gametogénesis. Además, en algunas especies de algas, se puede observar la fisión tanto binaria como múltiple en el mismo organismo, ya sea bajo diferentes condiciones de crecimiento o en diferentes fases del ciclo celular como es el caso del género *Scenedesmus* (Zachleder et al., 2016).

A partir de estos antecedentes, *Dictyosphaerium chlorelloides* presenta mayor capacidad de adaptación debido a su haploidía. Esto supone que, los organismos haploides responderán a la selección más rápidamente que los diploides porque las mutaciones no neutrales se expresan inmediatamente. Además, la tasa de crecimiento también está involucrada en la adaptación, ya que un mayor número de generaciones durante un tiempo determinado permite una evolución adaptativa más rápida (López-Rodas et al., 2011).

1.0.3. Phylum Chlorophyta: género *Dictyosphaerium*

Las microalgas pertenecientes al Phylum Chlorophyta se caracterizan por presentar cloroplastos con doble membrana que carecen de retículo endoplasmático (ER) y usualmente se encuentran asociados con el pirenoide, contienen almidón como polisacárido de reserva (amilosa y amilopectina), presentan generalmente los tilacoides apilados, y contienen como pigmentos principales la clorofila *a* y *b*, y el principal pigmento accesorio de los carotenoides es la luteína. Las clorofitas son especialmente de agua dulce en un 90%, mientras que solo alrededor del 10% de especies son de agua marina (costera y oceánica). Las especies de agua dulce tienen una distribución cosmopolita, con pocas especies endémicas en un área determinada (Lee, 2018).

El clado Chlorophyta contiene las tres clases de algas monofiléticas Chlorophyceae, Trebouxiophyceae y Ulvophyceae, y la clase parafilética (o convexa) Prasinophyceae (Bock, 2011). Las células de la clase Trebouxiophyceae ocupan una amplia gama de hábitats diferentes y son miembros destacados de las comunidades fitoplanctónicas de lagos y ríos.

1.0.3.1. Descripción del género *Dictyosphaerium* Nägeli

Entre la clase Trebouxiophyceae se encuentra el género *Dictyosphaerium* Nägeli, que se caracteriza por formar colonias flotantes, esféricas a irregulares con 4 a 64 células incrustadas en una envoltura común, con un tamaño entre 10 a 100 µm de diámetro. Las células se encuentran perpendiculares a la superficie de la colonia unidas a los extremos de los tallos delgados que emergen del centro de la colonia y se ramifican de forma dicotómica o tetracotómica (Figura 1.14). Las células de este género se presentan en forma esférica, oval a elipsoidal o cilíndrica, con un tamaño de 1-10 µm de diámetro o longitud. Las paredes celulares generalmente son lisas, aunque la especie de *D. granulatum* se caracteriza por su pared celular áspera, y este género no presenta espinas. Asimismo, se caracterizan por ser células uninucleadas, sus cloroplastos se encuentran en posición parietal y en forma de copa, generalmente únicos en células vegetativas, o a menudo dos en células maduras o cuando se encuentran en división. Presentan pirenoides individuales por cloroplasto (Figura 1.15) (Komárek & Perman, 1978). Su reproducción es vía autoesporulación con 2 a 4 autoesporas (células haploides), las esporas se liberan después de la ruptura de la célula parental y se adhieren a los restos de la pared parental (Figura 1.14). Los restos de la pared celular se convierten en tallos

mucilaginosos. Se forman colonias grandes que resultan de múltiples ciclos de formación de autoesporas. En este género se ha reportado reproducción sexual oogámica (gameto masculino móvil y de menor tamaño que el gameto femenino con forma alargada y dos flagelos apicales) únicamente en la especie *D. indicum* (Komárek & Perman, 1978). En la actualidad se conocen 32 especies de *Dictyosphaerium* (Guiry & Guiry, 2019).

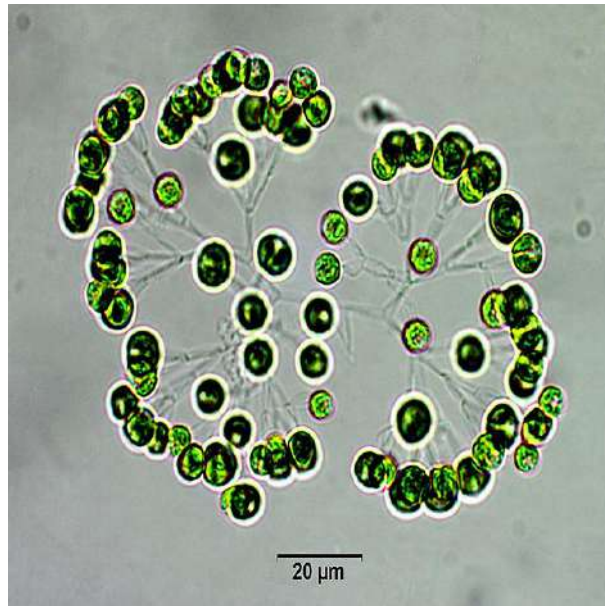


Figura 1.14. Colonia de *Dictyosphaerium pulchelum*. Las conexiones intercelulares de los restos de la pared celular parental son evidentes a partir de los extremos de los tallos de mucílago. Tomado de Guiry & Guiry, 2019.

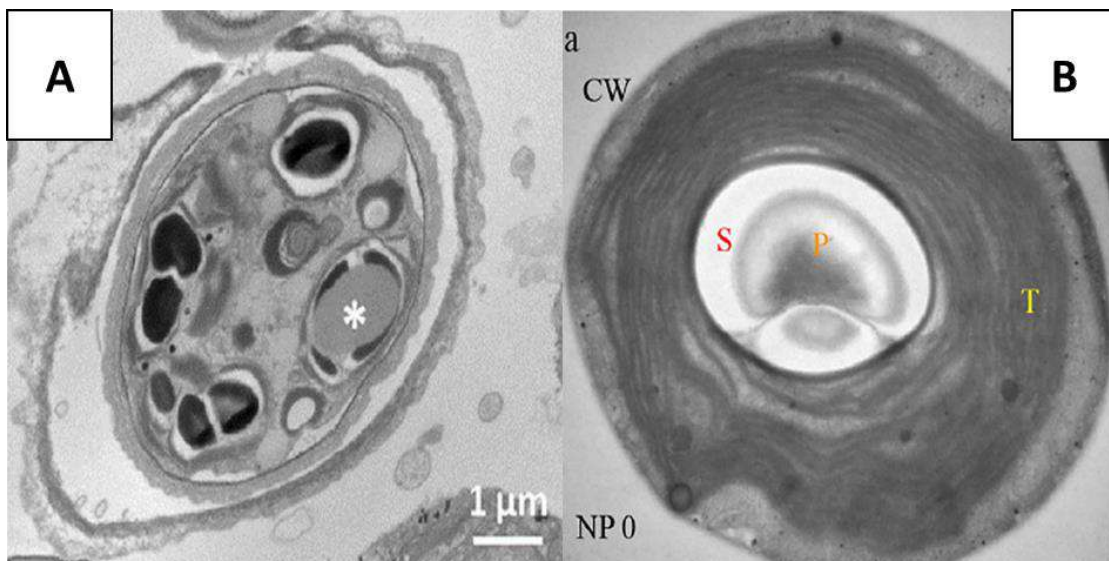


Figura 1.15. Ultraestructura por microscopía electrónica de: **A** célula de *Dictyosphaerium chlorelloides*, el asterisco (*) indica la localización del pirenoide. Magnificación a 15,000x. Tomado de D'ors et al., 2010. **B** célula de *Dictyosphaerium* sp. CW: pared celular, S: gránulos de almidón, P: pirenoide, T: tilacoides. Tomado de Cheng et al., 2019.

Una de las características particulares para todas las especies de *Dictyosphaerium* es la gran producción de mucílago difluente e incoloro (Figura 1.16). La excreción ocurre durante la liberación de las autoesporas y continúa durante la fase de crecimiento de las células individuales. Así, las envolturas de las diferentes células de la colonia se fusionan más tarde en una sola vaina de mucílago que la rodea y se origina en una célula madre (Komárek & Perman, 1978).

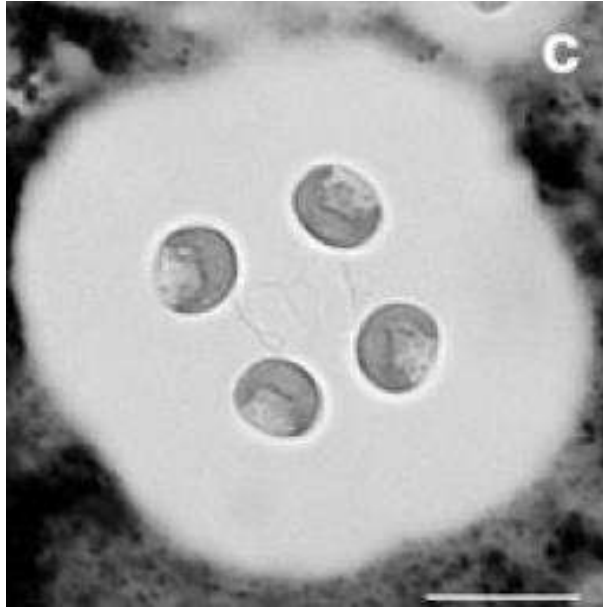


Figura 1.16. Microfotografía de una cepa de *Dictyosphaerium libertatis* (CCAP 222/92) rodeada de mucílago. Tomado de Bock et al., 2011.

Entre las funciones principales que desempeña el mucílago es reducir la densidad de la colonia y, por lo tanto, mejorar la flotabilidad de las células para tener una mayor captación lumínica. Asimismo, es un mecanismo de defensa contra la depredación zooplanctónica, ya que las partículas son muy grandes para ser ingeridas o filtradas por el zooplancton e incluso si las células se ingieren, el mucílago las protege durante la digestión para que puedan sobrevivir al paso a través del intestino del consumidor. Por otro lado, el mucílago actúa como un microhábitat para el microbiota bacteriano. Las bacterias heterótrofas pueden producir sustancias que proporcionan a las microalgas nutrientes adicionales o actúan como estimulantes de la división y crecimiento. Además, las microalgas pueden absorber nutrientes de las capas límite de la célula, ya que el mucílago es una forma económica para ahorrar energía y reducir costos metabólicos al aumentar

la posibilidad de captar nutrientes de la misma en situaciones de inanición o en ambientes oligotróficos como es el hábitat usual de este género (Reynolds, 2007).

Sin embargo, una de las funciones clave del mucílago es la permeabilidad selectiva, es decir, puede servir como un mecanismo de defensa contra la intoxicación por metales. Se ha estimado que la interacción de los grupos OH^- en los polisacáridos del mucílago con cationes metálicos tóxicos (por ejemplo, Al^{3+} , Cd^{2+}), reduce la absorción del metal al interior de la célula (Freire-Nordi et al., 1998).

1.0.4. Ecología, distribución y descripción de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman, 1978)

Dictyosphaerium chlorelloides (Nauman) (Komárek & Perman, 1978) es una especie cosmopolita, su hábitat se localiza en agua dulce y en suelos, también se puede encontrar en aguas ácidas oligotróficas o mesotróficas principalmente de Europa (Alemania, España, Reino Unido), Norte de América (México), Sur de América, África (Kenia, Zambia, Túnez), Australia y Asia. Su clasificación taxonómica se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1.2. Clasificación taxonómica de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman, 1978)

<i>Empire</i>	<i>Eukaryota</i>
<i>Kingdom</i>	<i>Plantae</i>
<i>Subkingdom</i>	<i>Viridiplantae</i>
<i>Infrakingdom</i>	<i>Chlorophyta</i>
<i>Phylum</i>	<i>Chlorophyta</i>
<i>Subphylum</i>	<i>Chlorophytina</i>
<i>Class</i>	<i>Trebouxiophyceae</i>
<i>Order</i>	<i>Chlorellales</i>
<i>Family</i>	<i>Chlorellaceae</i>
<i>Genus</i>	<i>Dictyosphaerium</i>
<i>Specie</i>	<i>Dictyosphaerium Chlorelloides</i> (Nauman) Komárek & Perman, 1978

Sinónimos: *Dictyosphaerium minitum* J.B. Petersen, *Dictyosphaerium simplex* Korshikov (Guiry & Guiry, 2019). Especie mesófila que crece a temperaturas entre 15 y 21 °C e incluso a 25 °C, por lo que no es posible su supervivencia a largo plazo a temperaturas superiores a 30 °C. Su incidencia fotónica óptima se encuentra en un rango de 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kumar et al., 2017). No obstante, sus valores de intensidad fotónica donde se produce saturación de la tasa fotosintética en la evolución de oxígeno varían entre 80 a 275 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (García-Villada et al., 2002).

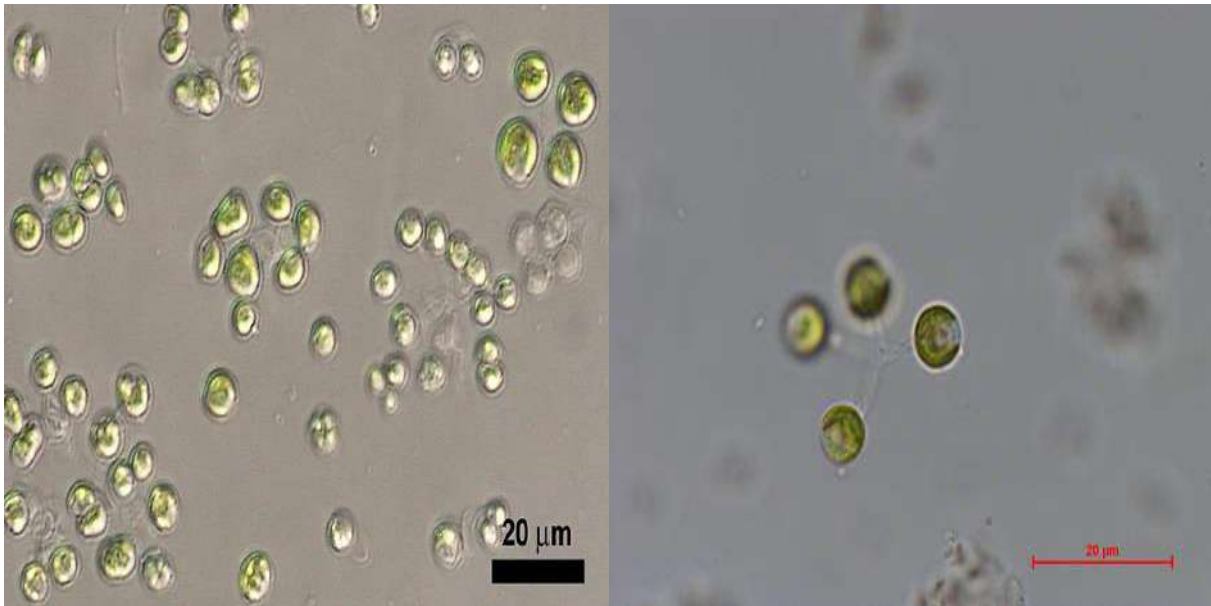


Figura 1.17. Células de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman, 1978). Tomado de Guiry & Guiry, 2019.

Forma colonias que pueden medir de 10 a 46 μm de diámetro, pueden ser tetraédricas o esféricas normalmente con 2 a 4 células, rara vez forman colonias de 16 células, las células miden de 3.5 a 9 μm de diámetro (Figura 1.17). Las células jóvenes tienen forma esférica, mientras que las células maduras van de esférica a ovoide. En la colonia están unidas de forma lateral con los remanentes de la pared celular parental. La pared celular es delgada y lisa (Figura 1.15A), el cloroplasto al igual que el género tiene forma de copa y basal. Su reproducción también es asexual a través de autoesporulación formando de 2 a 4 autoesporas de 3-6 x 2-6 μm por cada esporangio (John et al., 2002).

Esta especie produce exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos intracelulares (IPS) en valores máximos de 1075 y 2130 mg L⁻¹, respectivamente. La producción de los EPS en condiciones de altas incidencias fotónicas (valores cercanos a 100 μmol m⁻² s⁻¹) y temperatura de 26 a 28 °C en *D. chlorelloides*, revelan que es un mecanismo de adaptación inducidos por el calor y la desecación (Kumar et al., 2017).

Posteriormente, Halaj et al., (2018), realizaron el análisis de la composición química del exopolisacárido de *D. chlorelloides*, y revelaron la presencia en % de peso de galactosa y sus derivados metilados en un 42%, ramnosa 18%, manosa 14% y metilhexosas 12%, como los azúcares dominantes (86%). Además, determinaron otros azúcares en menor cantidad como glucosa y su derivado metilado en 8%, xilosa y derivado metilado en 4%, y arabinosa 2%. En este mismo estudio, también reportaron la composición de aminoácidos de las proteínas presentes en el biopolímero en la microalga, el dominio de la asparagina (Asp), glutamina (Glu), leucina (Le), glicina (Gly), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr) y alanina (Ala), que representan aproximadamente el 50% en peso de proteína de *D. chlorelloides*.

Por otro lado, existen varios estudios que demuestran la utilización de *D. chlorelloides* como modelo en la evolución de la resistencia a contaminantes como herbicidas (DCMU y simazina) y metales (Cr⁶⁺, Cr³⁺), a través de la estimación de la tasa de mutaciones (μ) y la frecuencia en que se presentan los biotipos mutantes (q), indicando que esta microalga tiene una μ de 2.1×10^{-6} mutantes por célula por división y una frecuencia de 21×10^{-4} de no. de células resistentes por célula tipo salvaje (Costas et al., 2001; López-Rodas et al., 2001; Sánchez-Fortún et al., 2009; D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2013). Es decir, la microalga presenta una tasa de pre-adaptación rápida a la condición abiótica en que se encuentre sometida (Tabla 1.1).

1.1.MATERIAL Y MÉTODOS

1.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa tipo salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman, 1978), fue obtenida de la colección de cultivos de algas del Laboratorio de Toxicología ambiental y de la Unidad de Genética (Depto. De Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria) de la Universidad Complutense de Madrid, España. La obtención de la cepa resistente se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH. La cepa Dc1M^{wt} se cultiva en frascos de cultivo (Greiner Bio-One, Longwood, NJ, EE.UU.) en 20ml del medio de enriquecimiento BG-11 con un pH de 7.5 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) para el crecimiento axénico. Dc1M^{wt} se mantiene a 21 °C bajo una incidencia fotónica de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12h una longitud de onda de 400 a 700nm. Las células se mantienen en crecimiento exponencial por medio de transferencias de inóculo unicelular a un medio fresco cada dos semanas.

1.1.2. Inhibición de crecimiento poblacional en Dc1M^{wt} expuesta a Cd

La determinación de la respuesta inhibitoria del cadmio ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fue de grado analítico (pureza $\geq 99.0\%$), sobre el crecimiento poblacional de las cepas Dc1M^{wt} por ensayo estático con las diluciones preparadas al día para la determinación de cada respuesta.

La estimación de la inhibición de crecimiento poblacional se basó de acuerdo con la directriz (201) de la OECD (OECD, 2006), que consiste en el bioensayo de inhibición de crecimiento poblacional de microalgas de agua dulce debido a la exposición de distintas concentraciones de las sales metálicas a las 72h de exposición. Inicialmente, en cada tubo se incluyó una concentración de 1×10^5 cel mL^{-1} con ajuste por recuento sobre cámara de Neubauer (Brand Gmb H + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) a un volumen total de 10 mL de medio BG-11.

La evaluación se realizó a partir de los índices de toxicidad: Concentración Inhibitoria al 50% de la población y la Concentración Máxima sin Respuesta Observada a las 72h de exposición ($\text{CI}_{50(72)}$)

y 72h-NOEC, respectivamente) en un rango de concentraciones de 1-50 mg L⁻¹ en la cepa Dc1M^{wt}, con la cuantificación de la fluorescencia emitida por la clorofila utilizando filtros de emisión-excitación de 485-670 nm, respectivamente. A través de la lectura en placa en fluorímetro (Tecan Group Ltd., Switzerland) con n= 8 ensayos.

1.1.3. Obtención de la cepa Cd-resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides*

La obtención de la cepa Cd-resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides*, se basó mediante el test de Análisis de Fluctuación propuesta por Luria & Delbrück, 1943, y modificada por Costas et al., 2001 y López-Rodas et al., 2001, para organismos fitoplanctónicos en medio líquido. El propósito del test fue determinar la tasa y variación de mutaciones que permite la adaptación de la microalga al agente tóxico, en este caso al cadmio.

Esta metodología consistió en establecer 2 sets de la microalga: el 1er Set correspondió a una serie de 100 cultivos de *D. chlorelloides* tipo salvaje del cultivo madre con una concentración inicial de 10² cel ($N_0=10^2$ cel) para el crecimiento en medio BG-11 sin el agente selectivo (Cd) hasta una $N_t=10^5$ cel, a esta concentración celular se suplementó el BG-11 con la $CI_{50(72)}$ del CdSO₄ estimada en la sección del “*Inhibición de crecimiento poblacional en Dc1M^{wt} expuesta a Cd*”. El segundo Set correspondió a una serie de 25 cultivos a partir también del cultivo madre con una $N_0=10^5$ cel expuestas desde un inicio al agente tóxico en el medio BG-11. Si las células resistentes aparecen por mutaciones aleatorias antes de la exposición al agente tóxico se encuentra una gran variación (fluctuación entre los cultivos) de células resistentes por cultivo. El set 2 se establece como control el cual, si existen diferencias, es decir, la varianza del set 1 es mayor que en el set 2 corresponde a mutaciones que posiblemente ocurrieran antes de la exposición al agente (Diagrama 1.1.1).

Ambos sets se cultivaron por 60 días a los parámetros anteriormente comentados para permitir el crecimiento de poblaciones de la variante resistente al cadmio. Antes de los ensayos, los cultivos fueron reclonados (mediante el aislamiento de una sola célula) para evitar la inclusión de los mutantes espontáneos antes de la exposición en los cultivos de acuerdo con Costas et al., (2001).

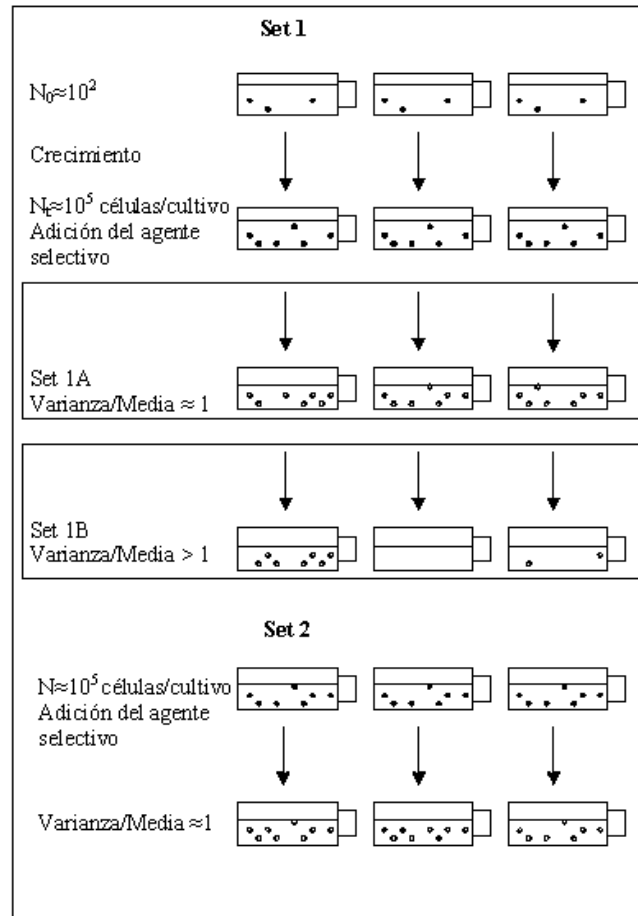


Diagrama 1.1.1. Análisis de fluctuación de mutantes en microalgas. Tomado de Costas et al., 2001 y López-Rodas et al., 2001.

1.1.4. Estimación del Parámetro Maltusiano de eficacia biológica

La cuantificación de la tasa máxima de crecimiento, se determinó a partir del Parámetro Maltusiano de eficacia biológica (m) (Crow & Kimura, 1970), como se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 1.1.1. Parámetro Maltusiano de eficacia biológica (Crow & Kimura, 1970)

$$m = \log_e \left(\frac{N_t/N_0}{t} \right)$$

Dónde, N_t corresponde a la concentración celular al final del ensayo; N_0 corresponde a la concentración celular al inicio del ensayo; y t pertenece al tiempo expresado en 3 días (72h).

El coeficiente de selección (s) mide la tasa de crecimiento máximo de las variantes sensibles y resistentes de *D. chlorelloides* en ausencia del agente selectivo:

Ecuación 1.1.2. Coeficiente de selección de tasa máxima de crecimiento en las cepas Cd-resistente y tipo salvaje de *D. chlorelloides* (Costas et al., 2001 y López-Rodas et al., 2001).

$$s = 1 - (m^r / m^s)$$

Dónde, m^r y m^s corresponden a las eficacias biológicas de la cepa Cd-resistente y tipo salvaje de *D. chlorelloides*, respectivamente.

El parámetro maltusiano de eficacia biológica fue estimado a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por la clorofila (Chl) de la cepa Cd-resistente obtenida y tipo salvaje Dc1M^{wt} como cepa control, utilizando filtros de emisión-excitación de 485-670 nm, respectivamente, a través de la lectura en placa en fluorímetro (Tecan Group Ltd., Switzerland) con n= 6 ensayos.

1.1.5. Estimación de diferencias morfológicas en la cepa Cd-resistente vs. cepa tipo salvaje de *D. chlorelloides*

Una vez obtenida la variante resistente de la microalga al Cd, se evaluaron los efectos fenotípicos en el tamaño celular a través de los modelos geométricos para el cálculo del volumen y superficie celular en fitoplancton establecidos por Hillebrand et al., 1999 y Sun & Liu, 2003. Este método aplica el principio de 20 modelos geométricos y sus respectivas ecuaciones a partir de las dimensiones lineales para más de 850 géneros de microalgas planctónicas. Utilizando una n= 50 células por cada cepa.

Dictyosphaerium chlorelloides muestra una forma esférica (modelo 1H-Tabla 1.1.1), para el cálculo de su volumen y superficie celular se basa de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

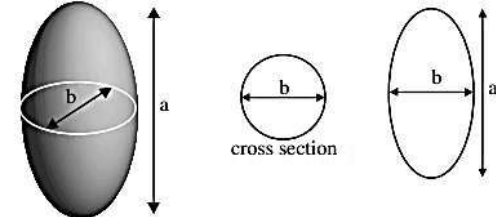
Ecuación 1.1.3. Cálculo del volumen (V) y superficie celular (A) de acuerdo con el modelo esférico (1H) (Hillebrand et al., 1999 y Sun & Liu, 2003).

$$V = \frac{(a^3) \cdot \pi}{6}$$

$$A = a^2 \cdot \pi$$

Dónde, V es el volumen, a es el diámetro y A es el área o superficie celular.

Tabla 1.1.1. Modelo geométrico esférico para la determinación del volumen y superficie celular en *D. chlorelloides*
Tomado de Hillebrand et al., 1999 y Sun & Liu, 2003.

Shape code	Simulated shape	Volume (V) and surface area (A) model
1-H	sphere 	$V = \frac{\pi}{6} \cdot a^3$ $A = \pi \cdot a^2$
2-H	prolate spheroid 	$V = \frac{\pi}{6} \cdot b^2 \cdot a$ $A = \frac{\pi \cdot b}{2} \left(b + \frac{a^2}{\sqrt{a^2 - b^2}} \sin^{-1} \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a} \right)$

La estimación de la morfología celular de Dc^{RCd100} comparada con Dc1M^{wt}, fue a través del análisis de imagen por microscopía óptica a 40x de magnificación (resolución de 12060010.61 y calibración al 100% de ajuste del zoom) (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) por cámara incorporada (AmScope Microscope Digital Camera, MU1000, FMA050, 5mm, 10MP, Color CMOS) e interpretación por el software AmScope versión 3.7.3377 (United Scope LLC, Irvine CA, U. S.).

1.2.ANÁLISIS DE DATOS

La determinación de cada uno de los índices de las cepas de *D. chlorelloides* Cd-resistente comparados con la cepa control tipo salvaje Dc1M^{wt} son expresados mostrando su media y su desviación estándar de cada valor ($\bar{x} \pm \sigma$). La determinación de la CI₅₀₍₇₂₎ y 72h-NOEC en Dc1M^{wt} se calculó a través de una curva Concentración-Respuesta por regresión no lineal, mostrando sus respectivos Límites de Confianza al 95%. La normalidad de los datos se evaluó por el Test de D'Agostino y Pearson, utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

La comparación de las respuestas de la cepa Cd-resistente (DcRCd) con respecto a la cepa tipo salvaje (Dc1M^{wt}) como cepa control, se estimó a partir de un T-test no pareado por corrección de la prueba de Welch para distintas variaciones y las diferencias se consideran significativas a $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó por el software Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

1.3.RESULTADOS

1.3.1. Inhibición de crecimiento poblacional en la cepa tipo control de *D. chlorelloides*

Los valores correspondientes a los índices de $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en la cepa Dc1M^{wt} previa a la generación de la cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* se exhiben en la siguiente tabla:

Tabla 1.3.1. Valores de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC del $CdSO_4$ y la equivalencia del ion Cd^{2+} en Dc1M^{wt} previa a la obtención de la cepa Cd-resistente. Se presentan los Límites de Confianza al 95%. n= 8

Compuesto	Dc1M ^{wt}
$CdSO_4 \cdot 8H_2O$	$CI_{50(72)}$: $11.57 mg\ CdSO_4\ L^{-1}$ (5.10-16.22) $0.79 mg\ Cd^{2+}\ L^{-1}$ $r = 0.98$ $y = 1.42X - 0.63$ (regresión lineal) $y = 16.98 + (100.1 - 16.98) / 1 + 10^{0.754 - X}$ (2.359) 72h-NOEC_{CdSO4} : 1.40 (0.23-3.40)

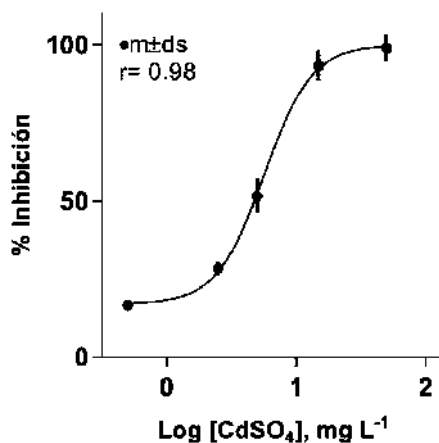


Gráfico 1.3.1. Curva Concentración-Respuesta del $CdSO_4$ a las 72h de exposición en la cepa tipo salvaje de *D. chlorelloides* (Dc1M^{wt})

Acorde con el Gráfico 1.3.1, la respuesta de la cepa tipo salvaje de *D. chlorelloides* incrementa conforme se aumenta la concentración del cadmio ($r = 0.98$), con la obtención de una $CI_{50(72)}$ de $11.57\ mg\ L^{-1}$ (equivalente a $100\ \mu M$ de Cd^{2+}) comportándose como altamente sensible a la exposición al Cd.

1.3.2. Eficacia biológica (m) de la cepa Cd-resistente (Dc^{RCd100}) comparada con la cepa control ($Dc1M^{wt}$)

Una vez obtenida la cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* por el Análisis de fluctuación, se estimó la eficacia biológica a partir del parámetro maltusiano de eficacia biológica (m) con respecto a la cepa control $Dc1M^{wt}$. Para Dc^{RCd100} se obtuvo un valor de m de $1.65 \pm 0.33 \text{ d}^{-1}$ con diferencias estadísticamente significativas comparada con $Dc1M^{wt}$ con una aptitud de $2.53 \pm 0.55 \text{ d}^{-1}$ ($p < 0.001$). Es decir, la capacidad para sobrevivir y dejar descendientes con la capacidad de resistencia de Dc^{RCd100} se reduce en un 34.78% (coeficiente de selección) en ausencia del agente selectivo (Cd) (Tabla 1.3.2 y Gráfico 1.3.2).

Tabla 1.3.2. Parámetro maltusiano de eficacia biológica (m) y coeficiente de selección de la cepa Cd-resistente (Dc^{RCd100}) vs. la cepa control ($Dc1M^{wt}$). $n=6$

Cepa <i>D. chlorelloides</i>	Malthusian fitness (m) d^{-1}	Coeficiente de selección (s)
Dc^{RCd100}	$1.65 \pm 0.33^{**}$	0.3478 ($1-s=0.6522$)
$Dc1M^{wt}$	2.53 ± 0.55	

******: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en Dc^{RCd100} con respecto a $Dc1M^{wt}$

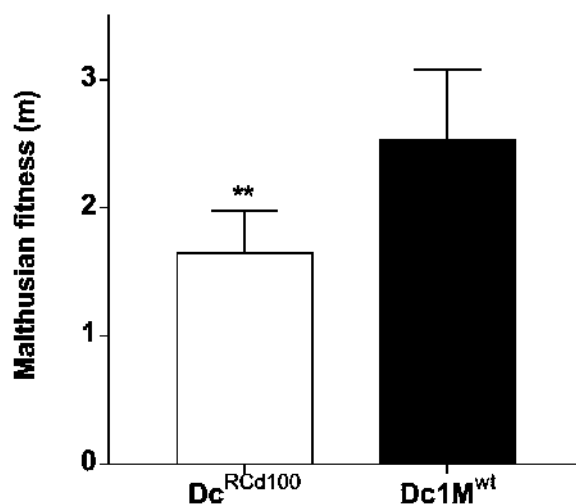


Gráfico 1.3.2. Eficacia biológica (m) de Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

Por lo que, la selección del genotipo resistente se selecciona en ambientes no contaminados por el Cd, pero, se incrementa su aptitud en presencia del metal.

1.3.3. Morfología celular de Dc^{RCd100} comparada con $Dc1M^{wt}$

La evaluación de modificaciones morfológicas exhibidas por la cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} presentó una reducción del 75% en el volumen celular, y 61% en la superficie celular marcando diferencias estadísticamente muy significativas con la cepa control $Dc1M^{wt}$ (Tabla 1.3.3).

Tabla 1.3.3. Volumen y superficie celular de Dc^{RCd100} comparada con $Dc1M^{wt}$. Se muestra la $m \pm ds$ y sus respectivos Límites de Confianza al 95%. $n = 50$ células.

Cepa	Volumen celular (μm^3)	Superficie celular (μm^2)
Dc^{RCd100}	0.06 ± 0.03 (0.05-0.21) ***	0.71 ± 0.22 (0.65-0.77) ***
$Dc1M^{wt}$	0.24 ± 0.11 (0.21-0.27)	1.82 ± 0.59 (1.65-1.99)
% Reducción	75.00 ± 2.70	61.00 ± 1.40

***: diferencias estadísticamente muy significativas en Dc^{RCd100} con respecto a $Dc1M^{wt}$

Esta reducción en el volumen y superficie celular, se reflejan como un costo en la aptitud de la cepa Cd-resistente en ausencia del metal, posiblemente con modificaciones fenotípicas (por ejemplo, en la pared celular) (Gráfico 1.3.3 y Figura 1.3.1).

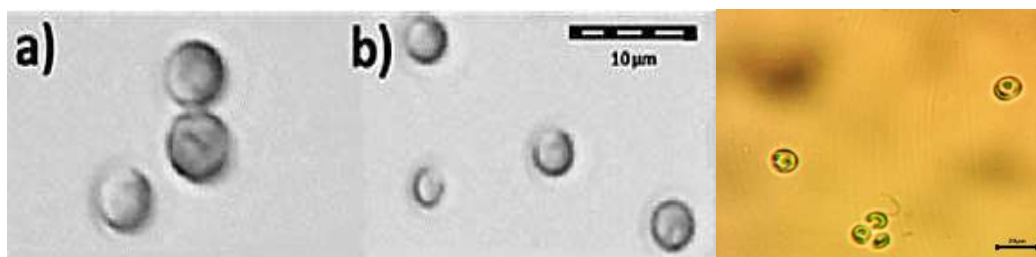


Figura 1.3.1. Diferencias en volumen y superficie celular de: a) $Dc1M^{wt}$, y b) Dc^{RCd100} en ausencia del Cd. $n = 50$ células.

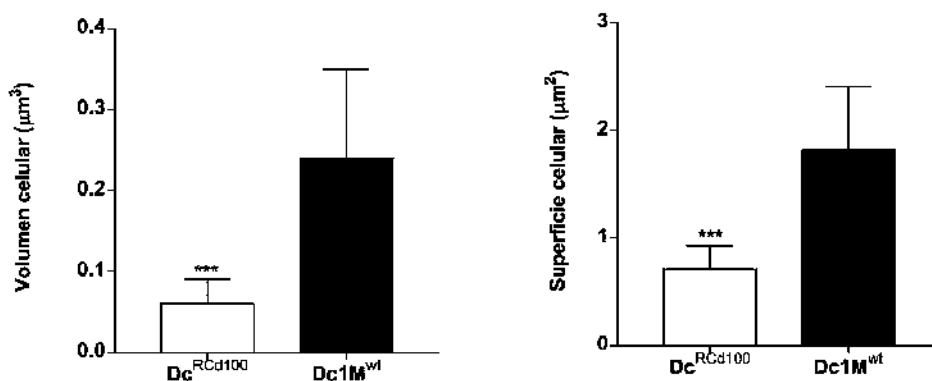


Gráfico 1.3.3. Volumen y superficie celular de Dc^{RCd100} con respecto a $Dc1M^{wt}$ ($p < 0.0001$).

1.4.DISCUSIÓN

La evolución a la adaptación metálica en diferentes géneros de microalgas de agua dulce (clorofíceas y cianobacterias) se encuentra poco estudiado, además se sabe que a concentraciones bajas de metales considerados de carácter puramente tóxico reducen drásticamente el crecimiento y la actividad fotosintética de microalgas. No obstante, entre los autores que han investigado la metalo-resistencia en microalgas se encuentran Baos et al., 2002; García-Villada et al., 2004; López-Rodas et al., 2008; Sánchez-Fortún et al., 2009; D'ors et al., 2010 y Pereira et al., 2013. Estos autores reportaron la aparición de mutantes resistentes a Cr^{6+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} y mezcla de metales como Co, Cu, Zn, As, Cd, Sb, Pb y Tl en cepas de *Dictyosphaerium chlorelloides*, *Microcystis aeruginosa* y *Scenedesmus intermedius* antes de la exposición al agente selectivo, es decir, la resistencia se modula por mutaciones pre-adaptativas.

Anteriormente, Kepler & Perelson, (1995), indicaron que los organismos pueden poseer la capacidad de regular su tasa de mutación en respuesta a las condiciones abióticas que se alteran y las tasas de mutación diferenciales entre genes pueden ser adaptaciones. Además, Costas et al., (1998), reportaron que la capacidad competitiva de los cultivos clonales de microalgas que crecen asexualmente, se mejora mediante la selección que actúa sobre la nueva variación genética que ha surgido por mutación, por lo que se adaptan de forma rápida.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente proyecto, en la aptitud biológica de la cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* ($\text{Dc}^{\text{RCd100}}$) se reduce a 34.78% en medio BG-11 en ausencia del Cd en comparación con la cepa control (Dc1M^{wt}), esto está acorde con lo reportado por García-Villada et al., (2004), donde los genotipos resistentes a Cu de *M. aeruginosa* exhiben una aptitud reducida en ausencia del agente selectivo (sulfato de cobre), y solo estas variantes pueden crecer en presencia del contaminante. Lo anterior se encuentra sostenido por lo planteado por Walker et al., (2012), donde un alelo es resistente si aumenta la aptitud en un ambiente contaminado.

Esto apunta a un costo en la aptitud, es decir, nuestros resultados revelan, además, una marcada reducción tanto en volumen como en superficie celular (75 y 61% en reducción, respectivamente) de la cepa Cd-resistente comparada con la cepa control también en ausencia del Cd en el medio.

De esta forma, Costas et al., 2001 y López-Rodas et al., 2001, indicaron que como la mutación es recurrente en cada generación, surgen nuevas células mutantes de forma continua. Una de las

características principales de las mutantes resistentes de *D. chlorelloides*, en comparación con las células tipo salvaje, es que los primeros tienen una tasa de crecimiento significativamente menor que los segundos, por lo que las mutaciones generalmente implican un costo energético que puede afectar la supervivencia de las poblaciones en adaptación.

Según un estudio realizado por López-Rodas et al., (2006), normalmente las cepas tipo salvaje de *D. chlorelloides* tienen una morfología esférica (células jóvenes) a elipsoide (en células maduras). Tras exponer dichas cepas a concentraciones de contaminantes como el TNT, solamente sobreviven células resistentes al tóxico cuya forma es fusiforme o alargada, lo que estos autores describen como cambios morfológicos “dramáticos” en cepas TNT-resistentes de *D. chlorelloides*. Anteriormente, García-Villada et al., (2004), evaluaron sobre la cepa Cu-resistente de *M. aeruginosa* menor diámetro celular comparada con la cepa control.

Posteriormente, esto también fue determinado en una cepa Cr-resistente de *D. chlorelloides* (Dc^{RCr25}) por D’ors et al., (2010), quienes indicaron que efectivamente la cepa control $Dc1M^{wt}$ mantiene su forma esférica a elipsoide sin rugosidad en la pared celular, mientras que en Dc^{RCr25} el diámetro celular disminuyó al 37.30% pero mantiene la forma esférica con remoción de la pared celular en ausencia del Cr. Por el contrario, Zachleder et al., (2016), revelaron que un incremento en el volumen celular por la exposición a distintos contaminantes, puede dar lugar a la inhibición de todos los procesos de consumo de energía y carbono, es decir, el bloqueo de la replicación del ADN nuclear y la citocinesis, lo que conduce a una acumulación y síntesis masiva de gránulos de almidón sin gasto lo que conlleva a un crecimiento del cloroplasto en la microalga. Además, se puede suponer que el mecanismo vinculado a la resistencia en microalgas, se encuentra implicado la disposición de los microtúbulos en las células, o en la expresión y el control de los reguladores del citoesqueleto (López-Rodas et al., 2006).

Por lo tanto, las variantes resistentes a contaminantes muestran un crecimiento reducido y una baja densidad poblacional (menor aptitud). En consecuencia, aunque las poblaciones de microalgas son capaces de sobrevivir a condiciones extremas de contaminación, los parámetros clave como la producción fotosintética y la biomasa celular se reducen de forma significativa (Baos et al., 2002).

1.5.CONCLUSIONES

En resumen, la cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* se obtiene a partir de mutaciones pre-adaptativas antes de la exposición al agente selectivo, que aparecen como consecuencia del incremento de la presión de selección como resultado de un medio contaminado por Cd, es decir, su selección se da antes de la aplicación del metal, pero se evidencia mayor supervivencia en el medio contaminado a 100 μm de Cd^{2+} (equivalente a la $\text{CI}_{50(72)}$ previa en la cepa control).

Asimismo, la cepa Cd-resistente reduce su aptitud biológica en ausencia del Cd en el medio, con un costo en la aptitud al reducir de forma significativa su volumen y superficie celular comparada con la cepa control de *D. chlorelloides*, a través de posibles modificaciones metabólicas y estructurales en ausencia del agente selectivo.

1.6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, S.J., 1983. Morphology, Performance and Fitness. *Am. Zool.* 23, 347–361.
- ATSDR, 2012. Toxicological Profile: Cadmium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Atlanta, Georgia.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal Tolerance. *New Phytol.* 106, 93–111. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04685.x>
- 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, 593–600. <https://doi.org/10.1017/S096702620200392X>
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 489, 97–122. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00065-5)
- Bertram, J., Masel, J., 2019. Density-dependent selection and the limits of relative fitness. *Theor. Popul. Biol.*, Special issue in honor of Marcus Feldman's 75th birthday 129, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2018.11.006>
- Bock, C., 2011. Genetic diversity and polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype. Institut für Biologie/Zoologie der Freien Universität Berlin, Berlin. <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-15273>
- Bock, C., Pröschold, T., Krienitz, L., 2011. Updating the Genus *Dictyosphaerium* and Description of *Mucidosphaerium* Gen. Nov. (trebouxiophyceae) Based on Morphological and Molecular Data1. *J. Phycol.* 47, 638–652. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00989.x>
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207. <https://doi.org/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, 217–228. <https://doi.org/10.1042/BJ20090655>
- 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, 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00194-X)
- Cheng, Q., Zhou, Q., Jin, Z., Jiang, Y., Xu, L., Jiang, H., Zhao, Y., 2019. Bioaccumulation, growth performance, and transcriptomic response of *Dictyosphaerium* sp. after exposure to nonylphenol. *Sci. Total Environ.* 687, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.136>
- Chia, M.A., Lombardi, A.T., da Graça Gama Melão, M., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquat. Toxicol.* 160, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.002>
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., López-Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40, 391–398. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-5-391.1>

- Costas, E., Nieto, B., Lopez-Rodas, V., Salgado, C., Toro, M., 1998. ADAPTATION TO COMPETITION BY NEW MUTATION IN CLONES OF ALEXANDRIUM MINUTUM. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 52, 610–613. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01659.x>
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. New York, Evanston and London: Harper & Row, Publishers, New York.
- Darwin, C.R., 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life., 1st edition. ed. John Murray, London.
- Devriese, M., Tsakaloudi, V., Garbayo, I., León, R., Vilchez, C., Vigar, J., 2001. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 443–448. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01257-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01257-8)
- 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 *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81, 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.051>
- Ernst, W.H.O., 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow Landsc. Res* 80, 25.
- Ernst, W.H.O., Krauss, G.-J., Verkleij, J. a. C., Wesenberg, D., 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ.* 31, 123–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01746.x>
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingeman, 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).
- Fotovat, 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, 213–234. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(97\)00130-4](https://doi.org/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. Amst. Neth.* 48, 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00042-9)
- Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R., 1998. Selective Permeability of the Extracellular Envelope of the Microalga *Spondylosium Panduriforme* (chlorophyceae) as Revealed by Electron Paramagnetic Resonance. *J. Phycol.* 34, 631–637. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340631.x>
- García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., Agrelo, M., Martín-Otero, L., Costas, E., 2002. Evolution of Microalgae in Highly Stressing Environments: An Experimental Model Analyzing the Rapid Adaptation of *Dictyosphaerium Chlorelloides* (chlorophyceae) from Sensitivity to Resistance Against 2,4,6-Trinitrotoluene by Rare Preselective Mutations1. *J. Phycol.* 38, 1074–1081. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01128.x>
- García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez-Martín, L., López-Rodas, V., Costas, E., 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Res.* 38, 2207–2213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.036>
- Grafen, A., 2007. The formal Darwinism project: a mid-term report. *J. Evol. Biol.* 20, 1243–1254. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01321.x>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2019. *Dictyosphaerium Nägeli, 1849* :: Algaebase. World-wide electronic publication [WWW Document]. AlgaeBase World-Wide Electron. Publ. URL https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43503 (accessed 12.17.19).

- Gupta, D.K., Sandalio, L.M. (Eds.), 2012. Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22081-4>
- Halaj, M., Paulovičová, E., Paulovičová, L., Jantová, S., Cepák, V., Lukavský, J., Capek, P., 2018. Biopolymer of *Dictyosphaerium chlorelloides* - chemical characterization and biological effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 113, 1248–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.052>
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytol.* 188, 478–487. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03370.x>
- 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.
- ICdA, 2011. All the information on Cadmium - Applications [WWW Document]. *Int. Cadmium Assoc.* URL <https://www.cadmium.org/cadmium-applications> (accessed 12.2.19).
- Idrees, N., Tabassum, B., Abd_Allah, E.F., Hashem, A., Sarah, R., Hashim, M., 2018. Groundwater contamination with cadmium concentrations in some West U.P. Regions, India. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 1365–1368. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.005>
- 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, 577–586. <https://doi.org/10.1242/jeb.011262>
- Jaffe, K., 2016. Extended inclusive fitness theory: synergy and assortment drives the evolutionary dynamics in biology and economics. *SpringerPlus* 5, undefined-undefined. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2750-z>
- John, D.M., Whitton, B.A., Brook, A.J., 2002. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae, 1st. Edition. ed. Cambridge University Press, The Natural History Museum and The British Phycological Society, Cambridge.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 76, 93–110. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.001>
- Kepler, T.B., Perelson, A.S., 1995. Modeling and optimization of populations subject to time-dependent mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8219–8223. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8219>
- Komárek, J., Perman, J., 1978. Review of the genus *Dictyosphaerium* (Chlorococcales). *Algol. Stud. Für Hydrobiol. Suppl. Vol.* 233–297.
- Kramer, J.R., Allen, H.E. (Eds.), 1988. Metal speciation: theory, analysis, and application. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Kumar, D., Kviderová, J., Kaštánek, P., Lukavský, J., 2017. The green alga *Dictyosphaerium chlorelloides* biomass and polysaccharides production determined using cultivation in crossed gradients of temperature and light. *Eng. Life Sci.* 17, 1030–1038. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700014>
- Lee, R.E., 2018. Phycology, 5th edition. ed. Cambridge University Press, Cambridge: Colorado State University. <https://doi.org/10.1017/9781316407219>

- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179–190. <https://doi.org/10.1080/09670260110001735328>
- López-Rodas, V., Costas, E., Flores-Moya, A., 2011. Genetic Adaptation of Phytoplankters to Herbicides. *Herbic. Environ.* <https://doi.org/10.5772/13439>
- López-Rodas, V., Costas, E., Flores-Moya, A., Garcia-Villada, L., 2006. Phenotypic evolution in microalgae: a dramatic morphological shift in *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyta) after exposure to TNT. *Acta Bot. Malacit.* 31, 141–147.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008. Microalgal adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environ. Exp. Bot.* 64, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.001>
- Luria, S.E., Delbrück, M., 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28, 491–511.
- Manahan, S.E., 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, Third Edition, Third edition. ed. CRC Press.
- Manahan, S.E., 2006. *Introducción a la química ambiental*, 1st. Edition. ed. Reverte.
- Martin, G., Gandon, S., 2010. Lethal mutagenesis and evolutionary epidemiology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 1953–1963. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0058>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.030>
- Nagel, R., 2007. La mutacion adaptativa: polemicas y mecanismos. *J. Basic Appl. Genet.* 18, 51–59.
- Nordic Council of Ministers, 2003. *Cadmium Review*. Report No. 1, Issue No. 4.
- OECD, 2006. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test - en - OECD [WWW Document]. URL <http://www.oecd.org/env/test-no-201-alga-growth-inhibition-test-9789264069923-en.htm> (accessed 7.27.16).
- 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, 241–249. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00144-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00144-2)
- Pereira, M., Bartolomé, M.C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.078>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.020>
- Pereira, M.P., D'ors, A.B., Sánchez-Fortún, S., 2009. Influencia del ph sobre el efecto tóxico inducido en clones de *Dictyosphaerium Chlorelloides* sensibles y resistentes a Cromo (VI). *Rev. Complut. Cienc. Vet.* 3, 22–30.
- Poshtegal, M.K., Mirbagheri, S.A., 2019. The Heavy Metals Pollution Index and Water Quality Monitoring of the Zarrineh River, Iran. *Environ. Eng. Geosci.* 25, 179–188. <https://doi.org/10.2113/EEG-1996>
- Ramírez, A., 2002. Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *An. Fac. Med.* 63, 51–64. <https://doi.org/10.15381/anales.v63i1.1477>

- Reynolds, C.S., 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia* 578, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0431-6>
- 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, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.01.015>
- S. P., 1870. Contributions to the Theory of Natural Selection. *Nature* 2, 471–473. <https://doi.org/10.1038/002471a0>
- 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, 1901–1905. <https://doi.org/10.1897/08-489.1>
- Sánchez-Fortún, S., Marvá, F., Rouco, M., Costas, E., López-Rodas, V., 2009. Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 18, 481–487. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0303-8>
- Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/60197.pdf>
- Secretaría de Salud. 2000. MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
- Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3295/1/nom-002-semarnat-1996.pdf>
- Sikder, M.T., Kihara, Y., Yasuda, M., Yustiawati, Mihara, Y., Tanaka, S., Odgerel, D., Mijiddorj, B., Syawal, S.M., Hosokawa, T., Saito, T., Kurasaki, M., 2013. River Water Pollution in Developed and Developing Countries: Judge and Assessment of Physicochemical Characteristics and Selected Dissolved Metal Concentration. *CLEAN – Soil Air Water* 41, 60–68. <https://doi.org/10.1002/clen.201100320>
- Sivakumar, S., Song, Y.C., Park, I.S., Cho, S.H., Lee, C.Y., Kim, B.G., 2010. Short-term influence of phosphate and nitrate on heavy metal accumulation by red alga *Acrosorium uncinatum*. *Environ. Monit. Assess.* 165, 449–460. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0958-x>
- Sun, J., Liu, D., 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.* 25, 1331–1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Thornton, I., Webb, J.S., 1980. Trace Elements in Soils and Plants, in: Blaxter, K. (Ed.), *Food Chains and Human Nutrition*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 273–315. https://doi.org/10.1007/978-94-011-7336-0_12
- Tokar, E.J., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Waalkes, M.P., 2015. Toxic Effects of Metals, in: Casarett & Doull's *Essentials of Toxicology*, Lange. AccessPharmacy | McGraw-Hill Medical, p. 544.

- Twiss, M.R., Errécalde, O., Fortin, C., Campbell, P.G.C., Jumarie, C., Denizeau, F., Berkelaar, E., Hale, B., Rees, K. van, 2001. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 13, 9–24. <https://doi.org/10.3184/095422901782775462>
- U.S. EPA, 2016. U.S. Environmental Protection Agency. Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria - Cadmium 2016 (No. EPA-820-R-16-002). U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology Health and Ecological Criteria Division, Washington, D.C.
- U.S. EPA, 2012. U.S. Environmental Protection Agency. 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories (EPA 822-S-12-001) (No. EPA 822-S-12-001). Office of Water U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Varol, M., Şen, B., 2012. Assessment of nutrient and heavy metal contamination in surface water and sediments of the upper Tigris River, Turkey. *CATENA* 92, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2011.11.011>
- Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N., Naidu, R., 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv. Environ. Res., Heavy Metals in Soils* 8, 121–135. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00135-1)
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B., 2012. *Principles of Ecotoxicology*, Fourth Edition. CRC Press.
- Wallace, A.R., 1866. Darwin Correspondence Project.
- WHO, 2017. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum, Fourth edition. ed. World Health Organization.
- WHO, 2011. World Health Organization. Cadmium in drinking-water (No. WHO/SDE/WSH/03.04/80/Rev/1). World Health Organization.
- Wongsasuluk, P., Chotpantarat, S., Siri Wong, W., Robson, M., 2014. Heavy metal contamination and human health risk assessment in drinking water from shallow groundwater wells in an agricultural area in Ubon Ratchathani province, Thailand. *Environ. Geochem. Health* 36, 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10653-013-9537-8>
- Wright, D.A., Welbourn, P.M., 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2, 187–214. <https://doi.org/10.1139/a94-012>
- Yan, H., Pan, G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 49, 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00285-0)
- Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M., 2016. The Cell Cycle of Microalgae, in: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*, Developments in Applied Phycology. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_1
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta* 606, 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018>



SECCIÓN II

FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA EN MICROALGAS

FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA Y ADAPTACIÓN



CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	59
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	59
ÍNDICE DE FIGURAS	59
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	61
2. MARCO TEÓRICO	133
2.0.1. FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA EN MICROALGAS	133
2.0.2. FASE LUMÍNICA: UNIDADES FOTOSINTÉTICAS	133
2.0.3. FOTOFOSFORILACIÓN NO CÍCLICA EN CLOROPLASTOS.....	142
2.0.4. FASE BIOQUÍMICA EN LA FIJACIÓN DE CO ₂ : CICLO DE CALVIN-BENSON-BASSHAM (CBB)	143
2.0.4.1. Regulación del Ciclo de Calvin-Benson-Bassham.....	147
2.0.5. RuBisCO: ESTRUCTURA, ACTIVIDAD Y REGULACIÓN	148
2.0.6. ANHIDRASA CARBÓNICA (AC): ACTIVIDAD Y REGULACIÓN.....	151
2.0.7. FIJACIÓN DEL O ₂ POR LA RuBisCO OXIGENASA: FOTORRESPIRACIÓN O CICLO C ₂	155
2.0.8. FACTORES QUE MODIFICAN LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA	158
2.0.8.1. Concentración de CO ₂ /O ₂	159
2.0.8.2. Intensidad lumínica.....	159
2.0.9. MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN.....	163
2.0.10. ADAPTACIÓN A FLUCTUACIONES LUMÍNICAS	166
2.0.11. TEMPERATURA.....	168
2.0.12. ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN A FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA	171
2.1. MATERIAL Y MÉTODOS	175
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR.....	175
2.1.2. ESTIMACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO FOTOSINTÉTICO SOBRE AMBAS CEPAS DE <i>D. CHLORELLOIDES</i> 175	
2.1.3. ESTIMACIÓN DEL BALANCE DE OXÍGENO	176
2.1.4. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA DEBIDO A VARIACIONES EN LA INTENSIDAD FOTÓNICA	177
2.1.5. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA POR BALANCE DE OXÍGENO BAJO EL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO POR FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA.....	177
2.2. ANÁLISIS DE DATOS	178
2.3. RESULTADOS	179
2.3.1. RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL PSII (Φ_{PSII}) EN DC ^{RCd100} VS. DC1M ^{WT}	179
2.3.2. EVALUACIÓN DEL BALANCE DE OXÍGENO EN DC ^{RCd100} Y CEPA CONTROL DC1M ^{WT}	180
2.3.3. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA BAJO FLUCTUACIONES EN INCIDENCIA FOTÓNICA	181
2.3.4. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA BAJO EL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO Y A FLUCTUACIONES EN TEMPERATURA.....	183
2.4. DISCUSIÓN	186
2.5. CONCLUSIONES.....	190
2.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

Índice de Tablas

TABLA 2.3.1. RENDIMIENTO CUÁNTICO FOTOSINTÉTICO DEL PSII (Φ_{PSII}) EN DC^{RCd100} VS. $DC1M^{WT}$	179
TABLA 2.3.2. BALANCE DE OXÍGENO EN FOTOSÍNTESIS BRUTA (PG) EN DC^{RCd100} VS. $DC1M^{WT}$ REPRESENTADO COMO $NMOL\ O_2\ mL^{-1}\ MIN^{-1}$	180
TABLA 2.3.3. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA NETA (PN) Y EN RESPIRACIÓN (R) POR BALANCE DE OXÍGENO REPRESENTADO EN $\% NMOL\ O_2\ mL^{-1}\ MIN^{-1}$ EN DC^{RCd100} COMPARADA CON $DC1M^{WT}$	181
TABLA 2.3.4. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA A TRAVÉS DEL BALANCE DE OXÍGENO EN FOTOSÍNTESIS BRUTA (PG) COMO $\% NMOL\ O_2\ mL^{-1}\ MIN^{-1}$ BAJO CAMBIOS EN TEMPERATURA Y EL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO DE DC^{RCd100} VS. $DC1M^{WT}$. LOS RESULTADOS SE REPRESENTAN COMO $M \pm DS$ (N= 6)	183

Índice de Gráficos

GRÁFICO 2.3.1. RENDIMIENTO CUÁNTICO FOTOSINTÉTICO DEL PSII (Φ_{PSII}) DE DC^{RCd100} VS. $DC1M^{WT}$, (***) $p < 0.0001$	179
GRÁFICO 2.3.2. BALANCE DE OXÍGENO EN DC^{RCd100} VS. $DC1M^{WT}$ A DIFERENTES INTENSIDADES FOTÓNICAS EN $MMOL\ M^{-2}\ S^{-1}$. A) $\%$ DE EFICIENCIA EN FOTOSÍNTESIS NETA (PN). B) $\%$ DE EFICIENCIA EN RESPIRACIÓN (R); ** DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS A $p < 0.05$	182
GRÁFICO 2.3.3. EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA EN EL BALANCE DE OXÍGENO ($\% NMOL\ O_2\ mL^{-1}\ MIN^{-1}$) A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA ($^{\circ}C$). A) CORRESPONDE A LA EFICIENCIA DE $DC1M^{WT}$ AL PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICO DE $300\ MMOL\ M^{-2}\ S^{-1}$. B) EFICIENCIA DE DC^{RCd100} A $200\ MMOL\ M^{-2}\ S^{-1}$. PG: FOTOSÍNTESIS BRUTA; PN: FOTOSÍNTESIS NETA; R: RESPIRACIÓN.	185

Índice de Figuras

FIGURA 2.1. FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA. TOMADO DE MASOJÍDEK ET AL., 2013.	133
FIGURA 2.2. ESTRUCTURA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CLOROFILAS Y SU ESPECTRO DE ABSORCIÓN. TOMADO DE CROCE & AMERONGEN, 2014 Y LARKUM, 2016.	134
FIGURA 2.3. ESTRUCTURA DE LOS CAROTENOIDES Y XANTOFILAS CON RESPECTIVO ESPECTRO DE ABSORCIÓN. TOMADO DE CROCE & AMERONGEN, 2014 Y LARKUM, 2016.	135
FIGURA 2.4. CENTROS COLECTORES DE LUZ (LHC) EN MICROALGAS. TOMADO DE HOLTZEGEL, 2016.....	136
FIGURA 2.5. UNIDADES FOTOSINTÉTICAS Y ESQUEMA "Z" DE LA FASE LUMÍNICA DE LA FOTOSÍNTESIS EN MICROALGAS. TOMADO DE CROCE & AMERONGEN, 2014.	137
FIGURA 2.6. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PSII. TOMADO DE BARBER, 2016.	138
FIGURA 2.7. REPRESENTACIÓN DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR EL PSII: A) LOS RESIDUOS EN LAS SUBUNIDADES D1, D2 Y CP43 SE MUESTRAN EN AMARILLO, NARANJA Y VERDE, RESPECTIVAMENTE. X1, X21 Y X22 SON POSIBLES POSICIONES DE UNIÓN DEL AGUA AL Mn_4 (X1) Y AL Ca^{2+} (X21 Y X22) IDENTIFICADAS DESDE LA POSICIÓN DEL LIGANDO NO PROTEICO Y EL PATRÓN DE COORDINACIÓN DE LOS IONES Mn Y Ca^{2+} . B) REPRESENTACIÓN GENERAL DEL PROCESO CATALÍTICO DEL PSII. TOMADO DE IWATA & BARBER, 2004.	139
FIGURA 2.8. REACCIONES DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN EL COMPLEJO DEL CITOCROMO b6f. TOMADO DE BOWYER & LEEGOOD, 1997.....	141
FIGURA 2.9. ESTRUCTURA MOLECULAR Y TRANSFERENCIA ENERGÉTICA DEL PSI. TOMADO DE CARRIL, 2009.	142

FIGURA 2.10. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FASE LUMÍNICA Y LA GENERACIÓN DEL GRADIENTE DE PROTONES A TRAVÉS DE LA MEMBRANA DEL TILACOIDE PARA LA SÍNTESIS DE ATP POR LA ATP-SINTASA. ORIGINAL DE BOYER ET AL., 1977.....	143
FIGURA 2.11. CICLO DE CALVIN-BENSON: FASE BIOQUÍMICA DE LA FOTOSÍNTESIS. MODIFICADA DE BASSHAM ET AL., 1950 Y BASSHAM & CALVIN, 1960.....	146
FIGURA 2.12. REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS DEL CICLO CBB POR INTENSIDAD LUMÍNICA A TRAVÉS DE LA RELACIÓN FERRODOXINA-TIORREDOXINA. TOMADO DE CARRIL, 2009.....	148
FIGURA 2.13. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA RuBisCO. A) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FOTOSÍNTESIS EN CLOROPLASTOS Y EL PAPEL DE LA RuBisCO. FASE FOTOQUÍMICA, EL CICLO DE CALVIN-BENSON-BASSHAM Y LA FOTORESPIRACIÓN. B) ESTRUCTURA DE LA FORMA HEXADECAMÉRICA LA FORMA I DE LA RuBisCO. C) SUPERPOSICIÓN DE CONFORMACIONES ABIERTAS Y CERRADAS DE LA RuBisCO. EN EL ESTADO CERRADO (VERDE OSCURO), EL BUCLE 6 (COLOR TURQUESA) CUBRE EL SITIO ACTIVO, ATRAPANDO EL RuBP UNIDO (ROJO), Y SE FIJA MEDIANTE EL PÉPTIDO C-TERMINAL FLEXIBLE (ROSA) QUE SE EXTIENDE A TRAVÉS DE LA SUBUNIDAD RbCL. EN LA CONFORMACIÓN ABIERTA (VERDE PÁLIDO), EL BUCLE 6 (AZUL OSCURO) SE RETRAE Y EL PÉPTIDO C-TERMINAL (ROSA) SE ENCUENTRA DESORDENADO. ORIGINAL DE TAYLOR & ANDERSSON, 1997, Y MODIFICADO POR BHAT ET AL., 2017.....	149
FIGURA 2.14. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA RuBisCO E INHIBICIÓN POR FOSFATOS DE AZÚCAR. E: ENZIMA NO CARBAMILADA. ECM: ENZIMA CARBAMILADA UNIDA A IONES Mg^{2+} . EI: ENZIMA INACTIVA POR EL FOSFATO DE XuBP Y PDBP. ECMI: LA FORMA INHIBIDA DE ECM. RCA: RuBisCO ACTIVASA. TOMADO DE BRACHER ET AL., 2017.....	151
FIGURA 2.15. ESTRUCTURA Y UNIÓN DEL IÓN Zn^{2+} EN A-AC, B-AC, Γ -AC. TOMADO DE MONDAL ET AL., 2016.....	153
FIGURA 2.16. MECANISMO DE CONCENTRACIÓN DE CO_2 (CCM) EN MICROALGAS. LA DIFUSIÓN DEL CO_2 HACIA ADENTRO Y HACIA AFUERA SE INDICA MEDIANTE FLECHAS PUNTEADAS. Pps: ESPACIO PERIPLÁSMICO; pCA: AC PERIPLÁSMICA; cpCA: AC CITOSÓLICA; cCA: AC EN CLOROPLASTO; mCA: AC MITOCONDRIAL. TOMADO DE SÜLTEMEYER, 1998.....	154
FIGURA 2.17. FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA AC PERIPLÁSMICA BAJO pH E INTENSIDAD LUMÍNICA. TOMADO DE SÜLTEMEYER, 1998.....	155
FIGURA 2.18. CICLO DE LA FOTORRESPIRACIÓN. TOMADO DE HAGEMANN ET AL., 2016.....	158
FIGURA 2.19. ESPECTRO DE RADIACIÓN. LA RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA (PAR) VARÍA DE 400 A 700 NM. TOMADO DE MASOJÍDEK ET AL., 2013.	160
FIGURA 2.20. TASA FOTOSINTÉTICA CON RESPECTO A LA INTENSIDAD LUMÍNICA APLICADA EN MICROALGAS: P_{MAX} : CORRESPONDE A LA FOTOSÍNTESIS MÁXIMA; I: INTENSIDAD LUMÍNICA; I_K : PUNTO DE SATURACIÓN LUMÍNICA; I_{INHIB} : INTENSIDAD LUMÍNICA INHIBITORIA. TOMADO DE BÉCHET ET AL., 2013B.....	161
FIGURA 2.21. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO QUE SE GENERAN POR ELEVADAS INTENSIDADES LUMÍNICAS. A) GENERACIÓN DE OXÍGENO SINGLETE $^1O_2$ EN EL PSII, Y GENERACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO $O_2^{\cdot-}$ EN EL PSI. B) SISTEMAS ENZIMÁTICOS ANTIOXIDANTES COMO LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD), ASCORBATO PEROXIDASA (APX), PEROXIREDOXINAS (PRX). EN PRESENCIA DE LOS IONES Fe^{2+} Y Cu^{2+} CON SUS RESPECTIVAS RXNES. DE ÓXIDO-REDUCCIÓN SE GENERA EL RADICAL HIDROXILO $\cdot OH$ Y $O_2^{\cdot-}$. TOMADO DE ROACH & KRIEGER-LISZKAY, 2014.....	163
FIGURA 2.22. DIFERENTES PROCESOS DE DISIPACIÓN DE EXCESO DE ENERGÍA LUMÍNICA. TOMADO DE AZCÓN-BIETO & TALÓN, 2013.....	165
FIGURA 2.23. MECANISMOS MOLECULARES EN LA ADAPTACIÓN A FLUCTUACIONES EN LA INCIDENCIA FOTÓNICA EN CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS. TOMADO DE RICHÁ & DONAT, 2013.....	167
FIGURA 2.24. MECANISMOS MOLECULARES EN EL PROCESO DE CONVERSIÓN ENERGÉTICA EN LA FOTOSÍNTESIS QUE SE EXPRESAN DURANTE FLUCTUACIONES DE INTENSIDAD LUMÍNICA EN CIANOBACTERIAS Y CLOROFÍCEAS (CHLAMYDOMONAS). TOMADO DE ALLAHVERDIYEVA ET AL., 2015B.	168
FIGURA 2.25. RESPUESTAS EN LA FOTOSÍNTESIS POR FLUCTUACIONES EN LA TEMPERATURA. TOMADO DE BUTTERWICK ET AL., 2005.	170
FIGURA 2.26. RESPUESTAS A TEMPERATURAS ELEVADAS EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE MICROALGAS. TOMADO DE MATHUR ET AL., 2014.....	172

FIGURA 2.27. 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 (PQRED), QUINONA REDUCIDA (QRED), PLASTOQUINONA OXIDADA (PQOX), QUINONA REDUCIDA (QOX), FUERZA PROTÓN-MOTRIZ (PMF). TOMADO DE MORGAN-KISS ET AL., 2006.....	174

Índice de Ecuaciones

ECUACIÓN 2.1.1. RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL FOTOSISTEMA II (Φ PSII) (SCHREIBER ET AL., 2002).	176
ECUACIÓN 2.1.2. TASA DE BALANCE DE OXÍGENO EN FOTOSÍNTESIS BRUTA	176

2. MARCO TEÓRICO

2.0.1. Fotosíntesis oxigénica en microalgas

Las microalgas son clave fundamental, pues como productores primarios proporcionan oxígeno y la transferencia energética a lo largo de la cadena trófica acuática. La fotosíntesis provee la mayor parte energética y el suministro de carbono a los diferentes biosistemas del planeta (García-Camacho et al., 2012). Este complejo proceso implica la absorción de cuantos de luz (fotones), la excitación energética para la escisión de las moléculas de agua y la liberación de oxígeno (fotosíntesis oxigénica), para la conversión en energía química a través de una serie de reacciones de óxido-reducción que involucran los productos fotoquímicos generados durante la fase lumínica: el ATP (Adenosín Trifosfato) y NADPH^+ (Dihidronicotinamida adenina dinucleótido) necesarios para llevar a cabo la fase bioquímica del Ciclo de Calvin en la fijación de CO_2 para la síntesis de carbohidratos (Figura 2.1), además en la reducción de nitrato, aminoácidos y síntesis de proteínas (Geider & MacIntyre, 2007).

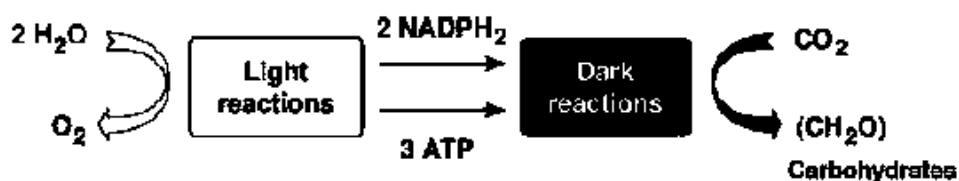


Figura 2.1. Fotosíntesis oxigénica. Tomado de Masojídek et al., 2013.

2.0.2. Fase Lumínica: Unidades fotosintéticas

Durante la fase lumínica de la fotosíntesis, son cuatro complejos los que llevan a cabo las reacciones lumínicas: el Fotosistema II (PSII por sus siglas en inglés), el complejo citocromo b_6f , el Fotosistema I (PSI por sus siglas en inglés) y la ATP sintasa (Carril, 2009).

El principal pigmento fotosintético en la fotosíntesis oxigénica es la clorofila (Chl) que convierte la energía lumínica en energía química presente en la membrana tilacoidal de los cloroplastos en cianobacterias, microalgas y plantas. La molécula de Chl consiste en un anillo de tetrapirrol (cabeza

polar, cromóforo) que contiene un átomo central de Mg^{2+} y un alcohol terpenoide de cadena larga (excepto la Chl *c*). Estructuralmente, los diversos tipos de moléculas de clorofila designadas *a*, *b*, *c* y *d* difieren en sus sustituyentes de grupos laterales en el anillo de tetrapirrol como se muestra en la Figura 2.2 (Masojídek et al., 2013; Larkum, 2016). Todas las clorofilas tienen dos bandas principales de absorción: azul (450–475 nm) y rojo (630–675 nm), resultando en su color verde característico.

No obstante, la Chl *a* está presente en todos los fotoautótrofos oxigénicos como parte clave en los complejos de pigmento-proteína de los centros de reacción del PSII y PSI (PSIIRC y PSIRC), y constituye de forma significativa de la mayoría de los centros antena colectores de luz (LHC: Light Harvesting Complex, por sus siglas en inglés), además se complementa con la Chl *b* cuyo nivel de energía de estado excitado más bajo (650 nm) se encuentra por encima de la Chl *a*. La Chl *c* absorbe a una longitud de onda de 450 nm, lo cual es favorable en condiciones subacuáticas, y se encuentra principalmente en diatomeas y dinoflagelados (Masojídek et al., 2013; Croce & Amerongen, 2014).

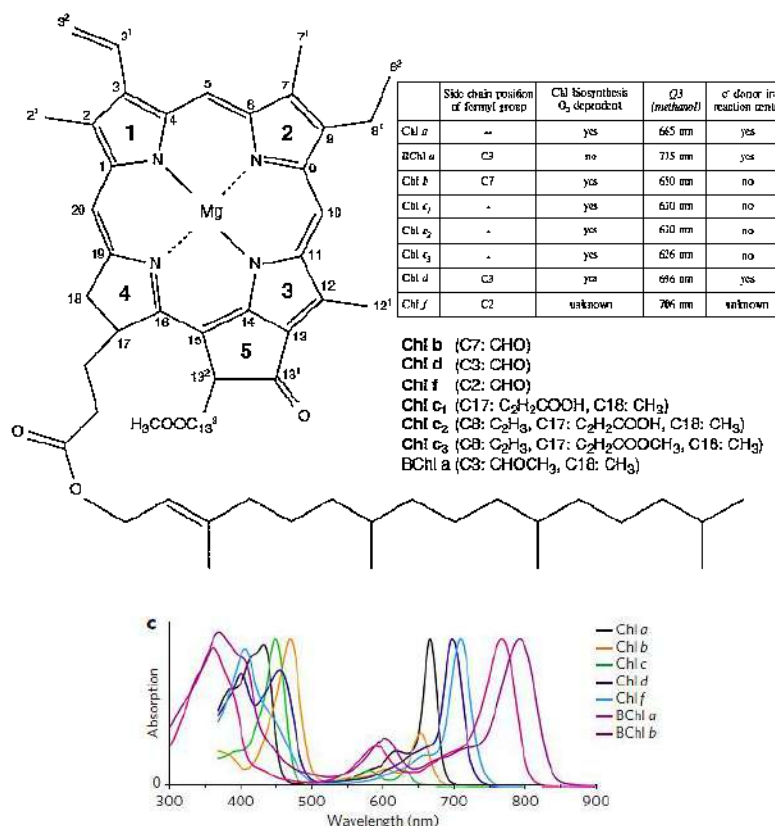


Figura 2.2. Estructura de los diferentes tipos de clorofilas y su espectro de absorción. Tomado de Croce & Amerongen, 2014 y Larkum, 2016.

Por otro lado, los carotenoides representan un grupo de pigmentos accesorios con un rango de absorción entre 400 y 550 nm, lo que da como resultado su color amarillo-naranja característico. La estructura de los carotenoides se basa en dos anillos hexacarbonados unidos por una cadena de doble enlace conjugada de 18 carbonos (Figura 2.3). Se dividen en dos grupos: los hidrocarburos como los carotenos entre ellos se encuentran el α -caroteno y el β -caroteno, e hidrocarburos oxigenados como las xantofilas, por ejemplo, luteína, violaxantina, zeaxantina, fucoxantina, peridina (Larkum, 2016). Presentan varias funciones en la fotosíntesis como: a) pigmentos accesorios para la recolección de luz transfiriendo la excitación energética a la Chl *a*; b) elementos estructurales dentro de los complejos pigmento-proteína del centro de reacción y de los centros colectores de luz (LHC); c) como pigmentos de protección con actividad sobre la absorción del exceso de energía que forma clorofila triplete ($^3\text{Chl}^*$) y especies reactivas de oxígeno (ROS) como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Masojídek et al., 2013).

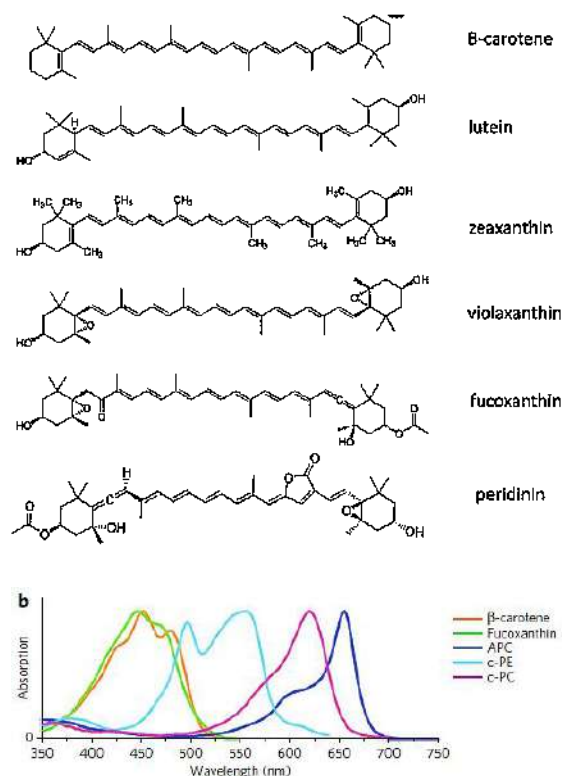


Figura 2.3. Estructura de los carotenoides y xantofilas con respectivo espectro de absorción. Tomado de Croce & Amerongen, 2014 y Larkum, 2016.

Parte de la energía lumínica absorbida por clorofilas y carotenoides se almacena al final del proceso fotosintético como energía química. No obstante, la mayoría de los pigmentos actúan como una antena (en el complejo antena colector de luz) captando la luz y transfiriendo la energía (proceso físico) al centro de reacción al que están asociados y donde se transfieren electrones desde la clorofila a una molécula aceptora de electrones (denominado proceso químico). Los pigmentos en el complejo antena están ordenados de manera que transfieren la energía de excitación por resonancia Förster hacia el centro de reacción donde tiene lugar la separación de carga formando un embudo como se muestra en la Figura 2.4 (Carril, 2009; Croce & Amerongen, 2014).

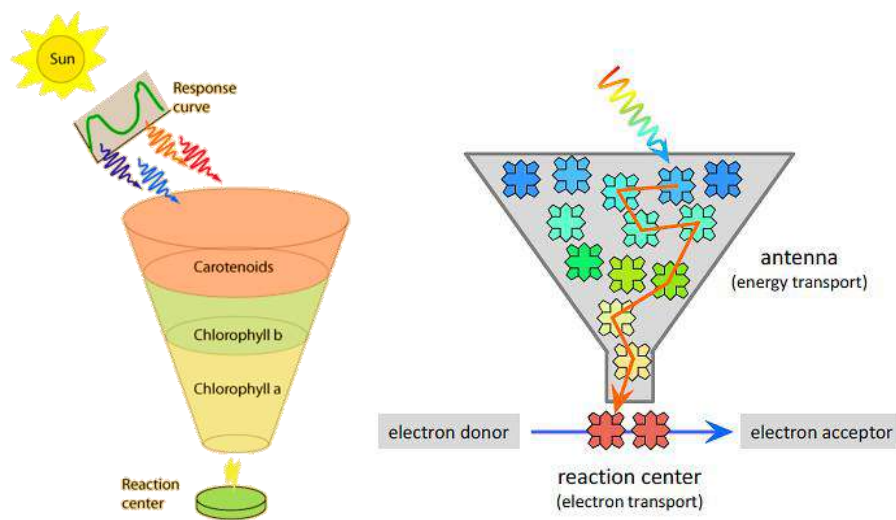


Figura 2.4. Centros colectores de luz (LHC) en microalgas. Tomado de Holtzegel, 2016.

Cuando un fotón llega a la Chl *a* en el centro de reacción, esa clorofila puede recibir la energía porque absorbe los fotones de longitudes de onda más largas que los otros pigmentos. Se han identificado dos tipos de centros de clorofila, y están asociados al PSII y al PSI en los que tienen lugar las reacciones iniciales de almacenamiento energético, además, si ambos fotosistemas funcionan en serie se producen dos reacciones fotoquímicas en serie. El PSI contiene una clorofila que absorbe luz del rojo lejano de 700 nm (denominada P700) produciendo un reductor fuerte capaz de reducir NADP^+ y un oxidante débil. Mientras que, el PSII contiene una clorofila que absorbe luz del rojo de 680 nm (P680), para producir un oxidante muy fuerte capaz de oxidar al

agua y un reductor más débil que el producido por el PSI. Por tanto, el agua actúa como donador primario de electrones y el NADP^+ es el último aceptor de electrones (Carril, 2009).

Cada fotosistema contiene un conjunto de clorofilas y carotenoides en los centros colectores de luz como pigmentos antena LHCII para el PSII y LHCI para el PSI (Kouril et al., 2005). Los fotosistemas operan en serie conectados por una cadena de transporte de electrones en forma de esquema "Z" (Hill & Bendall, 1960) como se muestra en la Figura 2.5.

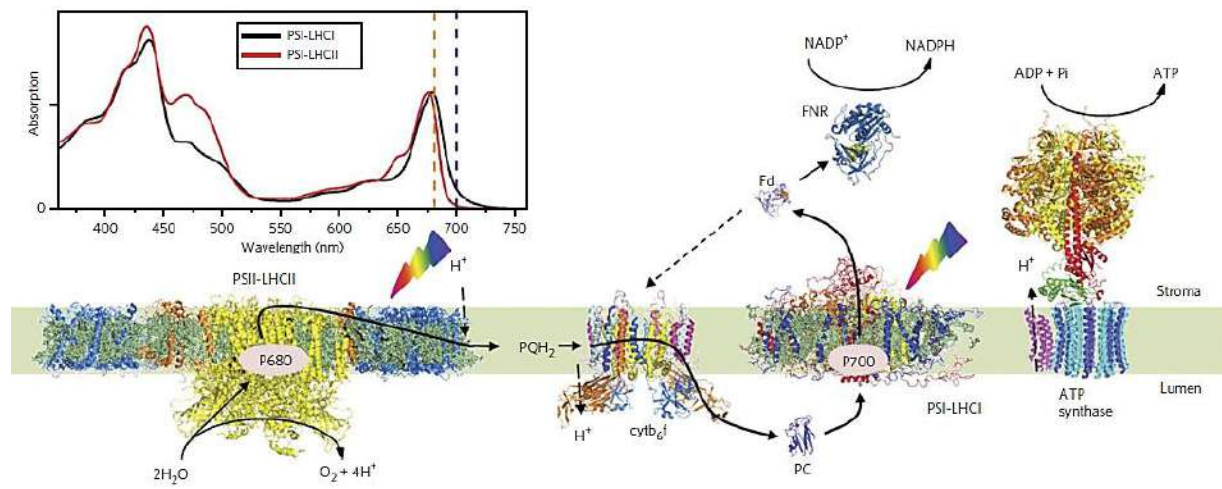


Figura 2.5. Unidades fotosintéticas y esquema "Z" de la fase lumínica de la fotosíntesis en microalgas. Tomado de Croce & Amerongen, 2014.

El PSII está ubicado en las membranas de los tilacoides como un dímero compuesto por dos copias de cada una de las proteínas centrales D1 y D2 (codificadas por el gen *psbA* y *psbD*, respectivamente) del centro de reacción y la clorofila de la antena central a las "proteínas de unión a clorofilas" denominadas CP43 y CP47 (codificadas por los genes *psbB* y *psbC*), que unen de 14 a 16 moléculas de Chl (Barber, 2016). Además, este dímero central del PSII se complementa con el complejo o centro colector de luz de este fotosistema (LHCII) con unión a Chl *a/b*. Conjuntamente, hay tres complejos de antena "menores" que se denominan Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) y Lhcb6 (CP24) y generalmente se presentan en monómeros (Peter & Thornber, 1991; Iwata & Barber, 2004; Kouřil et al., 2012). El centro de reacción del PSII (PSIIRC) contiene además el citocromo *b559* (Cyt *b559*), y varias proteínas extrínsecas unidas a su superficie luminal que forman un escudo proteico sobre el sitio catalítico del agua denominado "complejo de

evolución de oxígeno” (OEC por sus siglas en inglés) nombradas como PsbO, PsbP y PsbQ (Figura 2.6) (Barber, 2016).

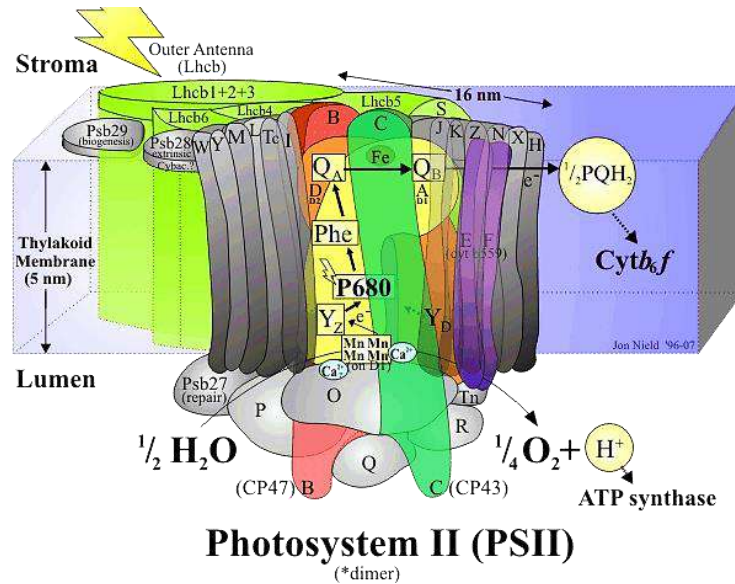


Figura 2.6. Estructura molecular del PSII. Tomado de Barber, 2016.

En las Figura 2.6 y Figura 2.7 se esquematiza el proceso catalítico del PSII, donde la clorofila excitada del PSII ($P680^*$) transfiere un e^- a una molécula de feofitina (Pheo) que es una clorofila en la que el átomo de Mg^{2+} ha sido sustituido por dos átomos de H^+ , formando el radical $P680^+Pheo^-$ y cediendo e^- de forma secuencial a la plastoquinona A PQ_A (Q_A) para producir $P^+PheoQ_A^-$ $P680^+$ el cual presenta un potencial redox alto oxidando un residuo de tirosina TyrZ (Y_Z) para formar $Tyr_Z^+P680PheoQ_A^-$. La Tyr_Z^+ se desprotona para formar un radical neutro Tyr_Z^* . La Q_A^- reduce una segunda plastoquinona PQ_B (Q_B) para formar $Tyr^*P680PheoQ_AQ_B^-$, y aproximadamente al mismo tiempo la Tyr^* extrae un electrón de un grupo de cuatro átomos de Mn que unen las dos moléculas de agua. El $P680$ se vuelve a reducir mediante electrones del OEC transfiriendo a través de un residuo de tirosina activo redox (Tyr_Z) (Iwata & Barber, 2004).

Se genera un siguiente recambio fotoquímico que reduce Q_B^- a Q_B^{2-} , que luego se protona a plastohidroquinona reducida PQH_2 y se libera del sitio de unión de la Q_B del PSII a la bicapa lipídica, donde posteriormente pasa al PSI a través del complejo del citocromo $b6f$ (2 cyt b y un cyt f). También dos entradas fotoquímicas adicionales proporcionan un grupo de cuatro iones Mn^+

y un ion Ca^{2+} ($\text{Mn}_4\text{Ca}^{2+}$), con un total de cuatro equivalentes oxidantes que se utilizan para oxidar dos moléculas de agua en la liberación de oxígeno ($2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{4h\nu} \text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+$) (Carril, 2009; Barber, 2016). El primer paso de la reacción de reducción de oxígeno en el citocromo c oxidasa implica la ruptura del enlace $\text{O} = \text{O}$ para formar un grupo oxo ligado al Fe y un OH ligado al Cu del centro binuclear. Para que esta reacción ocurra, tanto Fe como el Cu deben estar en sus estados más reducidos (es decir, Fe^{2+} y Cu^+) y la ruptura del enlace $\text{O} = \text{O}$ es impulsada por su oxidación (Iwata & Barber, 2004).

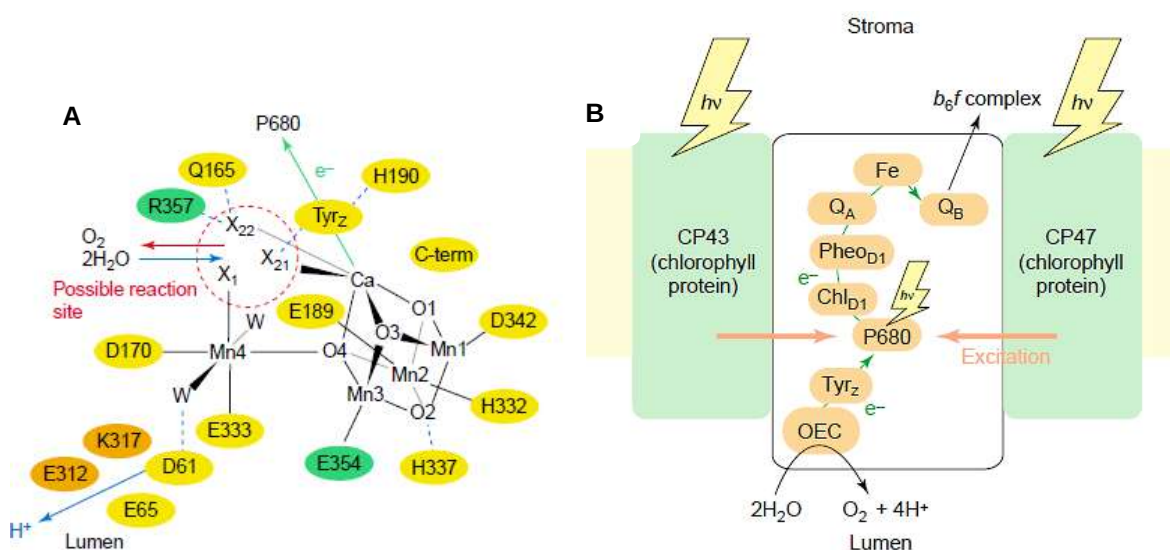


Figura 2.7. Representación de la reacción catalizada por el PSII: **A)** Los residuos en las subunidades D1, D2 y CP43 se muestran en amarillo, naranja y verde, respectivamente. X1, X21 y X22 son posibles posiciones de unión del agua al Mn₄ (X1) y al Ca²⁺ (X21 y X22) identificadas desde la posición del ligando no proteico y el patrón de coordinación de los iones Mn y Ca²⁺. **B)** Representación general del proceso catalítico del PSII. Tomado de Iwata & Barber, 2004.

Barber, (2016) reporta que además de estas reacciones, pueden producirse reacciones secundarias en algunas condiciones (por ejemplo, a elevadas intensidades lumínicas), se genera la oxidación de Cyt *b*559, una molécula de β -caroteno y una molécula de Chl *a*. Estas reacciones secundarias ocurren en una escala de tiempo de decenas de milisegundos y, por lo tanto, no compiten con la ruta de transferencia de electrones que conduce a la oxidación del agua. De hecho, probablemente solo ocurren cuando la tasa de oxidación del agua se limita proporcionando un mecanismo de protección contra las reacciones desfavorables resultantes del muy alto potencial redox del catión radical P680^{*} de larga duración produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, los

centros colectores de luz de los PSII y PSI (LHCII y LHCI), se adaptan a las fluctuaciones lumínicas para equilibrar la absorción de luz y la distribución de energía entre los PS como mecanismos de fotoprotección frente a intensidades lumínicas altas o muy bajas que modifiquen la productividad, e incluso presenten alteraciones foto-oxidativas y resulten en una fotoinhibición (Müller et al., 2001). Por ejemplo, en situaciones de exceso de energía lumínica, los LHCs cambian de transmisión a disipación del exceso de energía absorbida como calor para proteger los centros de reacción de los PS con disminución en la fluorescencia de los pigmentos antena. A este mecanismo de seguridad se le denomina “enfriamiento no fotoquímico de la fluorescencia de Chl” (NPQ por sus siglas en inglés), y ocurre en casi todos los eucariotas fotosintéticos como plantas y microalgas verdes (Müller et al., 2001; Johnson et al., 2011; Holtzegel, 2016).

Por otro lado, el citocromo *b6f* (cyt *b6f*) es un complejo enzimático denominado plastoquinol-plastocianina reductasa (codificado por los genes *petA* y *petD*) de gran tamaño formado por cuatro subunidades: un citocromo *b6* portando grupos hemo de bajo y alto potencial (bL y bH), un citocromo *f* con un grupo hemo *c* covalentemente unido, una proteína ferro-sulfurada de Rieske (FeS_R) en la que dos átomos de Fe están unidos por dos átomos de S y la subunidad IV (proteína de 17 kDa). Cuando la PQH_2 cede sus e^- se oxida transfiriendo uno de los e^- a la FeS_R oxidada, el grupo reducido de Fe y S transfieren el electrón al cit *f*. Posteriormente, el cit *f* transfiere el e^- a la plastocianina (PC). El otro e^- es transferido al cit *b* liberándose en el proceso 2 protones al lumen (Figura 2.8) (Kurusu et al., 2003).

Este complejo es el responsable de la transferencia no cíclica para la reducción a NADPH (proceso que se explica a lo largo del presente escrito y que se da en clorofíceas), y cíclica (está acoplado al bombeo de protones al lumen, puede ser utilizado para sintetizar ATP, pero no puede oxidar al agua ni reducir NADP^+ a NADPH, proceso que se lleva a cabo en ciertos géneros de plantas) (Carril, 2009).

La plastocianina (PC) es una metaloproteína soluble pequeña (~10 kDa) que se encuentra en el lumen del tilacoide, codificada por el gen nuclear *petE*. Funciona como un portador móvil de electrones para transferir electrones del complejo citocromo *b6f* al PSI (P700). Su grupo prostético es un átomo de Cu que sufre una reducción de electrones de Cu^{2+} a Cu^+ a pH 7.0. La estructura de la plastocianina revela que el átomo de Cu tiene cuatro ligandos (Cys, Met y dos His), pertenece a la familia de las proteínas llamadas “azules” debido a la oxidación a Cu^{2+} y produce una longitud de onda a los 600 nm por lo que le da un color azul intenso (Bowyer & Leegood, 1997).

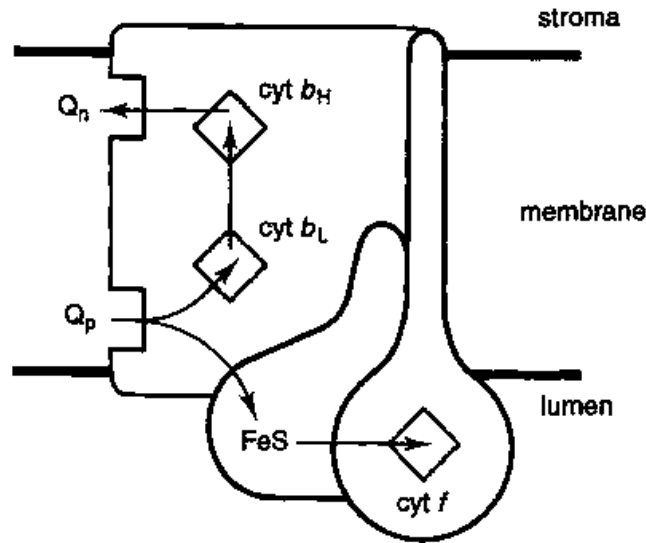


Figura 2.8. Reacciones de transferencia de electrones en el complejo del citocromo *b6f*. Tomado de Bowyer & Leegood, 1997.

El PSI (clorofila P700) es un complejo proteico acoplado a la membrana tilacoidal que utiliza la energía lumínica para producir moléculas energéticas tales como el ATP y NADPH. Cataliza la transferencia de electrones inducida por la luz desde la plastocianina (PC) o el citocromo *c6* en el lumen del tilacoide a ferredoxina o avodoxina en el estroma. Este fotosistema contiene nueve subunidades de proteínas con α -hélices transmembranales: PsaA, PsaB, PsaF, PsaI, PsaJ, PsaK, PsaL, PsaM y PsaX, y tres subunidades del estroma: PsaC, PsaD y PsaE; además de la proteína Ycf4 que se encuentra en la membrana tilacoidal. Esta proteína transmembranal del tilacoide es clave en el ensamblaje de componentes del PSI. La luz es capturada por un sistema de antena central (LHCI) que consta de 90 moléculas de Chl *a* y 22 moléculas de carotenoides (Fromme et al., 2001; Jordan et al., 2001). La energía de excitación se transfiere desde los pigmentos de la antena al donante de electrones primario la clorofila P700. La clorofila excitada (P700*) cede el e^- a un primer aceptor denominado A_0 (Chl *a*) y el siguiente aceptor A_1 (filoquinona) e intervienen tres proteínas ferrosulfuradas asociadas a la membrana que se denominan “centros ferrosulfurados” (4Fe-4S): FeSX, FeSA y FeSB (Figura 2.9). El electrón se transfiere desde el grupo terminal de FeS al transportador de electrones soluble la ferredoxina (Fd). Por último, una flavoproteína soluble asociada a la membrana, la ferredoxina-NADP reductasa (FNR) reduce el $NADP^+$ a NADPH el cual es necesario en el ciclo de Calvin para reducir CO_2 y sintetizar carbohidratos (Fromme et al., 2001).

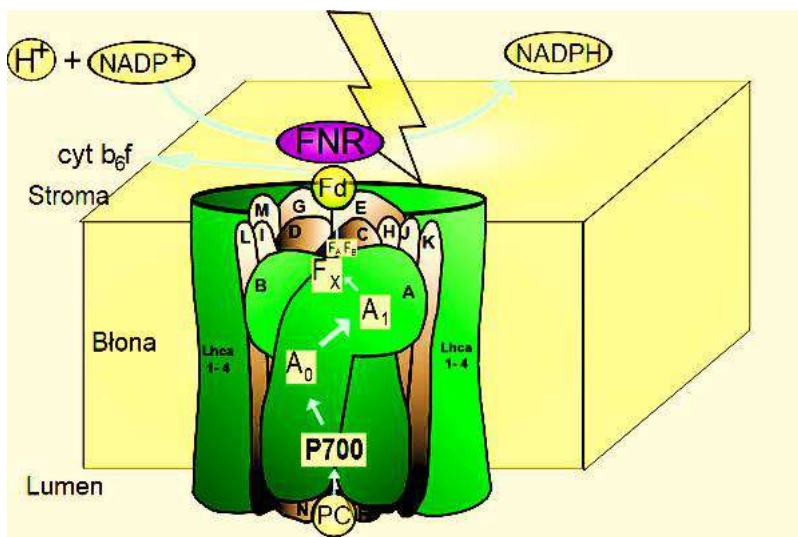
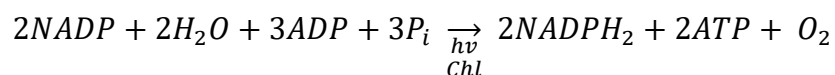


Figura 2.9. Estructura molecular y transferencia energética del PSI. Tomado de Carril, 2009.

2.0.3. Fotofosforilación no cíclica en cloroplastos

El transporte de electrones acumula protones en el lumen del tilacoide, debido a la oxidación del agua a O_2 y al transporte de e^- desde la plastoquinona (PQ) hasta la plastocianina (PC) con $NADP^+$ como aceptor de electrones. Esto produce un gradiente de concentración de iones H^+ entre el lumen (más ácido) y haciéndose el estroma más alcalino que dirige un flujo de iones H^+ a través de la membrana tilacoidal. Este flujo de H^+ libera energía que utiliza la ATP-sintasa en la síntesis de ATP en el estroma (Masojídek et al., 2013). La ATP-sintasa es una enzima que consta de dos partes: CF_0 , que es hidrofóbica y está unida a la membrana (es una porción integral de la membrana), y CF_1 que es la parte hidrofílica en el estroma que sintetiza ATP. La estequiometría del proceso es de: $4H^+$ por molécula de ATP, es decir, $4H^+$ transportados por molécula de ATP sintetizada (Figura 2.10):



Además, el complejo ATP-sintasa está altamente regulado para que no se produzca hidrólisis continua de ATP (por la ATPasa), es inactivo en oscuridad y puede ser activado por un gradiente de protones y por luz (Boyer et al., 1977; Carril, 2009).

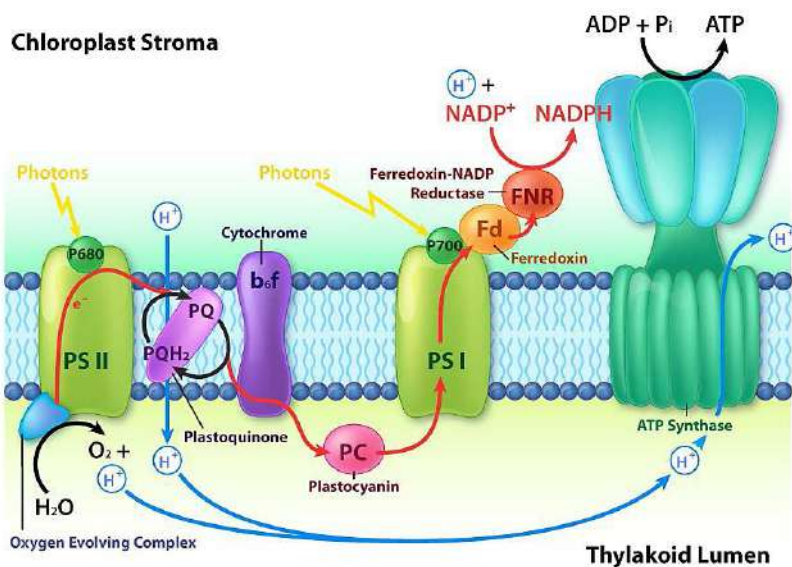
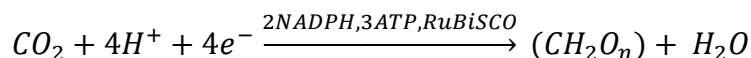


Figura 2.10. Representación esquemática de la fase lumínica y la generación del gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide para la síntesis de ATP por la ATP-sintasa. Original de Boyer et al., 1977.

2.0.4. Fase bioquímica en la fijación de CO₂: Ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB)

La fijación del CO₂ ocurre en la fase oscura usando el NADPH y el ATP producido en la fase fotoquímica de la fotosíntesis para la síntesis de carbohidratos, y tiene lugar en el estroma del cloroplasto. La reacción general de la fase bioquímica puede expresarse de la siguiente forma (Masojídek et al., 2013):



A esta fase bioquímica se le denomina “Ciclo de Calvin-Benson-Bassham” o CBB el cual fue descubierto en la década de los 40’s por Melvin Calvin, James Bassham y Andrew Benson utilizando radioisótopos de ¹⁴C en la Universidad de Berkeley, California, el cual le fue otorgado el Premio Nobel en 1961 a Melvin Calvin por tal descubrimiento (Bassham et al., 1950; Bassham & Calvin, 1960). Además, a esta fase también se le denomina “Metabolismo o ciclo de fijación del carbono de la fotosíntesis”. La conversión de CO₂ en carbohidratos (u otros compuestos) ocurre en cuatro fases distintas (Figura 2.11):

I. Fase de carboxilación o fijación del CO₂

El ciclo comienza con la fijación de una molécula de CO₂ por *carboxilación* en una molécula de ribulosa-1,5-bisfosfato (Ribulosa-bis-P), formándose dos moléculas de 3-fosfoglicerato (Glicerato-P). Esta reacción es catalizada por la enzima clave de este proceso la Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO). La Ribulosa-bis-P es una molécula de 5C, mientras que el Glicerato-P es una triosa. Así que, por cada molécula de CO₂ (1C) que se fija en la pentosa Ribulosa-bis-P, se forman dos moléculas de triosa (en total 6C). Así aumenta el contenido de C para la síntesis de carbohidratos (Bassham & Calvin, 1960; Carril, 2009; Masojídek et al., 2013).

II. Fase de reducción

Tras la fijación de CO₂ se produce la etapa de reducción de 3-fosfoglicerato a gliceraldehído-3-fosfato, un proceso inverso al que tiene lugar en la glucólisis. Esta etapa requiere ATP y el NADPH generados en la fase fotoquímica de la fotosíntesis. El ATP interviene en la fosforilación inicial de 3-fosfoglicerato, reacción catalizada por la fosfoglicerato-quinasa que rinde 1,3-bisfosfoglicerato, a la que sigue la reducción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa acoplada a la oxidación de NADPH (esta reacción es dependiente de luz). El gliceraldehído-3-fosfato (G3P) se convierte en dihidroxi-acetona fosfato (DHAP) (Bassham & Calvin, 1960; Carril, 2009).

III. Fase de regeneración

A partir de este punto del ciclo se inicia la regeneración del aceptor de CO₂ que es la Ribulosa-bis-P mediante varias conversiones. El DHAP se puede condensar con G3P o con eritrosa-4-fosfato en reacciones catalizadas por aldolasas. En el primer caso, se forma la fructosa-1,6-bisfosfato y en el segundo sedoheptulosa-1,7 bifosfato. Dos fosfatasa específicas (fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7 bifosfatasa) convierten estas formas difosfato de azúcares en los correspondientes fructosa-6-fosfato y sedoheptulosa-7-fosfato. Las transcetolasas transfieren un fragmento de 2C (glicolaldehído) desde la sedoheptulosa-7-fosfato y desde la fructosa-6-fosfato al gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y las pentosas que se forman, xilulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato se convierten en ribulosa-5-fosfato por medio de la ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa y ribulosa-5-fosfato isomerasa, respectivamente. Finalmente, la ribulosa-5-fosfato se convierte en ribulosa-1,5-bisfosfato (Ribulosa-bis-P) en una reacción catalizada por la enzima ribulosa-5-fosfato quinasa, la cual requiere de ATP (Bassham & Calvin, 1960; Carril, 2009).

Así pues, por cada molécula de CO_2 fijada en una molécula de ribulosa-1,5-bisfosfato se forman 2 moléculas de 3-fosfoglicerato, cada una de las cuales requiere 1 molécula de ATP para convertirse en 1,3-bisfosfoglicerato y éste a su vez requiere 1 molécula de NADPH para reducirse a gliceraldehído-3-fosfato. Por lo tanto, en fase estacionaria por cada 3 moléculas de CO_2 fijadas se utilizan 6 moléculas de NADPH y 9 de ATP (6 en la conversión de 3-fosfoglicerato en 1,3-bisfosfoglicerato y los otros 3 ATP en la regeneración de las 3 moléculas de ribulosa-1,5-bisfosfato). La sexta molécula de gliceraldehído-3-fosfato que representa la ganancia neta del ciclo, se utiliza en la síntesis de sacarosa o de almidón (Carril, 2009).

IV. Fase de producción: transporte del C fijado

Se consideran los principales productos finales de la fotosíntesis a los carbohidratos, pero los ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos también se sintetizan en la fijación fotosintética del CO_2 . No obstante, se pueden formar varios productos finales bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica, en distintas concentraciones de CO_2 , O_2 y de nutrientes (Masojídek et al., 2013).

El C fijado en forma de triosas-fosfato en el ciclo de Calvin, es exportado desde el cloroplasto al citoplasma. Este transporte se realiza en forma de sacarosa la cual no se sintetiza en el cloroplasto ya que en este no existen las enzimas necesarias para su síntesis y, además, la membrana interna del cloroplasto es impermeable al azúcar, no obstante, se sintetiza en el citosol a partir de las triosas-fosfato (triosas-P). Por tanto, la síntesis de almidón y sacarosa se producen en el cloroplasto y el citosol, respectivamente. La salida de triosas-fosfato del cloroplasto al citosol está mediada por un transportador de P_i que mediante un mecanismo de contratransporte intercambia moléculas de triosas-P y P_i con una estequiometría 1:1. La salida de triosas-P al citosol está estrictamente acoplada a la incorporación de ortofosfato (P_i) al cloroplasto. Esto da lugar a la captación continuada de energía lumínica y la síntesis de ATP que precisa P_i (Carril, 2009).

Por ejemplo, cuando la concentración de P_i en el citosol es alta, las triosas-P del cloroplasto se exportan al citosol para la síntesis de sacarosa, por el contrario, cuando la concentración citosólica de P_i es baja, las triosas-P son retenidas en el cloroplasto y se sintetiza almidón como un mecanismo de reserva. En condiciones de baja fijación de CO_2 y en ausencia de reservas de almidón, la disponibilidad de triosas fosfato puede ser un factor limitante en la síntesis de sacarosa. Por el contrario, cuando la tasa de fijación es muy alta, la liberación de P_i en el citosol asociada a la síntesis de sacarosa determina su exportación desde el cloroplasto (Carril, 2009).

Sin embargo, la sacarosa funciona como autoregulador en su síntesis, es decir, se comporta como inhibidor competitivo con el sustrato por el centro activo de la sacarosa P-fosfatasa por lo que el grado de inhibición depende de la concentración de ambas sustancias. Por último, la concentración de fructosa-2,6-bifosfato en el citosol también regula la síntesis de sacarosa. De igual manera, La fructosa-2,6-bifosfato se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato por una fructosa-6-fosfato-2-quinasa y es degradada por fructosa-2,6-bifosfatasa, y ambas enzimas están controladas por P_i y triosas-P (Carril, 2009).

Con respecto a la síntesis de almidón, cuando la producción de triosas-P supera la cantidad utilizada en la síntesis de sacarosa en el citosol, entonces el exceso de triosas se canaliza en el estroma del cloroplasto hacia la síntesis de almidón. El almidón se sintetiza vía fructosa-1,6-bifosfato. La glucosa-1-fosfato se convierte en ADP-glucosa por la ADP-glucosa pirofosforilasa, su actividad está modulada por las concentraciones de ácido 3-Fosfoglicérico y P_i por lo que requiere de ATP y genera pirofosfato (PP_i), de manera que se activa cuando la relación entre estos dos metabolitos es elevada, e inactivándose a bajas concentraciones. Una fosfatasa inorgánica específica hidroliza el PP_i a dos moléculas de ortofosfato (P_i) (Carril, 2009; Masojídek et al., 2013).

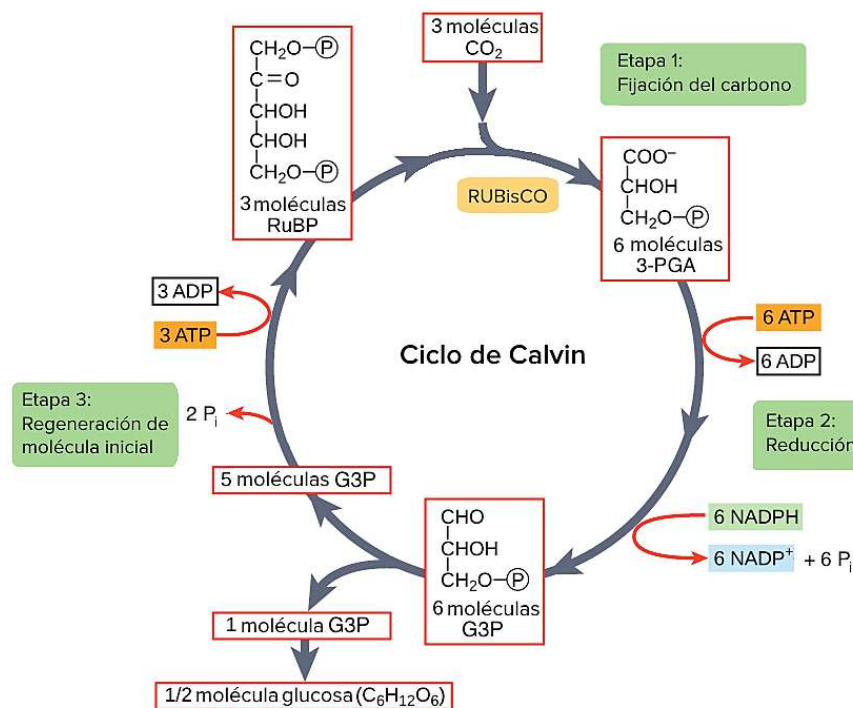


Figura 2.11. Ciclo de Calvin-Benson: fase bioquímica de la fotosíntesis. Modificada de Bassham et al., 1950 y Bassham & Calvin, 1960.

El almidón cloroplástico se moviliza durante la noche que es cuando hay una baja relación del 3 fosfoglicerato/ P_i que impide la acción de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa. Por lo tanto, las concentraciones relativas de triosas-P y ortofosfato (P_i) controlan si el C fijado se canaliza hacia la síntesis de sacarosa en el citosol o de almidón en el cloroplasto (Carril, 2009).

2.0.4.1. Regulación del Ciclo de Calvin-Benson-Bassham

Sin un sistema de regulación, este ciclo no mostraría alta eficacia energética y se producirían ciclos ineficientes como la acción simultánea de las enzimas fosfructoquinasa y fructosa-1,6-bifosfato 1-fosfatasa, las cuales actuarían conjuntamente como una ATPasa (Carril, 2009).

Por otra parte, la regulación enzimática se debe a la expresión génica, modificaciones conformacionales de las enzimas (transformaciones en enlaces covalentes como carbamilación de grupos amino o la reducción de grupos disulfuro), no obstante, la activación e inactivación enzimática se debe a factores como la temperatura, pH, intensidad lumínica, concentración de CO_2 y O_2 . Pero, además, de autorregulación de acuerdo con la concentración de sus sustratos, inhibición por contaminantes como metales (Cd), herbicidas (DCMU) o reemplazo de cofactores metálicos correspondientes a las metaloenzimas, entre otros.

Así pues, varias enzimas se encuentran reguladas por luz como la RuBisCO, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Fructosa-1,6 bifosfatasa, Sedoheptulosa-1,7 bifosfatasa, Ribulosa-5-fosfato quinasa. Estas enzimas presentan puentes disulfuro (-S-S-) y la luz controla su actividad a través de un sistema ferredoxina-tiorredoxina que implica transferencia de electrones desde ferredoxina a tiorredoxina. En oscuridad, los residuos están en forma oxidada (-S-S-) por lo que las enzimas se encuentran inactivas (Figura 2.12). No obstante, en presencia de luz, los grupos -S-S- son reducidos a grupos sulfidrilo (-SH HS-) de manera que, esta reacción de óxido-reducción produce la activación de la enzima (Carril, 2009).

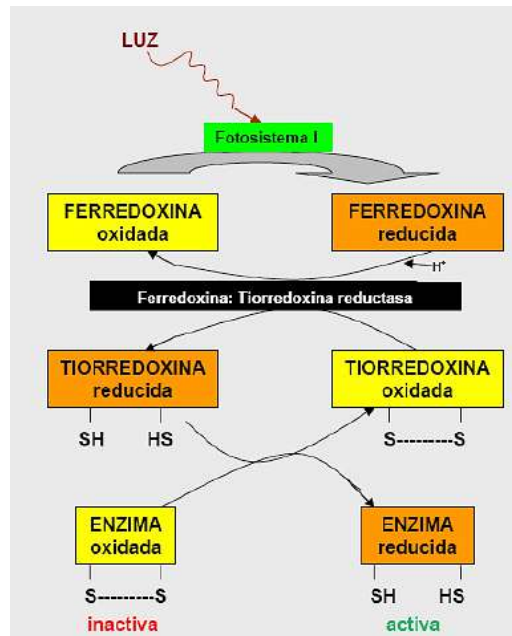


Figura 2.12. Regulación de las enzimas del Ciclo CBB por intensidad lumínica a través de la relación Ferredoxina-Tiorredoxina. Tomado de Carril, 2009.

2.0.5. RuBisCO: Estructura, actividad y regulación

La RuBisCO (Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa) es una enzima con una masa molecular de 560 kDa, se trata de una enzima monofilética que existe en 2 formas: la forma I que presenta 8 copias polipeptídicas grandes y 8 subunidades pequeñas $(L_2)_4(S_4)_2$, el gen cloroplasto *rbcL* codifica la subunidad grande (L) de 50-55 kDa, mientras que una familia de genes nucleares *rbcS* codifican para las subunidades pequeñas (S) de 12-18 kDa (Clegg, 1993; Spreitzer & Salvucci, 2002). Es la forma predominante de la RubisCO, y está presente en plantas terrestres y marinas, micro y macroalgas eucariotas, cianobacterias y bacterias fototróficas (Tabita et al., 2007). Mientras que, la forma II de la RuBisCO se encuentra en algunos organismos procariotas (por ejemplo, en bacterias no azufradas como *Rhodobacter sphaeroides*) y dinoflagelados, la cual consiste en un dímero de solo grandes subunidades $(L_2)_n$ (Whitney & Andrews, 1998; Spreitzer & Salvucci, 2002; Andersson & Backlund, 2008). Existe una forma III de la RuBisCO, hasta ahora encontrada en arqueas, que comprende 10 subunidades grandes dispuestas como cinco dímeros (Kitano et al., 2001).

La RuBisCO se le considera una enzima ineficiente con un recambio muy lento, debido a que fija solo 10 moléculas de CO_2 por segundo, por lo que se estima que la RuBisCO representa hasta el

50% de proteína total soluble en los organismos fotoautótrofos, no obstante, proporciona más del 45% de la productividad primaria en el planeta (Field et al., 1998; Feller et al., 2008). Además, las microalgas presentan una afinidad intermedia en la RuBisCO por el CO_2 en el rango de 30-80 μM (Badger et al., 1998).

El sitio activo la RuBisCO está ubicado en el extremo carboxilo terminal de las cadenas β . Los residuos del dominio amino-terminal de la subunidad grande adyacente en el dímero completan el sitio activo. Por lo tanto, la unidad funcional de la RuBisCO es un dímero L2 de grandes subunidades que albergan dos sitios activos como se muestra en la Figura 2.13 (Andersson & Backlund, 2008).

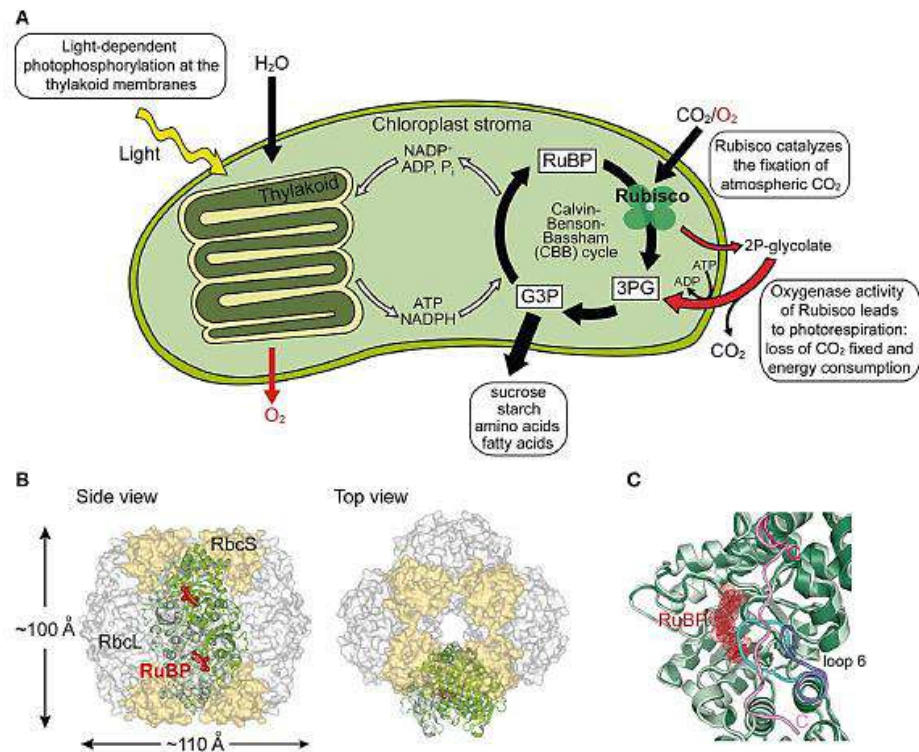


Figura 2.13. Estructura y función de la RuBisCO. **A)** Representación esquemática de la fotosíntesis en cloroplastos y el papel de la RuBisCO. Fase fotoquímica, el ciclo de Calvin-Benson-Bassham y la Fotorespiración. **B)** Estructura de la forma hexadecamérica la forma I de la RuBisCO. **C)** Superposición de conformaciones abiertas y cerradas de la RuBisCO. En el estado cerrado (verde oscuro), el bucle 6 (color turquesa) cubre el sitio activo, atrapando el RuBP unido (rojo), y se fija mediante el péptido C-terminal flexible (rosa) que se extiende a través de la subunidad RbcL. En la conformación abierta (verde pálido), el bucle 6 (azul oscuro) se retrae y el péptido C-terminal (rosa) se encuentra desordenado. Original de Taylor & Andersson, 1997, y Modificado por Bhat et al., 2017.

Además de fijar CO_2 por su actividad carboxilasa mencionado en el ciclo CBB, no obstante, la especificidad de la RuBisCO para el CO_2 es limitada (por ejemplo, por cambios en temperatura, concentración o déficit en CO_2 , expresión de la anhidrasa carbónica, intensidad lumínica, entre otros factores que se detallarán más adelante en el presente manuscrito), la RuBisCO también puede usar oxígeno como sustrato a través de su actividad oxigenasa. En esta reacción, denominada Fotorespiración, la RuBisCO cataliza la oxigenación de ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), produciendo solo una molécula de 3PG y una molécula del subproducto tóxico 2-fosfoglicolato (2P-glicolato). El 2P-glicolato debe luego reciclarse en 3PG a través de la vía mitocondria-peroxisoma dependiente de ATP con la pérdida de CO_2 (Whitney et al., 2011). Como se detalla más adelante en la fase de “*Fotorrespiración*”.

Para activar a la RuBisCO, un residuo de lisina del sitio activo (Lys201) primero debe ser carboxilado por una molécula de CO_2 sin sustrato, seguido de la unión de un ion Mg^{2+} . A este proceso se le denomina carbamilación y sirve para posicionar la Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) para el ataque electrofílico por la segunda molécula de CO_2 . Una vez carbamylada con Mg^{2+} unido, se acopla a la RuBP y lo convierte a la forma 2,3-enediolato (enol-RuBP), esta primera reacción parcial requiere que se abstraiga un protón del C-3 de RuBP. Conjuntamente, la basicidad del oxígeno del carboxilato libre está influenciada por los residuos Asp-203 y Glu-204 que, junto con el residuo Lys-201 carbamylado, ligan al Mg^{2+} , por lo que estos residuos son esenciales para la catálisis. Entonces, el par de iones H^+ de RuBP se mueve al C3-C2, creando una carga negativa en el oxígeno del C2. Luego, el CO_2 realiza un ataque nucleofílico al 2-3-enediolato, formando el 3-ceto-2-carboxiarabinitol-1,5-bisfosfato inestable (Spreitzer & Salvucci, 2002).

Aunque la RuBisCO funcione bajo condiciones de oscuridad, no obstante, se encuentra regulada también por la luz. En este caso, la activación de la RuBisCO implica la carbamilación (como se ha citado anteriormente), esta activación es igualmente favorecida por un aumento de Mg^{2+} y del pH (condiciones alcalinas o baja concentración de H^+), ya que facilita la desprotonación del grupo amino de la Lys-201 del sitio activo. Además, el CO_2 implicado en la carbamilación es otro distinto del CO_2 que se fija en ribulosa-1,5-bisfosfato (Carril, 2009).

Por otra parte, la RuBisCO puede inactivarse por una decarbamilación espontánea y puede ser inhibida por los llamados “subproductos de fallo de encendido” como la xilulosa-1,5-bisfosfato (XuBP) y 2,3-pentodiulosa-1,5-bisfosfato (PDBP) (Figura 2.14). De igual forma, a bajas

The diagram illustrates the activation of Rubisco (R1) and Rubisco activase (R2) in the chloroplast stroma. Rubisco (R1) is shown in a green oval, and Rubisco activase (R2) is shown in an orange oval. The activation of Rubisco (R1) is a two-step process. In the first step, Rubisco (R1) is converted to an active state (ECM) by the addition of CO_2 and Mg^{2+} . In the second step, the active state (ECM) is converted to a CO₂ fixation state by the addition of RuBP and CO_2 . The activation of Rubisco activase (R2) is also a two-step process. In the first step, Rubisco activase (R2) is converted to an active state (ECMI) by the addition of CA1P , XuBP, and PDBP. In the second step, the active state (ECMI) is converted to a CO₂ fixation state by the addition of CA1P , XuBP, and PDBP. The diagram also shows the conversion of Rubisco (R1) to an inactive state (EI) and Rubisco activase (R2) to an inactive state (ECMI) by the addition of RuBP and XuBP. The conversion of Rubisco (R1) to an inactive state (EI) is catalyzed by Rca + ATP. The conversion of Rubisco activase (R2) to an inactive state (ECMI) is catalyzed by Rca + ATP.

Así pues, para estos eventos inhibitorios, la RuBisCO debe ser “remodelada” conformacionalmente por la RuBisCO activasa (Rca) para recuperar su actividad catalítica (Portis et al., 2008). La Rca pertenece a un subgrupo de las ATPasas asociadas con diversas actividades celulares denominadas AAA⁺, por lo que se encuentra regulada por la relación ATP/ADP intracelular o por la formación reversible de enlaces disulfuro en el terminal C. Además, las microalgas verdes y plantas expresan fosfatasa específicas para la eliminación de fosfatos de azúcar inhibitorios como XuPB y PDBP los cuales compiten con la Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) (Bracher et al., 2017).

Las microalgas adquieren el carbono inorgánico (Ci) disuelto del medio acuoso circundante para llevar a cabo la fase bioquímica de la fotosíntesis. Sin embargo, la mayoría de géneros de microalgas crecen en medios alcalinos, ya sea en agua dulce a un pH superior a 7.0 o en agua marina con un rango de pH de 8.0 a 8.3. Dentro de estos rangos de pH, la mayor parte del Ci está en forma de HCO_3^- , y el CO_2 constituye el 1% del Ci total cuando el medio está en equilibrio con la atmósfera. Además, la tasa de difusión del CO_2 en el agua es 10^4 veces más pausada que la de la atmósfera, por lo que la tasa de conversión no catalizada de HCO_3^- a CO_2 es muy lenta a pH

alcalino. Así pues, estos factores causan una limitación en el suministro de CO_2 y, por lo tanto, pueden restringir severamente la actividad fotosintética en microalgas (Colman et al., 2002). En este contexto, las microalgas tienen la capacidad de absorber y acumular el CO_2 de forma intracelular, denominándose “**Mecanismos de concentración de CO_2** ” (CCM, por sus siglas en inglés). El objetivo principal del CCM es aumentar la concentración del CO_2 alrededor de la RuBisCO para favorecer la reacción de carboxilación a expensas de la reacción de oxigenasa, logrando así una eficiencia fotosintética incluso a bajas concentraciones de CO_2 como se muestra en la Figura 2.13 (Badger & Price, 1994; Badger et al., 1998). Este proceso consta de 3 componentes clave que intervienen en la absorción inicial del Ci : a) absorción activa y directa del HCO_3^- , b) un mecanismo de transporte activo del CO_2 , y c) la anhidrasa carbónica (AC) (Colman et al., 2002).

La anhidrasa carbónica (también denominada AC; carbonato liasa, carbonato deshidratasa; EC 4.2.1.1) es una metaloenzima que contiene zinc la cual cataliza la interconversión reversible de CO_2 y HCO_3^- (Sültemeyer, 1998). Se encuentra en varios compartimentos celulares como el estroma del cloroplasto, mitocondria, citoplasma y en el espacio periplásmico de microalgas (Figura 2.16) (Eriksson et al., 1996). En este caso, las AC que se encuentran en el espacio periplásmico están codificadas por dos genes CAH1 y CAH2. La CAH1 es la principal AC periplásmica y su transcripción se induce rápidamente en condiciones de baja concentración de CO_2 , mientras que la CAH2 se expresa principalmente en condiciones elevadas de CO_2 (Fujiwara et al., 1990). Existe otra forma de la AC en el lumen del tilacoide denominada CAH3 con actividad sobre la formación de CO_2 a partir de HCO_3^- en el lumen ácido del tilacoide (Figura 2.16), además tiene actividad sobre la difusión del CO_2 a través de la membrana tilacoidea al pirenoide (proteína rodeada de almidón que forma parte importante del CCM y su principal función es actuar como centro de fijación de CO_2 generando y manteniendo un ambiente rico en CO_2 alrededor de donde la RuBisCO lo carboxila) (Raven, 1997). Asimismo, la AC se ha encontrado en mitocondria en *Chlamydomonas reinhardtii* denominada LIP21 con función similar a la AC periplásmica, pero también parece estar involucrada en la amortiguación de la matriz mitocondrial al aumentar la velocidad a la que el NH_3 fotorrespiratorio se convierte en NH_4^+ (Eriksson et al., 1998). El sitio activo de Zn se encuentra coordinado por el grupo de aminoácidos Cys-Asp-His-Cys (Figura 2.15) (Mitsuhashi et al., 2000).

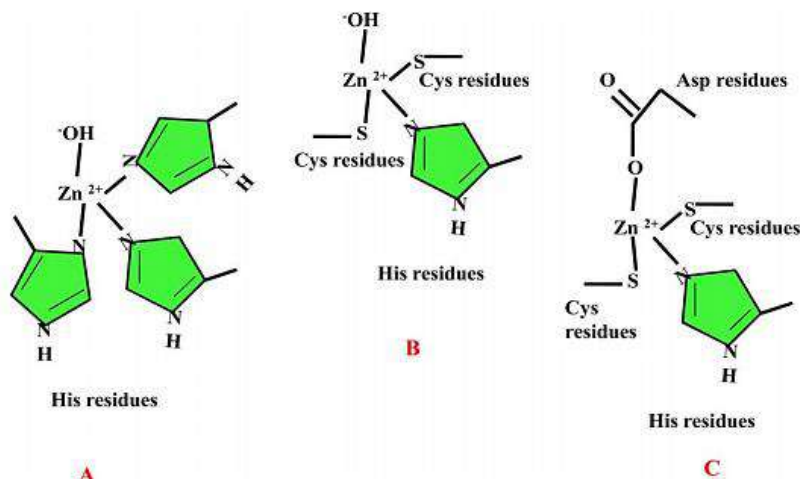


Figura 2.15. Estructura y unión del ion Zn^{2+} en α -AC, β -AC, γ -AC. Tomado de Mondal et al., 2016.

Esta enzima participa en diversos procesos fisiológicos como: en las reacciones de carboxilación-descarboxilación, el transporte de CO_2 y HCO_3^- a través de las membranas ya sea por mecanismos pasivos (difusión) o activos, regulación del pH e intercambio iónico (Sültemeyer, 1998). Existen 3 familias de genes de la AC: α , β y γ . Las plantas presentan los tres tipos de AC ya que las tres están representadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, las cianobacterias tienen tanto α -AC como β -AC y las γ -AC, en clorofíceas como *Chlamydomonas reinhardtii* presentan tanto α -AC como β -AC, e incluso en animales se encuentra el tipo α -AC. Sin embargo, se pueden expresar los 3 tipos de AC en animales como mamíferos y el ser humano, plantas, macro y microalgas verdes, eubacterias, arqueas e incluso virus (en la regulación de la replicación) (Hewett-Emmett & Tashian, 1996). La AC se presenta tanto en microalgas de agua dulce como agua marina de las clases Chlorophyceae (ej. El género de *Chlamydomonas*), Bacillariophyceae (ej. diatomeas), Rhodophyceae (ej. algas rojas), Haptophyceae (cocolitóforos como *Isochrysis* sp.) (Sültemeyer, 1998).

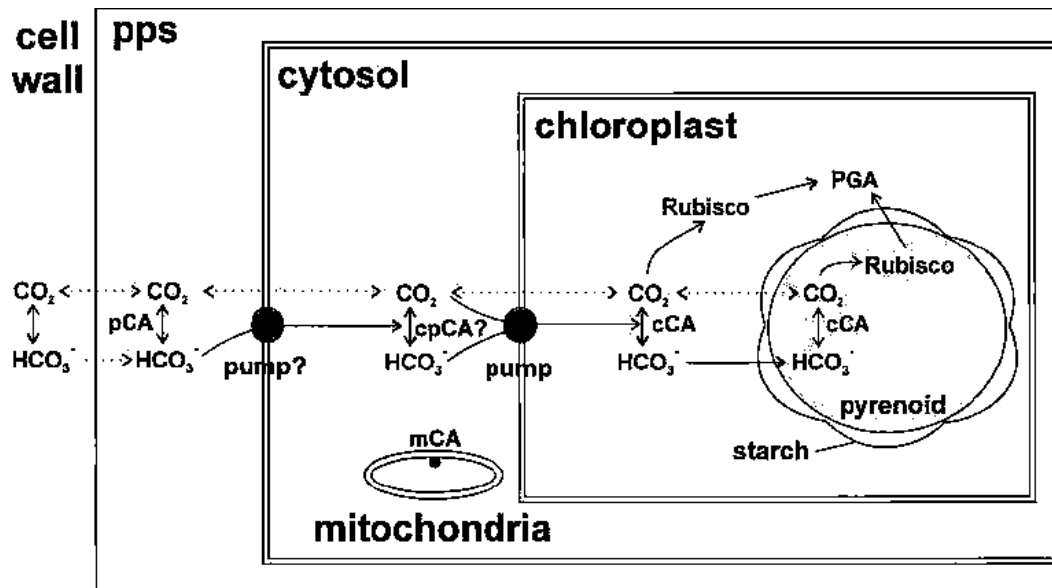
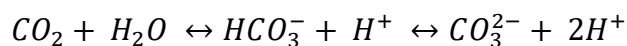


Figura 2.16. Mecanismo de concentración de CO₂ (CCM) en microalgas. La difusión del CO₂ hacia adentro y hacia afuera se indica mediante flechas punteadas. Pps: espacio periplásmico; pCA: AC periplásmica; cpCA: AC citosólica; cCA: AC en cloroplasto; mCA: AC mitocondrial. Tomado de Sültemeyer, 1998.

Su actividad se basa en que el Zn-OH⁻ ataca una molécula de CO₂ generando un HCO₃⁻ unido al Zn. El HCO₃ unido al zinc es reemplazado por 1 mol de H₂O liberando HCO₃⁻. El HCO₃⁻ gana un H⁺ para formar H₂CO₃ o puede perder un H⁺ adicional para formar CO₃²⁻, como se muestra a continuación (Sültemeyer, 1998; Moroney et al., 2001):



Como se mencionó anteriormente, el pH interviene en el equilibrio entre las formas de Ci. Por ejemplo, a pH por debajo de 6.4 predomina el CO₂; a pH entre 6.4 y 10.0 predomina la forma HCO₃⁻; mientras que por encima del pH de 10.3, prevalece el CO₃²⁻ (Moroney et al., 2001).

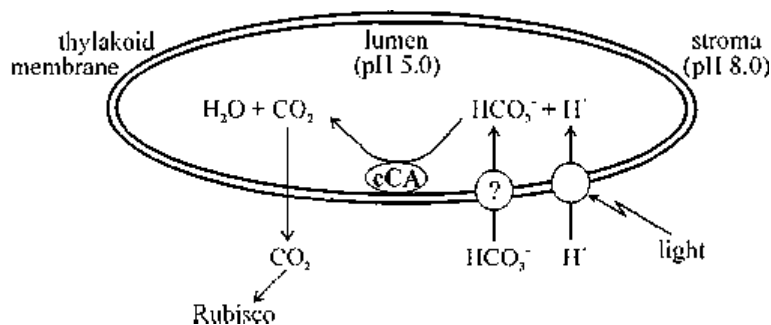


Figura 2.17. Función y regulación de la AC periplásmica bajo pH e intensidad lumínica. Tomado de Sültemeyer, 1998.

2.0.7. Fijación del O₂ por la RuBisCO oxigenasa: Fotorrespiración o ciclo C₂

Como se mencionó anteriormente, la RuBisCO actúa también como oxigenasa en la fijación de O₂ con la RuBP para formar el compuesto tóxico fosfoglicolato. Después de la desfosforilación por la 2-fosfoglicolato fosfatasa (2PG), el glicolato se transforma en tres compartimentos celulares: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria formando glicina, serina, amoníaco y liberando CO₂ (Masojídek et al., 2013). Es posible que este proceso sea un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo que se genera en organismos fotoautótrofos sometidos a elevadas intensidades lumínicas e irradiación, y a una disminución de la concentración de CO₂, lo que induce alteraciones entre el transporte de electrones y la fijación de C durante el ciclo de CBB (Figura 2.18) (Rigobello-Masini et al., 2012).

La afinidad de la RuBisCO por el CO₂ y el O₂ depende de la concentración de ambos sustratos, la solubilidad, es decir, el CO₂ es 10⁴ veces menos soluble y su difusión es baja, esto además depende de la temperatura. Por ejemplo, a bajos valores de temperatura se incrementa la solubilidad del CO₂, lo que favorece la carboxilación de la RuBisCO, mientras que, a elevados rangos de temperatura se estimula la fotorrespiración, esto se debe por una parte, a la mayor pérdida de afinidad de la RuBisCO por el CO₂ que por el O₂ a medida que la temperatura aumenta y, por otra parte, a que se incrementa la proporción de O₂ disuelto respecto a la proporción de CO₂ (Azcón-Bieto & Talón, 2013; Larkum, 2016). Además, la fotorrespiración disminuye la eficiencia fotosintética y genera un gasto energético elevado (3.5 ATP + 2 NADPH por cada RuBisCO oxigenasa) en comparación con la fijación del CO₂ por la RuBisCO carboxilasa en el ciclo CBB (3 ATP + 2 NADPH por cada ciclo), por lo tanto, la eficiencia se reduce de un 90% en condiciones

no fotorespiratorias y hasta un 54% en la fotorrespiración (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Sin embargo, este proceso permite la recuperación del 75% del carbono perdido por el cloroplasto en forma de fosfoglicolato. Conjuntamente, a intensidades lumínicas elevadas y baja concentración de CO₂, la fotorespiración utiliza el exceso de ATP y NADPH generado en los tilacoides y, por tanto, disipa el exceso de energía, previniéndose así la fotoinhibición (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Por tanto, el ciclo fotorespiratorio es un proceso de fotoprotección y complementario al de los carotenoides. No obstante, los factores que intervienen en la fotosíntesis se describen de forma detallada en la sección de “*Factores que modifican la eficiencia fotosintética*”.

Así pues, la fotorrespiración ocurre de la siguiente manera:

Cloroplasto

Se recicla el C del 2-fosfoglicolato a 3-fosfoglicerato que, a su vez, es metabolizado en la fase bioquímica del ciclo de CBB. El glicolato sale del cloroplasto a través de un antiportador de glicolato-glicerato y entra al peroxisoma a través de canales similares a la porina (Reumann & Weber, 2006; Bauwe et al., 2010).

Peroxisoma

El Glicolato es oxidado por la glicolato oxidasa (GOX) a glioxilato y a H₂O₂ de forma irreversible. El H₂O₂ producido es reducido por la catalasa (CAT) a 2H₂O + O₂. Sin embargo, en microalgas y cianobacterias utilizan la glicolato deshidrogenasa (GLD) que convierte el glicolato a glioxilato usando NAD⁺ como aceptor de e⁻ el cual minimiza la generación de H₂O₂ (Bauwe et al., 2010); no obstante, se ha estimado que en microalgas verdes se encuentran ambas enzimas (GOX y GDL) (Chauvin et al., 2008).

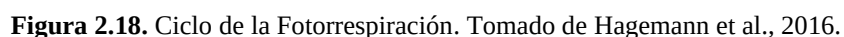
El siguiente paso implica dos procesos que ocurren de forma simultánea: la conversión a serina por la serina-glioxilato aminotransferasa (SGT) y la conversión a glicina por la glutamato-glioxilato aminotransferasa (GGT), que participa junto con los ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs, en el metabolismo de otros aminoácidos (Liepman & Olsen, 2001; Rigobello-Masini et al., 2012).

Mitocondria

La glicina sale del peroxisoma y entra en la mitocondria donde la glicina descarboxilasa (GDC) y la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) convierte 2 moléculas de glicina y 1 mol de NAD⁺ en una molécula de serina. Las enzimas SHMT y la GDC son altamente susceptibles a la oxidación y se regulan de forma similar por la relación ferredoxina-tiorredoxina (Martí et al., 2009). La GDC

es un complejo multienzimático que comprende de 4 proteínas: P, T, L y la forma lipofílica H. El ciclo de reacción completo requiere una molécula de glicina, tetrahydrofolato (THF) y NADP^+ para producir una molécula de metileno-THF ($\text{CH}_2\text{-THF}$). En esta reacción se libera una molécula de CO_2 y NH_3 (por las proteínas P y T, respectivamente) y se produce NADPH (por la proteína L) (Bauwe et al., 2010). El CO_2 se exporta por la anhidrasa carbónica (mecanismo citado anteriormente). Por otro lado, gran parte del NADPH generado se recicla a NADP^+ dentro de la mitocondria y una fracción se exporta al citosol a través del transportador de malato (Nunes-Nesi et al., 2008).

La serina formada en la mitocondria regresa al peroxisoma donde el grupo amino se transfiere al glioxilato mediante la SGT y el hidroxipiruvato producido se reduce a glicerato por la hidroxipiruvato reductasa dependiente de NADPH (HPR1). El NADPH no puede penetrar la membrana peroxisomal y debe ser generado por la malato deshidrogenasa peroxisomal (pMDH), que consume el malato proporcionado por los cloroplastos y las mitocondrias. Finalmente, la enzima glicerato-3 quinasa (GLYK) completa el ciclo devolviendo el 3-fosfoglicerato (3PGA) para llevar de vuelta al ciclo de CBB en el cloroplasto (Bauwe et al., 2010).



El complejo proceso de la fotosíntesis debe funcionar de forma integrada y eficiente en un medio en el que existen numerosos factores ambientales que alteran a la tasa fotosintética de las microalgas, entre tales factores que afectan de forma directa e indirecta se encuentran: la intensidad y calidad lumínica, la temperatura, pH, concentración de CO₂ y O₂ (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

158

2.0.8.1. Concentración de CO_2/O_2

El CO_2 se encuentra en la atmósfera de forma natural en concentraciones bajas alrededor de 380 ppm, es un factor clave que determina la tasa fotosintética durante su fijación por la RuBisCO carboxilasa en el ciclo bioquímico CBB (citado anteriormente). En general, al incrementarse la concentración de CO_2 se aumenta la tasa de fotosíntesis neta (P_n), es decir, se incrementa la asimilación bruta del CO_2 y disminuye la fotorespiración. Por el contrario, cuando los niveles de CO_2 son bajos, la Ribulosa1,5-bifosfato (RuBP) se sintetiza en la fase de regeneración del ciclo de Calvin, más rápidamente de lo que es utilizada por la RuBisCO, por lo que la RuBP se encuentra en exceso. En estas condiciones, la fotosíntesis se encuentra limitada por la actividad carboxilasa de la RuBisCO (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

La RuBisCO utiliza de forma rápida a la RuBP de lo que se sintetiza por lo que la tasa fotosintética llega a fase estacionaria, es decir, la enzima se satura y la fotosíntesis se encuentra ahora mediada por la velocidad en la regeneración de RuBP e intensidad lumínica, la cual a su vez necesita de los productos fotoquímicos ATP y NADPH. En este proceso, la concentración del CO_2 va disminuyendo a medida que se fija durante el ciclo de Calvin, pero nunca alcanza valores nulos, sino que existe un equilibrio entre la fijación del CO_2 por la RuBisCO y su liberación durante la fotorespiración, a este equilibrio se le denomina “**Punto de compensación de CO_2 (I)**” (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

2.0.8.2. Intensidad lumínica

Las microalgas contienen clorofila (Chl *a*, *b*) y otros pigmentos para la fotosíntesis que convierten la energía lumínica en energía química (Singh & Singh, 2015; Wong et al., 2015). Así pues, la productividad de la biomasa de microalgas es el resultado neto de la fotosíntesis y la respiración (Béchet et al., 2013b). La parte visible del espectro varía desde el violeta de aproximadamente 380 nm hasta el rojo lejano a 750 nm. Las longitudes de onda de la luz visible donde se lleva a cabo la fotosíntesis corresponden a la “**Radiación Fotosintéticamente Activa o Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético**” (PAR o PPFD por sus siglas en inglés), es decir, el flujo de fotones o cuantos de longitudes de onda efectivas para la actividad fotosintética (400-700 nm), se muestra en la Figura 2.19 (Masojídek et al., 2013). Mientras que, el “**Punto de Compensación lumínico**”

corresponde a la densidad del flujo fotónico en el que el intercambio neto de CO_2 es igual a 0, debido a que se igualan las tasas de consumo fotosintético del CO_2 y la liberación del mismo por la respiración (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

En el ambiente acuático, se presentan fluctuaciones de intensidad lumínica debido a que las moléculas del agua absorben fuertemente la luz en las longitudes de onda altas en la región del rojo lejano ($\sim 700 \text{ nm}$), por lo que no hay suficiente luz roja para que las microalgas puedan generar su captación. Los valores máximos de PAR se presentan entre los 2000 y 2300 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Masojídek et al., 2013).

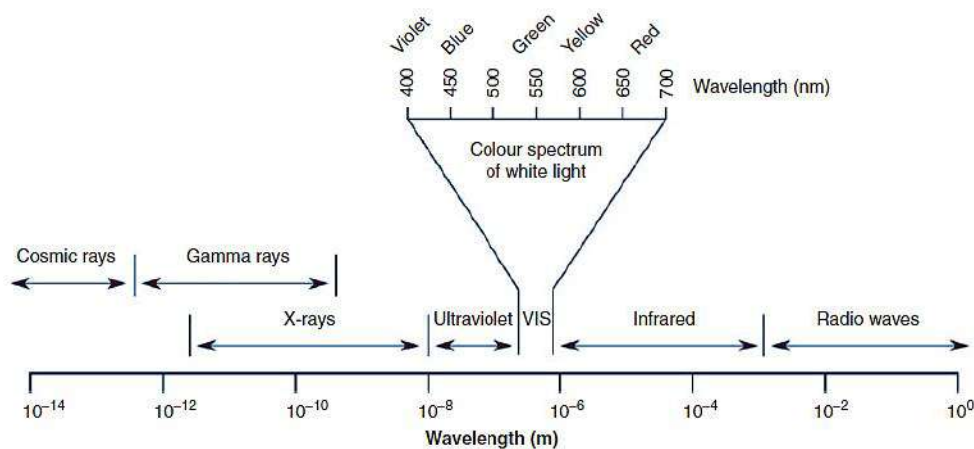


Figura 2.19. Espectro de radiación. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) varía de 400 a 700 nm. Tomado de Masojídek et al., 2013.

Por otro lado, en el agua se encuentran una gran cantidad y variedad de contaminantes (ej. Colorantes, plaguicidas, aceites, entre otros) y materia orgánica en suspensión que absorben y dispersan la cantidad de luz a zonas de longitudes de onda menores en la región del azul ($\sim 400 \text{ nm}$) que pueda penetrar en el agua, generando que esta luz incremente y se disminuya el proceso fotosintético del fitoplancton (Rai and Gaur, 2001). Asimismo, la calidad y cantidad de luz en el ambiente acuático varía desde la superficie hasta la capa más profunda por lo que condiciona la fotosíntesis.

De hecho, la intensidad lumínica es una de las principales determinantes en la productividad en las microalgas. Un incremento en la misma puede generar un aumento en la tasa de crecimiento máximo, pero, además en la evolución de la tasa de oxígeno fotosintético (Huesemann et al., 2016).

Sin embargo, a altas intensidades fotónicas se altera negativamente provocando una reducción en la tasa fotosintética, y por lo tanto en una fotoinhibición (Ragni et al., 2008). No obstante, a bajas intensidades lumínicas, la tasa de fotosíntesis suele ser proporcional a la intensidad de la luz porque la fotosíntesis está limitada por la velocidad de captación de fotones y la baja velocidad de transferencia de electrones (Chang et al., 2016). Cuando la intensidad lumínica alcanza un umbral de saturación o “**Punto de saturación lumínico**”, las microalgas se saturan de luz porque su tasa fotosintética ahora está limitada por la velocidad de las reacciones posteriores a la captación de fotones, como se muestra en la Figura 2.20. Bajo esta condición, la tasa de fotosíntesis generalmente es máxima e independiente de la intensidad de la luz (Béchet et al., 2013a). Conjuntamente, el “**Rendimiento cuántico fotosintético**” o “**Eficiencia fotosintética**” evalúa la concentración del CO_2 en función de los fotones absorbidos (es decir, $\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de fotones) (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

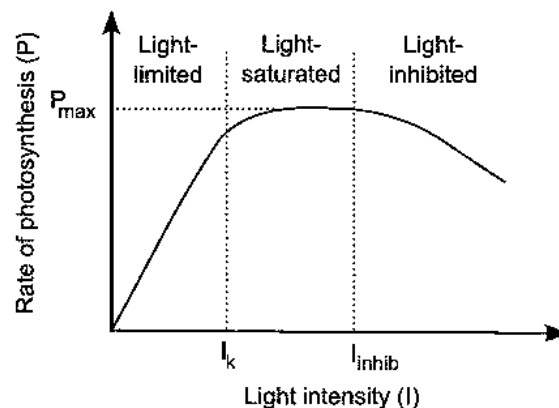


Figura 2.20. Tasa fotosintética con respecto a la intensidad lumínica aplicada en microalgas: $P_{\max}$: corresponde a la fotosíntesis máxima; I : Intensidad lumínica; I_k : Punto de saturación lumínico; I_{inhib} : Intensidad lumínica inhibitoria. Tomado de Béchet et al., 2013b.

De la misma manera, la intensidad fotónica interfiere con el contenido de pigmentos fotosintéticos en los complejos colectores de luz (en los pigmentos antena, por ejemplo, Clorofila *a*). Los cambios en la cantidad de luz ocurren en segundos y pueden conducir fácilmente a la sobreexcitación de la maquinaria fotosintética, induciendo fotoalteraciones o incluso llevando a la muerte de la microalga (Croce & Amerongen, 2014). Estas alteraciones también inducen una adaptación a las variaciones en la intensidad lumínica, a través de modificaciones en un incremento de clorofila para maximizar la captación fotónica a bajas intensidades de luz. Mientras que, a intensidades

lumínicas elevadas, las microalgas reducen el contenido de clorofila (Chl) para minimizar el riesgo de fotoinhibición (Béchet et al., 2013a).

Por otra parte, la fotorespiración a corto plazo durante la fase oscura puede consumir hasta el 25% de la energía química producida durante la fase lumínica de la fotosíntesis (NADPH y ATP), suponiendo que este consumo es directamente proporcional a la tasa de fotosíntesis (Pruvost et al., 2012). No obstante, la fotorespiración a largo plazo durante la noche causa pérdidas significativas de biomasa celular comparada con células expuestas a intensidades lumínicas limitadas que se encuentran en fase de crecimiento lineal. Esto es debido a que posiblemente la intensidad lumínica promedio que las células reciben durante el periodo de luz, afecta la acumulación de productos de almacenamiento de energía fotosintética y la magnitud de pérdida de biomasa debido a la respiración oscura de estos compuestos (Huesemann et al., 2016).

En investigaciones realizadas en el 2014, se reportaron que a elevados valores de intensidad lumínica (ej. $505 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se exhibe una reducción en los niveles de nitrógeno hasta el 70% en microalgas verdes (ej. *Scenedesmus obtusiusculus*) (Cabello et al., 2014). La fotosíntesis en estas condiciones puede dar lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) denominada reacción de Mehler en el PSI con incremento en los niveles de moléculas excitadas, tales como la clorofila triplete $^3\text{Chl}^*$ (en el PSII) y el oxígeno singlete (O_2^1) (Okamoto et al., 2001; Vicente et al., 2002). En adición, el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se genera durante la reducción del O_2 en el PSI, la SOD (superoxido dismutasa) dismuta el $\text{O}_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2 , éste último tiene la capacidad de reaccionar con iones metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+}) produciendo el radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$) (Figura 2.21), un oxidante fuerte que puede reaccionar y generar estrés oxidativo, con reducción en el rendimiento cuántico fotosintético, inhibición del crecimiento poblacional y la supervivencia de microalgas (Glatz et al., 1999). Por otra parte, la tasa de fotoalteración es proporcional a la tasa de absorción fotónica y de la concentración de las unidades fotosintéticas (PSU).

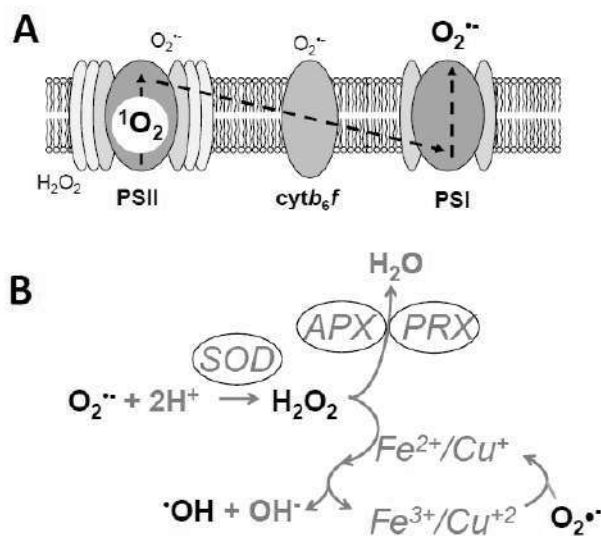


Figura 2.21. Especies reactivas de oxígeno que se generan por elevadas intensidades lumínicas. **A)** generación de oxígeno singlete ¹O₂ en el PSII, y generación del anión superóxido O₂^{•-} en el PSI. **B)** Sistemas enzimáticos antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), peroxiredoxinas (PRX). En presencia de los iones Fe²⁺ y Cu²⁺ con sus respectivas rxnes. de óxido-reducción se genera el radical hidroxilo •OH y O₂^{•-}. Tomado de Roach & Krieger-Liszkay, 2014.

La generación del oxígeno singlete ¹O₂, ocasiona la pérdida de la proteína D1 del PSII, no obstante, el centro colector de luz del PSII (LHCII) se encuentra levemente alterado por el ¹O₂ debido a la presencia de los pigmentos accesorios como los carotenoides y xantofilas que suprimen la formación de ³Chl^{*} y de ¹O₂ (Fischer et al., 2006; Jahns & Holzwarth, 2012). Por el contrario, a intensidades lumínicas muy bajas, el aceptor de electrones de quinona (Q_B) del PSII se presenta parcialmente reducido, lo que produce fotoalteraciones y pérdida de la proteína D1 (Roach & Krieger-Liszkay, 2014).

2.0.9. Mecanismos de fotoprotección

Los fotones absorbidos por organismos fotosintéticos están orientados a 3 procesos: a) son capturados por los centros de reacción de PSII para impulsar la fotosíntesis (fotoproducción o procesos fotoquímicos), b) se disipan como calor (fotorregulación o procesos no fotoquímicos NPQ), o c) se vuelven a emitir en forma de fluorescencia (Ramanna et al., 2017).

Los procesos no fotoquímicos (NPQ) consisten principalmente en la disipación térmica de la energía de excitación (Figura 2.22) (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Generalmente consta de varios componentes: qE (**quenching energético**) que depende del gradiente de pH transtilacoidal, requiere de la presencia de zeaxantina y de la proteína LHCSR, el segundo componente es el qT (**quenching transitorio**) es el estado de transición por el desacoplamiento entre los centros de reacción LHCII y el PSII reduciendo la excitación. El tercer componente corresponde al **quenching fotoinhibitorio** qI está relacionado con la fotoinhibición y fotoalteraciones por el exceso de luz (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

En este contexto, entre los procesos no fotoquímicos se encuentra el “**ciclo de las xantófilas (o ciclo VAZ - qE)**” en el cual el pigmento violaxantina en presencia de altas intensidades lumínicas se convierte primero en anteraxantina por desepoxidación/epoxidación (una molécula de oxígeno se libera o se absorbe completando el ciclo) por la violaxantina de-epoxidasa (VDE requiere ascorbato y se activa en condiciones ácidas), y por último a zeaxantina, el cual retorna al ciclo por la zeaxantina epoxidasa (ZEP se activa a pH neutro de 6.8, utiliza oxígeno, y NADPH). Por ejemplo, en microalgas verdes la enzima ZEP se encuentra siempre activa, pero funciona de forma más lenta que VDE, esto garantiza una mayor acumulación de zeaxantina en condiciones de exceso de energía lumínica y una conversión lenta a violaxantina (Mohanty et al., 1995; Giulio Rocco, 2016; Larkum, 2016). De acuerdo con Larkum, (2016), este ciclo comprende 3 factores para la disipación del exceso de energía en el PSII/LHCII:

- Mayor concentración de zeaxantina
- La presencia de la proteína LHCSR3 en clorofíceas como *Chlamydomonas* (Light Harvesting Complex Stress-Related, por sus siglas en inglés)
- Un gradiente de pH (inicio pH ácido, final pH neutro- Δ pH)

Con estos tres factores en funcionamiento, y en presencia del LHCII, la energía de excitación se transfiere a los carotenoides y la energía de excitación se transmite en forma de calor (Figura 2.22).

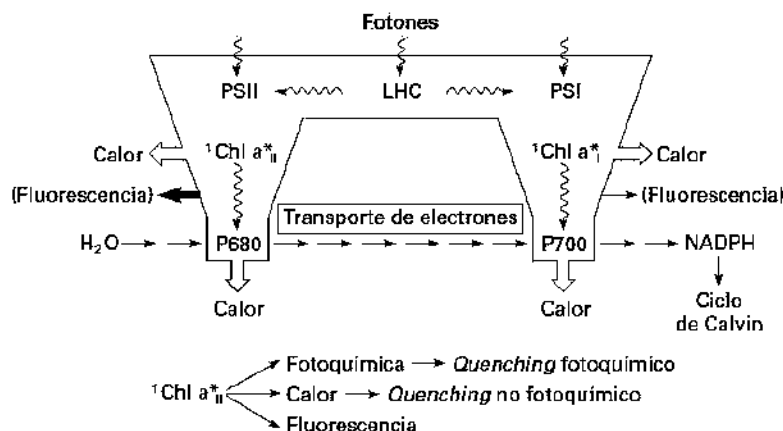


Figura 2.22. Diferentes procesos de disipación de exceso de energía lumínica. Tomado de Azcón-Bieto & Talón, 2013.

Asimismo, las xantofilas pueden desempeñar otras funciones en la protección contra el exceso de luz debido a su capacidad eficiente para eliminar las ROS, como la zeaxantina que protege del $^1\text{O}_2$ (Baroli et al., 2003). Otra de las xantofilas que se encuentra implicada en la disipación de energía es la luteína en *Chlamydomonas* que al igual que la zeaxantina secuestra al $^1\text{O}_2$ (Jahns & Holzwarth, 2012).

Además de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos de disipación del exceso de energía mencionados anteriormente, otro porcentaje de energía lumínica absorbida por las clorofilas se disipa en forma de fluorescencia (Figura 2.22). Este porcentaje de fluorescencia corresponde solo entre el 3 y 4% de la energía total disipada. Esta fluorescencia se origina principalmente en el PSII, de modo de que los cambios de esta radiación reflejan el estado en que se encuentra tal fotosistema (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Por ende, en el presente proyecto doctoral, la cuantificación de la fluorescencia nos permite obtener información sobre la tasa de transporte de electrones, el rendimiento cuántico y la existencia de fotoinhibición, esto debido a la energía de los fotones absorbidos que se distribuye entre estos tres procesos de disipación de energía que compiten entre sí, sobre la cepa Cd-resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides* Dc^{RCd100} comparando su respuesta con la cepa control Dc1M^{wt}.

2.0.10. Adaptación a fluctuaciones lumínicas

Las microalgas y cianobacterias han desarrollado mecanismos de fotoprotección y adaptación a las fluctuaciones lumínicas (Rai & Gaur, 2001). Estas estrategias se dividen en 2 tipos: 1) adaptación a la calidad de luz, y 2) adaptación a la intensidad lumínica. El primer tipo corresponde a una fase activa para incrementar la eficiencia fotosintética de la microalga en la utilización y el tipo de luz que incide para producir su captación (clorofilas *a/b* de los centros colectores de luz de LHCII del PSII y LHCI del PSI) y su utilización en los centros de reacción de la fotosíntesis. Mientras que el segundo corresponde a una fase pasiva para reducir la captación de luz por un exceso de fotones incidentes y proteger el aparato fotosintético del exceso de luz (Fujita et al., 2001). Además, existen diversos procesos de disipación de energía de excitación, como la asimilación del CO₂ por el ciclo de CBB y la fotorespiración (mencionado anteriormente) (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

Varios mecanismos de adaptación que presentan las microalgas debido a fluctuaciones en intensidad lumínica se han evidenciado entre los que se encuentran: a) la adaptación cromática complementaria CCA, es decir, la naturaleza y la concentración de pigmentos a la calidad de luz (ej. Chl *b*, ficobilinas, Chl *f*); b) los estados de transición, en el cual se regula la transferencia de energía en ambos fotosistemas PSI y PSII; c) el ajuste del tamaño del centro colector de luz o centro antena en respuesta a los cambios en la calidad y cantidad de luz (Fujita et al., 2001); d) la evasión a través de la migración hacia zonas de bajo flujo de rayos UV (ej. *Spirulina subsala*); e) síntesis de pigmentos absorbentes de radiación U.V. (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, α -tocoferoles, ascorbato) y polisacáridos extracelulares (ej. producción de glicano extracelular en *Nostoc commune*) como se muestra en la Figura 2.23 (Scherer et al., 1988; Ehling-Schulz et al., 1997; Quesada & Vincent, 1997); f) mecanismos de reparación del DNA, como la fotoreparación y reparación por escisión por el sistema SOS y el gen RecA identificado en cianobacterias (Geoghegan & Houghton, 1987); g) resíntesis de proteínas sensibles a radiación U.V., como 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 U.V.-B (Sass et al., 1997); h) síntesis de proteínas de choque térmico (Hsps) y la generación de NADPH (Jeffrey, 2014).

Dentro de los mecanismos de recambio de la proteína D1, en *Chlamydomonas reinhardtii* se ha estimado que bajo intensidades lumínicas elevadas se produce la sustitución de un residuo de alanina en D1-251 por cisteína e incrementa la tolerancia a elevadas radiaciones (Giardi et al., 2013).

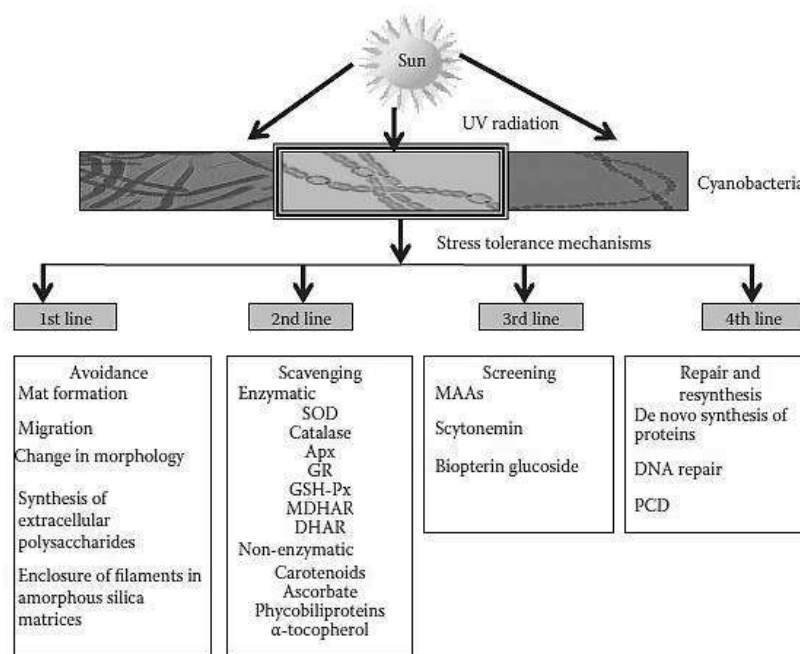


Figura 2.23. Mecanismos moleculares en la adaptación a fluctuaciones en la incidencia fotónica en cianobacterias y microalgas. Tomado de Richa & Donat, 2013.

Asimismo, se han identificado la expresión de las flavoproteínas (Flv1-Flv4 en cianobacterias y FlvA-FlvD en microalgas verdes como *Chlamydomonas*) específicas de membrana denominadas flavodiiron (FDP por sus siglas en inglés) y oxidasas terminales respiratorias específicas (ej. Citocromo tipo-*bd* quinol oxidasa (Cyd) y el Citocromo *c* tipo *aa3* oxidasa (Cox) en *Synechocystis*) (Lea-Smith et al., 2013; Allahverdiyeva et al., 2015a).

Las proteínas Flv1 y Flv3 (Figura 2.24) funcionan durante la iluminación y disipan el exceso de electrones reduciendo el O_2 liberado directamente al agua en el lado reductor del PSI (Allahverdiyeva et al., 2013). Mientras que, las proteínas Flv2 y Flv4 tienen actividad fotoprotectora del PSII bajo niveles ambientales de CO_2 al pasar el exceso de electrones del lado aceptor de PSII a otro aceptor secundario de electrones (Bersanini et al., 2014).

fotofosforilación, el transporte de electrones y las reacciones redox de la plastoquinona) dependen de la temperatura (Moreno et al., 2008).

Además, la tasa de respiración, el flujo de carbono orgánico y la cantidad de carbono fijado durante el ciclo de Calvin incrementan al aumentar la temperatura (Davison, 2004). Sin embargo, otros autores sugieren que, durante la respiración, un aumento en la temperatura causa la pérdida de biomasa celular debido a los mayores costos energéticos en el mantenimiento del metabolismo (Edmundson & Huesemann, 2015). Conjuntamente, las fluctuaciones de temperatura influyen directamente en la fluidez de las membranas celulares en las microalgas, lo que afecta el grado de saturación de los lípidos y la integración de proteínas transmembranales al aumentar el eflujo de iones y otros solutos (Jeffrey, 2014).

De acuerdo con Azcón-Bieto & Talón, (2013), los organismos fotosintéticos presentan distintas respuestas a diferentes rangos de temperatura, por lo que esta respuesta se traduce en una curva en forma de campana presentando 3 puntos clave (Figura 2.25):

- **Temperatura óptima de crecimiento ($T_{\text{ópt}}$):** se permite que la microalga lleve a cabo la asimilación neta de CO_2 y por lo cual su tasa fotosintética es máxima, esto sin producir modificaciones a parámetros bioquímicos y fisiológicos. Por ejemplo, para géneros de microalgas mesófilas, su $T_{\text{ópt}}$ se encuentra en un rango de 20-25 °C. No obstante, el crecimiento del fitoplancton se duplica por cada 10 °C que se incrementa (Q_{10}) y esto depende de las diferentes especies (Staehr & Birkeland, 2006).
- **Temperatura mínima ($T_{\text{mín}}$):** es el límite inferior de temperatura en que se disminuyen las tasas de actividad enzimática (ej. Reducción de la actividad carboxilasa de la RuBisCO, y una escasa disponibilidad de fosfato libre en el cloroplasto) alterando la fotosíntesis.
- **Temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$):** es el límite superior y máximo en que la microalga puede llevar a cabo la fotosíntesis. El proceso se encuentra alterado por reducción de la actividad enzimática por desnaturalización proteica. Por otro lado, conforme incrementa la temperatura se puede aumentar la fotorespiración (R_L), esto se debe, por una parte, a la mayor pérdida de afinidad de la RuBisCO por el CO_2 que por el O_2 a medida que la temperatura aumenta y, por otra parte, se incrementa la proporción de O_2 disuelto con respecto a la proporción de CO_2 ; o anular completamente la fotosíntesis (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

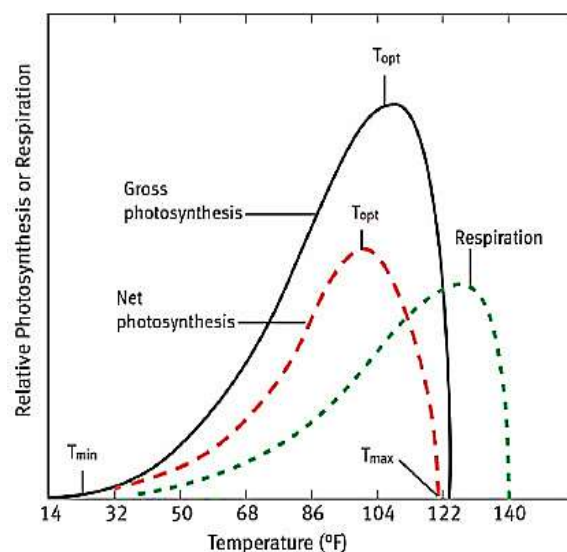


Figura 2.25. Respuestas en la fotosíntesis por fluctuaciones en la temperatura. Tomado de Butterwick et al., 2005.

En la Figura 2.25, además se muestra que este tipo de respuestas engloban a la fotosíntesis bruta (Pg) que es la producción primaria bruta, la fotosíntesis neta (Pn) que corresponde a la fijación neta del CO₂ y la respiración (R). Conjuntamente de los puntos señalados anteriormente, una vez que se supera a la T_{máx}, la célula fotosintética presenta el “*punto de compensación de calor*” que corresponde a que en presencia de fluctuaciones en temperaturas altas, la fotosíntesis bruta se reduce rápidamente y la respiración aumenta con gran velocidad, hasta llegar a un punto en que todo el CO₂ asimilado es liberado de nuevo (esto debido a probables modificaciones en estructura, actividad y desnaturalización de la RuBisCO) (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Por otra parte, se ha observado que la RuBisCO activasa (Rca) es una enzima termolábil, dado que a temperaturas moderadamente altas (> 35 °C) se inactiva, por lo que el estado de activación de la RuBisCO *in vivo* también disminuye de forma significativa afectando a la tasa fotosintética (Yamori et al., 2006).

En otro contexto, 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).

Como se ha mencionado anteriormente, la primera respuesta al estrés causado por altas temperaturas es, la desnaturalización de proteínas (por ejemplo, reducción de las actividades de la ATPasa o RuBisCO) que da como resultado la pérdida de actividad fotosintética, la formación de agregados proteicos o la inducción de apoptosis (Slabas et al., 2006). En adición, la acumulación de Chl en los complejos colectores de luz también se encuentra afectada por la temperatura. Se ha demostrado que a 20 °C la acumulación de Chl ocurre más lentamente, mientras que a 30 °C esta acumulación ocurre rápidamente en ciertos géneros de microalgas (ej. *Haematococcus*) (Giannelli et al., 2015). En este mismo estudio, se evaluó la acumulación de la astaxantina en *Haematococcus*, estimando que se da una mayor acumulación de este pigmento a 27 °C (1.4 veces mayor que a 20 °C).

Cuando el PSII se encuentra sometido a altas temperaturas, se reduce su actividad por la inhibición del lado catalítico del H₂O acompañada de la liberación de componentes del PSII como las proteínas PsbO, PsbP, PsbQ, Ca²⁺ del complejo catalítico (Mn₄O₅Ca) y Mn²⁺ (Barra et al., 2005; Mathur et al., 2014). Igualmente, a elevadas temperaturas se generan ROS debido a alteraciones sobre la membrana tilacoidal, es decir, se forma ¹O₂ debido a la peroxidación lipídica. Mientras que, en el PSII la oxidación parcial del H₂O da lugar a H₂O₂ el cual es reducido por el Mn²⁺ a [•]OH por vía reacción de Fenton, provocando alteraciones en la proteína D1 (Figura 2.26) (Marutani et al., 2012; Pospíšil, 2016).

2.0.12. Estrategias de adaptación a fluctuaciones en temperatura

De acuerdo con lo anterior, un desequilibrio entre el suministro de energía en la fotosíntesis y el consumo de los productos fotoquímicos en la fase bioquímica por alteraciones en fluctuaciones de temperatura, resulta en modificaciones en el aparato fotosintético, a esta temperatura se le denomina “***Temperatura de adaptación***” (Ras et al., 2013).

Así pues, para adaptarse a este estrés, las células fotosintéticas implican la inducción de chaperonas y proteasas como las proteínas de choque térmico (Hsps) para el replegamiento y degradación de proteínas (Vierling, 1991; Slabas et al., 2006). Por ejemplo, se ha identificado el incremento de la síntesis de la isoforma Hsp70 en *Chlamydomonas acidophila* en correlación a concentraciones elevadas de metales-temperatura dependiente (20-39 °C) (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). También en cultivos celulares de plantas superiores (*Lycopersicon peruvianum*), se presentó la inducción de Hsp70 en respuesta al estrés producido por Cd y a temperaturas elevadas (Neumann et al., 1994). Posteriormente, Hihara et al., (2001) y Summerfield & Sherman, (2008), identificaron a través de un análisis de microarreglos de DNA la expresión de una isoforma de HspA en la cianobacteria *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 en respuesta a una alta intensidad lumínica, expuesta a elevadas temperaturas, en presencia de concentraciones salinas altas, estrés alcalino (pH 10.0), acidificación (pH 3.0) y exposición a la radiación U.V.

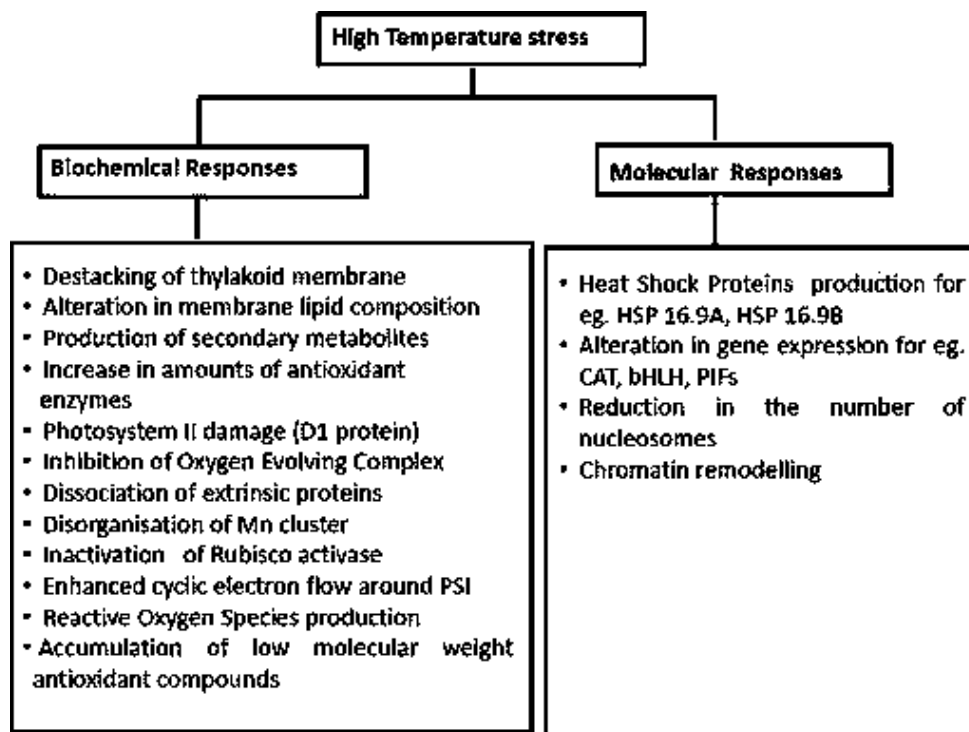


Figura 2.26. Respuestas a temperaturas elevadas en el aparato fotosintético de microalgas. Tomado de Mathur et al., 2014.

No obstante, 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, 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 por sus

siglas en inglés) 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, 2006).

De igual forma, a estas condiciones, los organismos fotosintéticos presentan mayor expresión de la RuBisCO carboxilasa (Yamasaki et al., 2002). Sin embargo, otros autores sugieren que, a bajas temperaturas, pero aunado a la aplicación lumínica constante, la actividad de la RuBisCO carboxilasa se reduce generando un desequilibrio y saturación lumínica (por ejemplo, *Chlorella vulgaris* presenta una tasa óptima de crecimiento a 5 °C y bajo contenido en Chl) (Maxwell et al., 1994; Ras et al., 2013). Por consiguiente, a bajas temperaturas (5 °C) algunas especies de microalgas como *Dunalliella salina* y *D. tertiolecta* crecen y son capaces de ajustar su sistema fotosintético a intensidades lumínicas altas con la intención de reducir el estrés ocasionado en el PSII (Kro et al., 1997). Posteriormente, Lomas & Glibert, (1999), reportaron 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_3^- para modular el balance energético entre la producción y el requerimiento mismo.

Posteriormente, Napolitano & Shain, (2005), revelaron 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, 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 2.27), y por medio de la regulación transcripcional traduciéndose a la adaptación a temperaturas extremas (Morgan-Kiss et al., 2006).

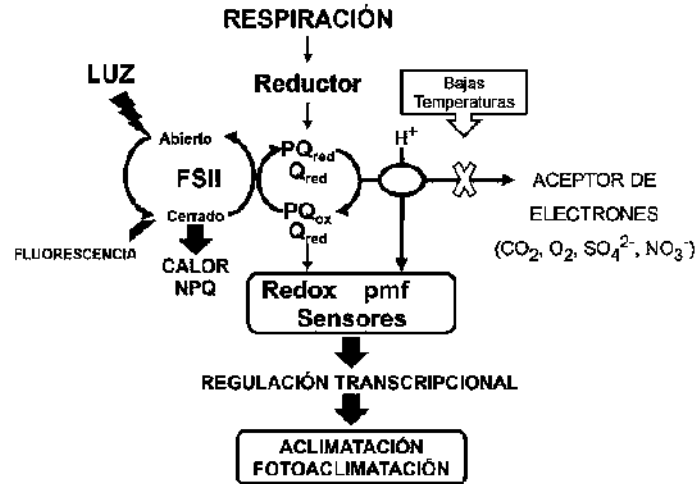


Figura 2.27. Sistema de transporte de electrones con actividad redox bajo variaciones en temperatura e intensidad lumínica. Fotosistema II (FSII), Procesos no fotoquímicos (NPQ-Calor), Plastoquinona reducida (PQ_{red}), Quinona reducida (Q_{red}), Plastoquinona oxidada (PQ_{ox}), Quinona oxidada (Q_{ox}), fuerza protón-motriz (pmf). Tomado de Morgan-Kiss et al., 2006.

Otro de los mecanismos que presentan distintos géneros de microalgas y cianobacterias (por ejemplo, *Scenedesmus acutus* y *Microcystis aeruginosa*) expuestas a elevadas temperaturas (< 25 °C) se genera adaptación con elevadas tasas fotosintéticas por incremento en la acumulación de Chl *a*, baja tasa respiratoria y reducción en volumen (Staehr & Birkeland, 2006). Estos mismos autores explican que la reducción en el volumen celular se debe probablemente para contrarrestar el desequilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos ocasionados por el incremento en la temperatura. Además, esta reducción genera que la microalga incremente las tasas de captación fotónica por disminución de superficie celular, pero también para reducir los costos metabólicos por menor gasto en la utilización del ATP producido en la fase lumínica (Atkinson et al., 2003).

En este contexto, las microalgas presentan una plasticidad de adaptarse genéticamente a diferentes fluctuaciones de factores ambientales como temperaturas extremas, distintas intensidades lumínicas a lo largo del día y de las estaciones, generando adaptación generacional, es decir, a lo largo de las generaciones, las microalgas incrementan su adaptación y las cuales son heredables a la progenie, aumentando la supervivencia bajo condiciones extremas. Así pues, la selección *a priori* de un genotipo que es capaz de sobrevivir y reproducirse (aptitud o eficacia biológica) garantiza la tasa de evolución y la transferencia de los genes involucrados en la adaptación y resistencia (Huertas et al., 2011).

2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo celular

La cepa tipo salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman, 1978), (Dc1M^{wt}) fue obtenida de la colección de cultivos de algas del Laboratorio de Toxicología ambiental y de la Unidad de Genética (Depto. De Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria) de la Universidad Complutense de Madrid, España, y la obtención de la cepa resistente se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH. La microalga se cultiva en frascos de cultivo (Greiner Bio-One, Longwood, NJ, EE.UU.) en 20 mL del medio de enriquecimiento BG-11 con un pH de 7.1 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) para el crecimiento axénico de ambas. La cepa resistente se cultiva en BG-11 suministrado con sulfato de cadmio de acuerdo a la $CI_{50(72)}$ (11.57 mg L^{-1} que corresponde a $100 \mu\text{M}$ a Cd^{2+}) previa en Dc1M^{wt} ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Ambas cepas se mantienen a 21 °C bajo una incidencia fotónica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12h una longitud de onda de 400 a 700 nm. Las células se mantienen en crecimiento exponencial por medio de transferencias de inóculo unicelular a un medio fresco cada dos semanas.

2.1.2. Estimación del rendimiento cuántico fotosintético sobre ambas cepas de *D. chlorelloides*

La base del ensayo para la determinación de la inhibición de la actividad fotosintética, fue a través de la medición del rendimiento cuántico efectivo del Fotosistema II (Φ_{PSII}) de Dc^{RCd100} comparada con Dc1M^{wt} a través del método de pulso de saturación utilizando fluorescencia emitida por un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada, ToxY-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Cualquier sustancia o tratamiento que induzca una limitación del flujo de electrones en el Fotosistema II de la fotosíntesis provoca una disminución correspondiente del rendimiento cuántico efectivo del fotosistema acorde con Schreiber et al., (2002). Con un número de ensayos de ocho (n= 8), la alteración del rendimiento cuántico efectivo del PSII (Φ_{PSII}) por el cadmio se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 2.1.1. Rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) (Schreiber et al., 2002).

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F_t}{F'_m}$$

Dónde, F'_m corresponde al rendimiento máximo de fluorescencia durante la aplicación del pulso de saturación, y F_t pertenece al rendimiento que será medido antes de aplicar el pulso de saturación.

2.1.3. Estimación del balance de oxígeno

El proceso respiratorio da lugar a un consumo de oxígeno en la oscuridad. El oxígeno que se acumula durante la fotosíntesis o el que se consume durante la respiración se puede detectar por el electrodo tipo Clark. El estudio de la inhibición de la respiración celular se realiza a través del sistema Chlorolab 2 (Hansatech Instruments, Norfolk, England). La medición de oxígeno es en fase líquida cuyo mecanismo se basa en la aplicación de una diferencia de voltaje; el platino que constituye el cátodo se polariza, el oxígeno entonces se reduce debido a la electronegatividad de la superficie del electrodo, formándose H_2O_2 , generándose una tendencia a que la polaridad disminuya debido a los electrones cedidos al oxígeno; el circuito se cierra con KCl aportado en la membrana, y la plata del ánodo se oxida generando cloruro de plata. El oxígeno de la muestra corresponde al que se consume por la reducción del cátodo. Para la estimación del balance de oxígeno en fase lumínica/oscura sobre las cepas Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$ de *D. chlorellioides* se estimó a partir de la tasa de fotosíntesis bruta (P_g) con un número de ensayos de ocho ($n=8$) de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 2.1.2. Tasa de balance de oxígeno en fotosíntesis bruta

$$P_g = P_n + R$$

Dónde P_g : corresponde a la tasa de producción primaria bruta, R : (Respiración) proceso por el cual las microalgas consumen oxígeno y liberan CO_2 (fase oscura) y P_n : tasa de fijación neta de CO_2 , se define como la diferencia entre P_g y R .

2.1.4. Eficiencia fotosintética debido a variaciones en la intensidad fotónica

Para evaluar la eficiencia fotosintética, se midió el balance de oxígeno en las fases lumínica/oscura de la fotosíntesis en ambas cepas de *D. chlorelloides* (Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt}) a través de la estimación de la tasa bruta de fotosíntesis (Ecuación 2.1.2) por balance de oxígeno. Se aplicaron valores de incidencia fotónica de 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt} para alcanzar el punto de saturación lumínica, con densidades celulares ajustadas a 1×10^6 células mL^{-1} para cada cepa, y el reemplazo celular para cada valor de intensidad lumínica seleccionada, a través de la utilización de un electrodo tipo Clark por el sistema Chlorolab 2 (Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra). Cada ensayo se repitió seis veces ($n=6$).

2.1.5. Eficiencia fotosintética por balance de oxígeno bajo el punto de saturación lumínico por fluctuaciones en temperatura

Para estimar el balance de oxígeno (Ecuación 2.1.2) debido a las variaciones de temperatura en fase fotoquímica/bioquímica, una vez obtenido los valores del punto de saturación lumínico estimado en la metodología anterior donde la cepa Cd-resistente y tipo salvaje (Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt}, respectivamente) presentan tasas fotosintéticas máximas, ambas cepas fueron expuestas a valores de temperatura crecientes a 5, 10, 15, 21, 25, 30 y 35 °C por medio de un baño recirculador (Thermo Fischer Scientific Inc., EE.UU.), y utilizando el electrodo tipo Clark a través del sistema Chlorolab 2 (Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra). Cada ensayo se repitió seis veces ($n=6$) con densidades celulares ajustadas a 1×10^6 células mL^{-1} para cada cepa, con reemplazo celular para cada valor de temperatura seleccionada.

2.2. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos de la inhibición del Φ_{PSII} se presentan como porcentaje de alteración sobre el flujo de electrones del PSII en Dc^{RCd100} comparada con la cepa control $Dc1M^{wt}$, a través del manejo paquete de software v1.14 ToxyWin (Heinz Walz GmbH, Alemania), esta estimación se realizó a través de la Ecuación 2.1.1.

La cuantificación de Oxígeno en ambas cepas se realizó en $\% \text{ nmolO}_2 \text{ mL}^{-1}$ a través del software Oxigraph Plus V. 1.01 (O2view, Hansatech, Norfolk, UK) por la Ecuación 2.1.2. La determinación de cada uno de los índices fotosintéticos en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ son expresados mostrando su media y su desviación estándar de cada valor ($m \pm ds$) con un número de réplicas de seis ($n=6$) para cada ensayo. La normalidad de los datos se evaluó a través del test de D'Agostino-Pearson. La comparación múltiple entre la cepa Cd-resistente (Dc^{RCd100}) con respecto a la cepa tipo salvaje ($Dc1M^{wt}$) se examina por t-test no pareado a través de la corrección por el Test de Welch para varianzas distintas, y las diferencias se consideran significativas a $p < 0.05$, el análisis de todos los datos se establece través del sistema estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

El rendimiento cuántico fotosintético de la cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} vs. con la cepa control $Dc1M^{wt}$ se cuantificó a través de fluorescencia emitida por la clorofila; cuando la cepa Dc^{RCd100} (canal 1, muestra) se confrontó con la tipo salvaje (canal 2, referencia), el rendimiento cuántico fotosintético (Φ_{PSII}) se redujo a un valor de $Y1 = 0.48 \pm 0.0124$ con respecto a la muestra de referencia ($Dc1M^{wt}$) de $Y2 = 0.59 \pm 0.004$, es decir, la cepa de estudio Dc^{RCd100} exhibió 20% de reducción en la actividad del PSII con diferencias estadísticamente muy significativas comparada con la cepa control $Dc1M^{wt}$ ($p < 0.0001$) como se muestra en la Tabla 2.3.1 y Gráfico 2.3.1.

Tabla 2.3.1. Rendimiento cuántico fotosintético del PSII (Φ_{PSII}) en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

Rendimiento cuántico del PSII Toxy-PAM								
Cepas <i>D. chlorelloides</i> Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$	n	Canal 1 (muestra) Dc^{RCd100}			Canal 2 (referencia) $Dc1M^{wt}$			% Inh. Φ_{PSII}
		F1	Fm1	Y1	F2	Fm2	Y2	
	8	1374 $\pm$ 83.66	2635 $\pm$ 149.60	0.48 $\pm$ 0.0124	1443 $\pm$ 41.84	3577 $\pm$ 112.90	0.59 $\pm$ 0.004***	19.76 $\pm$ 1.61

Los valores representan la media $\pm$ ds de 8 ensayos (n= 8)

F1, F2: representan el rendimiento de fluorescencia emitida poco antes de la aplicación del pulso de saturación en los canales 1 y 2

Fm1 y Fm2: representan el rendimiento de fluorescencia emitida después de la aplicación del pulso de saturación

Y1 y Y2: corresponden a los rendimientos cuánticos efectivos de los canales 1 y 2, respectivamente

*** Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) con respecto a Y1

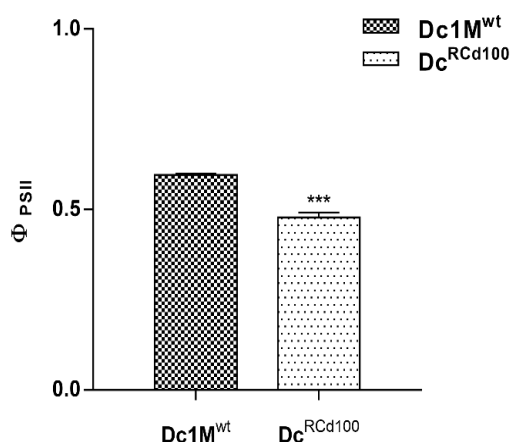


Gráfico 2.3.1. Rendimiento cuántico fotosintético del PSII (Φ_{PSII}) de Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$, (***) $p < 0.0001$.

Por tanto, estos datos reflejan posibles modificaciones en el aparato fotosintético que sucedieron en la cepa Cd-resistente para hacer frente al estrés que se generó a la exposición al Cd, y posteriormente inducir la resistencia. Además, la reducción del 20% en el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) en Dc^{RCd100} , indica la probabilidad de como su PSII se encuentra alterado y como orienta y utiliza la energía recibida a la cadena transportadora de electrones, o por el contrario el Cd haya producido alteraciones probablemente como intercambio iónico en las diferentes unidades fotosintéticas, ocasionando una moderada fotoinhibición de la cepa.

2.3.2. Evaluación del balance de oxígeno en Dc^{RCd100} y cepa control $Dc1M^{wt}$

La estimación del balance de oxígeno en fotosíntesis bruta (Pg) en Dc^{RCd100} resultó en una inhibición del $29.95 \pm 3.91\%$ de productividad primaria bruta, es decir, al desglosar este parámetro, la fijación del CO_2 en la fase bioquímica se redujo al $25.64 \pm 3.59\%$ ($45.98 \pm 3.95 \text{ nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$), no obstante, la tasa respiratoria fue la más afectada hasta en un 56% de inhibición como se muestra en la Tabla 2.3.2, con diferencias estadísticamente significativas en Dc^{RCd100} ($p < 0.001$).

Tabla 2.3.2. Balance de oxígeno en fotosíntesis bruta (Pg) en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$ representado como $\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Balance de oxígeno en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$				
Parámetro fotosintético	<i>n</i>	$Dc1M^{wt}$ ($\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Dc^{RCd100} ($\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	(%) Inhibición
Pg	8	72.39 ± 3.74	$50.81 \pm 5.31^{**}$	29.95 ± 3.91
Pn	8	61.62 ± 2.40	$45.98 \pm 3.95^{**}$	25.64 ± 3.59
R	8	-10.77 ± 1.38	$-4.83 \pm 1.36^{**}$	55.81 ± 7.52

Los valores se representan como media $\pm$ ds de ocho ensayos ($n=8$)

Pg: Representa la fotosíntesis bruta

Pn: Fotosíntesis neta (fijación neta de CO_2)

R: Respiración

******: Diferencias significativas ($p < 0.001$) en Dc^{RCd100} con respecto a los valores exhibidos por la cepa control $Dc1M^{wt}$

Estos resultados reflejan que la cepa Cd-resistente al conjuntar con los datos del rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) de la Tabla 2.3.1, efectivamente presenta cambios en su aparato fotosintético con la consecuente reducción en la eficiencia de la tasa fotosintética, lo que altera posiblemente la liberación de O_2 durante la fase lumínica, y éste no pueda ser fijado por la función oxigenasa de la RuBisCO en la respiración.

2.3.3. Eficiencia fotosintética bajo fluctuaciones en incidencia fotónica

En la fase oscura, en la cepa Dc^{RCd100}, el balance de oxígeno fue menor comparada con Dc1M^{wt}, es decir, resultó en una reducción sobre la fijación del O₂ al 46.28% con un valor de $11.27 \pm 3.64\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ (Tabla 2.3.3 y Gráfico 2.3.2B).

Tabla 2.3.3. Eficiencia fotosintética neta (Pn) y en respiración (R) por balance de oxígeno representado en % nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ en Dc^{RCd100} comparada con Dc1M^{wt}.

Eficiencia en fotosíntesis neta (Pn) de las cepas de <i>D. chlorelloides</i> (% nmol O ₂ mL ⁻¹ min ⁻¹)			
Intensidad fotónica μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>n</i>	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}
50	6	3.68±7.35	42.73±18.27**
75	6	25.68±3.61	74.30±12.44***
100	6	92.40±4.10	93.45±13.10 ^{ns}
200	6	94.56±11.55	96.32±3.63 ^{ns}
300	6	97.72±2.99	89.52±11.51 ^{ns}
400	6	92.50±7.50	73.68±8.20**
500	6	86.90±5.34	66.75±9.10**
Eficiencia de la tasa respiratoria (R) en las cepas de <i>D. chlorelloides</i> % nmol O ₂ mL ⁻¹ min ⁻¹			
Photon intensity μmol m ⁻² s ⁻¹	<i>n</i>	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}
--	6	24.35±4.79	11.27±3.64**

Los resultados son mostrados como m ± ds

, *: Diferencias significativas a $p < 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente; comparada con la cepa Dc1M^{wt} s

ns: Diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0.05$) con respecto a la cepa Dc1M^{wt}

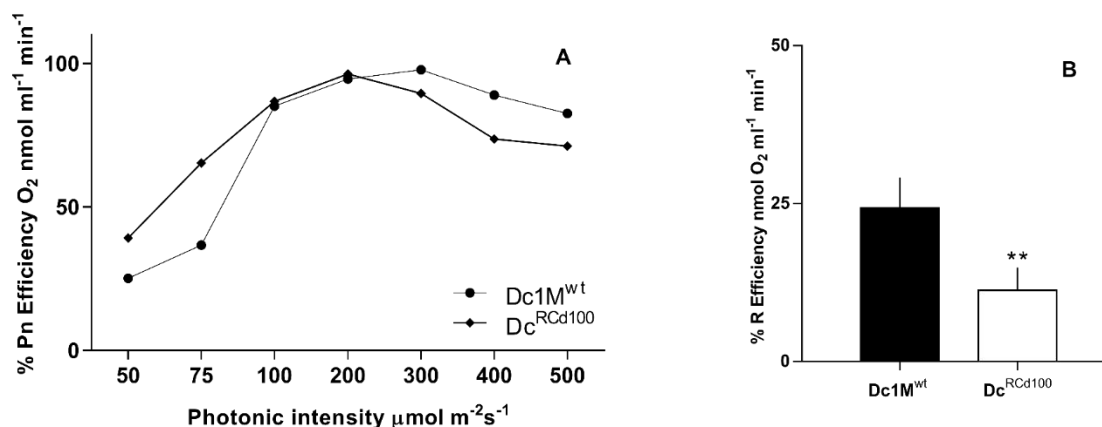


Gráfico 2.3.2. Balance de oxígeno en Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt} a diferentes intensidades fotónicas en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **A)** % de eficiencia en fotosíntesis neta (Pn). **B)** % de eficiencia en respiración (R); ** diferencias estadísticas a $p < 0.05$.

Sin embargo, a bajas intensidades lumínicas de 50 y 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Dc^{RCd100} mostró una mayor eficiencia en la tasa fotosintética en comparación con Dc1M^{wt} (42.73 ± 18.27 y 74.30 ± 12.44 % $\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). A 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Dc^{RCd100} presentó el punto de saturación lumínico donde se muestra la máxima eficiencia en productividad fotosintética (96.32 ± 3.63 % $\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$); mientras que Dc1M^{wt} presentó su máxima eficiencia a 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (97.72 ± 2.99 % $\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$) se muestra en la Tabla 2.3.3 y Gráfico 2.3.2A.

Por otro lado, a intensidades fotónicas superiores al punto de saturación lumínico, la cepa Cd-resistente exhibió una disminución en la eficiencia fotosintética siendo más pronunciada a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 2.3.3) como respuesta de fotoinhibición (66.75 ± 9.10 % Eficiencia $\text{nmol O}_2 \text{ mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$) con diferencias estadísticamente significativas con Dc1M^{wt}, esta cepa mantiene mayor tasa fotosintética a dicho valor de incidencia fotónica. Esto posiblemente a modificaciones durante el transporte de electrones en el PSI para hacer frente a las elevadas intensidades lumínicas con la disipación del exceso de energía lumínica recibida.

2.3.4. Eficiencia fotosintética bajo el punto de saturación lumínico y a fluctuaciones en temperatura

En la fotosíntesis bruta (Pg) y en la fotosíntesis neta (Pn), a la temperatura más baja ensayada de 5 °C al punto de saturación lumínico de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cepa Dc^{RCd100} mostró una marcada reducción en su eficiencia fotosintética ($p < 0.05$) de $6.25 \pm 1.81\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ en Pg y un valor de $5.07 \pm 9.80\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ en Pn, comparada con la cepa control Dc1M^{wt} (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como su punto de saturación lumínico) con valores de 27.18 ± 7.51 y $25.02 \pm 9.80\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ para Pg y Pn, respectivamente (Tabla 2.3.4).

Tabla 2.3.4. Eficiencia fotosintética a través del balance de oxígeno en fotosíntesis bruta (Pg) como % nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ bajo cambios en temperatura y el punto de saturación lumínico de Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt}. Los resultados se representan como $m \pm ds$ (n= 6)

Eficiencia fotosintética de las cepas de <i>D. chlorelloides</i> en fotosíntesis bruta (Pg) (% nmol O ₂ mL ⁻¹ min ⁻¹)							
Pg= Pn + R		Fotosíntesis bruta (Pg)		Fotosíntesis neta (Pn) ^a		Respiración (R)	
Temperatura (°C)	n	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}
5	6	27.18±7.51	6.25±1.81**	25.02±9.80	5.07±2.44*	2.11±0.68	2.99±1.47 ^{ns}
10	6	25.46±7.86	19.26±4.74 ^{ns}	19.84±6.84	15.74±6.57 ^{ns}	1.85±1.48	4.95±0.73*
15	6	31.29±5.64	27.59±5.77 ^{ns}	38.98±4.68	22.94±6.34**	6.42±3.63	5.56±1.55 ^{ns}
21	6	99.85±0.30	56.10±5.83***	81.89±5.20	35.93±2.17***	17.93±3.18	18.94±2.97 ^{ns}
25	6	91.29±8.37	75.74±6.09*	66.59±10.60	56.33±5.87 ^{ns}	20.76±7.05	21.84±1.37 ^{ns}
30	6	28.79±7.98	94.99±10.03***	19.42±6.16	68.82±7.42***	16.97±5.71	26.17±6.76 ^{ns}
35	6	10.00±1.15	42.43±8.46**	8.42±1.52	28.54±5.32**	1.55±0.45	18.18±6.49*

^a Los valores de la fotosíntesis neta corresponden a intensidades fotónicas de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para Dc1M^{wt} y de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para la cepa Dc^{RCd100} como los puntos de saturación lumínicos.

*, **, ***: diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a Dc1M^{wt}

ns: no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$)

No obstante, a 10 y 15 °C la eficiencia fotosintética en Pg no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas. Esto no sucede en Pn a 15 °C, ya que Dc^{RCd100}

una reducción del 41% en la fijación de CO₂ con respecto a Dc1M^{wt} (22.94 ± 6.34 a $38.98 \pm 4.68\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹, respectivamente).

Cuando las cepas fueron expuestas a 21 °C, Dc1M^{wt} exhibió su máxima tasa fotosintética (Pg 99.85 ± 0.30 y Pn de $81.89 \pm 5.20\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹) como se muestra en la Tabla 2.3.4 y Gráfico 2.3.3A, una respuesta que normalmente se presenta en géneros de clorofíceas mesófilas (alelo nativo de *D. chlorelloides*) en un rango de temperatura de 21-25 °C óptima para la actividad fotosintética y tasa de crecimiento. Mientras que, esta respuesta no la comparte la cepa Cd-resistente alcanzando solamente el $56.10 \pm 5.83\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ en Pg y $35.93 \pm 2.17\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹ en Pn, con diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) (Tabla 2.3.4).

Sin embargo, a 30 °C la cepa Dc^{RCd100} presentó su máxima tasa fotosintética en Pg= Pn + R (94.99 ± 10.00 , 68.82 ± 7.42 y $26.17 \pm 6.76\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹, respectivamente), resultando en posibles modificaciones en el aparato fotosintético para dar lugar a una tolerancia y posterior adaptación debido a la capacidad de resistencia al Cd (Gráfico 2.3.3B). Por otra parte, a 30 y 35 °C la cepa control Dc1M^{wt} fue incapaz de mantener las reacciones fotosintéticas primarias y en la fijación del CO₂ (Tabla 2.3.4).

En el proceso respiratorio, Dc1M^{wt} presentó su máxima tasa de fijación del O₂ a 25 °C (Gráfico 2.3.3A). No obstante, en 35°C se presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) con respecto a la fijación O₂, donde Dc^{RCd100} aún presenta una eficiencia de $18.18 \pm 6.49\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹, al contrario de Dc1M^{wt} el proceso respiratorio ya no se mantiene ($1.55 \pm 0.45\%$ nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹), resultando en una temperatura letal para la cepa tipo salvaje de *D. chlorelloides* (Gráfico 2.3.3A y B).

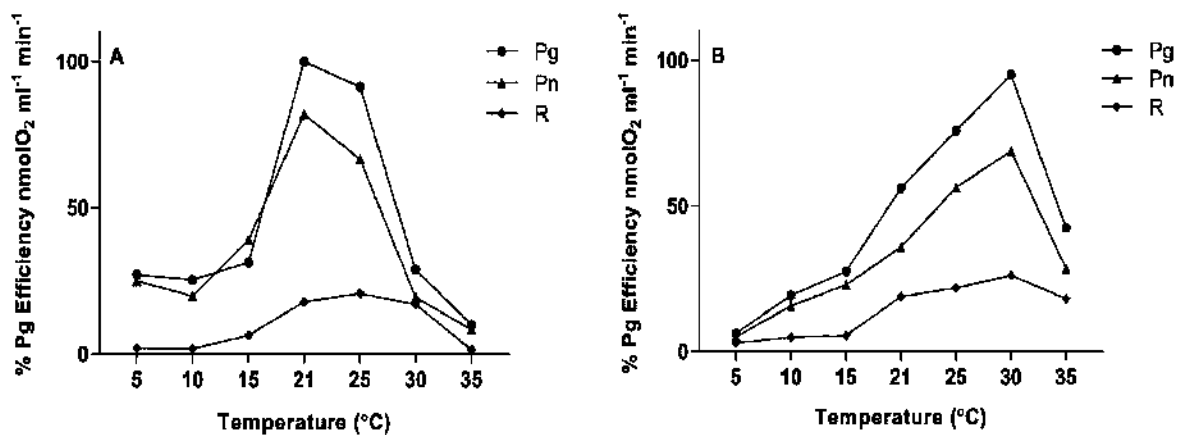


Gráfico 2.3.3. Eficiencia fotosintética en el balance de oxígeno (% nmol O₂ mL⁻¹ min⁻¹) a diferentes valores de temperatura (°C). **A)** Corresponde a la eficiencia de Dc1M^{wt} al punto de saturación lumínico de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **B)** eficiencia de Dc^{RCd100} a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pg: fotosíntesis bruta; Pn: fotosíntesis neta; R: respiración.

2.4. DISCUSIÓN

La evaluación de la actividad fotosintética total a través del rendimiento cuántico fotosintético del PSII (Φ_{PSII}) sobre la eficiencia de la tasa fotosintética bruta en el balance de oxígeno, y la fluorescencia de la Chl sobre cepas de microalgas verdes metalo-resistentes de aguas superficiales, proporciona información novedosa y sumamente importante sobre como los pigmentos fotosintéticos realizan la transferencia de energía de excitación, los cambios físicos (aclimatación) o modificaciones genéticas (adaptación) en las unidades fotosintéticas (PSII, PSI, proteínas D1 y D2, LHCI, LHCII, RuBisCO) que se realizaron para hacer frente al estrés abiótico producido, pero además en interacción con factores ambientales como luz y temperatura, que son determinantes y limitantes en la fotosíntesis. Asimismo, se reportan las tasas en la eficiencia de las reacciones de transferencia de electrones del PSII, los posibles sitios donde inhibidores (por ejemplo, metales como el Cd o herbicidas como la simazina) interactúan, y de las mutaciones que se generan antes de la presencia del o los agentes activadores (Govindjee, 2004).

Por lo tanto, y de acuerdo con Suresh Kumar et al., (2014), cualquier modificación en el proceso fotosintético conduciría a cambios significativos en el rendimiento y en las cinéticas de reacción que se producen como la fluorescencia disipada, indicando alteraciones inducidas por contaminantes y/o cambios ambientales.

En el 2005 Miao et al., evaluaron la respuesta de exposición al Cd^{2+} , indicando alteraciones sobre la transferencia de electrones en el PSII en cepas de alelos nativos de microalgas de ecosistemas marinos (*Dunaliella tertiolecta*, *Prorocentrum minimum*, *Synechococcus* sp., y *Thalassiosira weissflogii*). Además, este metal reduce el ratio de concentración de Chl *a*/Chl *b*, disminuye la actividad de la RuBisCO, inhibe las actividades del PSII y PSI e incrementa la actividad de la lipooxigenasa (Suresh Kumar et al., 2014). Anteriormente, Mendoza-Cozatl et al., (2002), reportaron que el Cd^{2+} se acumula en los cloroplastos e inhibe la fotofosforilación en protistas como *Euglena gracilis*.

Posteriormente, Sbihi & Cherifi, (2012) evaluaron la reducción del Φ_{PSII} a una concentración de 0.1 mg L^{-1} de Cd^{2+} en la diatomea *Planothidium lanceolatum*. En cianobacterias como *Microcystis aeruginosa*, el sitio de inhibición del Cd se encuentra en la ferredoxina/NADP⁺-oxidoreductasa del PSI (Zhou et al., 2006). En este contexto, en un estudio realizado sobre *Chlorella pyrenoidosa* expuesta a $200 \text{ }\mu\text{M}$ de Cd^{2+} por 96h, inhibe la actividad de la evolución del oxígeno fotosintético

y la respiración, además, reduce el Φ_{PSII} y la desactivación del proceso no fotoquímico (NPQ) indicando que, el Cd altera los mecanismos protección del aparato fotosintético (Wang et al., 2013). Anteriormente, Andosch et al., (2012), estimaron un incremento en la liberación de O_2 y de la actividad fotosintética a 4h de exposición al Cd en la clorofícea de agua dulce *Micrasterias denticulata*, sugiriendo que esta respuesta es debido a un mecanismo de adaptación al metal. No obstante, después de 1d y 4d de exposición, la actividad del PSII se anuló por completo. Además, estos mismos autores, indicaron que un pre-tratamiento de 2 mM $CaSO_4$ por 21d antes de la exposición a 150 μM de $CdSO_4$ previene la inhibición de la actividad fotosintética y de la reducción en la evolución del oxígeno en *M. denticulata* hasta aproximadamente 66%.

De acuerdo con todo lo anteriormente citado, se muestra claramente que las referencias están acordes con cepas de microalgas de alelos nativos expuestas a Cd sin la inducción de resistencia según los diferentes bioensayos de los autores mencionados. Por lo que ha sido sumamente difícil para este proyecto doctoral realizar comparaciones con las respuestas en actividad fotosintética a los diferentes parámetros evaluados que se reportaron en la cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* (Dc^{RCd100}). No obstante, entre los pocos trabajos de investigación realizados sobre estas cepas de microalgas resistentes, se encuentran los estudios realizados por Sánchez-Fortún et al., (2009); D'ors et al., (2010); Pereira et al., (2013) y Bartolomé et al., (2016). Estos autores investigaron en cepas de *Dictyosphaerium chlorelloides* resistentes a metales como Cr^{6+} , Cr^{3+} y Cd^{2+} la actividad fotosintética, y establecieron que efectivamente hay alteraciones en la función de PSII (reducción en el rendimiento cuántico fotosintético Φ_{PSII}) y en el balance de oxígeno al disminuir la fijación del mismo en la tasa de respiración, con altas tasas de tolerancia a concentraciones elevadas de estos metales de los cuales se generó la resistencia, en comparación con las bajas concentraciones que se requirieron para inhibir la fotosíntesis en la cepa sensible ($Dc1M^{wt}$).

Por otra parte, es evidente que factores ambientales como la intensidad lumínica y la temperatura son limitantes directas en la actividad fotosintética de microalgas. No obstante, y como se ha mencionado anteriormente, en microalgas metalo-resistentes las modificaciones sobre la eficiencia fotosintética (en la tasa de evolución del oxígeno fotosintético tanto en la fijación neta del CO_2 como la tasa respiratoria) no se conocen para hacer frente a condiciones extremas de temperatura e intensidad lumínica. Sin embargo, en el presente estudio la cepa de control de *Dictyosphaerium chlorelloides* ($Dc1M^{wt}$) como especie mesófila, su tasa de eficiencia fotosintética máxima fue a 21

°C y $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad fotónica, pero a 30 y 35 °C fueron temperaturas letales para esta cepa. Esto está acorde con el rango de temperaturas de 30 a 35 °C que son letales para los géneros de microalgas mesófilas (Ragsdale & Clebsch, 1970; Butterwick et al., 2005).

No obstante, la cepa Cd-resistente $\text{Dc}^{\text{RCd100}}$ exhibió su máxima tasa fotosintética a 30 °C y a $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como temperatura de adaptación. De acuerdo con Avendaño-Coletta y Schubert, (2005) y posteriormente Cabello et al., (2014), indicaron que la redistribución de la energía de excitación entre los fotosistemas y el mecanismo no fotoquímico (NPQ) operan de forma conjunta para ajustar la cantidad de energía lumínica cedida al PSII en las microalgas.

Por otro lado, ciertas especies de microalgas del Phylum Chlorophyceae (*Chlorella sorokiniana*) son tolerantes con tasas de crecimiento máximas a la exposición a altas temperaturas de 36 °C e intensidades fotónicas de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se redujo notablemente el crecimiento debido a una fotoinhibición (Huesemann et al., 2016). Además, estos mismos autores indicaron que *Nannochloropsis salina* tiene una correlación positiva en una tasa de eficiencia máxima fotosintética entre intensidades fotónicas elevadas de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de 32 °C.

En el 2008, Rosenberg et al., estimaron sobre cepas genéticamente modificadas de *Chlamydomonas reinhardtii* denominadas cc124, una elevada resistencia a la fotoinhibición y una mayor absorción de fotones con alta eficiencia en la conversión de energía. En otros estudios realizados por Cabello et al., (2014) sobre *Scenedesmus obtusiusculus*, se estimó que a $336 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e incremento en la temperatura del cultivo, la tasa de O_2 aumentó el 21% y el valor máximo de eficiencia fotosintética se alcanzó a 35 °C, asimismo, a $505 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se exacerbó el crecimiento celular como un proceso de fotoadaptación. En este mismo año, las investigaciones realizadas por Hancke et al., (2008), indicaron que la máxima eficiencia fotosintética de la microalga marina *Prorocentrum minimum* se induce a 25 °C y a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Otro de los estudios acerca de las respuestas sobre el complejo fotosintético de microalgas metalo-resistentes se encuentra el realizado por Herburger et al., (2016), sobre cepas de *Zygonium ericetorum* (AUT y SCOT) tolerantes a hierro y aluminio, género psicrófilo (temperaturas bajas de crecimiento de -3 a 17 °C) y adaptadas a ambientes ácidos, estos autores reportaron que la eficiencia fotosintética incrementa a temperaturas de 5 a 20 °C en la cepa *Z. ericetorum* AUT, en esta misma cepa la tasa fotorespiratoria incrementó a partir de 5 °C y presentó su máxima fijación a un rango

amplio entre 25 y 45 °C. Para la cepa SCOT a 45 °C la fotosíntesis se encontró notablemente alterada; y para ambas cepas la P_g incrementó de forma lineal de 5 a 20 °C. Conjuntamente, en AUT y SCOT se inhibió el Φ_{PSII} .

Por otra parte, ciertos géneros de microalgas presentan mecanismos complementarios de fotoprotección como el presentado por *Chroococcidiopsis thermalis*, esta microalga sintetiza Chl *f* como pigmento antena para mitigar fotoalteraciones debido al exceso de energía y temperaturas por encima de 40 °C (Nürnberg et al., 2018). Además, Wong et al., (2015) indicaron que la constante de reparación en el PSII aumenta con el incremento de temperatura bajo alta exposición lumínica. Conjuntamente, las microalgas presentan una plasticidad a través de ajustes fisiológicos a temperaturas extremas por medio de adaptaciones generacionales, por ejemplo, *Scenedesmus intermedius* se adaptó a 30 °C después de 15 generaciones, a 35 °C después de 30 generaciones y a un máximo de 40 °C después de 135 generaciones (Huertas et al., 2011).

Finalmente, no se han estudiado las respuestas sobre las microalgas resistentes a metales expuestos a condiciones extremas discutidas previamente. Por lo tanto, este estudio es pionero en este campo y establece las pautas para futuras investigaciones en estas cepas de microalgas resistentes que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, para posteriormente dilucidar las modificaciones en el aparato fotosintético después de la adaptación metálica.

2.5.CONCLUSIONES

La cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* (Dc^{RCd100}) presentó alteraciones sobre el PSII y esto se traduce en reducción de su respuesta en la actividad fotosintética primaria, así como un déficit de tasa respiratoria por encima del 50% con respecto a la cepa control (Dc1M^{wt}).

Por otra parte, la cepa Dc^{RCd100} exhibió una máxima eficiencia en la tasa fotosintética a 30 °C y tolerancia a bajas intensidades fotónicas con un umbral de saturación lumínica a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoinhibición a intensidades altas (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estos resultados indican tentativamente que esta adaptación se debe a posibles modificaciones en el aparato fotosintético que se refleja en la tasa de evolución neta de O₂ para hacer frente a tales condiciones evaluadas. Mientras que para Dc1M^{wt}, su eficiencia fotosintética máxima fue de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a 21 °C en respuesta óptima al equilibrio de oxígeno que normalmente logra este género mesófilo de microalgas.

2.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L., Aro, E.-M., 2013. Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4111–4116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221194110>
- Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Tikkanen, M., Aro, E.-M., 2015a. Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. *J. Exp. Bot.* 66, 2427–2436. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru463>
- Andersson, I., Backlund, A., 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem., Plant structural biology* 46, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>
- Andosch, A., Affenzeller, M.J., Lütz, C., Lütz-Meindl, U., 2012. A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *J. Plant Physiol.* 169, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.002>
- Andralojc, P.J., Madgwick, P.J., Tao, Y., Keys, A., Ward, J.L., Beale, M.H., Loveland, J.E., Jackson, P.J., Willis, A.C., Gutteridge, S., Parry, M.A.J., 2012. 2-Carboxy-D-arabinitol 1-phosphate (CA1P) phosphatase: evidence for a wider role in plant Rubisco regulation. *Biochem. J.* 442, 733–742. <https://doi.org/10.1042/BJ20111443>
- Atkinson, D., Ciotti, B.J., Montagnes, D.J.S., 2003. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% °C⁻¹. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 2605–2611. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2538>
- Avendaño-Coletta, D., Schubert, H., 2005. Oxygen evolution and respiration of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under two different light regimes applying light/dark intervals in the time scale of minutes. *Physiol. Plant.* 125, 381–391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00562.x>
- Azcón-Bieto, J., Talón, M., 2013. FUNDAMENTOS DE FISILOGIA VEGETAL, 2da. ed, 2. McGraw Hill Education, Universitat de Barcelona-UBE.
- Badger, M.R., Andrews, T.J., Whitney, S.M., Ludwig, M., Yellowlees, D.C., Leggat, W., Price, G.D., 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* 76, 1052–1071. <https://doi.org/10.1139/b98-074>
- Badger, M.R., Price, G.D., 1994. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 369–392. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.45.060194.002101>
- Barber, J., 2016. “Photosystem II: the water splitting enzyme of photosynthesis and the origin of oxygen in our atmosphere.” *Q. Rev. Biophys.* 49, e14. <https://doi.org/10.1017/S0033583516000093>
- Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T., Niyogi, K.K., 2003. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell* 15, 992–1008. <https://doi.org/10.1105/tpc.010405>
- Barra, M., Haumann, M., Dau, H., 2005. Specific loss of the extrinsic 18 KDa protein from Photosystem II upon heating to 47 °C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex. *Photosynth. Res.* 84, 231–237. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-7158-x>
- Bartolomé, M.C., Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, A., Garnica-Romo, M.G., Sánchez-Carrillo, S., Sánchez-Fortún, S., 2016. Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. *Int. J. Phytoremediation* 18, 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>

- Bassham, J.A., Benson, A.A., Calvin, M., 1950. The Path of Carbon in Photosynthesis VIII. The Role of Malic Acid (No. UCRL-584). Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA (US). <https://doi.org/10.2172/910351>
- Bassham, J.A., Calvin, M., 1960. The path of carbon in photosynthesis, in: Pirson, A. (Ed.), *Die CO₂-Assimilation / The Assimilation of Carbon Dioxide: In 2 Teilen / 2 Parts, Handbuch Der Pflanzenphysiologie / Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 884–922. https://doi.org/10.1007/978-3-642-94798-8_30
- Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A.R., 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.* 15, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.006>
- Béchet, Q., Muñoz, R., Shilton, A., Guieysse, B., 2013a. Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 118–126. <https://doi.org/10.1002/bit.24603>
- Béchet, Q., Shilton, A., Guieysse, B., 2013b. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol. Adv.* 31, 1648–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Bersanini, L., Battchikova, N., Jokel, M., Rehman, A., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Aro, E.-M., 2014. Flavodiiron Protein Flv2/Flv4-Related Photoprotective Mechanism Dissipates Excitation Pressure of PSII in Cooperation with Phycobilisomes in Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 164, 805–818. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231969>
- Bhat, J.Y., Thieulin-Pardo, G., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2017. Rubisco Activases: AAA+ Chaperones Adapted to Enzyme Repair. *Front. Mol. Biosci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00020>
- Bowyer, J.R., Leegood, R.C., 1997. 2 - Photosynthesis, in: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 49–p4. <https://doi.org/10.1016/B978-012214674-9/50003-5>
- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., Slater, E.C., 1977. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 955–966. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.004515>
- Bracher, A., Whitney, S.M., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2017. Biogenesis and Metabolic Maintenance of Rubisco. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 29–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111633>
- Butterwick, C., Heaney, S.I., Talling, J.F., 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshw. Biol.* 50, 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01317.x>
- Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2014. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chem. Eng. J.* 252, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.073>
- Carril, E.P.-U., 2009. Fotosíntesis: Aspectos Básicos. REDUCA Ser. Fisiol. Veg. 2, 1–47.
- Chauvin, L., Tural, B., Moroney, J.V., 2008. *Chlamydomonas reinhardtii* Has Genes For Both Glycolate Oxidase and Glycolate Dehydrogenase, in: Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B. (Eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer Netherlands, pp. 823–827.
- Clegg, M.T., 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 363–367.
- Colman, B., Huertas, I.E., Bhatti, S., Dason, J.S., 2002. The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. *Funct. Plant Biol.* 29, 261. <https://doi.org/10.1071/PP01184>

- Croce, R., Amerongen, H. van, 2014. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat. Chem. Biol.* 10, 492–501. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1555>
- Davison, I.R., 2004. ENVIRONMENTAL EFFECTS ON ALGAL PHOTOSYNTHESIS: TEMPERATURE. *J. Phycol.* 27, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>
- 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 *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81, 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.051>
- Edmundson, S.J., Huesemann, M.H., 2015. The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Res.* 12, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012>
- 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, 1940–1945. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1940-1945.1997>
- Eriksson, M., Villand, P., Gardeström, P., Samuelsson, G., 1998. Induction and Regulation of Expression of a Low-CO₂-Induced Mitochondrial Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 116, 637–641. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.637>
- Eriksson, M., Karlsson, J., Ramazanov, Z., Gardeström, P., Samuelsson, G., 1996. Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12031–12034. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.12031>
- Feller, U., Anders, I., Mae, T., 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.* 59, 1615–1624. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm242>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Fischer, B.B., Eggen, R.I.L., Trebst, A., Krieger-Liszkay, A., 2006. The glutathione peroxidase homologous gene *Gpxh* in *Chlamydomonas reinhardtii* is upregulated by singlet oxygen produced in photosystem II. *Planta* 223, 583–590. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0108-9>
- Fromme, P., Jordan, P., Krauß, N., 2001. Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1507, 5–31. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5)
- Fujita, Y., Oshihiko, K., Murakami, A., 2001. Acclimation of Photosynthetic Light Energy Conversion to the Light Environments, in: *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 135–171.
- Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A., Miyachi, S., 1990. Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9779–9783.
- García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Molina-Grima, E., Camacho-Rubio, F., Merchuck, J.C., 2012. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *J. Theor. Biol.* 304, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.03.021>
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., 2007. Physiology and Biochemistry of Photosynthesis and Algal Carbon Acquisition, in: *Phytoplankton Productivity*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 44–77. <https://doi.org/10.1002/9780470995204.ch3>

- 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, 119–126. <https://doi.org/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*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 345–354. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00078.x>
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., Yamaji, H., 2015. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.002>
- Giardi, M.T., Rea, G., Lambrea, M.D., Antonacci, A., Pastorelli, S., Bertalan, I., Johanningmeier, U., Mattoo, A.K., 2013. Mutations of Photosystem II D1 Protein That Empower Efficient Phenotypes of *Chlamydomonas reinhardtii* under Extreme Environment in Space. *PLOS ONE* 8, e64352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064352>
- Giulio Rocco, S., 2016. Light stress and photoprotection in green algae, mosses and diatoms (Vegetal Biology). Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Glatz, A., Vass, I., Los, D.A., Vígh, L., 1999. The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80061-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80061-8)
- Govindjee, 2004. Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History. *Chlorophyll Fluoresc.* 1–41. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_1
- 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, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.074>
- Hagemann, M., Kern, R., Maurino, V.G., Hanson, D.T., Weber, A.P.M., Sage, R.F., Bauwe, H., 2016. Evolution of photorespiration from cyanobacteria to land plants, considering protein phylogenies and acquisition of carbon concentrating mechanisms. *J. Exp. Bot.* 67, 2963–2976. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw063>
- Hancke, K., Hancke, T.B., Olsen, L.M., Johnsen, G., Glud, R.N., 2008. Temperature Effects on Microalgal Photosynthesis-Light Responses Measured by O₂ Production, Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence, and 14c Assimilation. *J. Phycol.* 44, 501–514. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00487.x>
- 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, 48–55. <https://doi.org/10.1007/s003000050275>
- Herburger, K., Remias, D., Holzinger, A., 2016. The green alga *Zygogonium ericetorum* (Zygnematophyceae, Charophyta) shows high iron and aluminium tolerance: protection mechanisms and photosynthetic performance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw103>
- Hertle, A.P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., Leister, D., 2013. PGRL1 Is the Elusive Ferredoxin-Plastoquinone Reductase in Photosynthetic Cyclic Electron Flow. *Mol. Cell* 49, 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.030>
- Hewett-Emmett, D., Tashian, R.E., 1996. Functional Diversity, Conservation, and Convergence in the Evolution of the α -, β -, and γ -Carbonic Anhydrase Gene Families. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 50–77. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0006>

- 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, 793–806. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.793>
- Hill, R., Bendall, F., 1960. Function of the Two Cytochrome Components in Chloroplasts: A Working Hypothesis. *Nature* 186, 136–137. <https://doi.org/10.1038/186136a0>
- Holtzegel, U., 2016. The Lhc family of *Arabidopsis thaliana*. *Endocytobiosis Cell Res.* 27, 20.
- Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2011. Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 3534–3543. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0160>
- Huesemann, M., Crowe, B., Waller, P., Chavis, A., Hobbs, S., Edmundson, S., Wigmosta, M., 2016. A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Res.* 13, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.008>
- Iwata, S., Barber, J., 2004. Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.07.002>
- Jahns, P., Holzwarth, A.R., 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., Photosystem II* 1817, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.012>
- Jeffrey, M., 2014. Srivastava, A. K., Rai, A. N. & Neilan, B. A. [Eds.] 2013. *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. CRC Press, Boca Raton, FL, 375 pp., \$159.95. *J. Phycol.* 50, 770–770. <https://doi.org/10.1111/jpy.12201>
- Johnson, M.P., Goral, T.K., Duffy, C.D.P., Brain, A.P.R., Mullineaux, C.W., Ruban, A.V., 2011. Photoprotective Energy Dissipation Involves the Reorganization of Photosystem II Light-Harvesting Complexes in the Grana Membranes of Spinach Chloroplasts. *Plant Cell* 23, 1468–1479. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081646>
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauß, N., 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909–917. <https://doi.org/10.1038/35082000>
- 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, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.065>
- Kitano, K., Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., Miki, K., 2001. Crystal Structure of a Novel-Type Archaeal Rubisco with Pentagonal Symmetry. *Structure* 9, 473–481. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00608-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00608-6)
- Kouřil, R., Dekker, J.P., Boekema, E.J., 2012. Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., Photosystem II* 1817, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.024>
- Kouril, R., Zygadlo, A., Arteni, A.A., de Wit, C.D., Dekker, J.P., Jensen, P.E., Scheller, H.V., Boekema, E.J., 2005. Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 44, 10935–10940. <https://doi.org/10.1021/bi051097a>
- Kro, M., Maxwell, D.P., Huner, N.P.A., 1997. Exposure of *Dunaliella salina* to Low Temperature Mimics the High Light-Induced Accumulation of Carotenoids and the Carotenoid Binding Protein (Cbr). *Plant Cell Physiol.* 38, 213–216. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029155>

- Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L., Cramer, W.A., 2003. Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* 302, 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1090165>
- Larkum, A.W., 2016. Photosynthesis and Light Harvesting in Algae, in: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 67–87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_3
- Laureau, C., Paepe, R.D., Latouche, G., Moreno-Chacón, M., Finazzi, G., Kuntz, M., Cornic, G., Streb, P., 2013. Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species *Ranunculus glacialis* L. *Plant Cell Environ.* 36, 1296–1310. <https://doi.org/10.1111/pce.12059>
- Lea-Smith, D.J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D.S., Dennis, J.S., Scott, S.A., Smith, A.G., Howe, C.J., 2013. Thylakoid Terminal Oxidases Are Essential for the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to Survive Rapidly Changing Light Intensities. *Plant Physiol.* 162, 484–495. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210260>
- Liepmann, A.H., Olsen, L.J., 2001. Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 25, 487–498. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00961.x>
- 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, 556–572. <https://doi.org/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, 4613–4617. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4613>
- Martí, M.C., Olmos, E., Calvete, J.J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., Lázaro, J.J., Sevilla, F., Jiménez, A., 2009. Mitochondrial and Nuclear Localization of a Novel Pea Thioredoxin: Identification of Its Mitochondrial Target Proteins. *Plant Physiol.* 150, 646–657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Marutani, Y., Yamauchi, Y., Kimura, Y., Mizutani, M., Sugimoto, Y., 2012. Damage to photosystem II due to heat stress without light-driven electron flow: involvement of enhanced introduction of reducing power into thylakoid membranes. *Planta* 236, 753–761. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1647-5>
- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M., 2013. Photosynthesis in Microalgae, in: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp. 21–36. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Mathur, S., Agrawal, D., Jajoo, A., 2014. Photosynthesis: Response to high temperature stress. *J. Photochem. Photobiol. B, Stress and Photosynthesis* 137, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.010>
- Maxwell, D.P., Falk, S., Trick, C.G., Huner, N., 1994. Growth at Low Temperature Mimics High-Light Acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 105, 535–543. <https://doi.org/10.1104/pp.105.2.535>
- Mendoza-Cozatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., Moreno-Sánchez, R., 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115, 276–283. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150214.x>

- Miao, A.-J., Wang, W.-X., Juneau, P., 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2603–2611. <https://doi.org/10.1897/05-009R.1>
- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., Tsukihara, T., 2000. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J. Biol. Chem.* 275, 5521–5526. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5521>
- 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, 41–51. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00216-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00216-9)
- Mohanty, N., Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y., 1995. Mechanism of Non-Photochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching. II. Resolution of Rapidly Reversible Absorbance Changes at 530 Nm and Fluorescence Quenching by the Effects of Antimycin, Dibucaine and Cation Exchanger, A23187. *Funct. Plant Biol.* 22, 239–247. <https://doi.org/10.1071/pp9950239>
- Mondal, M., Khanra, S., Tiwari, O.N., Gayen, K., Halder, G.N., 2016. Role of carbonic anhydrase on the way to biological carbon capture through microalgae—A mini review. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 35, 1605–1615. <https://doi.org/10.1002/ep.12394>
- Moreno, S.G., Vela, H.P., Alvarez, M.O.S., 2008. LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA a COMO HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE PLANTAS Y ALGAS. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 119–129.
- Morgan-Kiss, R., Ivanov, A.G., Williams, J., Mobashsher Khan, 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* 1561, 251–265. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00352-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00352-8)
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P.A., 2006. Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 222–252. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>
- Moroney, J.V., Bartlett, S.G., Samuelsson, G., 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 24, 141–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00669.x>
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Napolitano, M.J., Shain, D.H., 2005. Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extrem. Life Extreme Cond.* 9, 93–98. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0424-1>
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K., Nover, L., 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360–367. <https://doi.org/10.1007/BF00197536>
- Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., Fernie, A.R., 2008. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 59, 1675–1684. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern002>
- Nürnberg, D.J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., Antonaru, L.A., Ruban, A.V., Cardona, T., Krausz, E., Boussac, A., Fantuzzi, A., Rutherford, A.W., 2018. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science* 360, 1210–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aar8313>

- 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, 18–24. <https://doi.org/10.1007/s002440010144>
- Pereira, M., Bartolomé, M.C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.078>
- Peter, G.F., Thornber, J.P., 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 16745–16754.
- Portis, A.R., Li, C., Wang, D., Salvucci, M.E., 2008. Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J. Exp. Bot.* 59, 1597–1604. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm240>
- Pospíšil, P., 2016. Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01950>
- Pruvost, J., Cornet, J.F., Goetz, V., Legrand, J., 2012. Theoretical investigation of biomass productivities achievable in solar rectangular photobioreactors for the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol. Prog.* 28, 699–714. <https://doi.org/10.1002/btpr.1540>
- Quesada, A., Vincent, W.F., 1997. Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur. J. Phycol.* 32, 335–342. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737269>
- Ragni, M., Airs, R.L., Leonardos, N., Geider, R.J., 2008. Photoinhibition of Psii in *Emiliania Huxleyi* (haptophyta) Under High Light Stress: The Roles of Photoacclimation, Photoprotection, and Photorepair1. *J. Phycol.* 44, 670–683. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00524.x>
- Ragsdale, H.L., Clebsch, E.E.C., 1970. Temperature and Light Intensity Effects on Growth of *Dictyosphaerium pulchellum*. *Am. J. Bot.* 57, 234–238. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1970.tb09812.x>
- Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), 2001. *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59491-5>
- Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F., 2017. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 80, 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.202>
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Raven, J.A., 1997. CO₂-concentrating mechanisms: a direct role for thylakoid lumen acidification? *Plant Cell Environ.* 20, 147–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-67.x>
- Reumann, S., Weber, A.P.M., 2006. Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C₂ cycle have become filled—Others remain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Peroxisomes: Morphology, Function, Biogenesis and Disorders* 1763, 1496–1510. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.008>
- Richa, R.P.S., Donat, P.H., 2013. Molecular Mechanisms of UV-B Stress Tolerance in Cyanobacteria, in: *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. CRC Press, pp. 231–304. <https://doi.org/10.1201/b13853>
- Rigobello-Masini, M., Penteado, J.C.P., Tiba, M., Masini, J.C., 2012. Study of photorespiration in marine microalgae through the determination of glycolic acid using hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 35, 20–28. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100488>

- Roach, T., Krieger-Liszkay, A.K., 2014. Regulation of Photosynthetic Electron Transport and Photoinhibition. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15, 351–362. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327105143>
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol., Tissue, cell and pathway engineering* 19, 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.008>
- Sánchez-Fortún, S., Marvá, F., Rouco, M., Costas, E., López-Rodas, V., 2009. Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 18, 481–487. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0303-8>
- 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, 973–979. <https://doi.org/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 centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 54, 55–62. <https://doi.org/10.1023/A:1005895924892>
- Sbihi, K., Cherifi, O., 2012. Accumulation and toxicological effects of cadmium, copper and zinc on the growth and photosynthesis of the freshwater diatom *Planorhynchium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: A laboratory study. *J Mater Env. Sci* 3, 497–506.
- Scherer, S., Chen, T.W., Böger, P., 1988. A New UV-A/B Protecting Pigment in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiol.* 88, 1055–1057.
- Schreiber, U., Müller, J.F., Haugg, A., Gademann, R., 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynth. Res.* 74, 317–330. <https://doi.org/10.1023/A:1021276003145>
- Singh, S.P., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- 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, 845–864. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500196>
- Spreitzer, R.J., Salvucci, M.E., 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 449–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233>
- Staehr, P.A., Birkeland, M.J., 2006. Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *Phycologia* 45, 648–656. <https://doi.org/10.2216/06-04.1>
- Sültemeyer, D., 1998. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characterization, regulation, and possible function during photosynthesis. *Can. J. Bot.* 76, 962–972. <https://doi.org/10.1139/b98-082>
- 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, 5276–5284. <https://doi.org/10.1128/AEM.00883-08>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.-H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>

- Tabita, F.R., Hanson, T.E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J., Chan, S., 2007. Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 576–599. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-07>
- Taylor, T.C., Andersson, I., 1997. The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* 265, 432–444. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0738>
- Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A., Teixeira, M., 2002. Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 82–87. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00434-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00434-5)
- Vierling, E., 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>
- Wang, S., Zhang, D., Pan, X., 2013. Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow. *Chemosphere* 93, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.070>
- Whitney, S.M., Andrews, T.J., 1998. The CO₂/O₂ specificity of single-subunit ribulose-bisphosphate carboxylase from the dinoflagellate, *Amphidinium carterae*. *Funct. Plant Biol.* 25, 131–138. <https://doi.org/10.1071/pp97131>
- Whitney, S.M., Houtz, R.L., Alonso, H., 2011. Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco. *Plant Physiol.* 155, 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>
- Wong, C.-Y., Teoh, M.-L., Phang, S.-M., Lim, P.-E., Beardall, J., 2015. Interactive Effects of Temperature and UV Radiation on Photosynthesis of *Chlorella* Strains from Polar, Temperate and Tropical Environments: Differential Impacts on Damage and Repair. *PLOS ONE* 10, e0139469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139469>
- Yamasaki, T., Yamakawa, T., Yamane, Y., Koike, H., Satoh, K., Katoh, S., 2002. Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol.* 128, 1087–1097. <https://doi.org/10.1104/pp.010919>
- Yamori, W., Suzuki, K., Noguchi, K., Nakai, M., Terashima, I., 2006. Effects of Rubisco kinetics and Rubisco activation state on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant Cell Environ.* 29, 1659–1670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01550.x>
- Zhou, W., Juneau, P., Qiu, B., 2006. Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere* 65, 1738–1746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.078>



SECCIÓN III

INFLUENCIA DEL pH EN MICROALGAS



CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	203
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	203
ÍNDICE DE FIGURAS.....	203
ÍNDICE DE ECUACIONES	203
MARCO TEÓRICO	134
INFLUENCIA DEL pH EN MICROALGAS	134
MECANISMOS DE TOLERANCIA Y ADAPTACIÓN EN CONDICIONES EXTREMAS DE pH.....	138
MATERIAL Y MÉTODOS	142
MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	142
EFECTO DEL pH SOBRE LA TASA CRECIMIENTO: PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA	142
ANÁLISIS DE DATOS	144
RESULTADOS	145
DISCUSIÓN	148
CONCLUSIONES.....	151
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

Índice de Tablas

TABLA 3.1. ADSORCIÓN DE IONES METÁLICOS A DIFERENTES VALORES DE pH. TOMADO DE MASINDI & MUEDI, 2018.	136
TABLA 3.3.1. VALORES DEL PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA DE LOS DISTINTOS DÍAS DE EXPOSICIÓN (1, 3, 6, 10 Y 15 DÍAS) A LOS DIFERENTES VALORES DE pH SELECCIONADOS (4.0, 5.0, 6.0, 7.1, 8.0, 9.0 Y 10.0) SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO EN LAS CEPAS TIPO SALVAJE ($DC1M^{WT}$) Y CD-RESISTENTE (DC^{RCd100}) DE <i>D. CHLORELLOIDES</i> . LOS RESULTADOS SE REPRESENTAN COMO LA MEDIA MUESTRAL $\pm$ DESVIACIÓN ESTÁNDAR (N= 6).	146

Índice de Gráficos

GRÁFICO 3.3.1. EFECTO DE LA FLUCTUACIÓN DEL pH EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE LA CEPA CD-RESISTENTE (DC^{RCd100}) VS. CEPA TIPO SALVAJE ($DC1M^{WT}$) DE <i>D. CHLORELLOIDES</i> . (A) PRIMER DÍA DE EXPOSICIÓN (1ER DÍA), (B) 3ER DÍA, (C) 6TO DÍA, (D) 10MO DÍA, (E) 15TO DÍA. (N= 6).	147

Índice de Figuras

FIGURA 3.1. ESPECIACIÓN DEL Cd A DIFERENTES VALORES DE pH EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS. TOMADO DE LANGMUIR ET AL., 2005.	134
FIGURA 3.2. MECANISMO Y DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSORCIÓN DE IONES METÁLICOS EN MICROALGAS (SH^- , COO^- , OH^- , PO_4^{3-} , ETC.). TOMADO DE ZERAATKAR ET AL., 2016.	137
FIGURA 3.3. A) ESTRUCTURA DE UNA PARED CELULAR DE MICROALGAS QUE CONTIENEN ALGAENAN, Y B) MATERIA ORGÁNICA PROTEICA ENCAPSULADA DENTRO DEL MATERIAL DEGRADADO DE LA PARED CELULAR. TOMADO DE KNICKER & HATCHER, 2001.	140

Índice de Ecuaciones

ECUACIÓN 3.1.1. PARÁMETRO MALTUSIANO DE EFICACIA BIOLÓGICA (M) (CROW & KIMURA, 1970)	143

3. MARCO TEÓRICO

3.0.1. Influencia del pH en microalgas

Como se menciona en las secciones anteriores, 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. Esto es particularmente importante, puesto que la especiación metálica ha demostrado una relación directa con el grado en que está disponible para el organismo y al cual es reactivo (Figura 3.1) (Canli & Atli, 2003). Fundamentalmente, las fluctuaciones de pH que ocurren por hasta 2 unidades se presentan en lagos donde la capacidad de amortiguación del sistema carbonato es menos eficiente, en cuerpos de agua pequeños altamente productivos y en las zonas litorales de lagos poco profundos con producción primaria intensa (Weisse & Stadler, 2006). Además, la acidificación de cuerpos de agua naturales es uno de los principales problemas ambientales debido a la emisión de desechos industriales (Visviki & Santikul, 2000).

En este contexto, 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).

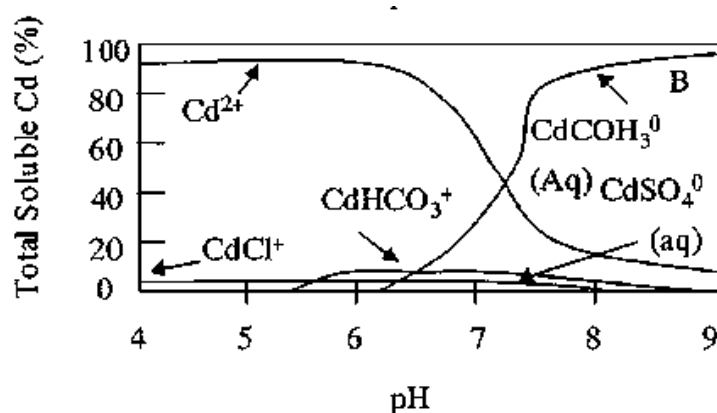


Figura 3.1. Especiación del Cd a diferentes valores de pH en los ecosistemas acuáticos. Tomado de Langmuir et al., 2005.

Por otro lado, en las barreras biológicas como el mucílago, pared celular y membrana plasmática, los iones duros (de menor tamaño) como Fe, Zn, Mn forman enlaces estables con grupos

funcionales como OH^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , R-COO^- , $=\text{C=O}$; mientras que los iones blandos (con mayor diámetro) como el Cd, Pb y Cu se unen de forma preferente a CN^- , R-S^- , $-\text{SH}^-$, $-\text{NH}_2^-$ e imidazol (Suresh Kumar et al., 2015), como se menciona más adelante en la clasificación de los metales en el apartado de “*Mecanismos de metalo-resistencia de forma individual*”.

Dentro de este contexto, a bajos valores de pH, los ligandos de la pared celular están asociados con los iones H_3O^+ y H^+ , lo que restringe la aproximación de los cationes metálicos debido a las fuerzas repulsivas; mientras que, a condiciones alcalinas, los grupos funcionales como los grupos carboxilo (R-COOH), fosfato (PO_4^{3-}), hidroxilo (R-OH^-), amino (R-NH_2^-) cargados negativamente o bien con sus pares de electrones libres disponibles, favoreciendo interacciones con los cationes metálicos dando como resultado la biosorción en la superficie celular (Figura 3.2) (Çetinkaya Dönmez et al., 1999; Suresh Kumar et al., 2015). Además, existen diferencias en la adsorción superficial de los iones metálicos a distintos valores de pH (Tabla 3.1) de acuerdo con Masindi & Muedi, (2018).

Lo anterior se encuentra sostenido por Monteiro et al., (2012), donde varios grupos químicos funcionales están disponibles para unir cationes metálicos con respecto a diferentes rangos de pH: por ejemplo, al rango de pH 5.0-9.0 los metales están unidos por grupos fosfato, mientras que a pH 9.0-12.0 los grupos carboxilo, hidroxilo y amino también influyen sobre la unión al metal. Otros grupos funcionales, como el grupo tiol (R-SH) juegan un papel importante en la sorción del Cd a pH bajos ($\text{pH} > 2.0$) (Mehta & Gaur, 2005).

Sin embargo, una disminución de la absorción de cationes metálicos por las microalgas se ha observado con frecuencia a un pH extremadamente ácido ($\text{pH} < 2.0$), esto sucede probablemente a la alta concentración de iones H^+ generan la exclusión competitiva de la unión a los ligandos en la superficie celular (Campbel & Stokes, 1985; Gupta & Rastogi, 2008). Mientras que, por encima de pH 6.5, los metales tienden a precipitar en forma de hidróxidos, por lo que solo una baja concentración de metales permanecen en solución formando complejos (Suresh Kumar et al., 2015). Así pues, el incremento del pH de 1.0 a 7.0 se aumenta la capacidad de unión del 30 al 90% aproximadamente de metales como Cu, Cd y Zn en microalgas (Bishnoi et al., 2004). No obstante, la esterificación de los grupos carboxilo presentes en las paredes celulares generalmente da como resultado una disminución de la capacidad de unión del metal (Suresh Kumar et al., 2015).

Tabla 3.1. Adsorción de iones metálicos a diferentes valores de pH. Tomado de Masindi & Muedi, 2018.

Metal ion	pH	Metal ion	pH	Metal ion	pH
Al ³⁺	4.1	Hg ²⁺	7.3	Cd ²⁺	6.7
Fe ³⁺	3.5	Na ⁺	6.7	Fe ²⁺	5.5
Mn ²⁺	8.5	Pb ²⁺	6.0	Cu ²⁺	5.3
Cr ³⁺	5.3	Zn ²⁺	7.0		

Además, las fluctuaciones de pH impulsadas por la fotosíntesis y la respiración crean un entorno en donde se producen rangos de pH cambiantes. Es decir, durante el día, la fotosíntesis y la fijación del CO₂ aumentan los niveles de pH, mientras que durante la oscuridad, en la respiración se revierte este proceso y reduce los niveles de pH nuevamente (Bartley et al., 2014). Sin embargo, a pH > 9.5, los iones de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ son las especies de Carbono inorgánico disueltos (DIC, por sus siglas en inglés) dominantes, mientras que las concentraciones de CO₂ disuelto son insignificativamente bajas debido al equilibrio de carbono inorgánico dependiente del pH. No obstante, las microalgas presentan los “mecanismos de concentración de carbono o CCM” a través de la expresión de la anhidrasa carbónica en la acumulación y fijación de CO₂ bajo estas condiciones (Vadlamani et al., 2017), explicado en la sección “*Anhidrasa carbónica (AC): actividad y regulación*”. Esto produce un incremento en la tasa de crecimiento al aumentar la actividad fotosintética alrededor de pH 9.0 (Lundholm et al., 2004). Conjuntamente, el pH influye en la calidad y composición de carotenoides en algunos géneros de microalgas como *Chlorococcum* sp. (Liu and Lee, 2000). Por ejemplo, en la cianobacteria *Synechocystis* sp. se ha estimado un incremento de la síntesis de β-caroteno a pH de 11.0 como mecanismos de protección celular (Touloupakis et al., 2016).

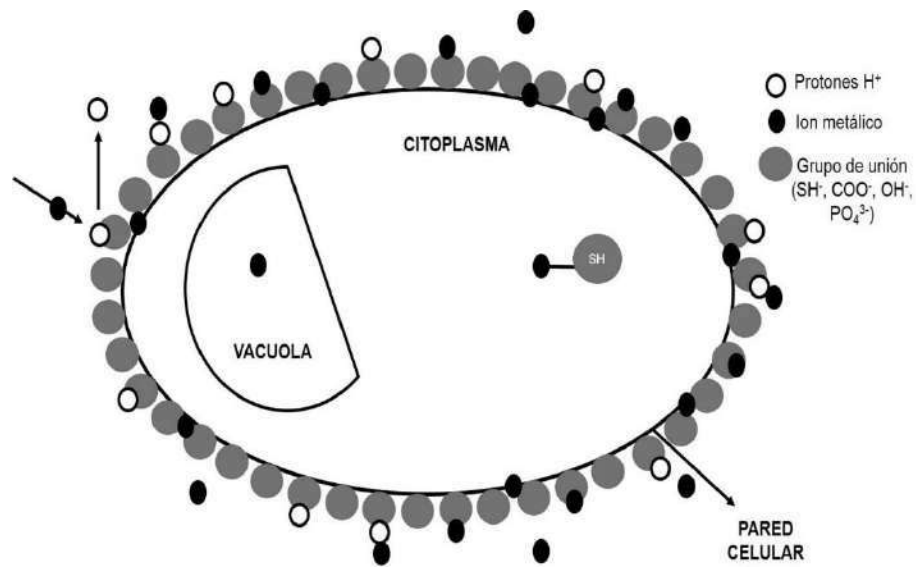


Figura 3.2. Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH⁻, COO⁻, OH⁻, PO₄³⁻, etc.). Tomado de Zeraatkar et al., 2016.

En estudios previos ya se tenía conocimiento acerca de que en el rango de pH de 5.0 a 9.0, se produce la remoción del Cd en clorofíceas (*Chlorella* y *Scenedesmus*) (Gipps & Coller, 1980; Starý & Kratzer, 1982; Monteiro et al., 2012). Por otra parte, el pH influye directamente sobre la fuerza iónica en la absorción metálica en microalgas, es decir, se produce reducción de la unión de protones con el aumento de la fuerza iónica y el pH, no obstante, también se incrementa la unión de Cu y Ni con el aumento del pH, pero se reduce la fuerza iónica (Schiewer & Wong, 2000).

3.0.2. Mecanismos de tolerancia y adaptación en condiciones extremas de pH

Entre 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 de carácter tóxico (Vierling, 1991; Jeffrey, 2014). Igualmente, 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. Igualmente, se induce y se acumulan estas mismas isoformas de las Hsp (Hsp70) en el mecanismo de adaptación de *Chlamydomonas acidophila* a fluctuaciones de pH y temperatura (20-39 °C) dependientes de ambientes acuáticos contaminados con elevadas concentraciones de metales (Fe, Al, Mn, Cr, Ni) (Gerloff-Elias et al., 2006). Esta inducción de Hsps por choque térmico leve aumenta la tolerancia a condiciones ácidas en microalgas, denominándose “**protección o tolerancia cruzada**” (Wang & Doyle, 1998).

También se ha evaluado sobre *Chlamydomonas acidophila*, la capacidad para mantener el pH neutro intracelular a través de varias estrategias como: a) la generación de un potencial positivo de membrana, b) carga positiva fuera de la membrana citosólica, c) reducción en la permeabilidad de membrana a protones, y d) un sistema de transporte activo o bombas de eflujo de protones (Goss & Garab, 2001; Rai & Gaur, 2001). Esto último, especialmente, puede dar como resultado una mayor demanda energética en la célula a través de la reducción en las tasas fotosintéticas bajo un pH ácido. Las microalgas pueden aumentar su potencial para la síntesis de ATP a través de la inducción de mecanismos alternativos de transporte de electrones, como el transporte cíclico de electrones alrededor del PSI (Canaani, 1990; Gerloff-Elias et al., 2005).

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* sp. cepa PCC6803. Así, entre las proteínas ácido-base inducidas en esta cianobacteria, se identificaron a la anhidrasa carbónica y el oxalato descarboxilasa encargadas de la homeostasis del pH (Kurian et al., 2006). En el 2005, se evaluó que a cambios extremos en pH de 1.5 a 7.0, se reduce de forma significativa la tasa de crecimiento y el Φ_{PSII} en *C. acidophila*, debido a elevadas tasas de respiración y reducción sobre la fotosíntesis neta (Gerloff-Elias et al., 2005).

Por otra parte, Zhang et al., (2009), 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.

Como se menciona anteriormente, los microorganismos presentan estrategias para mantener la homeostasis del pH en el citosol y en el volumen celular de células eucariotas, a través de: a) la expresión de antitransportadores M^+/H^+ (por ejemplo, el antitransportador de $Na^+(K^+)/H^+$), simportadores de HCO_3^-/Na^+ , b) aumento de la ATP sintasa que utiliza protones H^+ para síntesis de ATP (bombas de Na^+/K^+ -ATPasa), c) modificaciones estructurales en la pared celular (Padan et al., 2005).

En este último mecanismo, la pared celular de las microalgas influye directamente sobre la adsorción metálica, con actividad mecano estructural, de regulación y de protección. Las microalgas pertenecientes a la Clase Trebouxiophyceae, Phylum Chlorophyta (los géneros *Dictyosphaerium* y *Chlorella*) su pared celular contiene celulosa y está recubierta por un estrato externo altamente resistente denominado “algaenan”, que consiste en largas cadenas de polímeros alifáticos polimetilénicas asociadas con grupos amida y N-alquil pirroles sustituidos (Rodrigues & Bon, 2011). Este polímero confiere resistencia a elevadas temperaturas, condiciones extremas de pH como hidrólisis ácida y alcalina, agentes químicos como detergentes, y su actividad se basa a través de la encapsulación de proteínas lábiles (Figura 3.3) (Knicker & Hatcher, 2001; Domozych et al., 2012).

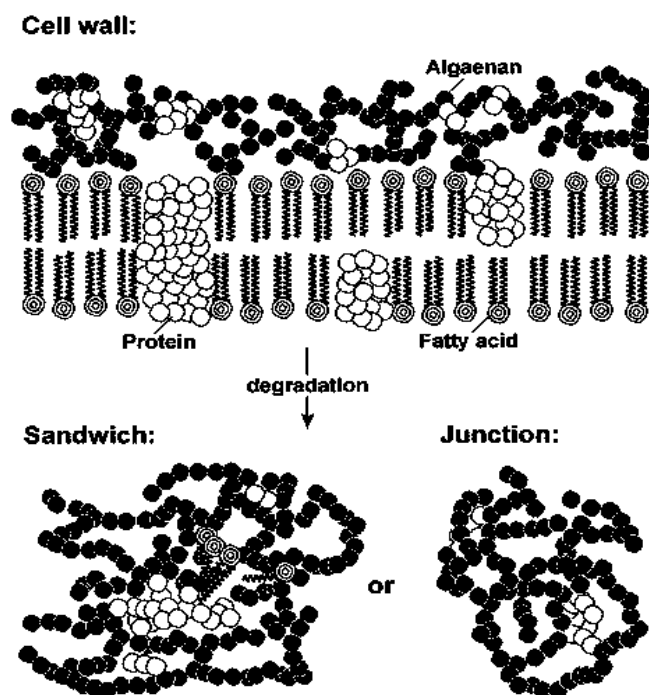


Figura 3.3. A) Estructura de una pared celular de microalgas que contienen algaenan, y **B)** Materia orgánica proteica encapsulada dentro del material degradado de la pared celular. Tomado de Knicker & Hatcher, 2001.

Asimismo, clorofíceas como del género *Chlamydomonas* en su pared celular presentan agregados de glicoproteínas cristalinas de hidroxiprolina (HRGPs), y glicoproteínas ricas en glicina. Otros miembros del Phylum como *Chlorella* contienen β -1,4-glucano-celulosa. Las especies de la Clase Chlorococcales presentan engrosamiento de la pared celular de 10-30 nm de espesor con una apariencia de una envoltura trilaminar, la cual es altamente resistente a la hidrólisis química (Domozych et al., 2012).

Por otra parte, a través de análisis proteómicos Summerfield et al., (2013), determinaron en *Synechocystis* sp., expuesta a pH de 10.0, produce un mayor acoplamiento de los ficobilisomas en el PSII junto con una mayor transcripción de genes para las proteínas psbO y psbU que responden al estrés oxidativo, incrementando la resistencia del PSII a dicho estrés.

Otro de los mecanismos que se expresan en condiciones alcalinas, es el incremento en la agregación celular y la inhibición de la liberación de autoesporas. Estos efectos se observan como cambios en el metabolismo de la pared celular a través de un aumento en la flexibilidad de la pared celular de las células madre, así como el tiempo se incrementa para completar el ciclo celular (Guckert & Cooksey, 1990).

Simultáneamente, a valores de $\text{pH} > 6.0$, la carga superficial de las microalgas está mayormente dominada por iones carboxilato cargados negativamente y grupos aminos neutros, no obstante, a medida que el pH disminuye ($\text{pH} 4.0$), los iones carboxilato acepta protones con reducción de la carga superficial, las células se vuelven inestables coagulándose formando flóculos. A condiciones altamente ácidas de 1.5 a 4.0, los potenciales Z incrementan, pero la floculación disminuye, con lo que la superficie celular se carga de forma positiva resultando en la re-suspensión celular (Liu et al., 2013).

No obstante, los mecanismos anteriormente mencionados presentan un elevado coste energético para tolerar a tales variaciones en el pH , sugiriendo que a exposiciones a corto plazo se expresa el bombeo de protones a través de los antitransportadores antes mencionados, mientras que a fluctuaciones de pH a largo plazo, las microalgas optan por regular la homeostasis a través del transporte de protones de forma pasiva, “ahorrando” energía para el metabolismo en tales condiciones (Ihnken et al., 2014).

Por ende, las cepas de microalgas metalo-resistentes inducen otros mecanismos que pueden actuar de forma simultánea potenciando las respuestas de tolerancia a distintas condiciones abióticas extremas, estos mecanismos de adaptación a través de modificaciones genéticas como se ha mencionado a lo largo del presente manuscrito, son heredables a las siguientes generaciones, en el caso de microalgas con reproducción asexual, incrementando la respuesta de resistencia por selección de los biotipos que son capaces de sobrevivir en variables extremas.

3.1.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo

La cepa tipo salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek & Perman,1978) (Dc1M^{wt}), fue obtenida de la colección de cultivos de algas del Laboratorio de Toxicología ambiental y de la Unidad de Genética (Depto. De Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria) de la Universidad Complutense de Madrid, España, y la obtención de la cepa resistente se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH. La microalga se cultiva en frascos de cultivo (Greiner Bio-One, Longwood, NJ, EE.UU.) en 20 mL del medio de enriquecimiento BG-11 con un pH de 7.1 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) para el crecimiento axénico de ambas. La cepa resistente se cultiva en BG-11 suministrado con sulfato de cadmio de acuerdo a la IC₅₀₍₇₂₎ (11.57 mg L⁻¹ que corresponde a 100μM a Cd²⁺) previa en Dc1M^{wt} (3CdSO₄ · 8H₂O; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Ambas cepas se mantienen a 21 °C bajo una incidencia fotónica de 60 μmol m⁻² s⁻¹ a con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12h una longitud de onda de 400 a 700 nm. Las células se mantienen en crecimiento exponencial por medio de transferencias de inóculo unicelular a un medio fresco cada dos semanas.

3.1.2. Efecto del pH sobre la tasa crecimiento: Parámetro Maltusiano de eficacia biológica

Para estimar el estrés producido por variaciones del pH en el medio sobre ambas cepas de *D. chlorelloides* Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt}, se estimó a partir del Parámetro Maltusiano de eficacia biológica (*m*). Se utilizaron los buffers de HCl y NaOH 0.1M para alcanzar los valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 7.1 como pH control. En orden para estimar la tasa máxima de crecimiento de Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt}, los cultivos fueron mantenidos a los tiempos de 0,1, 3, 6, 10 y 15 días para su cuantificación a través de las diferentes fases de crecimiento poblacional, a 21 °C, fotoperiodo de 12:12h, incidencia fotónica de 60 μmol m⁻² s⁻¹ a una longitud de onda de 400 a 700 nm, en cámara controlada termostatizada (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.). Como concentración inicial celular se ajustó a 1x10⁴ células mL⁻¹. Cada ensayo fue repetido 6 veces (n= 6).

La cuantificación de tasa máxima de crecimiento, se determinó a partir del Parámetro Maltusiano de eficacia biológica (*m*) (Crow & Kimura, 1970), como se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 3.1.1. Parámetro Maltusiano de eficacia biológica (m) (Crow & Kimura, 1970)

$$m = \log_e \left(\frac{N_t/N_0}{t} \right)$$

Dónde, N_t corresponde a la concentración celular al final del ensayo; N_0 corresponde a la concentración celular al inicio del ensayo; y t pertenece al tiempo expresado en días de 0, 1, 3, 6, 10 y 15 días.

Este parámetro fue estimado a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por la clorofila (Chl) de Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt} como cepa control utilizando filtros de emisión-excitación de 485-670 nm, respectivamente, a través de la lectura en placa en fluorímetro (Tecan Group Ltd., Switzerland) con $n=6$ ensayos.

3.2. ANÁLISIS DE DATOS

Las respuestas del pH sobre la tasa máxima de crecimiento en las cepas Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt} se determinaron mediante el Parámetro Maltusiano de eficacia biológica descrito anteriormente. Cada prueba se repitió seis veces ($n=6$) y se obtuvo la media de la muestra y su desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$), con sus respectivos límites de confianza al 95%. La normalidad de los datos se evaluó por el Test de D'Agostino y Pearson, utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Las diferencias estadísticas se obtuvieron mediante la aplicación de un T-test no pareado por corrección de la prueba de Welch para distintas variaciones y las diferencias se consideran significativas a $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó por el software Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

3.3.RESULTADOS

Después de los diferentes tiempos exposición, la cepa control Dc1M^{wt} no fue capaz de mantener tasas de crecimiento exponencial en condiciones moderadamente ácidas (valores de pH 4.0 y 5.0) exhibiendo valores negativos de m de diferente magnitud, el cual incrementa acorde con el aumento en el tiempo de exposición como se muestra en la Tabla 3.3.1 y Gráfico 3.3.1A a E.

A pH de 10.0, Dc1M^{wt} no presenta tasa de crecimiento, respuesta que comparte con la variante Dc^{RCd100} en el primer, tercer y sexto día de exposición (Tabla 3.3.1, Gráfico 3.3.1A-C). No obstante, a los 10 y 15 días, Dc1M^{wt} exhibió una tasa de crecimiento a este valor de pH, con la consiguiente fase de inducción que inicia la división y el crecimiento celular. De hecho, su tasa máxima de crecimiento se da en el valor de pH de 9.0 con un incremento en la aptitud para el tiempo de exposición más largo (día 15, $m= 2.17$, y Gráfico 3.3.1E). Por tanto, la cepa control en fase estacionaria tiene preferencia a valores de pH alcalinos para llevar a cabo la fotosíntesis y estimular la división y crecimiento poblacional.

En contraste, la cepa Dc^{RCd100} en el primer día de la exposición a pH 4.0 ($m= 0.67$), tuvo una tasa de crecimiento estadísticamente significativa en comparación con Dc1M^{wt} ($p < 0.0001$) (Tabla 3.3.1). Sin embargo, a los 10 y 15 días ($m= 0.16$ y 0.13 , respectivamente), esta cepa Cd-resistente creció a pH 5.0, pero el crecimiento fue muy lento debido a una fase de adaptación más larga en el medio de cultivo (Gráfico 3.3.1D y E). A pesar de que esta cepa tuvo un crecimiento limitado y lento en ambientes moderadamente ácidos, no obstante, la división celular y por ende la tasa de crecimiento de Dc^{RCd100} comenzaron a incrementarse a un pH de 6.0, alcanzando un máximo en el día 10 ($m= 0.93$) a pH de 8.0 (Gráfico 3.3.1D).

Así pues, las principales diferencias entre ambas cepas son: la Dc^{RCd100} no crece en ambientes alcalinos (valores de pH de 9.0 y 10.0), esta cepa prefiere ambientes ligeramente alcalinos a neutros con tendencia a crecer a pH moderadamente ácidos; mientras que la cepa control Dc1M^{wt} prefiere condiciones alcalinas donde muestra su tasa de crecimiento máxima y por lo tanto mayor productividad (Tabla 3.3.1 y Gráfico 3.3.1B-E).

Tabla 3.3.1. Valores del parámetro maltusiano de eficacia biológica de los distintos días de exposición (1, 3, 6, 10 y 15 días) a los diferentes valores de pH seleccionados (4.0, 5.0, 6.0, 7.1, 8.0, 9.0 y 10.0) sobre la tasa de crecimiento en las cepas tipo salvaje ($Dc1M^{wt}$) y Cd-resistente (Dc^{RCd100}) de *D. chlorelloides*. Los resultados se representan como la media muestral $\pm$ desviación estándar (n= 6).

		Día 1		Día 3		Día 6		Día 10		Día 15	
pH	n	$Dc1M^{wt}$	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{RCd100}
4.0	6	-1.18 $\pm$ 0.80	0.67 $\pm$ 0.15**	- 2.40 $\pm$ 0.40	- 0.28 $\pm$ 0.13***	- 3.43 $\pm$ 1.00	-0.47 $\pm$ 0.22**	- 4.00 $\pm$ 0.51	- 0.14 $\pm$ 0.10***	- 5.24 $\pm$ 0.67	-0.51 $\pm$ 0.16 ***
5.0	6	-0.11 $\pm$ 0.09	-0.28 $\pm$ 0.004*	- 0.22 $\pm$ 0.10	0.005 $\pm$ 0.013 **	- 0.41 $\pm$ 0.13	-0.50 $\pm$ 0.14 ns	- 0.62 $\pm$ 0.19	0.16 $\pm$ 0.08 ***	- 0.42 $\pm$ 0.12	0.13 $\pm$ 0.06 ***
6.0	6	0.018 $\pm$ 0.005	0.031 $\pm$ 0.009*	- 0.07 $\pm$ 0.19	0.41 $\pm$ 0.11**	- 0.05 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.02 ***	- 0.09 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.19 ***	0.28 $\pm$ 0.08	0.76 $\pm$ 0.10 ***
7.1	6	-0.24 $\pm$ 0.15	0.089 $\pm$ 0.058**	0.10 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.04 ns	0.05 $\pm$ 0.03	- 0.43 $\pm$ 0.11***	0.20 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.02 **	0.32 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.03 **
8.0	6	0.17 $\pm$ 0.087	0.19 $\pm$ 0.080 ns	0.37 $\pm$ 0.22	0.72 $\pm$ 0.16*	0.30 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.15 ns	0.57 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.31 *	0.61 $\pm$ 0.20	0.90 $\pm$ 0.23 ns
9.0	6	-0.43 $\pm$ 0.19	-0.57 $\pm$ 0.27 ns	1.05 $\pm$ 0.31	0.04 $\pm$ 0.14***	1.33 $\pm$ 0.59	-0.30 $\pm$ 0.31**	1.87 $\pm$ 0.88	- 1.93 $\pm$ 0.40***	2.17 $\pm$ 0.24	0.04 $\pm$ 0.02***
10.0	6	-0.52 $\pm$ 0.12	-0.50 $\pm$ 0.24ns	- 0.67 $\pm$ 0.19	-0.02 $\pm$ 0.05 ***	- 2.01 $\pm$ 0.15	- 0.36 $\pm$ 0.11***	0.15 $\pm$ 0.62	-0.08 $\pm$ 0.53 ***	0.68 $\pm$ 0.34	- 0.079 $\pm$ 0.06**

*, **, ***: diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a $Dc1M^{wt}$

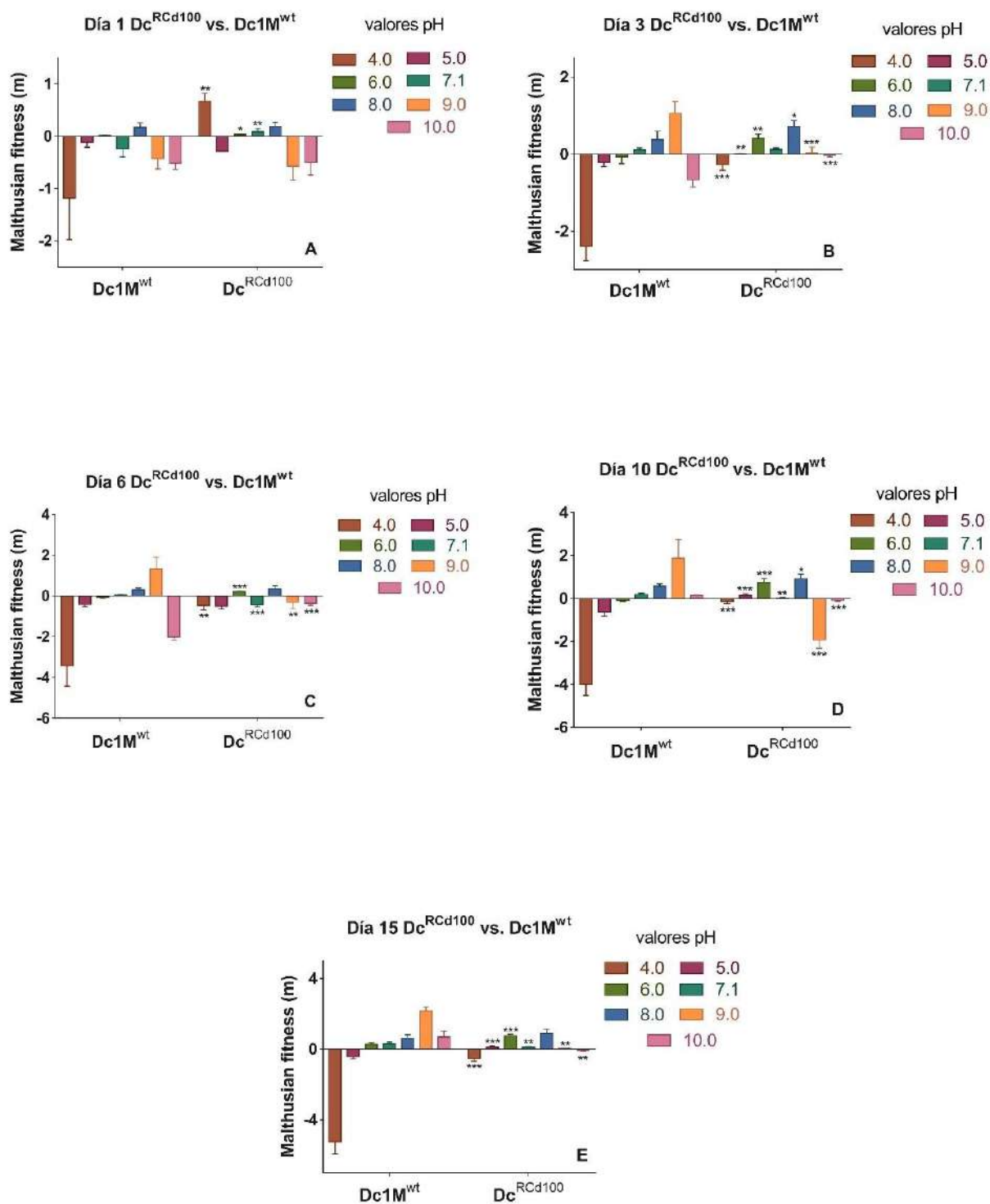


Gráfico 3.3.1. Efecto de la fluctuación del pH en el medio de cultivo sobre la eficacia biológica de la cepa Cd-resistente (Dc^{RCd100}) vs. cepa tipo salvaje ($Dc1M^{wt}$) de *D. chlorelloides*. (A) Primer día de exposición (1er día), (B) 3er día, (C) 6to día, (D) 10mo día, (E) 15to día. (n= 6).

3.4.DISCUSIÓN

El pH en el medio de crecimiento, es importante en el contexto de la especiación metálica (es decir, la formación de complejos de diferente solubilidad y toxicidad, o en forma de iones libres), además influye en la unión de los metales a las paredes celulares. Este proceso implica el desplazamiento de protones, que depende del grado de protonación determinado por el pH del medio circundante (Macfie et al., 1994; Macfie & Welbourn, 2000; Chen et al., 2017).

Este parámetro también influye en la tasa de reproducción y de crecimiento en organismos fitoplanctónicos, con modificaciones en la composición y riqueza de las comunidades de microalgas, lo que resulta en la extinción local de especies sensibles (Visviki & Santikul, 2000; Sakarika & Kornaros, 2016;). No obstante, esta variable participa en la metalo-resistencia en las microalgas, afectando la unión del metal en la superficie celular y en la floculación de las microalgas (Liu et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que, la cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} no creció en condiciones alcalinas y exhibe su tasa máxima de crecimiento en el rango de pH más cercano a la neutralidad (6.0 y 8.0) con capacidad limitada para sobrevivir en condiciones moderadamente ácidas (pH 4.0 y 5.0). Por otro lado, la cepa control Dc1M^{wt} tuvo preferencia sobre ambientes alcalinos con una tasa máxima de crecimiento a pH 9.0, 10.0 y a neutros. Estos resultados son consistentes con otros estudios donde la mayoría de las especies de microalgas tienen una tasa máxima de crecimiento alrededor de un pH neutro (7.0-7.6), aunque el pH óptimo es el pH de cultivo inicial al que las microalgas inician su fase de latencia (Visviki & Santikul, 2000; Hansen, 2002).

Touloupakis et al., (2016), reportaron sobre ciertas microalgas como la cianobacteria *Synechocystis* presenta una productividad óptima en el rango de pH 7.5 a 10.0. Estos autores también indicaron que la exposición a pH de 11.0 la productividad fotosintética, el rendimiento en crecimiento y la utilización de la energía lumínica disminuyeron en un 32, 28 y 26%, respectivamente.

Anteriormente, Bartley et al., (2014), investigaron la influencia del pH en el crecimiento y la acumulación de lípidos en *Nannochloropsis salina*, indicando que las tasas de crecimiento más altas estaban en valores de pH 8.0 y 9.0 (0.19 ± 0.008 y 0.19 ± 0.011 , respectivamente), pero esta microalga no pudo crecer a pH 10.0, y las densidades celulares máximas se alcanzaron alrededor de los 21 días del bioensayo. Otros autores informaron el efecto del pH en diferentes géneros de microalgas marinas y de agua dulce (*Thalassiosira pseudonana* y *Chlorella pyrenoidosa*), sus tasas

de crecimiento y fotosíntesis se mantenían a valores de pH 5.7, 6.5, 8.3 y 8.8; no obstante, a pH 9.0 fueron incapaces de mantener la tasa de crecimiento (Chen and Durbin, 1994; Tan et al., 2016). Por lo tanto, el cambio de pH en los medios puede limitar el crecimiento de microalgas a través de la inhibición metabólica (Juneja et al., 2013).

En nuestro estudio, el pH 7.1 es el valor de pH óptimo por lo que normalmente la clorofícea de *Dictyosphaerium chlorelloides* alelo nativo presenta una tasa óptima de crecimiento. Sin embargo, la tasa máxima de crecimiento fue de pH 9.0, lo que concuerda con Eaton-Rye et al., (2003) y Kurian et al., (2006), estos autores establecieron que el pH óptimo para el crecimiento de clorofíceas es superior a 7.5 y cercano a 10.0. En este contexto, Moheimani, (2013), evaluó sobre las clorofíceas *Chlorella* sp. y *Tetraselmis suecica*, la mayor productividad de la biomasa tenía el siguiente orden en términos de pH: pH 7.0 > pH > 7.5 > pH 6.5 > pH 8.0 > pH 6.0 > pH 5.5.

Para *Dunaliella salina* se determinó que a los días 2 al día 5, se presenta la tasa máxima de crecimiento a pH 7.0-8.0 con un valor de $0.5 \mu\text{m día}^{-1}$; mientras que, del 5to. al 10mo. día, la tasa de crecimiento específica alcanzó un valor bajo de $0.1 \mu\text{m día}^{-1}$ (Ying et al., 2014).

En condiciones ácidas, la absorción de nutrientes puede alterarse y, por lo tanto, afectar el crecimiento de microalgas (Juneja et al., 2013). Por ejemplo, en *Chlamydomonas acidophila*, expuesta a pH 4.4 se desnaturaliza la proteína V-lisina por los iones H^+ , una enzima proteolítica que facilita la liberación de células hijas de la pared celular madre de la colonia de autoesporas (Visviki & Palladino, 2001).

Sin embargo, existe poca correlación con trabajos realizados sobre cepas de microalgas metalo-resistentes y sus respuestas ante fluctuaciones en el pH circundante. No obstante, entre tales estudios, Visviki & Santikul, (2000), informaron sobre la tolerancia de *Chlamydomonas applanata* a pH 3.4 con producción de mucílago, no obstante, esta microalga presentó una tasa de crecimiento exponencial óptima después de 5 días a pH de 7.4. Posteriormente, Pereira et al., (2013), estimaron la respuesta en las fluctuaciones de pH en el medio sobre dos cepas de *D. chlorelloides*: Dc1M^{wt} y una cepa Cr⁶⁺-resistente Dc^{RCr(VI)R25}, reportando que ambas cepas pueden sobrevivir en ambientes acuáticos alcalinos y moderadamente acidificados (pH 4.25). En este contexto, nuestra cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} pudo crecer, aunque con una capacidad limitada a niveles de pH moderadamente bajos (pH 4.0 y 5.0), pero exhibió mayor aptitud biológica que Dc1M^{wt} cuando ambos se sometieron a tales condiciones en el medio de cultivo. Otra de las adaptaciones observadas en

microalgas en condiciones ácidas, fue la reportada por Tatsuzawa et al., (1996) sobre *Chlamydomonas* sp., revelando un aumento del contenido de ácidos grasos saturados, lo que reduce la fluidez de membrana e inhibe altas concentraciones de protones a pH de 2.7. Otros investigadores reportaron sobre *Scenedesmus* sp. la cepa R-16 una elevada tolerancia a un amplio rango de pH (4.0-11.0), e informaron que esta cepa tiene el potencial de usarse para el tratamiento de aguas residuales en un amplio rango de pH (Ren et al., 2013).

En estudios previos realizados por Lavoie et al., (2012), estimaron los cambios en la permeabilidad de la membrana celular en función del pH en tres especies de microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Chlorella fusca*, indicando que estas microalgas se adaptaron a pH 5.5, no obstante, con una tasa de crecimiento menor que a pH 7.0.

Autores como Juneja et al., (2013) y Cabello et al., (2015), informaron que para mantener una pH neutro intracelular en entornos ácidos, se requieren costos de energía adicionales para bombear protones fuera de la célula (por ejemplo, la microalga ácido-tolerante *Chlorella saccharophila* puede cambiar el pH intracelular en respuesta al cambio del pH externo), o en correlación con bajas irradiaciones la liberación del O₂ no se genera, revelando que no se obtiene suficiente ATP de la fotofosforilación para compensar las necesidades energéticas de las células, incluido el mantenimiento de un gradiente extracelular de protones H⁺ alto. Además, la evolución de O₂ se reprime cuando se produce una caída de pH o en condiciones neutras a valores de 6.5 (Ihnken et al., 2014). Por ejemplo, en condiciones desfavorables de pH, la respiración incrementa y se suprime la actividad fotosintética en *Euglena gracilis* (Danilov & Ekelund, 2001).

Por lo tanto, el estudio de la adaptación genética de microalgas a condiciones fluctuantes caracterizadas por valores extremos de pH y presencia de metales, es una aproximación adecuada al problema del origen de las mutaciones y de los mecanismos que favorecen el proceso de adaptación (López-Rodas et al., 2008).

3.5.CONCLUSIONES

En resumen, la cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} en relación con la cepa control $Dc1M^{wt}$ exhibió una tasa de crecimiento máxima a un pH cercano al óptimo (pH 8.0), y con una baja aptitud en condiciones moderadamente ácidas.

No obstante, la cepa $Dc1M^{wt}$ mostró su tasa máxima de crecimiento a valores de pH alcalino (pH 9.0), a diferencia de Dc^{RCd100} , que comienza a crecer a pH 9.0 a los 15 días de exposición (fase estacionaria) mostrando un valor bajo de la tasa de crecimiento, pero sin eficacia biológica a pH 10.0.

3.6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, H.E., Hall, R.H., Brisbin, T.D., 1980. Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 14, 441–443. <https://doi.org/10.1021/es60164a002>
- Bartley, M.L., Boeing, W.J., Dungan, B.N., Holguin, F.O., Schaub, T., 2014. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *J. Appl. Phycol.* 26, 1431–1437. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>
- 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, 29–34. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10006-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10006-5)
- Bishnoi, N.R., Pant, A., Garima, 2004. Biosorption of copper from aqueous solution using algal biomass. *JSIR Vol6310 Oct.* 2004.
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour. Technol.* 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
- Campbel, P.G.C., Stokes, P.M., 1985. Acidification and Toxicity of Metals to Aquatic Biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034–2049. <https://doi.org/10.1139/f85-251>
- Canaani, O., 1990. THE ROLE OF CYCLIC ELECTRON FLOW AROUND PHOTOSYSTEM I and EXCITATION ENERGY DISTRIBUTION BETWEEN THE PHOTOSYSTEMS UPON ACCLIMATION TO HIGH IONIC STRESS IN *Dunaliella salina*. *Photochem. Photobiol.* 52, 591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1990.tb01804.x>
- 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, 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00194-X)
- Çetinkaya Dönmez, G., Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T., 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochem.* 34, 885–892. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00005-9)
- Chen, C.Y., Durbin, E.G., 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109, 83–94. <https://doi.org/10.3354/meps109083>
- Chen, J.P., Wang, L.K., Hung, Y.-T., Shammass, K.N., Wang, M.H.S., 2017. Remediation of Heavy Metals in the Environment, 1st. Edition. ed. CRC Press Taylor & Francis Inc., Bosa Roca, United States.
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. New York, Evanston and London: Harper & Row, Publishers, New York.
- Danilov, R.A., Ekelund, N.G.A., 2001. Effects of pH on the growth rate, motility and photosynthesis in *Euglena gracilis*. *Folia Microbiol. (Praha)* 46, 549–554. <https://doi.org/10.1007/BF02818001>
- Domozych, D., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T., 2012. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>
- Eaton-Rye, J.J., Shand, J.A., Nicoll, W.S., 2003. pH-dependent photoautotrophic growth of specific photosystem II mutants lacking luminal extrinsic polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett.* 543, 148–153. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00432-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00432-0)

- 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. Amst. Neth.* 48, 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00042-9)
- 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*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 345–354. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00078.x>
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., Pröschold, T., 2005. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant Cell Environ.* 28, 1218–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01357.x>
- Gipps, J.F., Collier, B. a. W., 1980. Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*. *Mar. Freshw. Res.* 31, 747–755. <https://doi.org/10.1071/mf9800747>
- Goss, R., Garab, G., 2001. Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching and structural rearrangements induced by low pH in intact cells of *Chlorella fusca* (Chlorophyceae) and *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Photosynth. Res.* 67, 185. <https://doi.org/10.1023/A:1010681511105>
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E., 1990. TRIGLYCERIDE ACCUMULATION AND FATTY ACID PROFILE CHANGES IN CHLORELLA (CHLOROPHYTA) DURING HIGH pH-INDUCED CELL CYCLE INHIBITION1. *J. Phycol.* 26, 72–79. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x>
- 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, 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.021>
- Hansen, P.J., 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquat Microb. Ecol* 28, 279–288.
- Ihnken, S., Beardall, J., Kromkamp, J., Gómez Serrano, C., Torres, M., Masojídek, J., Malpartida, I., Abdala, R., Jerez, C., Malapascua, J., Navarro, E., Rico, R., Peralta, E., Ezequiel, J., Figueroa, F., 2014. Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture. *Aquat. Biol.* 22, 95–110. <https://doi.org/10.3354/ab00586>
- Jeffrey, M., 2014. Srivastava, A. K., Rai, A. N. & Neilan, B. A. [Eds.] 2013. *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. CRC Press, Boca Raton, FL, 375 pp., \$159.95. *J. Phycol.* 50, 770–770. <https://doi.org/10.1111/jpy.12201>
- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 6, 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Knicker, H., Hatcher, P.G., 2001. Sequestration of organic nitrogen in the sapropel from Mangrove Lake, Bermuda. *Org. Geochem.* 32, 733–744. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00005-5)
- Kurian, D., Phadwal, K., Mäenpää, P., 2006. Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PROTEOMICS* 6, 3614–3624. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600033>
- Langmuir, D., Chrostowski, P., Vigneault, B., Chaney, R., 2005. Issue paper on the environmental chemistry of metals.

- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Boullemant, A., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2012. The influence of pH on algal cell membrane permeability and its implications for the uptake of lipophilic metal complexes (1). *J. Phycol.* 48, 293–302. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01126.x>
- Liu, B.-H., Lee, Y.-K., 2000. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 12, 301–307. <https://doi.org/10.1023/A:1008185212724>
- Liu, J., Zhu, Y., Tao, Y., Zhang, Y., Li, A., Li, T., Sang, M., Zhang, C., 2013. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnol. Biofuels* 6, 98. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-98>
- López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., Flores-Moya, A., 2008. Microalgal adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environ. Exp. Bot.* 64, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.001>
- Lundholm, N., Hansen, P., Kotaki, Y., 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 273, 1–15. <https://doi.org/10.3354/meps273001>
- Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454–458. <https://doi.org/10.1007/BF00214835>
- Macfie, S.M., Welbourn, P.M., 2000. The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 413–419. <https://doi.org/10.1007/s002440010122>
- Masindi, V., Muedi, K.L., 2018. Environmental Contamination by Heavy Metals. *Heavy Met.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 113–152. <https://doi.org/10.1080/07388550500248571>
- Moheimani, N.R., 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 25, 387–398. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9873-6>
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., 2012. Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* 28, 299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., Krulwich, T.A., 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta* 1717, 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
- Pereira, M., Carmen Bartolomé, M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.020>
- Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), 2001. *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59491-5>
- Ren, H.-Y., Liu, B.-F., Ma, C., Zhao, L., Ren, N.-Q., 2013. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnol. Biofuels* 6, 143. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-143>

- Rodrigues, M.A., Bon, E.P. da S., 2011. Evaluation of *Chlorella* (Chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars via Cell Wall Enzymatic Hydrolysis. *Enzyme Res.* 5. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/405603>
- Sakarika, M., Kornaros, M., 2016. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresour. Technol.* 219, 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.033>
- Schiewer, S., Wong, M.H., 2000. Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae. *Chemosphere* 41, 271–282. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00421-X)
- Starý, J., Kratzer, K., 1982. The Cumulation of Toxic Metals on Alga. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 12, 65–71. <https://doi.org/10.1080/03067318208071571>
- Summerfield, T.C., Crawford, T.S., Young, R.D., Chua, J.P.S., Macdonald, R.L., Sherman, L.A., Eaton-Rye, J.J., 2013. Environmental pH Affects Photoautotrophic Growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Strains Carrying Mutations in the Lumenal Proteins of PSII. *Plant Cell Physiol.* 54, 859–874. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct036>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., Shin, K.-H., 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Tan, X.-B., Zhang, Y.-L., Yang, L.-B., Chu, H.-Q., Guo, J., 2016. Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia. *Bioresour. Technol.* 200, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.095>
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., Yamamoto, Y., 1996. Fatty Acid and Lipid Composition of the Acidophilic Green Alga *Chlamydomonas* Sp.1. *J. Phycol.* 32, 598–601. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00598.x>
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Benavides, A.M.S., Torzillo, G., 2016. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1333–1341. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7024-0>
- Vadlamani, A., Viamajala, S., Pendyala, B., Varanasi, S., 2017. Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 7284–7294. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01534>
- Vierling, E., 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>
- Visviki, I., Palladino, J., 2001. Growth and Cytology of *Chlamydomonas acidophila* Under Acidic Stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 623–630. <https://doi.org/10.1007/s001280054>
- Visviki, I., Santikul, D., 2000. The pH Tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 147–151. <https://doi.org/10.1007/s002449910018>
- Wang, G., Doyle, M.P., 1998. Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 31–34. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1998.00264.x>
- Weisse, T., Stadler, P., 2006. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1708–1715. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.4.1708>
- Ying, K., Gilmour, J.D., Zimmerman, 2014. Effects of CO₂ and pH on Growth of the Microalga *Dunaliella salina*. *J. Microb. Biochem. Technol.* 06. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138>

- 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. <https://doi.org/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, 2892–2902. <https://doi.org/10.1021/pr900024w>



SECCIÓN IV

INTERACCIÓN METÁLICA EN LA CEPA Cd-resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides*



CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	159
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	159
ÍNDICE DE FIGURAS	159
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	160
MARCO TEÓRICO	161
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA AL Cd EN MICROALGAS	161
EXPRESIÓN DE LAS METALOTIONEÍNAS (Mt(III)).....	163
TRANSPORTADORES LIGADOS A LA RESISTENCIA DEL Cd EN MICROALGAS	165
MECANISMOS MOLECULARES COMPLEMENTARIOS LIGADOS A LA RESISTENCIA	168
MECANISMOS DE FORMA INDIVIDUAL DE METALES ESENCIALES	171
Cobre.....	173
Hierro.....	174
Zinc.....	176
Níquel	176
Cromo.....	177
Cobalto.....	178
Mercurio.....	179
Plata	181
MECANISMOS DE RESISTENCIA CRUZADA E INTERACCIÓN METÁLICA CON Cd	182
MATERIAL Y MÉTODOS	185
MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR	185
INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LOS COMPUESTOS METÁLICOS DE FORMA INDIVIDUAL	185
INTERACCIÓN METÁLICA Y RESISTENCIA CRUZADA/MÚLTIPLE DEL Cd CON EN Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$	187
ANÁLISIS DE DATOS	188
RESULTADOS	189
INTERACCIÓN CON METALES DE CARÁCTER ESENCIAL	189
RESPUESTA DE FORMA INDIVIDUAL EN INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{wt}$	189
INTERACCIÓN METÁLICA EN MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{wt}$	191
INTERACCIÓN CON METALES DE CARÁCTER TÓXICO	200
RESPUESTA DE FORMA INDIVIDUAL EN INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO POBLACIONAL EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{wt}$	200
INTERACCIÓN METÁLICA EN MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{wt}$	202
CONCLUSIONES.....	220
DISCUSIÓN	211
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	221

Índice de Tablas

TABLA 4.1. ALGUNOS GENES IMPLICADOS EN LA ACUMULACIÓN Y RESISTENCIA A METALES. TOMADO GUPTA & SANDALIO, 2012.	163
TABLA 4.1.1. COMPUESTOS METÁLICOS SELECCIONADOS PARA LA INTERACCIÓN METÁLICA CON EL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	186
TABLA 4.3.1. VALORES DE LAS $CI_{50(72)}$ Y 72H-NOEC EN $MG L^{-1}$ DE LAS SALES METÁLICAS TOMANDO EL Cd COMO CONTROL EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	190
TABLA 4.3.2. INTERACCIÓN METÁLICA EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{WT}$ Y VALORES DE LA $CI_{50(72)}$ Y 72H-NOEC CORRESPONDIENTES A LAS MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd.....	192
TABLA 4.3.3. $CI_{50(72)}$ Y 72H-NOEC DE LOS METALES TÓXICOS DE FORMA INDIVIDUAL CON RESPECTO AL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	201
TABLA 4.3.4. INTERACCIÓN METÁLICA EN Dc^{RCd100} Y $Dc1M^{WT}$ Y VALORES DE LA $CI_{50(72)}$ Y 72H-NOEC CORRESPONDIENTES A LAS MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd.....	204

Índice de Gráficos

GRÁFICO 4.3.1. PRINCIPIO DE EFECTO MEDIO (PEM) DE LAS MEZCLAS BINARIAS METÁLICAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$. SE PRESENTAN LOS VALORES DE LAS $CI_{50(72)}$ DE CADA COMBINACIÓN BINARIA.....	194
GRÁFICO 4.3.2. PRINCIPIO DE EFECTO MEDIO (PEM) DE LAS MEZCLAS BINARIAS METÁLICAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$. SE PRESENTAN LOS VALORES DE LAS $CI_{50(72)}$ DE CADA COMBINACIÓN BINARIA.	195
GRÁFICO 4.3.3. RELACIÓN FRACCIÓN AFECTADA (FA) - ÍNDICE DE COMBINACIÓN (IC) CON RESPECTO A LOS LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES (LMP EN $MG L^{-1}$) DE METALES EN AGUAS RESIDUALES DE LA NOM-001-ECOL-1996 DE LAS MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} (EN AZUL) VS. $Dc1M^{WT}$ (EN NEGRO).	196
GRÁFICO 4.3.4. RELACIÓN FRACCIÓN AFECTADA (FA) - ÍNDICE DE COMBINACIÓN (IC) CON RESPECTO A LOS LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES (LMP EN $MG L^{-1}$) DE METALES EN AGUAS RESIDUALES DE LA NOM-001-ECOL-1996 DE LAS MEZCLAS BINARIAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} (EN AZUL) VS. $Dc1M^{WT}$ (EN NEGRO).	197
GRÁFICO 4.3.5. POLIGONOGRAMAS DE RESPUESTA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO AL 0, 10, 25, 50, 75, 95 Y 100% A LAS MEZCLAS BINARIAS METÁLICAS CON EL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	199
GRÁFICO 4.3.6. PRINCIPIO DE EFECTO MEDIO (PEM) DE LA INTERACCIÓN BINARIA CON EL $CdSO_4$ EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	206
GRÁFICO 4.3.7. CURVAS DE ÍNDICE DE COMBINACIÓN (IC)-FRACCIÓN AFECTADA (FA) EN INTERACCIÓN CON $CdSO_4$ EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	207
GRÁFICO 4.3.8. POLIGONOGRAMAS DE RESPUESTA DE LA INTERACCIÓN METÁLICA CON EL Cd EN Dc^{RCd100} VS. $Dc1M^{WT}$	210

Índice de Figuras

FIGURA 4.1. DIVERSOS MECANISMOS EN LA TRANSLOCACIÓN Y CAPTACIÓN DE CATIONES METÁLICOS EN MICROALGAS. MEL: COMPLEJO METÁLICO EN SOLUCIÓN; Me^{N+} : ION METÁLICO LIBRE; X: LIGANDO BIÓTICO EXTRACELULAR; E: ÁCIDO GLUTÁMICO; C: CISTEÍNA; G: GLICINA; GS: GLUTATIÓN SINTETASA; γEC : GAMMA GLUTAMILCISTEÍNA; γECG : GLUTATIÓN; $\gamma [EC]_2G$: METALOTIONEÍNA N=2; LMW: COMPLEJOS DE BAJO PESO MOLECULAR; HMW: COMPLEJOS DE ALTO PESO MOLECULAR; PCS: FITOQUELATINA SINTASA; PC: FITOQUELATINAS O MET(III); γECS : GAMMA GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA. AA: AMINOÁCIDOS; OA: ÁCIDOS ORGÁNICOS; SA: ADSORCIÓN SUPERFICIAL; P: PRECIPITACIÓN; IE: INTERCAMBIO IÓNICO; CC: FORMACIÓN DE COMPLEJOS Y QUELACIÓN; PD: DIFUSIÓN PASIVA. TOMADO DE SURESH KUMAR ET AL., 2015.	161
FIGURA 4.2. FAMILIA DE TRANSPORTADORES EN MICROALGAS EUCARIOTAS. EL GRUPO A CORRESPONDE AL TRANSPORTE DE IONES METÁLICOS TRANSMEMBRANALES AL CITOPLASMA O VACUOLAS. GRUPO B AL	

TRANSPORTE DE M^+ AL EXTERIOR DE LA CÉLULA Y/O EN MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS (BLABY-HAAS & MERCHANT, 2012).	166
FIGURA 4.3. TRANSPORTADORES UTILIZADOS POR EL Cd EN CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS (NIES, 1999).	167
FIGURA 4.4. TRANSPORTADORES DE LA FAMILIA ABC LIGADOS AL TRANSPORTE Y RESISTENCIA DEL Cd Y OTROS METALES Y METALOIDES TÓXICOS (Pb, As, Fe, Al) TANTO EN PLANTAS COMO EN MICROALGAS (SONG ET AL., 2014).	168
FIGURA 4.5. EL TRANSPORTE DE M^+ EN CLOROFÍCEAS (GÉNERO CHLAMYDOMONAS) (BLABY-HAAS & MERCHANT, 2012).	168
FIGURA 4.6. INDUCCIÓN DE MET(III) Y DE PROLINA COMO RESPUESTA AL Cd^{2+} EN 2 CEPAS DE <i>C. REINHARDTII</i> . A) CEPA TIPO SALVAJE (WT) EL Cd INDUCE ROS QUE OXIDAN AL GSH A GSSG CON REDUCCIÓN EN LA SÍNTESIS DE PCs. B) CEPA TRANSGÉNICA CON INCREMENTO EN GSH Y LA SÍNTESIS DE PROLINA. TOMADO DE SIRIPORNADULSIL ET AL., 2002.	170
FIGURA 4.7. PROCESOS ABIÓTICOS (QUÍMICOS) QUE CONTROLAN LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS METALES (M^+) EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS. ENTRE LOS CONSTITUYENTES QUE INTERACTÚAN SE INCLUYEN A LA CONCENTRACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (DOC), PRESENCIA DE CATIONES METÁLICOS (Ca^{2+} , Mg^{2+}), ALCALINIDAD (HCO_3^- , OH^-), pH (H^+), MATERIA ORGÁNICA, SEDIMENTOS, pH, ENTRE OTROS. TOMADO DE DOMINGOS ET AL., 2015.	172
FIGURA 4.8. ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR IONES METÁLICOS Y LA ACTIVACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN MICROALGAS. TOMADO DE PINTO ET AL., 2003.	173
FIGURA 4.9. CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DEL Fe. LA REDUCCIÓN DEL Fe^{3+} AL Fe^{2+} POR FERRIREDUCTASAS (FRE) DE LA PARED CELULAR Y EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE SIDERÓFOROS Y DE TRANSPORTADORES COMO IRT-ZIP Y NRAMP EN MICROALGAS. TOMADO DE SUTAK ET AL., 2012.	175
FIGURA 4.10. HIDRÓLISIS DEL Cr^{3+} . TOMADO DE VIGNATI ET AL., 2010.	178
FIGURA 4.11. INTERACCIONES DEL Hg ORGÁNICO E INORGÁNICO EN MICROALGAS. TOMADO DE FAUCHEUR ET AL., 2014.	179
FIGURA 4.12. BIOSÍNTESIS DE METALOTIONEÍNAS DE CLASE III EN <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> EXPUESTA A $HgCl_2$. TOMADO DE GÓMEZ-JACINTO ET AL., 2015.	180

Índice de Ecuaciones

ECUACIÓN 4.1.1. ÍNDICE DE COMBINACIÓN (CHOU & TALALAY, 1984)	187

4. MARCO TEÓRICO

4.0.1. Mecanismos moleculares de resistencia al Cd en microalgas

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, como se observa en la Figura 4.1.

En la década de los 90's ya se tenía conocimiento acerca de mutaciones nucleares *CadA^R* y *CadB^R* que resultan para generar adaptación al Cd (expresándose a través de una menor captación del metal) en cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* Cd-resistentes (Collard & Matagne, 1990, 1994).

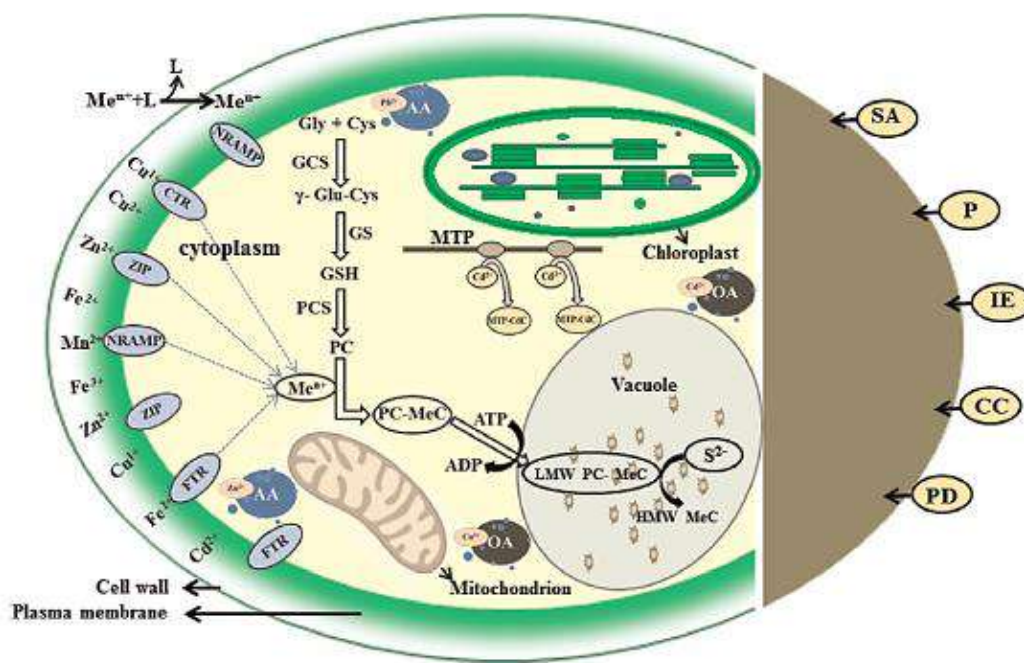


Figura 4.1. Diversos mecanismos en la translocación y captación de cationes metálicos en microalgas. MeL: complejo metálico en solución; Me^{n+} : ion metálico libre; X: Ligando biótico extracelular; E: ácido glutámico; C: cisteína; G: glicina; GS: Glutación sintetasa; γ EC: gamma glutamilcisteína; γ ECG: Glutación; γ [EC]₂G: Metalotioneína n=2; LMW: Complejos de Bajo Peso Molecular; HMW: Complejos de Alto Peso Molecular; PCS: fitoquelatina sintetasa; PC: fitoquelatinas o Met(III); γ ECS: gamma glutamilcisteína sintetasa. AA: aminoácidos; OA: ácidos orgánicos; SA: adsorción superficial; P: precipitación; IE: Intercambio iónico; CC: Formación de complejos y quelación; PD: difusión pasiva. Tomado de Suresh Kumar et al., 2015.

Acorde con Hanikenne, (2003), en *Chlamydomonas reinhardtii* el Cd induce la expresión entre 2 a 20 veces más de los genes *Crd1* con actividad sobre la biosíntesis de Chl, reconfiguración del PSI y del centro colector de luz (LHC1) de este fotosistema; el gen *CHLL* regula a la protoclorofila reductasa independiente de luz, la inducción de este gen podría estar relacionada con condiciones oxidantes resultantes de la exposición al cadmio o con la susceptibilidad de grupos tiol. El gen *CHRSAMS* codifica para una sintetasa de S-adenosilmetionina (SAM) como precursor de la cisteína, su expresión incrementa la síntesis de GSH y por lo tanto la síntesis de metalotioneínas (descrita a continuación). El gen *H43* codifica una proteína inducible con alto contenido de CO₂ localizada en el espacio periplásmico, este gen está relacionado con el gen *HCR1* inducible por CO₂ e inducible por deficiencia de hierro en ciertos géneros de microalgas como *Chlorococcum littorale*. Por lo tanto, el cadmio compite con el hierro por la absorción, lo que resulta en deficiencia de hierro y en la inducción del gen *H43*.

Por otra parte, Chia et al., (2015), demostraron que una limitación en la concentración de nitrógeno y el estrés inducido por la exposición a Cd sobre *Chlorella vulgaris*, produce un marcado descenso en el crecimiento y densidad celular de la clorofícea, no obstante, lo relevante de esta investigación es que esta combinación de estrés abiótico genera una acumulación de clorofila α , proteínas, carbohidratos y lípidos totales. Por otra parte, este mismo estudio reveló que no solo la prolina influye sobre la quelación del metal, sino que intervienen otros aminoácidos como la histidina y la glutamina (en la síntesis de metalotioneínas).

Algunos de los genes que se expresan para la metalo-resistencia en plantas, pero también en microalgas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Algunos genes implicados en la acumulación y resistencia a metales. Tomado Gupta & Sandalio, 2012.

Gene	Function	Effect on tolerance and accumulation	OAS-TL	Cysteine synthase	Cd/Ni/Se tolerance
MT	Metallothionein	Confers metal tolerance, in some cases increases metal content	ATP-PRT	Histidine synthesis	Confers Ni tolerance but not accumulation
PCS1	Phytochelatin synthase	Pb tolerance—As tolerance and accumulation—Cd/As tolerance and accumulation	PDF MTP3	Defensin Metal tolerance protein	Confers Zn tolerance Increases Zn accumulation and tolerance
ZAT	Zn transporter	Confers Zn tolerance and accumulation in roots	PDR8	ABC transporter	Confers Pb/Cd tolerance, Cd accumulation
NtCBP4	Ion transporter, Calmodulin binding protein	Confers Ni tolerance and decreased accumulation, Pb sensitivity and accumulation	ZIF1	Zinc induced facilitator	Confers Zn tolerance
NRAMP3	Plasma membrane metal transporters	Increases Cd sensitivity, no effect on Ni resistance	ZIP4	Zn transporter	Increases Zn accumulation in roots, decreases in shoots
APS	ATP sulfurylase	Confers Se tolerance and increased accumulation	CAX2, CAX4	Divalent action/proton antiporters	Confers Cd/Zn/Mn tolerance
CGS	Cystathionine gamma synthase	Increases Se tolerance and volatilisation	TSB1	Tryptophan synthase	Confers Cd tolerance without accumulation
SMT	Selenocysteine methyltransferase	Confers tolerance to Se compounds, increased Se accumulation and volatilisation	PIP1	Aquaporin	Increases Cd resistance
CpNifS	Selenocysteine lyase	Confers Se tolerance and accumulation	MRP7	ABC transporter	Confers Cd tolerance, increases concentration in leaf vacuoles
NAS	Nicotianamine synthase	Ni tolerance/Ni accumulation	ECS	Gamma-glutamylcysteine synthetase	Confers Cd tolerance and increased accumulation
SAT	Serine acetyltransferase	Ni resistance			

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.

4.0.2. Expresión de las metalotioneínas (Mt(III))

Factores ambientales como la concentración de sulfato en aguas influye directamente sobre la toxicidad del cadmio. De acuerdo con Mera et al., (2016), la biosíntesis de las metalotioneínas depende del contenido de cisteína (en la reducción del azufre). Así, a mayor concentración de sulfato es menor la respuesta tóxica del Cd en microalgas (ej. *Chlamydomonas moewusii*) debido a una mayor biosíntesis y acumulación de estas proteínas.

Es uno de los mecanismos que se han definido mejor en protistas, plantas, algas y algunos hongos sobre el proceso de detoxificación por metales tóxicos a través de la quelación de metales vía inducción del glutatión reducido (GSH) (Pantoja Munoz 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 (Y-Glu- Cys)*n*-Gly (Figura 4.1), 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 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). Los complejos de Mt(III) de acuerdo con 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 (S²⁻) 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) como se muestra en la Figura 4.1: (1) las Mt(III) se sintetizan en el citosol donde secuestran al Cd²⁺, 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).

En investigaciones recientes por Olsson et al., (2017), revelaron la expresión fuertemente inducida por Cd del gen *CaPCS2* que codifica para síntesis *de novo* de la fitoquelatina sintasa CaPCS2 en *Chlamydomonas acidophila*, hecho que indudablemente constituye uno de los mecanismos moleculares de resistencia al Cd que se gobierna en esta microalga extremófila y posiblemente en otros géneros de microalgas.

4.0.3. Transportadores ligados a la resistencia del Cd en microalgas

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 (OH^- , SH^- , COO^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , RNH_2^- , RS^- y RO^-); (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).

De igual forma, anteriormente ya se tenía conocimiento de que polisacáridos y proteínas presentes en las pared y membrana celular eran los principales responsables en el transporte de iones metálicos hacia el interior de la célula (Crist et al., 1981; Trevors et al., 1986). Además, el Cd bloquea y utiliza los canales transmembranales del calcio (Mera et al., 2016).

En plantas, levaduras y microalgas se conocen 5 familias de proteínas implicadas en el transporte activo de Cd y de otros metales (Figura 4.2) a través de la membrana al interior de la célula: (1) antitransportador de M^+/H^+ ; (2) del tipo CPx $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPasas; (3) Facilitadores de difusión de cationes (CDF) implicados en el transporte de Fe^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} (Figura 4.1, Figura 4.2 y Figura 4.3) 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”) que transportan Fe^{2+} y Mn^{2+} ; y (5) proteínas ZIP como ZRT-IRT con transporte de Zn^{2+} y Fe^{2+} (Guerinot, 2000; Williams et al., 2000). En levaduras, los transportadores Nramp, CDF y ZIP participan además en el tráfico del ion Cd^{2+} entre el citosol y la vacuola (Mendoza- Cózatl et al., 2005).

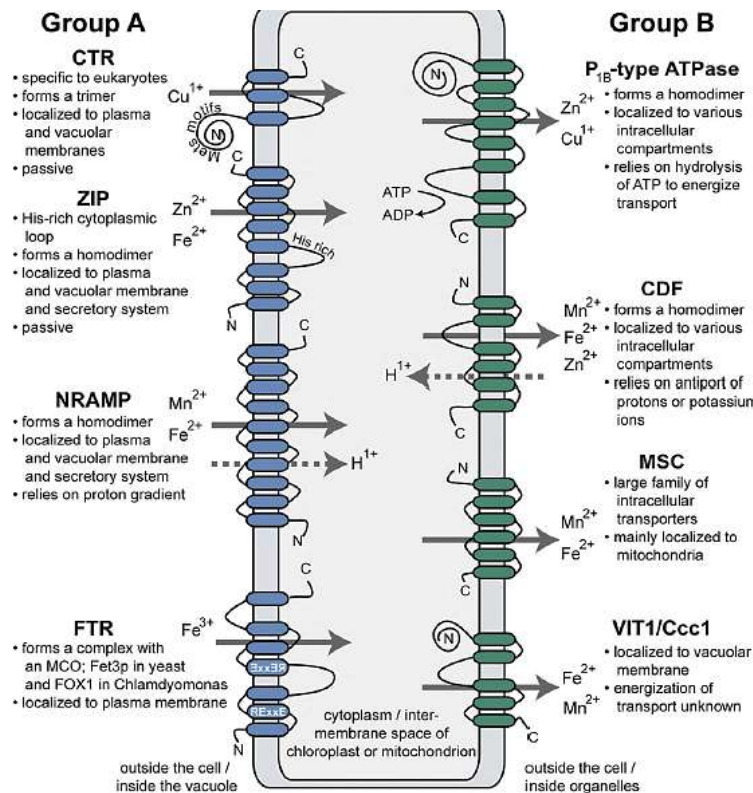


Figura 4.2. Familia de transportadores en microalgas eucariotas. El grupo **A** corresponde al transporte de iones metálicos transmembranales al citoplasma o vacuolas. Grupo **B** al transporte de M^{+} al exterior de la célula y/o en mitocondrias y cloroplastos (Blaby-Haas & Merchant, 2012).

Sin embargo, 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 como se observa en las Figura 4.4 y Figura 4.5 (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; Blaby-Haas & Merchant, 2012). Por otro lado, Page et al., (2009), identificaron a 2 transportadores con alta afinidad para Cu^{2+} y posiblemente para Cd^{2+} también sobre *Chlamydomonas reinhardtii* denominados 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 como *Euglena gracilis* y microalgas que participan en la acumulación de metales tóxicos (García-García et al., 2012).

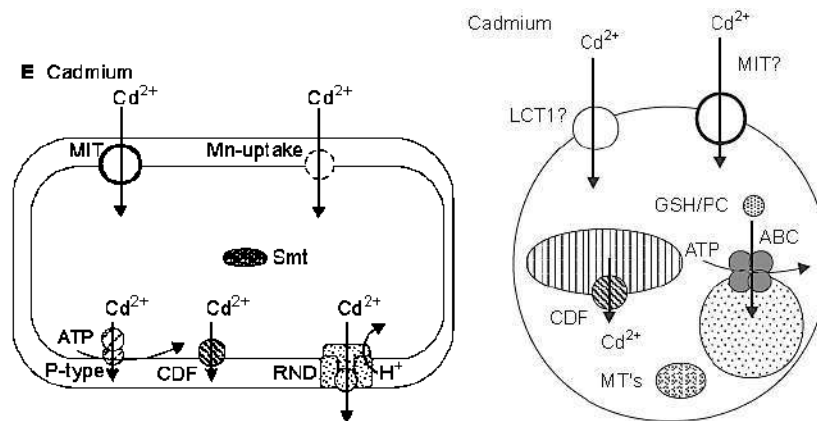


Figura 4.3. Transportadores utilizados por el Cd en cianobacterias y microalgas (Nies, 1999)

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^{2+}/Cd^{2+} de tipo ATPasa) para internalizarse en la célula vegetal y provocar su respuesta tóxica (Cailliatte et al., 2009). Entre los transportadores que utiliza el Cd destaca uno específico de calcio LCT1 de levaduras (Figura 4.3) y el antitransportador CAX (H^+/Ca^{2+}) 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^+/H^+ ubicado en el tonoplasto (Salt & Wagner, 1993).

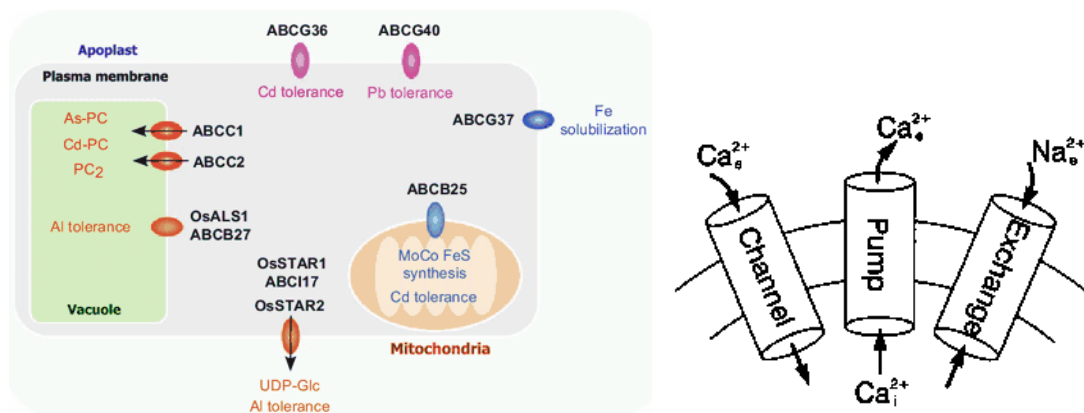


Figura 4.4. Transportadores de la familia ABC ligados al transporte y resistencia del Cd y otros metales y metaloides tóxicos (Pb, As, Fe, Al) tanto en plantas como en microalgas (Song et al., 2014).

Investigaciones realizadas por Hanikenne et al., (2005) determinaron la expresión de los genes *H43* y *Cds1* que codifican para la proteína mitocondrial CrCds1 perteneciente a la familia de los transportadores tipo ABC (Figura 4.4), inducido por el Cd en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* después de 4h de exposición a un rango de concentración de 200-400 μ M de Cd.

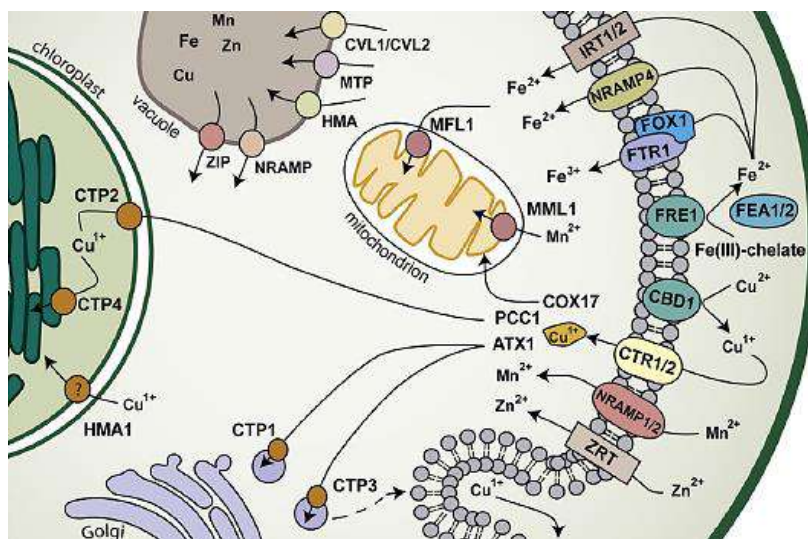


Figura 4.5. El Transporte de M^{+} en clorofíceas (género *Chlamydomonas*) (Blaby-Haas & Merchant, 2012)

4.0.4. Mecanismos moleculares complementarios ligados a la resistencia

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^{6+} , Cd^{2+} y Cu^{2+}) (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 273 nM comparada con el valor mostrado en *P. subcapitata* de 127 nM. 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 (fitoquelatinas) con oligómeros más largos y con mayor número de grupos tiol, demostrando así las diferencias en estrategias de detoxificación del Cd y otros metales en varios géneros de microalgas de agua dulce. En otros estudios utilizando rayos X, se ha documentado la presencia de gránulos compuestos por cadenas lineales de polifosfatos (poli-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 detoxificación 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^{6+} , 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^{2+}), mientras que cuando esta misma microalga fue expuesta al Cd^{2+} 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 al 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 confirmado en una cepa transgénica de *Chlamydomonas reinhardtii*, la expresión del gen de la enzima D1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa genera una producción de niveles elevados por encima del 80% de prolina (Pro), lo que resulta en una mayor capacidad de crecimiento a concentraciones altas de 100 μM de Cd^{2+} específicamente, lo que representa mayor resistencia en el orden de 4 veces mayor comparada con la del tipo salvaje (Mehta & Gaur, 1999; Siripornadulsil, 2002; Sharma & Dietz, 2006; Jamers et al., 2013). Se ha revelado que una mayor síntesis de Pro por estrés al Cd regula la acidosis metabólica manteniendo un equilibrio entre la tasa de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, y un equilibrio entre las tasas de reducción que activan la fosforilación oxidativa mitocondrial y la generación de ATP (Siripornadulsil et al., 2002).

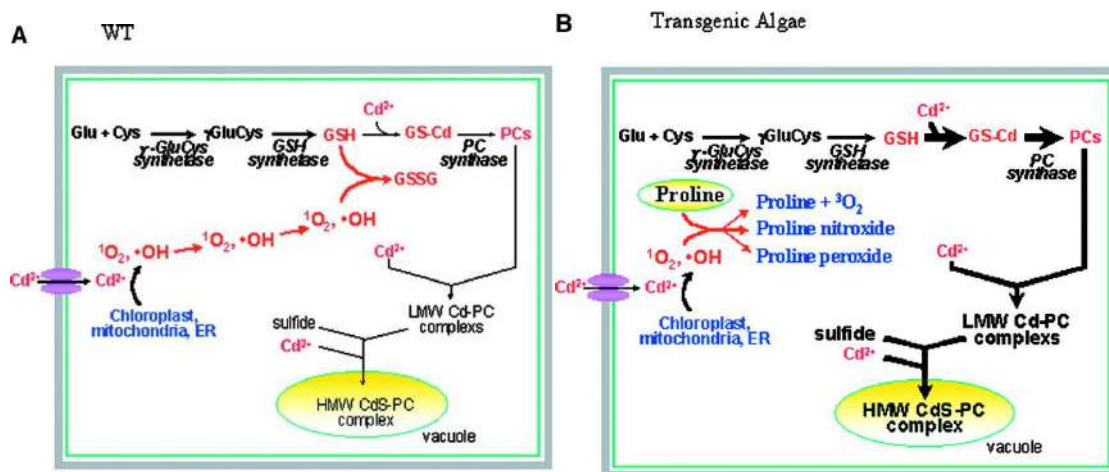


Figura 4.6. Inducción de Met(III) y de prolina como respuesta al Cd^{2+} en 2 cepas de *C. reinhardtii*. A) Cepa tipo salvaje (WT) el Cd induce ROS que oxidan al GSH a GSSG con reducción en la síntesis de PCs. B) Cepa transgénica con incremento en GSH y la síntesis de prolina. Tomado de Siripornadulsil et al., 2002.

Por otra parte, recientemente se ha informado de la inducción de transcripciones que codifican un inductor del factor de la apoptosis, la proteína NSG6 (con función en la gametogénesis e inducida por inanición de nitrógeno), la proteína NifU-5 mitocondrial (actividad sobre la unión y formación

de complejos Fe-S) en *Chlamydomonas acidophila* (Puente-Sánchez et al., 2018). Asimismo, otro de los mecanismos que ha llamado la atención y que se ha revelado por primera vez en microalgas verdes (eucariotas), es la expresión de transposones y de la transferencia horizontal de genes que codifican para la síntesis *de novo* de fitoquelatinas sintasas (comentado anteriormente, en específico de los genes *CaPCS2* en *Chlamydomonas acidophila* y *DaPCS1* en *Dunaliella acidophila*) especies de microalgas eucariotas extremófilas aisladas de un ambiente acuático de pH ácido y presencia de altas concentraciones de metales (Fe, Cd, Cu) a partir de la clonación y de la expresión de los genes en *Escherichia coli* (Olsson et al., 2017; Puente-Sánchez et al., 2018).

Puente-Sánchez et al., (2018) también identificaron varios genes que se expresan durante la exposición y tolerancia al Cd en *C. acidophila* y que normalmente en la cepa control que utilizan como *C. reinhardtii* no se expresan. Entre las transcripciones se incluyen para la proteína MTM1 una metalochaperona o transportador del ion Mn^{2+} como cofactor esencial de la SOD2 (superóxido dismutasa en mitocondrias); la proteína ACR3 que induce resistencia al As, pero además en la tolerancia al Cd, el transportador AcrB como bomba eflujo que expulsa As y Sb, y la proteína CobW con actividad sobre la biosíntesis de cobalamina (complejo vitamínico B₁₂) utilizando al Co como cofactor. De igual forma, detectaron bajos niveles de los aminoácidos Glu y Asp, al contrario de Cys (para la biosíntesis de Met(III)) y Ser con altos niveles en *C. acidophila* con tolerancia a ambientes ácidos, esto posiblemente a que los aminoácidos Glu y Asp presentan carga negativa en ambientes neutros, no obstante, cuando ocurre el cambio a pH ácidos disminuyen la capacidad de estabilizar proteínas a través de puentes salinos.

Por otro lado, se ha descubierto la síntesis de fitohormonas como la espermidina, giberelina, citocininas, zeatina, ácido indolacético, ácido abscísico en microalgas (ej. *Chlorella vulgaris*) como un mecanismo modulador en la resistencia a metales (Cd, Pb, Cu) (Bajguz, 2011; Lu & Xu, 2015).

4.0.5. Mecanismos de forma individual de metales esenciales

El fitoplancton y los metales han co-evolucionado conjuntamente en el ambiente acuático, así los organismos fitoplanctónicos se han adaptado a los oligoelementos disponibles alterando la química de los metales en las aguas superficiales, mientras que éstos modulan los flujos de macronutrientes mediante la co-regulación del crecimiento del fitoplancton, dependiente además de factores

abióticos que intervienen en la biodisponibilidad del metal (pH, materia orgánica en suspensión, sedimentos, temperatura, Carbono Orgánico Disuelto, etc.) (Moore et al., 2013; Echeveste et al., 2018) como se observa en la Figura 4.7.

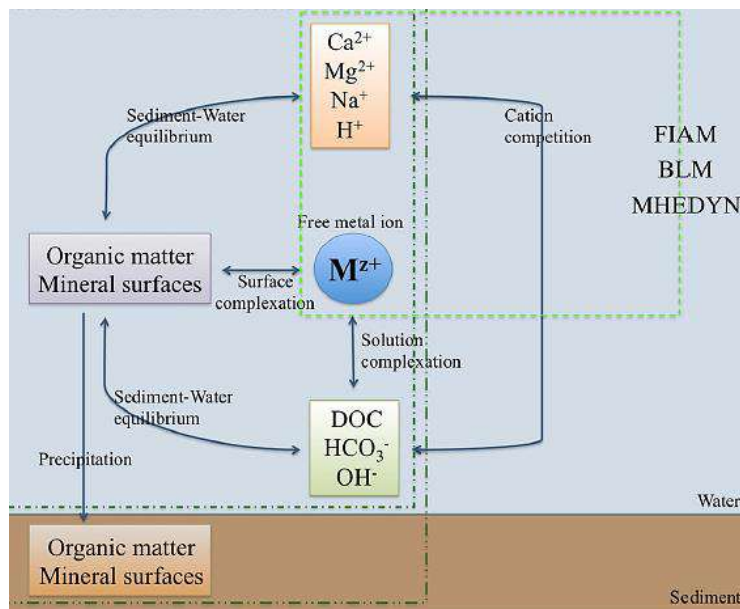


Figura 4.7. Procesos abióticos (químicos) que controlan la biodisponibilidad de los metales (M^+) en los ecosistemas acuáticos. Entre los constituyentes que interactúan se incluyen a la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (DOC), presencia de cationes metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+}), alcalinidad (HCO_3^- , OH^-), pH (H^+), materia orgánica, sedimentos, pH, entre otros. Tomado de Domingos et al., 2015.

Los metales pueden ser clasificados en tres tipos, dependiendo de su reactividad con los grupos funcionales de biomoléculas: metales de clase A (Al^{3+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , La^{3+}) los cuales muestran mayor reactividad con el oxígeno ($O > N > S$); metales de la clase B (Cu^+ , Hg^{2+} , Ag^+) que prefieren el azufre ($S > N > O$); y metales de la clase C (Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}) que tienen una afinidad intermedia (Mendoza-Cózatl et al., 2005).

En este sentido, los metales esenciales (Cu, Zn, Fe, Ni, Mg, Ca, Mn, Co) presentan respuestas biológicas benéficas como cofactores enzimáticos y constituyen parte de componentes clave moleculares en el crecimiento y el proceso fotosintético del fitoplancton (ej. SOD, citocromo *c* oxidasa, DNA polimerasa, RuBisCO, ferredoxina reductasa, clorofila, feofitina, anhidrasa carbónica, complejo vitamínico B_{12} , entre otras) (Sunda, 2012; Miazek et al., 2015). Sin embargo, la presencia de elevadas concentraciones de estos metales presentan respuestas tóxicas resultando en inhibición de crecimiento celular, estrés oxidativo por generación de ROS y peroxidación

lipídica, inhibición del proceso fotosintético por alteración en el transporte de electrones, alteraciones sobre la división celular, inactivación de enzimas clave (ej. RuBisCO), alteraciones sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos, modificaciones en la estructura de cloroplastos, pared celular, etc. (Echeveste et al., 2017, 2018).

4.0.5.1. Cobre

Metal esencial como cofactor en metalotioneínas, en el transporte de electrones en la fotosíntesis durante las reacciones de óxido-reducción (plastocianina), y en sistemas antioxidantes presente en el citocromo *c* oxidasa, Cu-SOD (Pluciński et al., 2018). No obstante, este metal es tóxico a elevadas concentraciones y su toxicidad depende de la concentración del metal y en especial en la formación de las especies más tóxicas que es el $\text{Cu}(\text{OH})_2$ y el Cu^{2+} (Le Jeune, et al., 2006; Lee, et al., 2010; Mai, et al., 2012). De igual forma, altera la absorción de sodio por competencia iónica impidiendo el mantenimiento de la homeostasis osmótica, reflejando en la liberación por difusión de Na^+ hacia el medio extracelular (Grosell, et al., 2002). Conjuntamente, inhibe la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa y la anhidrasa carbónica por competencia con la unión del Mg^{2+} y otros cationes bloqueando la osmoregulación (Bianchini, et al., 2004; Martins, et al., 2011). Como metal de transición, la toxicidad del cobre está directamente relacionada con la generación de estrés oxidativo a través de la formación de ROS por reacciones tipo Fenton y ciclo de Haber-Weiss con estrés oxidativo (Figura 4.8) y escisión de la hélice del ADN (Pinto et al., 2003; Lesser, 2006; Pluciński et al., 2018).

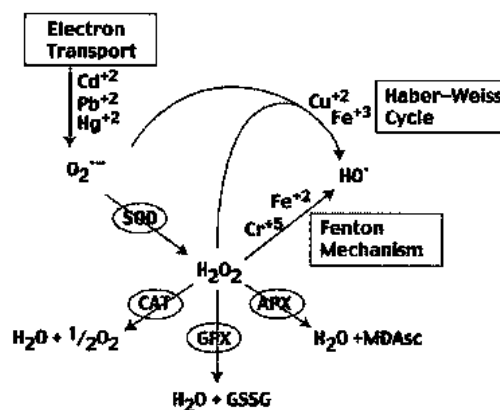


Figura 4.8. Estrés oxidativo generado por iones metálicos y la activación de sistemas antioxidantes en microalgas. Tomado de Pinto et al., 2003.

El cobre presenta alteraciones sobre la fotosíntesis a través de su unión a grupos sulfhidrilo de las proteínas dando lugar a la desnaturalización (Tripathi, et al., 2006). De esta manera, el Cu^{2+} inhibe la actividad del Fotosistema II (PSII) al interactuar con el aceptor primario de electrones Feofitina- QA-Fe^{2+} y en el residuo redox Tyr161 de la proteína D1 del PSII, ocasionando alteraciones sobre el flujo de electrones en la cadena transportadora, y el cual incrementa su toxicidad a intensidades lumínicas altas (Pätsikkä et al., 2001; Knauert & Knauer, 2008; Pluciński et al., 2018). También interviene en la fijación de CO_2 durante la fase oscura de la fotosíntesis, altera la absorción de nitrato y en la síntesis de la enzima nitrato reductasa, en la reducción de ATP, así como cambios morfológicos y en el volumen celular (García-Villada, et al., 2004). A elevadas concentraciones de $50 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} altera la división celular y la duplicación del ADN a través de la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) en ciertas especies de microalgas eucariotas (ej. *Chlamydomonas reinhardtii*) (Luis et al., 2006). Estos mismos autores indicaron que esta inhibición de la CDK y de la mayor expresión de los genes que codifican para la Fe-SOD, CAT (catalasa), VET3 (metiltransferasa- en la biosíntesis de la plastoquinona), el gen *psbA* que codifica para la proteína D1 del PSII, son biomarcadores para determinar la resistencia al Cu, pero además a otros metales como el Cd.

4.0.5.2. Hierro

Al igual que el cobre, el hierro es un metal esencial presente en metaloenzimas (ferredoxina reductasa, Fe-nitrato reductasa), aceptores y pigmentos fotosintéticos (feofitina, ferredoxina) claves que intervienen en el proceso fotosintético de las microalgas. Las formas del hierro como el ion ferroso (Fe^{2+}) se presentan en ambientes acuáticos con pH ácidos, mientras que la forma oxidada del hierro (Fe^{3+}) se muestra en ambientes acuáticos neutros a alcalinos y por lo general es la forma inocua del metal (Randall et al., 1999). Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de Fe puede conducir a cambios en la dinámica de la población, con consecuencias graves para la comunidad fitoplanctónica y otros eslabones de la cadena alimenticia (Sotero-Santos, et al., 2007). A pH neutro, el Fe precipita como óxido de hierro obstruyendo los espacios intersticiales del hábitat bentónico y reduciendo la captación de luz disponible para llevar a cabo la fotosíntesis (Cadmus et al., 2018).

La captación del Fe se da en dos estrategias: 1) reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} , es decir, los complejos férricos extracelulares se disocian por reducción a través de la transferencia de electrones de la membrana por flavo-hemoproteínas o ferrireductasas (Fre) (Figura 4.9), así dentro de la célula el Fe^{2+} se transporta mediante un sistema permeasa de alta afinidad acoplada a una oxidasa dependiente de Cu (Ftr1); 2) transporte activo después de la reducción a Fe^{2+} mediante sideróforos (transportadores de Fe con átomos donadores de electrones como O, N o S) y de los cuales tienen capacidad para quelar otros metales como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{6+} en varios géneros de microalgas como *Phaeodactylum*, *Thalassiosira*, *Ostreococcus*, *Micromonas* y *Emiliania*; y de la activación transportadores como IRT-ZIP, Nramp (mencionados anteriormente) y de Fet3, Fetrl1 para el transporte y resistencia al Fe (Philpott, 2006; Sutak et al., 2012).

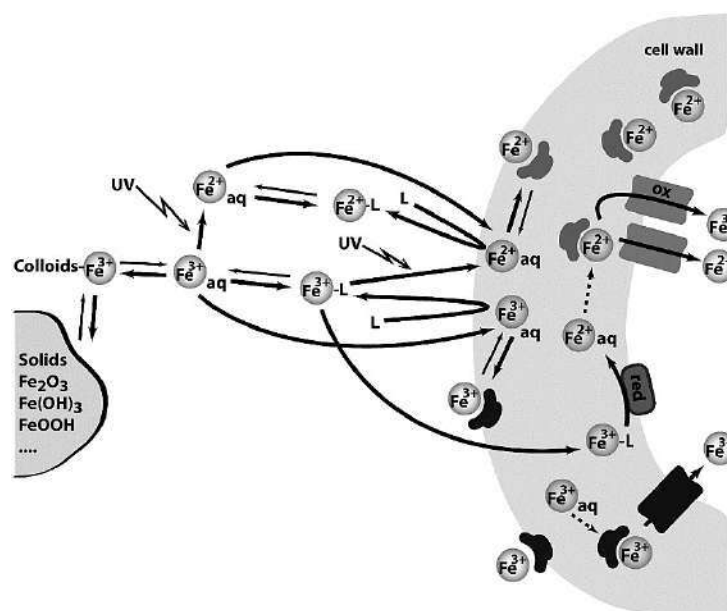


Figura 4.9. Captación y transporte del Fe. La reducción del Fe^{3+} al Fe^{2+} por ferrireductasas (Fre) de la pared celular y el transporte a través de sideróforos y de transportadores como IRT-ZIP y Nramp en microalgas. Tomado de Sutak et al., 2012.

Aún que presente baja toxicidad aguda, al igual que el cobre, el Fe a bajos pH presenta la capacidad de provocar peroxidación lipídica principalmente por radicales hidroxilo, en presencia de H_2O_2 puede producir $\text{HO}^\bullet$ a través de las reacciones tipo Fenton y del ciclo de Haber-Weiss (Figura 4.8), induciendo alteraciones sobre la membrana celular y de estrés oxidativo sobre el DNA por la generación de ROS (Valavanidis, et al., 2006). Posteriormente, estudios realizados por Rizwan et al., (2017), encontraron que la variación de concentración de diferentes sales de hierro (férricas y

ferrosas) en el medio cultivo F-2 de microalgas de ambiente salinos (ej. *Dunaliella tertiolecta*), incrementan la tasa de crecimiento de la microalga después de 4 días de exposición, aumento en la síntesis de lípidos y carbohidratos. En otras investigaciones, la respuesta del ion Fe^{2+} se centra en el incremento de pigmentos accesorios como β -caroteno, zeaxantina y luteína como mecanismos que se inducen a estrés y como posible proceso para la posterior tolerancia al Fe en la clorofícea acidotolerante *Coccomyxa onubensis* y en *Dunaliella salina* (Mojaat et al., 2008; Garbayo et al., 2012).

4.0.5.3. Zinc

Este metal forma parte de metaloenzimas como la ADN y ARN polimerasa, participa en la fijación de CO_2 formando parte de la anhidrasa carbónica (Zn-AC como α y β -AC en *Chlamydomonas reinhardtii*), y en la captación de fósforo en la Zn-fosfatasa alcalina (Moroney et al., 2001; Miazek et al., 2015). Este metal altera el lado oxidante del PSII al inhibir de forma no competitiva al Ca^{2+} y Mn^{2+} en el sitio catalítico del H_2O (oxidasa dependiente de Mn^{2+}) (Rashid et al., 1994). También se ha informado que el Zn reduce el contenido de clorofila *a* en diatomeas y otros géneros de microalgas (*Dunaliella*) debido a la inhibición de la protoclorofila reductasa (Miao et al., 2005). Además, participa en la reducción de la síntesis de ATP por la inhibición de la ATPasa al competir con el Ca^{2+} para unirse a los canales de calcio (Omar, 2002).

Otro de los mecanismos que se inducen por el Zn, es la formación de vacuolas y plastoglóbulos que participan en la quelación del metal y así como gránulos electro densos en la superficie celular de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Stigeoclonium tenue*) inhibiendo la entrada del Zn al interior de la célula (Pawlik-Skowrońska, 2003). Al igual que el Cd, el Zn incrementa la expresión de proteínas de choque térmico en específico la isoforma Hsp70 y la síntesis de metalotioneínas de clase III debido a las características fisicoquímicas similares que comparten ambos metales y se genere una competencia entre ambos cationes metálicos (Wong et al., 2010).

4.0.5.4. Níquel

Las microalgas como diatomeas necesitan de la captación y asimilación de nitrógeno orgánico a través de la urea. El níquel es cofactor enzimático de la enzima ureasa y de la ATP-amidolasa (en

clorofíceas específicamente) en la asimilación de nitrógeno orgánico. De igual forma, este metal incrementa la tasa de crecimiento en diatomeas a concentraciones nanomolares (Oliveira & Antia, 1984; Price & Morel, 1991). Además, induce un mayor contenido en Arg y Cys en *Scenedesmus obliquus* (Osman et al., 2004).

Un incremento en los niveles de níquel induce una mayor expresión y actividad de enzimas antioxidantes CAT, APX (ascorbato-peroxidasa), POD (peroxidasa) pero una disminución en la actividad de la SOD y la acumulación de prolina (como mecanismo osmoprotector de igual forma que con el Cd) al producirse estrés oxidativo por ROS como H_2O_2 (Gajewska & Skłodowska, 2008). Por otra parte, el Ni incrementa el ratio del glutatión reducido a oxidado (GSH a GSSG) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en cepas sensibles al Ni, no obstante, en cepas Ni y Cu resistentes de *Scenedesmus acutus* se incrementa la tasa de GSH y CAT (Randhawa et al., 2001). También, este metal reduce el contenido de clorofila, inactivación de la anhidrasa carbónica e incremento en la síntesis de la fitohormona giberelina para hacer frente al estrés oxidativo que genera el Ni (Siddiqui et al., 2011).

4.0.5.5. Cromo

El cromo trivalente (Cr^{3+}) es la forma estable e “inocua” de este metal, su respuesta biológica es en la captación y metabolismo de la glucosa en organismos superiores. Sin embargo, en microalgas su rol biológico aún es desconocido, no obstante, su captación en clorofíceas (ej. *Chlorella*) se da por mayor afinidad a los grupos carboxilo y amino de la pared celular (Han et al., 2006). Sin embargo, puede fácilmente ser oxidado a la forma de Cr^{6+} el cual es la forma más tóxica de este metal por el MnO_2 (Han et al., 2006). Se trata de un oxidante de acción rápida, puede oxidar compuestos orgánicos a través de varias vías de reacción incluyendo el intercambio de electrones, la abstracción de hidrógeno o donación directa de oxígeno a través de las reacciones tipo Fenton (Rodríguez, et al., 2007). A pesar de lo anterior, la toxicidad del Cr^{3+} se encuentra subestimada, ya que depende de la dureza y la carga de materia orgánica disuelta en el agua. El Cr^{3+} presenta menor solubilidad en el agua y al hidrolizarse forma complejos polinucleares, formación de coloides para dar como resultado la precipitación de hidróxidos de cromo (Figura 4.10) (Vignati et al., 2010).

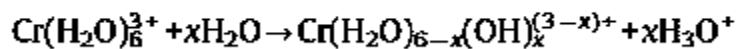


Figura 4.10. Hidrólisis del Cr^{3+} . Tomado de Vignati et al., 2010.

A pesar de que el Cr^{6+} es más tóxico debido a que atraviesa fácilmente las membranas celulares, no obstante, esta respuesta tóxica se debe a la formación de especies activas durante su reducción intracelular a Cr^{3+} y/o a las interacciones posteriores entre el Cr^{3+} intracelular y el ADN (Ortega et al., 2005). Se ha sugerido también, que ambas especies del metal interfieren en la captación del Fe y el S (Shanker et al., 2005). De igual forma, alteran la producción de pigmentos fotosintéticos clorofila y antocianina, incremento de glutatión y ácido ascórbico, pero también de fitoquelatinas (Boonyapookana et al., 2002; Shanker et al., 2005). D'ors et al., (2010) y posteriormente Pereira et al., (2013), investigaron sobre cepas Cr^{3+} y Cr^{6+} -resistentes de *Dictyosphaerium chlorelloides* ($\text{Dc}^{\text{RCr(III)R30}}$ y $\text{Dc}^{\text{RCr(VI)R25}}$) el efecto de éstos sobre la célula, y determinaron una disminución en el volumen celular, incremento de vacuolas, la presencia de precipitados densos por la formación de complejos con polifosfatos en la pared celular, también en cloroplastos y mitocondrias, y modificaciones estructurales que resultan a la resistencia de ambos estados de oxidación del Cr.

4.0.5.6. Cobalto

Constituyente del complejo vitamínico B_{12} (cobalamina) a bajas concentraciones (en medios de cultivo) estimula el crecimiento celular, contenido en clorofila *a* y *b*, pigmentos accesorios como carotenoides, estimulación en la síntesis de proteínas y monosacáridos en microalgas (ej. *Chlorella pyrenoidosa*) (Miazeck et al., 2015). No obstante, el Co^{2+} a mayores concentraciones (10 a 20 ppm) resulta en la inhibición de la tasa fotosintética de O_2 por interrupción en el transporte de electrones y en las reacciones redox de Q_A a Q_B , así como en el proceso respiratorio, reduce el contenido de clorofila debido al reemplazo del ion Mg^{2+} por el Co^{2+} (El-Sheekh et al., 2003; Chen et al., 2018).

Anteriormente, ya se tenía conocimiento que el Co^{2+} y el Cd^{2+} reemplazan al Zn^{2+} en metaloenzimas como la anhidrasa carbónica, disminuyendo la fijación de CO_2 en diatomeas (Price & Morel, 1991). Al igual que el Cd, el Co interactúa con grupos sulfhidrilo (SH^-) en proteínas y genera un incremento en el volumen celular en los géneros *Scenedesmus* y *Nitzschia*, además, de una mayor estimulación en el contenido de Pro y Cys como sucede con el Cd, pero de otros

aminoácidos como Val y Leu con actividad sobre la enzima acetohidroxiácido sintasa (Osman et al., 2004).

4.0.5.7. Mercurio

Considerado uno de los metales (metaloide) más tóxicos en conjunto con el Cd, As y el Pb los cuales no tienen un rol biológico benéfico alguno. En microalgas, las concentraciones de Hg pueden alcanzar hasta 10^6 veces más elevadas que en el medio acuático (Mason et al., 1996). La bioacumulación del Hg en fitoplancton se atribuye al carácter lipofílico de la forma organomercurial que es el metilmercurio (CH_3Hg) con un coeficiente octanol/agua K_{ow} de 182, no obstante, la forma inorgánica en Hg^{2+} como HgCl_2 también es hidrófobo y puede atravesar muy fácilmente la membrana celular con K_{ow} de 3.3 como se exhibe en la Figura 4.11 (Gutknecht, 1981; Mason et al., 1996).

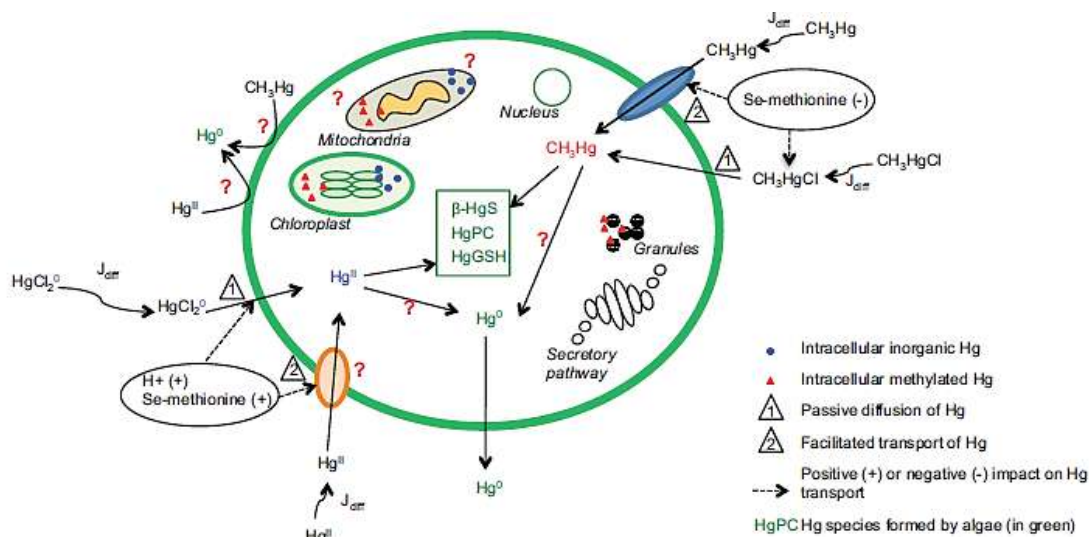


Figura 4.11. Interacciones del Hg orgánico e inorgánico en microalgas. Tomado de Faucheur et al., 2014.

A pesar de que el Hg inorgánico es la forma más común que se encuentra en el medio acuático, no obstante, el metilmercurio presenta mayor poder inhibitorio sobre el proceso fotosintético (Kukarskikh et al., 2003). A concentraciones mayores de $1 \mu\text{M}$ de CH_3Hg induce alteraciones sobre la síntesis de clorofila a , inhibe el transporte de electrones durante las reacciones de óxido-reducción debido a un déficit en la capacidad del PSII de disipar el exceso de energía en la fase

fotoquímica de Q_A a Q_B (Graevskaya et al., 2003; Shanab et al., 2012; Naorbe and Serrano, 2018). Se ha determinado que el Hg^{2+} inhibe la $NADP^+$ -oxidoreductasa en *Euglena* disminuyendo de forma significativa el suministro de NADPH (de Filippis et al., 1981).

A concentraciones de 10 mg L^{-1} de $HgCl_2$ en un tiempo de exposición de 24h produce el colapso del crecimiento poblacional de clorofíceas como *Chlorella sorokiniana*, además de una reducción significativa en el contenido de clorofila *a* de $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta una concentración menor de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gómez-Jacinto et al., 2015). Estos mismos autores, identificaron metalotioneínas que se expresan durante la exposición al Hg (Figura 4.12), ya que este mecanismo se expresa en mayor magnitud en presencia de Cd, como se menciona en el apartado de las “Metalotioneínas clase III (Met(III))”.

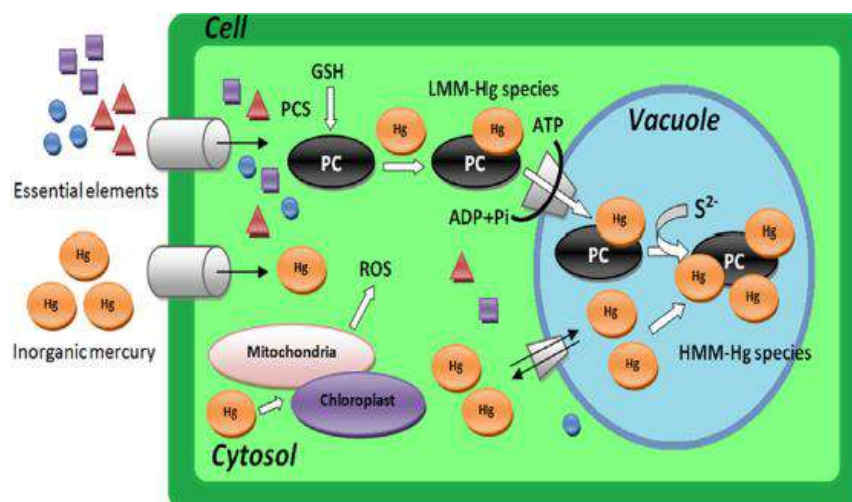


Figura 4.12. Biosíntesis de metalotioneínas de clase III en *Chlorella sorokiniana* expuesta a $HgCl_2$. Tomado de Gómez-Jacinto et al., 2015.

De igual forma, el Hg altera el centro de reacción del PSI, el centro catalítico del H_2O en el PSII, y la subunidad β de la ATP-sintasa, la expresión de proteínas Hsp (como la Hsp70) y la generación de ROS (Nicolardi et al., 2012; Bakar et al., 2015).

En bacterias, plantas superiores y en microalgas se ha detectado la inducción de resistencia al Hg a través de la expresión del operón *mer* (específicamente el conjunto de genes *merA*, *merR*, *merE*, *merG*, *merB*, *merT*, *merC*, *merF*, *merP* y *merD*) el cual es inducido solamente por la forma inorgánica del Hg (Dash and Das, 2012). La forma *merC* interviene en la acumulación y el

transporte de mercurio, mientras que la expresión de *merA* codifica para la enzima ion mercúrico reductasa la cual requiere de NADPH que actúa reduciendo la forma inorgánica Hg^{2+} a la forma elemental Hg^0 el cual es volátil y puede ser eliminado fácilmente por difusión (Kiyono et al., 2013). Sin embargo, también se expresan los genes *merE* y *merT* para la expresión de los transportadores del metilmercurio (CH_3Hg) y el Hg^{2+} (Boyd & Barkay, 2012). Por otro lado, el gen *merB* codifica para la organomercurio liasa que cataliza la protonólisis del enlace C-Hg del CH_3Hg , resultando en la formación de Hg^{2+} (Dash & Das, 2012; Das et al., 2016).

4.0.5.8. Plata

Este metal es considerado como altamente tóxico para las microalgas, en el ecosistema acuático se encuentra en forma de AgCl , Ag_2S , no obstante, la forma iónica Ag^+ es la forma más tóxica para la biota acuática (Ribeiro et al., 2014). Tiene afinidad a grupos tiol de proteínas generando desnaturalización proteica (Zhao & Wang, 2011). Sin embargo, otras formas del metal como nanopartículas de plata (AgNP 's) pueden generar estrés oxidativo a través de la producción de ROS, reduce el rendimiento cuántico fotosintético del PSII en *Chlamydomonas reinhardtii* (Navarro et al., 2008; Mylon et al., 2010). Por otra parte, la pared celular de las microalgas adsorbe y acumula agregados de AgNP , esto fue estudiado por Perreault et al., (2012) en la comparación de dos cepas de *Chlamydomonas reinhardtii*: una cepa tipo salvaje y otra cepa mutante deficiente de pared celular expuestas a 48h a AgNP , en el cual observaron mayor adsorción de agregados densos de nanopartículas en la pared celular de la cepa tipo salvaje, mientras que en la cepa mutante deficiente de pared celular no presentó tales agregados. Estos agregados presentan alteraciones sobre el aparato fotosintético reduciendo la disponibilidad de la captación lumínica y, por tanto, en la tasa de división celular resultando en inhibición de crecimiento (Navarro et al., 2008; Perreault et al., 2012). Incluso, las microalgas excretan exopolímeros capaces de adsorber a los metales como Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} y nanopartículas debido a los grupos de unión (ej. Carboxilo) dándoles carácter aniónico a las microalgas (partículas coloidales) como mecanismo de detoxificación con mayor producción de exopolisacáridos en concentraciones elevadas de Ag^+ (Miao et al., 2009).

Asimismo, la Ag reduce el contenido de clorofila en microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella tertiolecta* hasta un 80% en concentraciones de 10 mg L^{-1} de AgNP tras 24h de exposición (Oukarroum et al., 2012). La toxicidad de las AgNP , viene mediada por Ag^+ ya que al

igual que el Cd presenta el efecto de “caballo de Troya” interactuando con transportadores de cationes metálicos esenciales como Na^+ compitiendo en la Na^+/K^+ -ATPasa reduciendo la captación y el transporte de Na^+ , Cl^- , K^+ (Oukarroum et al., 2012).

4.0.6. Mecanismos de resistencia cruzada e interacción metálica con Cd

Una de las variables claves a considerar es la interferencia con otros contaminantes como la presencia de 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). Las interacciones entre estos elementos pueden producir efectos aditivos, sinérgicos/potenciadores o antagonistas que pueden manifestarse como toxicidad celular directa, o interactuar con el AD, produciendo aductos y estrés oxidativo (Nordberg, 2007). Así, el comportamiento sinérgico que pudiera surgir debido a la interacción metálica podría aumentar el riesgo ambiental de bioacumulación (Baos et al., 2002), o por el contrario la presencia de otros cationes metálicos en solución puede antagonizar la toxicidad del Cd (Torres et al., 1997). Sin embargo, poco se sabe de la interacción y su efecto en la resistencia cruzada con otros metales sobre microalgas. Además, a principios de los 90's las primeras investigaciones enfocadas al estudio de especies de microalgas resistentes a metales se iniciaron con el análisis de cepas Cd-resistente de *C. reinhardtii* indicando que esta capacidad es inducida por mutaciones nucleares *CadA^R* y *CadB^R*, y que, además estas mutaciones incrementan la resistencia a otros metales como Zn, Cu y en menor medida al Ni, pero no al Co (Collard & Matagne, 1990, 1994). Esta investigación provee de información y las bases en que se gobierna las resistencias cruzadas del Cd con diferentes metales en exclusivo en microalgas eucariotas.

Gran cantidad de mecanismos fisiológicos, expresión de genes y por tanto moleculares coexisten como procesos de protección y defensa a la interacción metálica en microalgas, uno de esos factores fisiológicos en primer instancia que influyen conjuntamente en la resistencia cruzada es la pared celular, de acuerdo con los estudios de Macfie et al., (1994) y Prasad et al., (1998), cepas mutantes deficientes de pared celular de *C. reinhardtii* (CW15) incrementan la captación y sensibilidad a Cd, Co, Cu y Ni al contrario de la cepa tipo salvaje (WT 2137).

Por otro lado, la existencia sobre diferencias de sensibilidad de distintas especies de fitoplancton a exposición de contaminantes metálicos, se deben a algún efecto estimulante sobre el crecimiento

celular asociado con bajas concentraciones de algunos metales como el Zn, Fe y Cu (Morelli & Scarano, 2001). En el ambiente acuático, los iones de Zn y Cd exhiben propiedades físicas y bioquímicas similares, los cuales tienen la misma carga electrónica, además, comparten una afinidad similar a ligandos de S, N y O (Newman & McCloskey, 1996); y compiten con frecuencia por los mismos canales y transportadores en organismos acuáticos inhibiendo la unión de Ca^{2+} y Mn^{2+} (Wright, 1977). En este contexto, el Ca ha demostrado ser altamente protector contra la absorción de Zn, Pb y Cd en *Scenedesmus quadricauda* (Kováčik & Dresler, 2018). De igual manera, las formas oxidadas del Mn (MnO_x) son muy reactivas con otros metales en su forma reducida como Fe^{2+} y al Cd modificando su biodisponibilidad y la posterior acumulación en sedimentos (Trivedi & Axe, 2000; Dong et al., 2000). Conjuntamente, se ha evidenciado que el Cd causa cambios en la actividad de diversas enzimas (ej., aminopeptidasas) que requieren al Zn como cofactor (Nordberg, 2007).

Continuando con el nivel de organización en las vías de protección y defensa, las variantes genéticas que influyen en la susceptibilidad a los efectos tóxicos por la interacción metálica podrían ser de varios tipos: uno de ellos es que podrían afectar a la biotransformación del metal mediante la absorción, el metabolismo de un metal (polimorfismos del gen de la metiltransferasa como la CYT19 en el metabolismo del As), o en el aumento o disminución de excreción de un metal a otro (Nordberg, 2007). Factores epigenéticos, por ejemplo el As, Cd y el Ni alteran el patrón de metilación del ADN (Costa et al., 1994; Takiguchi et al., 2003; Chen et al., 2004). Esta resistencia puede incrementarse por generaciones; justamente en investigaciones previas realizadas por Navarro et al., (1997) y posteriormente por Avilés et al., (2003), revelaron en células de *Euglena gracilis* pretratadas con Hg^{2+} por 60 generaciones presentaron una mayor resistencia y acumulación del Cd^{2+} después de 4 días de exposición comparadas con las cepas control.

En otros estudios, se ha indicado de la interacción del Cd con As en organismos superiores y con efecto aditivo sobre la toxicidad de ambos, de igual forma estas investigaciones revelaron la presencia de factores moleculares mecanicísticos (por ejemplo, inducción de proteínas de estrés-Hsp) los cuales contribuyen a la resistencia cruzada (Madden et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, los transportadores juegan un papel clave en la resistencia no solo de un metal sino en interacción metálica, esto fue observado en la competencia del Fe y Cd sobre su unión al transportador DMT-1, generando una estrecha correlación entre la expresión del

DMT-1 y la absorción de Cd (Tallkvist et al., 2001). En estudios anteriores, Parker et al., (2000), estudiaron la sorción de varios metales (Zn, Pb, Cu, Cd, Mn) sobre *Microcystis aeruginosa* la cepa C3-40, y comprobaron que en situaciones de saturación el Pb y Cd compiten de manera similar con los sitios de unión a grupos funcionales del polisacárido capsular de la cianobacteria. Por otra parte, en el mismo estudio cuando estos metales fueron confrontados con Mn, este metal alteró indirectamente la unión de Pb y Cd sobre los sitios de unión en el polisacárido, explicando que el Mn modifica la conformación del polímero por entrecruzamiento de los sitios de unión.

En otras investigaciones, se ha determinado que la adsorción de Cd disminuye notablemente por la adición de Zn, Pb, Cu (Wang & Wang, 2009). Esto mismo sucede con la síntesis de sideróforos para incrementar la captación y quelación del Fe, pero también de otros metales como Cu, Zn, Cd, Mn, Pb (Philpott, 2006).

Sin embargo, es difícil cuantificar la toxicidad de los productos químicos individuales contenidos en el agua, debido a que una amplia variedad de compuestos metálicos co-existen en el ecosistema, y una mezcla puede tener mayor toxicidad que de forma individual (Arrhenius, et al., 2004). Por lo tanto, para una mejor determinación de estos xenobióticos, es muy importante tener las herramientas necesarias para el monitoreo de concentraciones de metales tóxicos provenientes de efluentes industriales y agrícolas teniendo como reservorio final al ecosistema acuático.

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo celular

La cepa tipo salvaje de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) (Komárek and Perman, 1978) (Dc1M^{wt}), fue obtenida de la colección de cultivos de algas del Laboratorio de Toxicología ambiental y de la Unidad de Genética (Depto. De Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria) de la Universidad Complutense de Madrid, España, y la obtención de la cepa resistente se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH. La microalga se cultiva en frascos de cultivo (Greiner Bio-One, Longwood, NJ, EE.UU.) en 20 mL del medio de enriquecimiento BG-11 con un pH de 7.5 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Alemania) para el crecimiento axénico de ambas. La cepa resistente se cultiva en BG-11 suministrado con sulfato de cadmio de acuerdo con la $CI_{50(72)}$ (11.57 mg L⁻¹ que corresponde a 100 μ M de Cd²⁺) previa en Dc1M^{wt} (3CdSO₄ · 8H₂O; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Ambas cepas se mantienen a 21 °C bajo una incidencia fotónica de 60 μ mol m⁻² s⁻¹ a con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12h una longitud de onda de 400 a 700 nm. Las células se mantienen en crecimiento exponencial por medio de transferencias de inóculo unicelular a un medio fresco cada dos semanas.

4.1.2. Inhibición de crecimiento poblacional de los compuestos metálicos de forma individual

La determinación de la respuesta inhibitoria de los compuestos metálicos seleccionados (Tabla 4.1.1) fueron de grado analítico (pureza $\geq 99.0\%$) obtenidos de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) con respecto al Cd sobre el crecimiento poblacional de las cepas Dc1M^{wt} y Dc^{RCd100} por ensayo estático con las diluciones preparadas al día para la determinación de cada respuesta.

La estimación de la inhibición de crecimiento poblacional se basa de acuerdo con la directriz (201) de la OECD, (OECD, 2006) que consiste en el bioensayo de inhibición de crecimiento poblacional de microalgas de agua dulce debido a la exposición de distintas concentraciones de las sales metálicas a las 72h de exposición. Inicialmente, en cada tubo se incluye una concentración de 1×10^5

cel mL⁻¹ con ajuste por recuento sobre cámara de Neubauer (Brand Gmb H + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) a un volumen total de 10 mL de medio BG-11.

Tabla 4.1.1. Compuestos metálicos seleccionados para la interacción metálica con el Cd en Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt}

Sustancia	Fórmula molecular	No. CAS	Solubilidad, Densidad, PM
Sulfato de cadmio octahidratado*	3CdSO ₄ ·8H ₂ O	7790-84-3	1130g 100 ml ⁻¹ H ₂ O (25°C), 3.08g cm ⁻³ , 769.55g mol ⁻¹
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ ·6H ₂ O	7791-13-1	191g 100ml ⁻¹ , 1.92g cm ⁻³ 237.90g mol ⁻¹
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	7758-99-8	31.70g 100ml ⁻¹ (0°C), 2.30g cm ⁻³ , 249.70g mol ⁻¹
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7446-20-0	960g l ⁻¹ , 1.96g cm ⁻³ , 287.55g mol ⁻¹
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	7782-63-0	26.50g 100ml ⁻¹ (20 °C), 1.90g cm ⁻³ , 278.02g mol ⁻¹
Dicromato de Potasio	K ₂ Cr ₂ O ₇	7778-50-9	130g 1000ml ⁻¹ H ₂ O (20°C), 2.68g cm ⁻³ , 294.19g mol ⁻¹
Cloruro de cromo hexahidratado	CrCl ₃ · 6H ₂ O	10060-12-5	585g 1000ml ⁻¹ H ₂ O (25°C), 1.76g cm ⁻³ , 266.4g mol ⁻¹
Cloruro mercúrico	HgCl ₂	7487-94-7	74g 1000ml ⁻¹ H ₂ O (20°C), 5.44g cm ⁻³ , 271.5g mol ⁻¹
Nitrato de plata	AgNO ₃	7761-88-8	245g 100ml ⁻¹ H ₂ O (25°C), 44g cm ⁻³ , 169.87g mol ⁻¹

*Compuesto control para la interacción metálica en Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt}

La estimación se realizó a partir de los índices de toxicidad: Concentración Inhibitoria al 50% de la población y la Concentración Máxima sin Respuesta Observada a las 72h de exposición (CI₅₀₍₇₂₎ y 72h-NOEC, respectivamente) de forma individual en un rango de concentraciones de 0.001-500 mg L⁻¹ en la cepa Cd-resistente y tipo salvaje de *D. chlorelloides*, con la cuantificación de la fluorescencia emitida por la clorofila de cada sal metálica utilizando filtros de emisión-excitación de 485-670 nm, respectivamente en ambas cepas a través de la lectura en placa en fluorímetro (Tecan Group Ltd., Switzerland) con n= 8 ensayos.

4.1.3. Interacción metálica y resistencia cruzada/múltiple del Cd con en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

La base del ensayo es la determinación del efecto sinérgico, aditivo y antagónico que puedan presentar distintas combinaciones de las sustancias metálicas tomando como base al Cd a través de la metodología descrita por Chou & Talalay, (1984, 2006) a través de la “Ley de Acción de Masas” basada en modelos de cinética enzimática y teorías de unión al receptor.

Utilizando la inducción y la deducción matemática por simulación informática del sinergismo y antagonismo que involucran al Principio de Efecto Medio (MEP) y el Índice de Combinación (IC) en la mezcla de dos o más sustancias de acuerdo con la potencia de cada producto, es decir, si dos xenobióticos que presentan mecanismos de acción similares o son mutuamente excluyentes se presentan en un Índice de Combinación $IC < 1$ muestran un efecto sinérgico, pero si por el contrario dos xenobióticos presentan mecanismos totalmente distintos y son independientes se presentan en un Índice de Combinación $IC > 1$, exhibirán entonces un efecto antagónico, o en su caso cuando $IC = 1$ se mostraría un efecto aditivo.

El Índice de Combinación (IC) se determina a partir de la siguiente ecuación:

Ecuación 4.1.1. Índice de Combinación (Chou & Talalay, 1984)

$$n(IC)_x = \sum_{j=1}^n (D)_j / (D_x)_j$$

Dónde, $n(IC)_x$ corresponde al Índice de Combinación para n sustancias, $(D)_j$ pertenece a la concentración o dosis de cada sustancia en x% de inhibición en combinación y $(D_x)_j$ corresponde a la dosis o concentración de cada sustancia de manera individual en x% de inhibición.

4.2. ANÁLISIS DE DATOS

La estimación de cada una de las $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC de forma individual de los metales seleccionados en la Tabla 4.1.1 en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ fue a través de regresión lineal, con sus respectivos límites de confianza al 95% y el análisis de normalidad de los datos por Test de D'Agostino y Pearson, utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$ con una $n = 8$ por cada sal metálica, expresados con su media y su desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$).

Una vez obtenidas las respuestas individuales de cada sal metálica, el Índice de Combinación se estableció por el sistema de algoritmos basados en el Principio del Efecto Medio (MEP) y el Índice de Combinación (IC) (Ecuación 4.1.1) expresando las respuestas de sinergismo, antagonismo o adición en su caso en mezcla binaria con el Cd como metal control y utilizando los LMP (Límites Máximos Permisibles) de la NOM-001-ECOL-1996 de contaminantes como metales presentes en aguas residuales y aguas superficiales en $mg\ L^{-1}$, a través de la relación Fracción afectada (Fa)-IC (Índice de combinación) y el poligonograma de respuesta por medio del programa farmacológico CompuSyn v 1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, EE. UU.) desarrollado por Chou & Martin (2005) y Chou (2010).

La comparación tanto en las respuestas en forma individual de cada metal en Dc^{RCd100} con respecto a la cepa $Dc1M^{wt}$ se estableció por un T-test no pareado por corrección de Test de Welch, y para la comparación entre los valores de $CI_{50(72)}$ de cada metal por ANOVA de 1 vía utilizando al $CdSO_4$ como metal control a través del Test de Dunnett, como para las interacciones binarias con el $CdSO_4$ (Test de Tukey). Las diferencias se consideran significativas a $p < 0.05$, el análisis estadístico se realizó por el software Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Interacción con metales de carácter esencial

4.3.1.1. Respuesta de forma individual en inhibición de crecimiento poblacional en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

La exposición de forma individual de los compuestos metálicos (y sus iones M^+) a las 72h de exposición expresado en $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en la cepa Cd-resistente (Dc^{RCd100}) con respecto a $Dc1M^{wt}$ se muestra en la Tabla 4.3.1. Dónde se exhibe que, el orden de sensibilidad para Dc^{RCd100} es: $CuSO_4 > CoCl_2 > ZnSO_4 > CdSO_4 > NiCl_2 > FeSO_4$ con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) con la cepa control $Dc1M^{wt}$ (su orden de sensibilidad es: $CuSO_4 > CoCl_2 > NiCl_2 > CdSO_4 > ZnSO_4 > FeSO_4$) ambas con mayor sensibilidad en Cu y Co (Dc^{RCd100} supera a $Dc1M^{wt}$ entre 4 y 12 veces los valores tanto de $CI_{50(72)}$ como de NOEC); excepto en la respuesta del Zn (equivalente a 1.79 y 1.32 mg $Zn^{2+} L^{-1}$ para Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$, respectivamente). A pesar de que no hubo diferencias estadísticas con el Zn entre ambas cepas, no obstante, Dc^{RCd100} en términos de sensibilidad fue mayor si se compara el orden en ambas variantes.

Al confrontar los metales con el Cd, solamente con $NiCl_2$ y $FeSO_4$ ($CI_{50(72)}$ de 153.11 y 348.34mg L^{-1} , respectivamente) presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$; $p < 0.0001$) en Dc^{RCd100} superando la $CI_{50(72)}$ del Cd (50.00 mg L^{-1} , equivalente a 3.42 mg $Cd^{2+} L^{-1}$), es decir, esta cepa presentó mayor resistencia al Fe seguido del Ni, como una respuesta de una resistencia cruzada de forma individual que es inducida por el Cd. En otras palabras, la sensibilidad que exhibe $Dc1M^{wt}$ en la exposición a los metales de manera individual es elevada comparada con Dc^{RCd100} la cual como se muestra en la Tabla 4.3.1, se necesita de concentraciones por encima de entre 3 y 15 veces de las CI_{50} exhibidas por la cepa tipo salvaje para inhibir el crecimiento.

Tabla 4.3.1. Valores de las $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en $mg\ L^{-1}$ de las sales metálicas tomando el Cd como control en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

$CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en $mg\ L^{-1}$ (L.C. al 95%) de los compuestos metálicos en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$			
n	Compuesto	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$
	$CdSO_4 \cdot 8H_2O$	$CI_{50(72)}$: 50.00mg $CdSO_4\ L^{-1}$ (32.96-54.10) $^a3.42mg_{Cd^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=1.18x-1.91$ 72h-NOEC$CdSO_4$: 5.08 (2.83-7.56)	$CI_{50(72)}$: 11.57mg $CdSO_4\ L^{-1}$ (5.10-16.22) *** $^a0.79mg_{Cd^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.98$ $y=1.42x-0.63$ 72h-NOEC$CdSO_4$: 1.40 (0.23-3.40)
8	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$^{ns}CI_{50(72)}$: 8.76mg $CuSO_4\ L^{-1}$ (6.04-10.23) $^a0.69mg_{Cu^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=0.85x-1.90$ 72h-NOEC$CuSO_4$: 0.43 (0.06-0.50)	$^{ns}CI_{50(72)}$: 2.92mg $CuSO_4\ L^{-1}$ (0.91-4.23) *** $^a0.23mg_{Cu^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.98$ $y=1.05x-0.099$ 72h-NOEC$CuSO_4$: 4.3×10^{-4} (3.0×10^{-5}-0.011)
8	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$^{ns}CI_{50(72)}$: 40.64mg $ZnSO_4\ L^{-1}$ (23.33-54.20) $^a1.79mg_{Zn^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.98$ $y=3.07x-4.93$ 72h-NOEC$ZnSO_4$: 0.95 (0.08-3.04)	$^*CI_{50(72)}$: 30.01mg $ZnSO_4\ L^{-1}$ (21.28-41.21) ns $^a1.32mg_{Zn^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=1.92x-2.61$ 72h-NOEC$ZnSO_4$: 0.02 (4.0×10^{-4}-0.17)
8	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	$^*CI_{50(72)}$: 153.11mg $NiCl_2\ L^{-1}$ (138.36-207.97) $^a6.20mg_{Ni^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=0.85x-1.90$ 72h-NOEC$NiCl_2$: 7.39 (1.11-18.45)	$^{ns}CI_{50(72)}$: 10.76mg $NiCl_2\ L^{-1}$ (7.94-12.71) *** $^a0.44mg_{Ni^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=1.61x-1.63$ 72h-NOEC$NiCl_2$: 1.95 (0.37-3.95)
8	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$^{***}CI_{50(72)}$: 348.34mg $FeSO_4\ L^{-1}$ (219.79-765.60) $^a17.33mg_{Fe^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.98$ $y=1.92x-5.02$ 72h-NOEC$FeSO_4$: 51.52 (2.78-123.88)	$^{**}CI_{50(72)}$: 35.73mg $FeSO_4\ L^{-1}$ (8.76-75.50) ** $^a1.78mg_{Fe^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.96$ $y=1.08x-1.32$ 72h-NOEC$FeSO_4$: 4.83 (1.80-15.60)
8	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	$^{ns}CI_{50(72)}$: 38.73mg $CoCl_2\ L^{-1}$ (26.42-53.70) $^a1.56mg_{Co^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.99$ $y=1.51x-2.32$ 72h-NOEC$CoCl_2$: 4.60 (1.51-8.63)	$^{ns}CI_{50(72)}$: 3.37mg $CoCl_2\ L^{-1}$ (1.08-6.59) *** $^a0.14mg_{Co^{2+}}\ L^{-1}$ $r=0.98$ $y=1.34x-0.71$ 72h-NOEC$CoCl_2$: 0.38 (0.14-2.09)

******, *******: T-test no pareado, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$; $p < 0.0001$) en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

******, *******: ANOVA de 1 vía, ($p < 0.001$, $p < 0.0001$) en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ como control al $CdSO_4$ por Test de Dunnett

ns: sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$)

^a: Valores de $CI_{50(72)}$ de los iones metálicos (M^{+}) a partir de los compuestos metálicos

4.3.1.2. Interacción metálica en mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

El Índice de Combinación de las mezclas binarias resultantes de los metales seleccionados con respecto al Cd en ambas cepas se muestra en la Tabla 4.3.2. La mezcla $CdSO_4/CuSO_4$ resultó en una respuesta antagónica, que se intensifica conforme se aumenta en la respuesta (y en la concentración de estos metales) en Dc^{RCd100} ($IC_{100\%}= 1412.43$) y con diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) en los valores de $CI_{50(72)}$ de la mezcla con $Dc1M^{wt}$ (1648.60 y 110.62 $mg\ L^{-1}$, respectivamente) (Tabla 4.3.2 y Gráfico 4.3.3); no obstante, en $Dc1M^{wt}$ el antagonismo es menos pronunciado, pero se mantiene de forma lineal en cada respuesta de la combinación ($IC \geq 90$) como se observa en el Gráfico 4.3.3. Comparando esta mezcla con $CdSO_4/ZnSO_4$ en ambas cepas, la respuesta es la de mayor antagonismo en términos de $CI_{50(72)}$ de 4061.17 $mg\ L^{-1}$ ($IC_{50\%}= 100.80$) y 272.50 $mg\ L^{-1}$ ($IC_{50\%}= 12.86$) mayor para Dc^{RCd100} que en $Dc1M^{wt}$, respectivamente (Gráfico 4.3.3). Mientras que, en $Dc1M^{wt}$ al 0% de inhibición ($NOEC_{CdSO_4/ZnSO_4}$ $IC_{0\%}= 1.45$) es aditiva, pero se bloquea a elevados efectos exhibiendo respuesta antagónica ($IC_{100\%}= 90.99$)

Continuando con las respuestas de interacción, la combinación de $CdSO_4/NiCl_2$ en Dc^{RCd100} a bajas concentraciones ($NOEC$) en un inicio es antagónica ($IC_{0\%}= 44.79$), pero al incrementarse la respuesta y por tanto en concentración como relación lineal ($r= 0.99$), se torna en adición ($IC_{100\%}= 1.36$) con diferencias estadísticas marcadas ($p < 0.0001$) comparada con $Dc1M^{wt}$ la cual en un principio es aditiva ($IC_{0\%}= 1.15$) pero al aumentar la respuesta disminuye a un antagonismo ($IC_{100\%}= 27.52$) (Gráfico 4.3.1, Gráfico 4.3.3 y Gráfico 4.3.5). No obstante, a los valores de $CI_{50(72)}$ Dc^{RCd100} muestra resistencia elevada al Ni comparada con la sensibilidad de $Dc1M^{wt}$ a la mezcla (844.40 y 56.68 $mg\ L^{-1}$, respectivamente) como se observa en: Tabla 4.3.1, Tabla 4.3.2, Gráfico 4.3.1, Gráfico 4.3.3 y Gráfico 4.3.5.

Tabla 4.3.2. Interacción metálica en Dc^{RCd100} y Dc1M^{wt} y valores de la CI₅₀₍₇₂₎ y 72h-NOEC correspondientes a las mezclas binarias con el Cd

Interacción metálica del CdSO ₄ con los compuestos metálicos en ambas cepas de <i>D. chlorelloides</i>						
Cepas de <i>D. chlorelloides</i>			Dc ^{RCd100}		Dc1M ^{wt}	
Mezcla	%Respuesta	^a LMP NOM-001-ECOL-1996 [mg L ⁻¹]	Índice de Combinación	^b CI ₅₀₍₇₂₎ Mezcla 72h-NOEC (L.C. 95%) mg L ⁻¹	Índice de Combinación	^b CI ₅₀₍₇₂₎ Mezcla 72h-NOEC (L.C. 95%) mg L ⁻¹
CdSO ₄ /CuSO ₄	0	[0.1:4.0]	39.45	***1648.60 (1135-2344.33) 287.08 (133.05-472.06) r= 0.99 y= 1.32x-4.24	91.00	***110.62 (22.91-428.79)*** 12.27 (1.73-44.26) r= 0.94 y= 1.05x-2.14
	10		118.84		90.20	
	25		176.93		90.10	
	50		263.82		90.05	
	75		393.76		90.08	
	95		588.02		90.35	
	100		1412.43		90.95	
CdSO ₄ /ZnSO ₄	0	[0.1:10]	11.58	***4061.17 (2798.98-5767.60) 706.32 (327.34-1164.13) r= 0.99 y= 1.32x-4.76	1.45	***272.49 (56.36-1032.76)*** 30.27 (5.18-109.14) r= 0.94 y= 1.05x-2.56
	10		39.66		5.13	
	25		63.05		8.11	
	50		100.80		12.86	
	75		161.68		20.45	
	95		358.96		44.86	
	100		733.82		90.99	
CdSO ₄ /NiCl ₂	0	[0.1:2.0]	44.79	***844.40 (582.10-1199.50) 146.89 (68.10-241.55) r= 0.99 y= 1.32x-3.86	1.15	***56.68 (11.78-214.29)*** 6.29 (1.38-22.70) r= 0.94 y= 1.05x-1.84
	10		13.04		3.08	
	25		8.57		4.37	
	50		5.72		6.22	
	75		3.88		8.86	
	95		2.15		16.09	
	100		1.36		27.52	
CdSO ₄ /FeSO ₄	0	[0.1:0.3]	1.57	***160.84 (110.92-228.56) 27.99 (12.97-46.03) r= 0.99 y= 1.32x-2.91	0.28	***10.79 (2.23-40.93)*** 1.20 (0.71-4.32) r= 0.94 y= 1.05x-1.08
	10		1.27		0.61	
	25		1.22		0.83	
	50		1.20		1.13	
	75		1.25		1.57	
	95		1.38		2.89	
	100		1.27		5.36	

CdSO₄/CoCl₂	0	[0.1:0.2]	2.94	***120.63 (83.18-171.40) 20.99 (9.73-34.51) r= 0.99 y= 1.32x-2.74	0.79	***8.08 (1.68-30.55)*** 0.90 (0.0054-3.24) r= 0.94 y= 1.05x-0.95
	10		3.06		1.58	
	25		3.16		2.02	
	50		3.29		2.58	
	75		3.46		3.30	
	95		3.81		4.99	
	100		4.23		7.23	

***: T-test no pareado, diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) correspondiente a las mezclas binarias de cada metal con el Cd en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

***: ANOVA 1 vía (Test de Tukey), diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) entre los valores de $CI_{50(72)}$ en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

^a: Límites Máximos Permisibles en $mg\ L^{-1}$ (LMP) de metales en aguas residuales de acuerdo con NOM-001-SEMARNAT-1996

^b: Valores de $CI_{50(72)}$ en $mg\ L^{-1}$ resultante de las mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

Otra de las respuestas que se ha presentado en la mezcla con Cd, es la combinación CdSO₄/FeSO₄ en Dc^{RCd100} a diferencia de la respuesta en forma individual que se requirió de una elevada concentración de FeSO₄ ($CI_{50(72)}$ de 348.34 $mg\ L^{-1}$) para generar la inhibición de crecimiento en la cepa, en esta mezcla se produjo una adición que se mantiene a lo largo de los porcentajes de respuesta con una $CI_{50(72)}$ CuSO₄/FeSO₄ de 160.84 $mg\ L^{-1}$ y un $IC_{50\%}$ de 1.20 (Tabla 4.3.2, Gráfico 4.3.1, Gráfico 4.3.3 y Gráfico 4.3.5). Posiblemente debido a alteraciones en el transporte del Cd con mayor incremento o la inducción conjunta de estrés oxidativo de ambos.

Por el contrario, en $Dc1M^{wt}$ se presentó un sinergismo a bajas concentraciones ($IC_{0,10\ y\ 25\%} = 0.28, 0.61\ y\ 0.83$), aditiva a la $CI_{50(72)}$ de 10.72 $mg\ L^{-1}$ ($IC_{50\%} = 1.13$) y bajo antagonismo a altas concentraciones ($IC_{100\%} = 5.36$). Para la mezcla de CdSO₄/CoCl₂ Dc^{RCd100} presentó una $IC_{50(72)}$ de 120.63 $mg\ L^{-1}$ un valor 15 veces más resistente que en $Dc1M^{wt}$ ($CI_{50(72)}$ de 8.08 $mg\ L^{-1}$; $p < 0.0001$) con respuesta antagónica no tan pronunciada pero que se mantiene de forma lineal (Gráfico 4.3.1). Sin embargo, $Dc1M^{wt}$ a bajas concentraciones ($IC_{0\ y\ 25\%} = 0.79\ y\ 1.58$) presenta sinergismo y adición, pero al aumentar las concentraciones se antagoniza tal respuesta $IC_{100\%}$ de 7.23 (Gráfico 4.3.1). A pesar de que en la $CI_{50(72)}$ individualmente y en mezcla no hay diferencias en concentración (8.08 y 3.37 $mg\ L^{-1}$ para CdSO₄/CoCl₂ y CoCl₂, respectivamente).

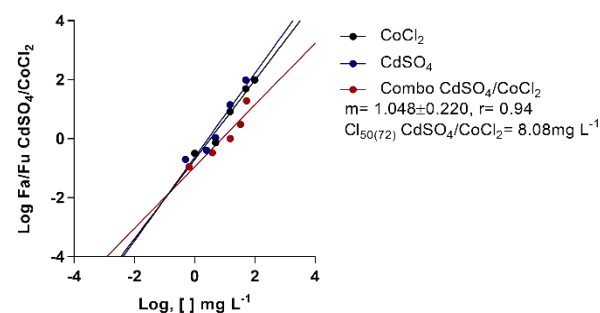
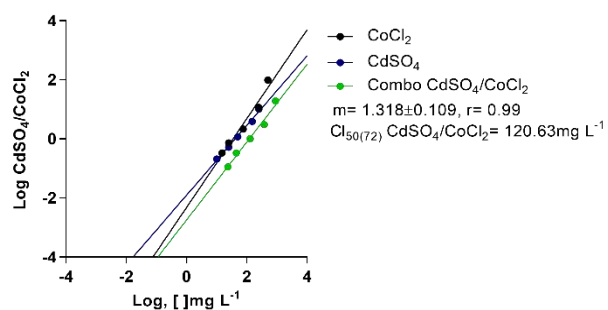
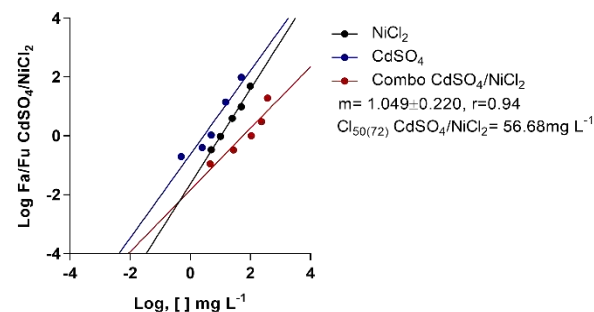
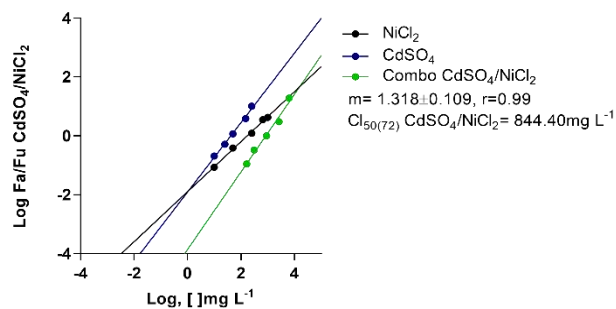
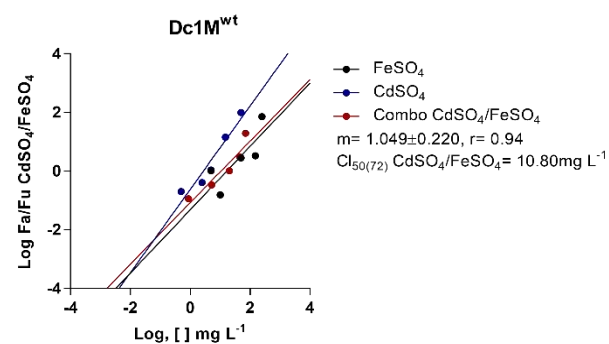
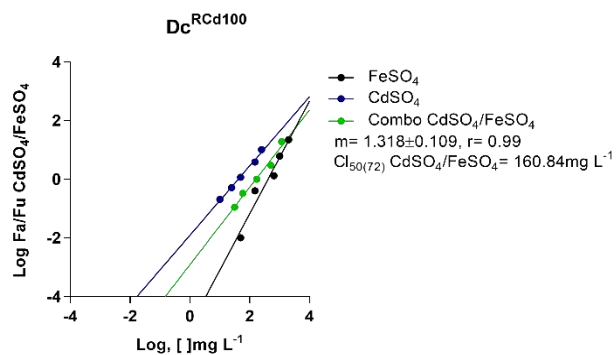


Gráfico 4.3.1. Principio de Efecto Medio (PEM) de las mezclas binarias metálicas con el Cd en Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt}. Se presentan los valores de las CI₅₀₍₇₂₎ de cada combinación binaria.

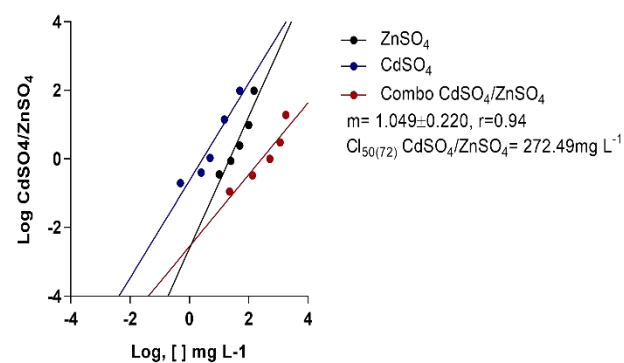
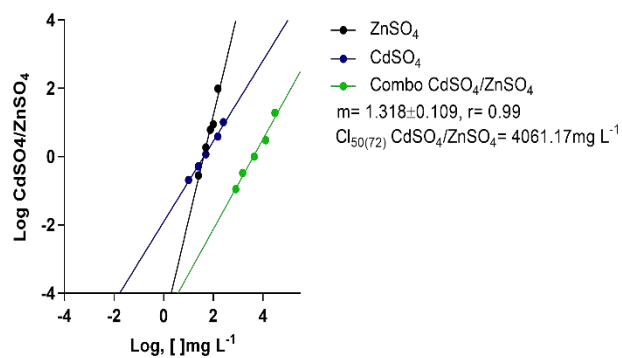
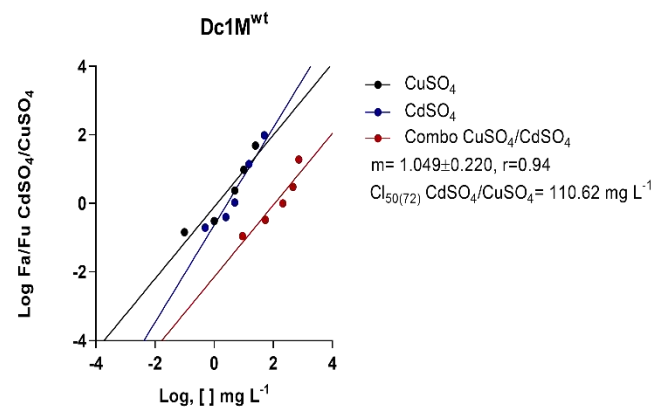
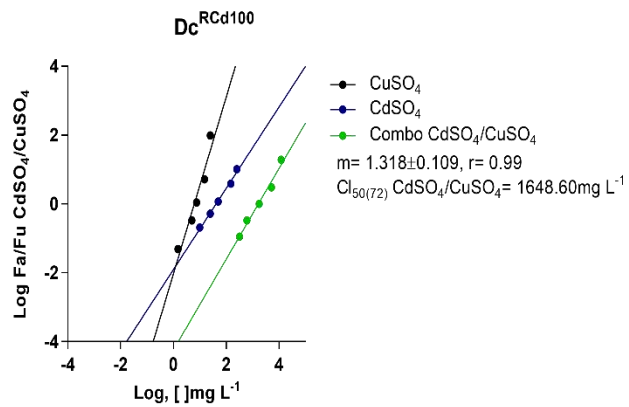


Gráfico 4.3.2. Principio de Efecto Medio (PEM) de las mezclas binarias metálicas con el Cd en Dc^{RCd100} vs. Dc1M^{wt}. Se presentan los valores de las $CI_{50(72)}$ de cada combinación binaria.

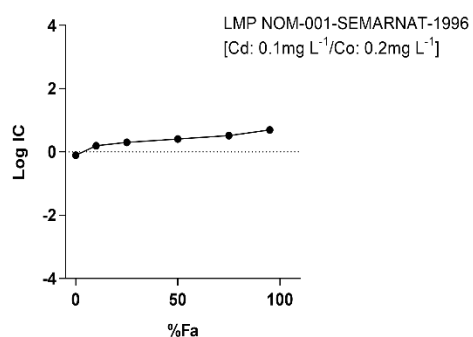
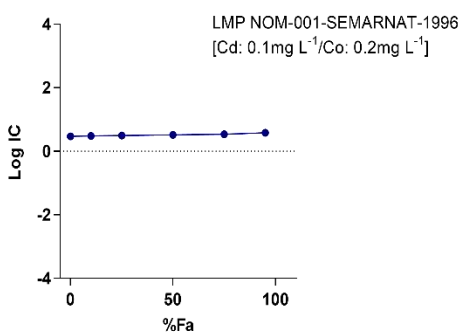
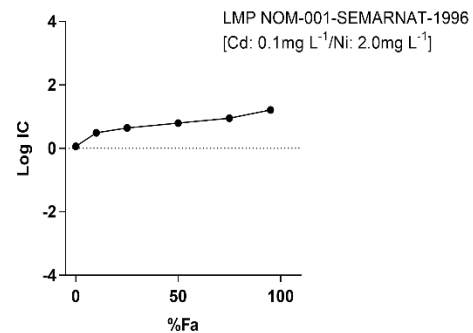
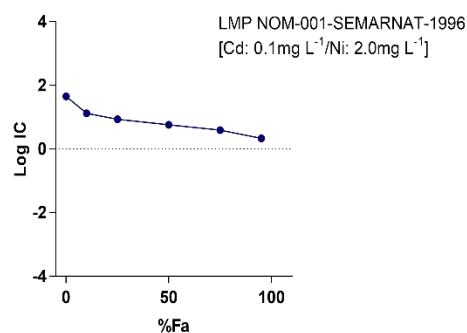
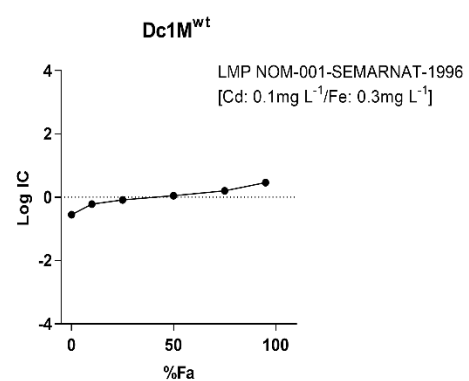
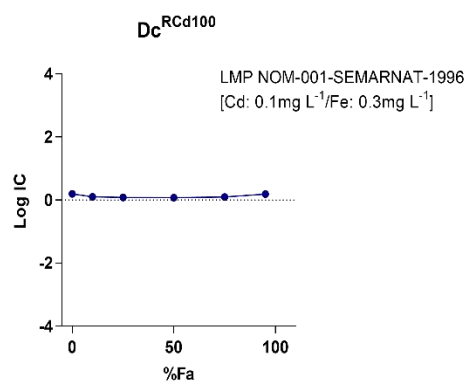


Gráfico 4.3.3. Relación Fracción afectada (Fa) - Índice de Combinación (IC) con respecto a los Límites Máximos Permisibles (LMP en mg L⁻¹) de metales en aguas residuales de la NOM-001-ECOL-1996 de las mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} (en azul) vs. Dc1M^{wt} (en negro).

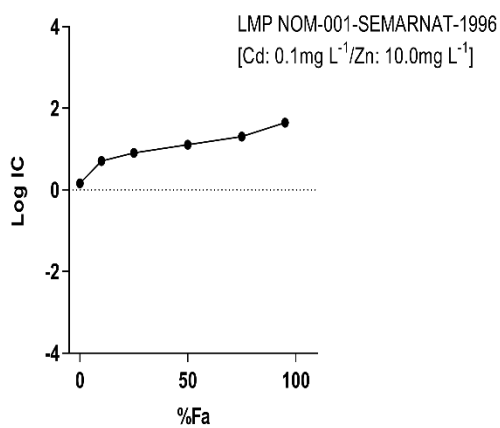
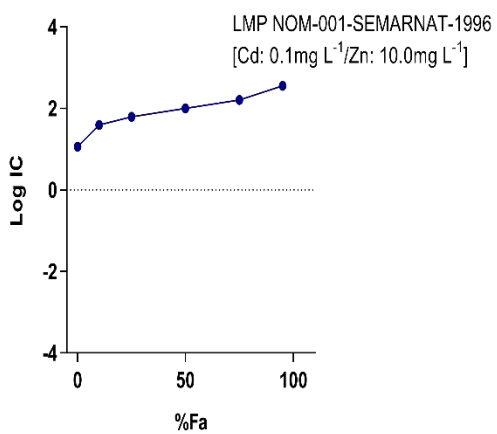
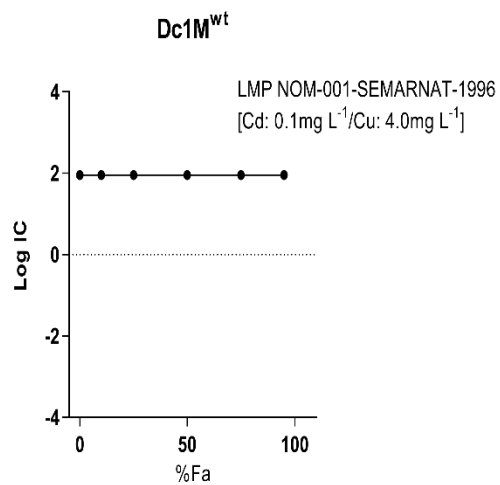
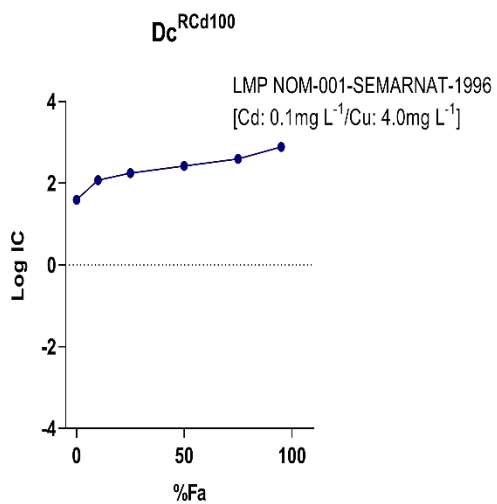


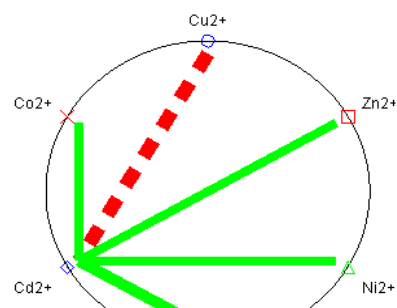
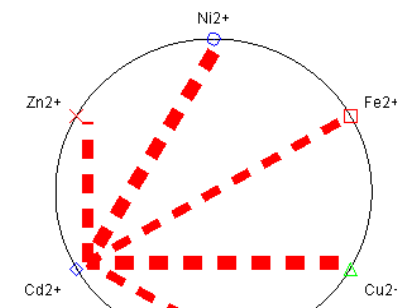
Gráfico 4.3.4. Relación Fracción afectada (Fa) - Índice de Combinación (IC) con respecto a los Límites Máximos Permisibles (LMP en mg L⁻¹) de metales en aguas residuales de la NOM-001-ECOL-1996 de las mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} (en azul) vs. Dc1M^{wt} (en negro).

% Fa

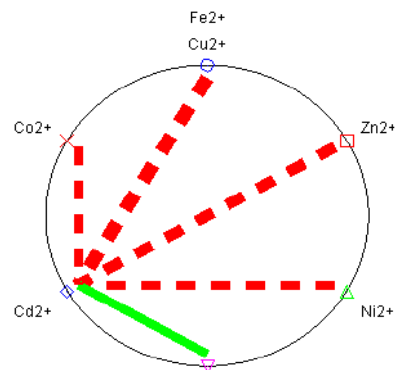
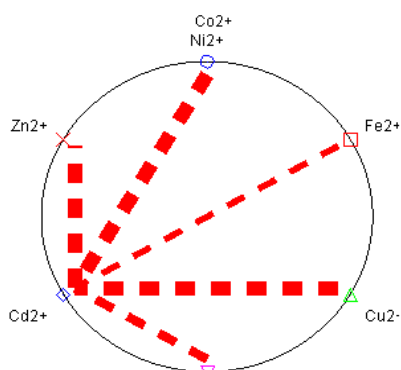
Dc^{RCd100}

Dc1M^{wt}

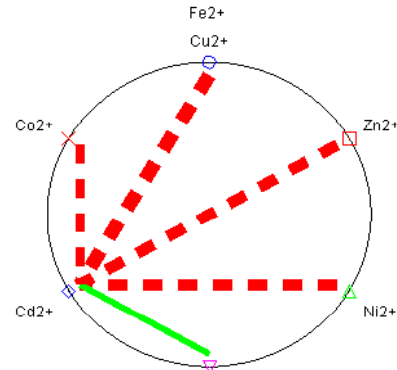
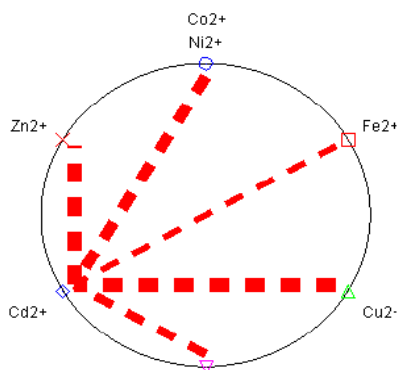
0.0



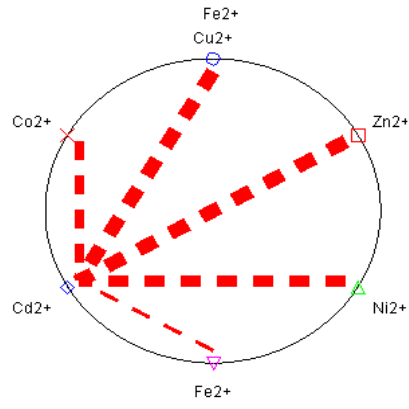
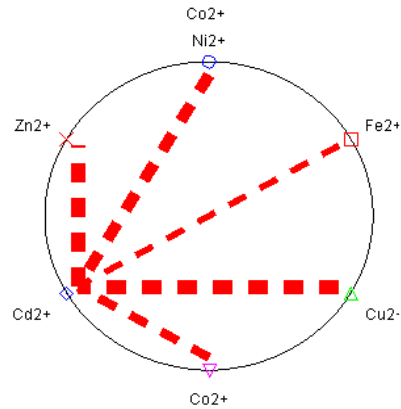
10.0



25.0



50.0



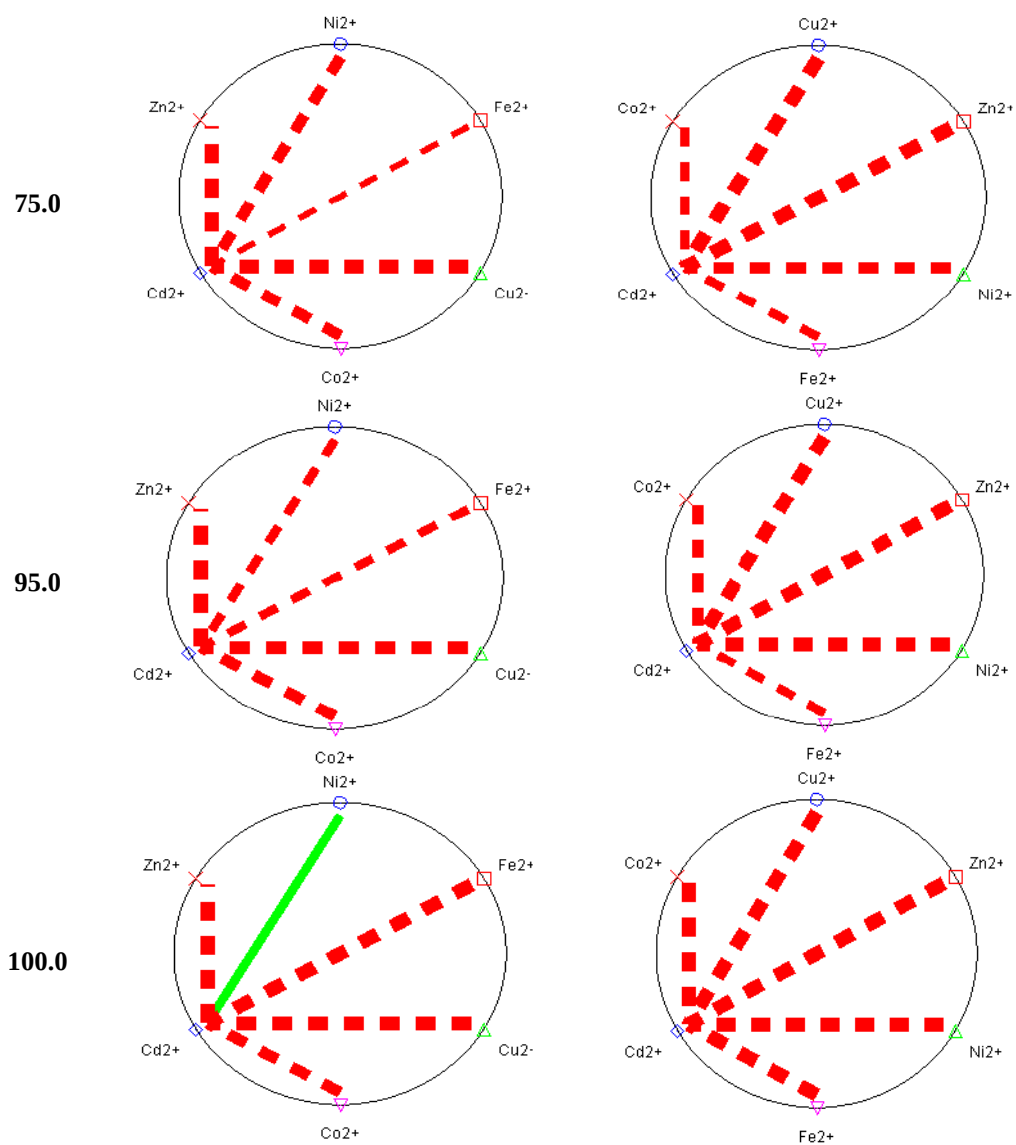


Gráfico 4.3.5. Poligonogramas de respuesta de inhibición de crecimiento al 0, 10, 25, 50, 75, 95 y 100% a las mezclas binarias metálicas con el Cd en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

4.3.2. Interacción con metales de carácter tóxico

4.3.2.1. Respuesta de forma individual en inhibición de crecimiento poblacional en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

Las respuestas en inhibición de crecimiento poblacional por la exposición de forma individual al segundo grupo de metales tóxicos seleccionados con respecto al Cd se muestran en la Tabla 4.3.3. La cepa Dc^{RCd100} de acuerdo con el orden en términos de sensibilidad de cada metal se da de la siguiente forma: $AgNO_3 > HgCl_2 > K_2Cr_2O_7 > CrCl_3 > CdSO_4$, y como se exhibe esta cepa fue altamente sensible a la exposición al ion Ag^+ con una $CI_{50(72)}$ de $8.20 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ con diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) con $Dc1M^{wt}$ con un valor de $CI_{50(72)} 1.00 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$.

Por otra parte, Dc^{RCd100} se comprobó que efectivamente su resistencia al Cd es de 5 veces mayor ($CI_{50(72)}$ de 50.00 mg L^{-1}) que la sensibilidad exhibida por la $Dc1M^{wt}$ ($CI_{50(72)} 11.57 \text{ mg L}^{-1}$, donde se partió para estimular la resistencia en Dc^{RCd100} equivalente a $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} ; $p < 0.0001$). Con respecto a su respuesta con Cr^{6+} derivado del $K_2Cr_2O_7$, Dc^{RCd100} fue incluso más sensible a este metal que la cepa nativa $Dc1M^{wt}$ como se muestra en la Tabla 4.3.3. No obstante, para el Cr^{3+} derivado de la sal $CrCl_3$, la $CI_{50(72)}$ de este ion para Dc^{RCd100} fue de $0.80 \text{ mg}_{Cr^{3+}} \text{ L}^{-1}$ contrastada con $Dc1M^{wt}$ de $0.62 \text{ mg}_{Cr^{3+}} \text{ L}^{-1}$ sin diferencias estadísticas por lo que para esta forma reducida del cromo la cepa Cd-resistente presenta una sensibilidad similar a la cepa nativa $Dc1M^{wt}$ por lo que, aunque esta forma es menos tóxica, Dc^{RCd100} no presentó tolerancia.

Continuando con las respuestas generadas por el mercurio inorgánico, Dc^{RCd100} a pesar de tolerar 3 veces más este metal en la $CI_{50(72)}$ ($p < 0.001$) con respecto a $Dc1M^{wt}$, no exhibe resistencia de forma individual al Hg^{2+} (Tabla 4.3.3).

Efectivamente, Dc^{RCd100} no fue resistente de forma individual a ninguno de los metales de carácter tóxico seleccionados, ya que al compararlos con la respuesta tanto en $CI_{50(72)}$ como en 72h-NOEC del $CdSO_4$ se presentan diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) como se observa en la Tabla 4.3.3. Mientras que, para $Dc1M^{wt}$ el orden de sensibilidad fue: $AgNO_3 > HgCl_2 > K_2Cr_2O_7 > CdSO_4 > CrCl_3$ compartiendo sensibilidades equivalentes en respuesta al Cr^{3+} con Dc^{RCd100} e incluso con el Cr^{6+} .

Tabla 4.3.3. $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC de los metales tóxicos de forma individual con respecto al Cd en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

$CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en $mg\ L^{-1}$ (L.C. al 95%) de los compuestos metálicos en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$			
n	Compuesto	Dc^{RCd100}	$Dc1M^{wt}$
8	$CdSO_4 \cdot 8H_2O$	$CI_{50(72)}$: $50.00mg\ CdSO_4\ L^{-1}$ (32.96-54.10) $^a 3.42mg\ Cd^{2+}\ L^{-1}$ $r = 0.99$ $y = 1.18x - 1.91$ 72h-NOEC$_{CdSO_4}$: 5.08 (2.83-7.56)	$CI_{50(72)}$: $11.57mg\ CdSO_4\ L^{-1}$ (5.10-16.22) *** $^a 0.79mg\ Cd^{2+}\ L^{-1}$ $r = 0.98$ $y = 1.42x - 0.63$ 72h-NOEC$_{CdSO_4}$: 1.40 (0.23-3.40)
8	$K_2Cr_2O_7$	*** $5.02mg\ K_2Cr_2O_7\ L^{-1}$ (3.48-6.95) $^a 0.28mg\ Cr^{6+}\ L^{-1}$ $r = 0.99$ $y = 1.53x - 1.01$ 72h-NOEC$_{K_2Cr_2O_7}$: 0.62 (0.24-1.10)	$11.02mg\ K_2Cr_2O_7\ L^{-1}$ (3.91-18.30) * $^a 0.62mg\ Cr^{6+}\ L^{-1}$ $r = 0.98$ $y = 1.55x - 1.31$ 72h-NOEC$_{K_2Cr_2O_7}$: 1.62 (0.04-4.34)
8	$HgCl_2$	*** $2.70mg\ HgCl_2\ L^{-1}$ (1.33-6.42) $^a 0.04mg\ Hg^{2+}\ L^{-1}$ $r = 0.97$ $y = 2.63x - 0.88$ 72h-NOEC$_{HgCl_2}$: 0.84 (0.01-1.56)	*** $0.74mg\ HgCl_2\ L^{-1}$ (0.58-0.90) ** $^a 0.01mg\ Hg^{2+}\ L^{-1}$ $r = 0.95$ $y = 1.03x - 0.57$ 72h-NOEC$_{HgCl_2}$: 4.3×10^{-6} (1.2×10^{-6}-0.003)
8	$AgNO_3$	*** $0.52mg\ AgNO_3\ L^{-1}$ (0.35-0.68) $^a 0.0082mg\ Ag^+\ L^{-1}$ $r = 0.95$ $y = 3.26x + 1.71$ 72h-NOEC$_{AgNO_3}$: 0.024 (0.009-0.14)	*** $0.0070mg\ AgNO_3\ L^{-1}$ (0.0043-0.011) *** $^a 1.10 \times 10^{-4}mg\ Ag^+\ L^{-1}$ $r = 0.99$ $y = 1.73x + 3.77$ 72h-NOEC$_{AgNO_3}$: 8.70×10^{-4} (2.70×10^{-4}-1.70×10^{-3})
8	$CrCl_3 \cdot 6H_2O$	*** $15.52mg\ CrCl_3\ L^{-1}$ (2.96-31.32) $^a 0.80mg\ Cr^{3+}\ L^{-1}$ $r = 0.95$ $y = 0.53x - 0.51$ 72h-NOEC$_{CrCl_3}$: 6.20×10^{-5} (3.30×10^{-5}-9.30×10^{-3})	$12.16mg\ CrCl_3\ L^{-1}$ (8.30-29.38) ns $^a 0.62mg\ Cr^{3+}\ L^{-1}$ $r = 0.95$ $y = 2.80x - 3.30$ 72h-NOEC$_{CrCl_3}$: 0.25 (2.60×10^{-4}-1.46)

, *: T-test no pareado, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$; $p < 0.0001$) en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

***: ANOVA de 1 vía, ($p < 0.0001$) en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ como control al $CdSO_4$ por Test de Dunnett

ns: sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$)

^a: Valores de $CI_{50(72)}$ de los iones metálicos (M^+) a partir de los compuestos metálicos

4.3.2.2. *Interacción metálica en mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$*

Las respuestas en interacción por mezclas binarias con el $CdSO_4$ de los metales seleccionados de acuerdo con los Límites Máximos Permisibles en $mg\ L^{-1}$ de metales presentes en aguas residuales y superficiales establecidos por la NOM-001-ECOL-1996 se muestran en la Tabla 4.3.4, Dc^{RCd100} en interacción con el Cd presentó el siguiente orden en términos de resistencia cruzada: $CdSO_4/K_2Cr_2O_7 > CdSO_4/CrCl_3 > CdSO_4/HgCl_2 > CdSO_4/AgNO_3$. A diferencia de su respuesta individual en exposición al $K_2Cr_2O_7$ y $CrCl_3$, Dc^{RCd100} aquí sí exhibió resistencia en presencia del Cd mostrando valores similares de $CI_{50(72)}$ de 241.26 y 200.45 $mg\ L^{-1}$, respectivamente. Esto puede suponer que los mecanismos moleculares que estimuló la resistencia al Cd en la cepa, aunque el Cr presente diferencias en su actividad tóxica, el Cd estimule la resistencia múltiple.

Al compararlo con la cepa tipo salvaje $Dc1M^{wt}$ con estos dos metales en interacción con Cd, se muestran diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) que incluso si se confronta con la sensibilidad individual en los valores de las $CI_{50(72)}$ se observan similitudes con las concentraciones tanto individual como en interacción binaria (Tabla 4.3.3 y Tabla 4.3.4). Así pues, $Dc1M^{wt}$ en la interacción del $CdSO_4/CrCl_3$ y con $K_2Cr_2O_7$, se presentaron los 3 tipos de respuesta, es decir, al 0% de respuesta (72h-NOEC= 1.50 y 1.46 $mg\ L^{-1}$, respectivamente) resultó en un IC de 0.19 y 0.43 como sinérgico, un $IC_{50\%}$ de 1.87 y 2.24 aditivo y antagónico y un $IC_{100\%}$ de 61.94 y 10.60 como respuesta antagónica (Gráfico 4.3.6H y Gráfico 4.3.7).

La resistencia cruzada en Dc^{RCd100} se expresa a través de una respuesta antagónica ($IC_{50\%}$ $CdSO_4/K_2Cr_2O_7$ = 16.89; $IC_{50\%}$ $CdSO_4/CrCl_3$ = 22.41), no obstante, conforme se incrementó en concentraciones de la combinación $CdSO_4/CrCl_3$ evolucionó a un sinergismo con un $IC_{100\%}$ de 0.55 como se muestra en el Gráfico 4.3.8. Mientras que, al valor correspondiente de la NOEC en mezcla se obtuvo una respuesta fuertemente antagónica ($IC_{0\%CdSO_4/CrCl_3}$ = 47066.90) expuesto en la Tabla 4.3.4, Gráfico 4.3.6G y Gráfico 4.3.7G. Este cambio en respuesta de interacción no sucede con la combinación de $CdSO_4/K_2Cr_2O_7$ el cual se mantiene antagónica a lo largo de los porcentajes de interacción metálica (Gráfico 4.3.7A y Gráfico 4.3.8).

Continuando con el orden de resistencia cruzada en Dc^{RCd100} , la interacción de $CdSO_4/HgCl_2$ de forma similar se traslada a un antagonismo ($IC > 1$) con una $CI_{50(72)}$ de 80.42 $mg\ L^{-1}$ y un $IC_{50\%}$ de 16.89 y se incrementa al aumentar la concentración de la combinación ($IC_{100\%}$ = 102.68) (Gráfico 4.3.6 y Gráfico 4.3.7C). Para $Dc1M^{wt}$ presentó una tolerancia al Hg inorgánico ($IC_{50\%}$ = 10.78) que

se induce en presencia al CdSO_4 ($\text{CI}_{50(72)} \text{ CdSO}_4/\text{HgCl}_2 = 5.40 \text{ mg L}^{-1}$; Tabla 4.3.4), respuesta que no comparte en forma individual ($\text{CI}_{50(72)} \text{ HgCl}_2 = 0.74 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabla 4.3.3, Tabla 4.3.4, Gráfico 4.3.6 y Gráfico 4.3.7D).

De igual forma, la respuesta en interacción del $\text{CdSO}_4/\text{AgNO}_3$ en $\text{Dc}^{\text{RCd}100}$ fue antagónica con una $\text{CI}_{50(72)}$ de 60.31 mg L^{-1} ($\text{IC}_{50\%} = 67.92$) con diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) que comparte con $\text{Dc}1\text{M}^{\text{wt}}$, incrementándose tal respuesta a concentraciones altas de la combinación en $\text{Dc}^{\text{RCd}100}$ ($\text{IC}_{100\%} = 536.67$) como se muestra en el Gráfico 4.3.7E y en los poligonogramas de respuesta del Gráfico 4.3.8, con diferencias en la exposición individual a la Ag que fue de alta sensibilidad (Tabla 4.3.4 y Gráfico 4.3.7E).

Por otra parte, en $\text{Dc}1\text{M}^{\text{wt}}$ igualmente el Cd generó una tolerancia a la Ag, si bien, aunque el valor de la $\text{CI}_{50(72)} \text{ CdSO}_4/\text{AgNO}_3$ de 4.05 mg L^{-1} es baja y aún que presente sensibilidad como se muestra en la pendiente que es análoga y paralela a la exposición individual del AgNO_3 con la combinación $\text{CdSO}_4/\text{AgNO}_3$ mostrada en las curvas de Concentración-Respuesta del Principio del Efecto Medio (PEM) del Gráfico 4.3.6F, no obstante, el $\text{IC}_{50\%}$ de 206.65 es elevado resultando en una respuesta altamente antagónica.

Tabla 4.3.4. Interacción metálica en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$ y valores de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC correspondientes a las mezclas binarias con el Cd

Interacción metálica del $CdSO_4$ con los compuestos metálicos en ambas cepas de <i>D. chlorelloides</i>						
Cepas de <i>D. chlorelloides</i>			Dc^{RCd100}		$Dc1M^{wt}$	
Mezcla	%Respuesta	^a LMP NOM-001-ECOL-1996 [mg L ⁻¹]	Índice de Combinación	^b $CI_{50(72)}$ Mezcla 72h-NOEC (L.C. 95%) mg L ⁻¹	Índice de Combinación	^b $CI_{50(72)}$ Mezcla 72h-NOEC (L.C. 95%) mg L ⁻¹
$CdSO_4/K_2Cr_2O_7$	0	[0.1:0.5]	26.82	***241.26 (166.34-342.77) 41.98 (19.45-69.02) r= 0.99 y= 1.32x-3.14	0.43	***16.19 (14.66-35.08)*** 1.46 (0.61-2.74) r= 0.94 y= 1.05x-1.27
	10		36.05		1.11	
	25		40.16		1.57	
	50		44.79		2.24	
	75		50.01		3.22	
	95		60.27		5.99	
	100		71.31		10.60	
$CdSO_4/HgCl_2$	0	[0.1:0.1]	3.42	***80.42 (55.46-114.29) 14.00 (6.49-23.01) r= 0.99 y= 1.32x-2.52	11.15	***5.40 (1.12-20.37)*** 0.60 (0.004-2.16) r= 0.94 y= 1.05x-0.77
	10		7.72		10.84	
	25		11.28		10.78	
	50		16.89		10.78	
	75		25.70		10.85	
	95		53.09		11.03	
	100		102.68		11.90	
$CdSO_4/AgNO_3$	0	[0.1:0.05]	7.64	***60.31 (41.59-85.70) 10.49 (4.87-17.26) r= 0.99 y= 1.32x-2.35	28.60	***4.05 (0.84-15.31)*** 0.45 (0.003-1.62) r= 0.94 y= 1.05x-0.64
	10		25.94		90.90	
	25		41.79		137.05	
	50		67.92		206.65	
	75		110.97		311.63	
	95		254.64		621.53	
	100		536.67		1152.51	
$CdSO_4/CrCl_3$	0	[0.1:0.5]	47066.90	***200.45 (138.36-285.76) 34.99 (16.22-57.54) r= 0.99 y= 1.318x-3.140	0.19	***13.46 (2.80-51.05)*** 1.50 (0.0091-5.40) r= 0.94 y= 1.049x-1.269
	10		248.96		0.81	
	25		73.94		1.21	
	50		22.41		1.87	
	75		7.19		3.00	
	95		1.57		7.24	
	100		0.55		61.94	

***: T-test no pareado, diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) correspondiente a las mezclas binarias de cada metal con el Cd en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

***: ANOVA 1 vía (Test de Tukey), diferencias estadísticas ($p < 0.0001$) entre los valores de $CI_{50(72)}$ en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

^a: Límites Máximos Permisibles en $mg\ L^{-1}$ (LMP) de metales en aguas residuales de acuerdo con NOM-001-SEMARNAT-1996

^b: Valores de $CI_{50(72)}$ en $mg\ L^{-1}$ resultante de las mezclas binarias con el Cd en Dc^{RCd100} y $Dc1M^{wt}$

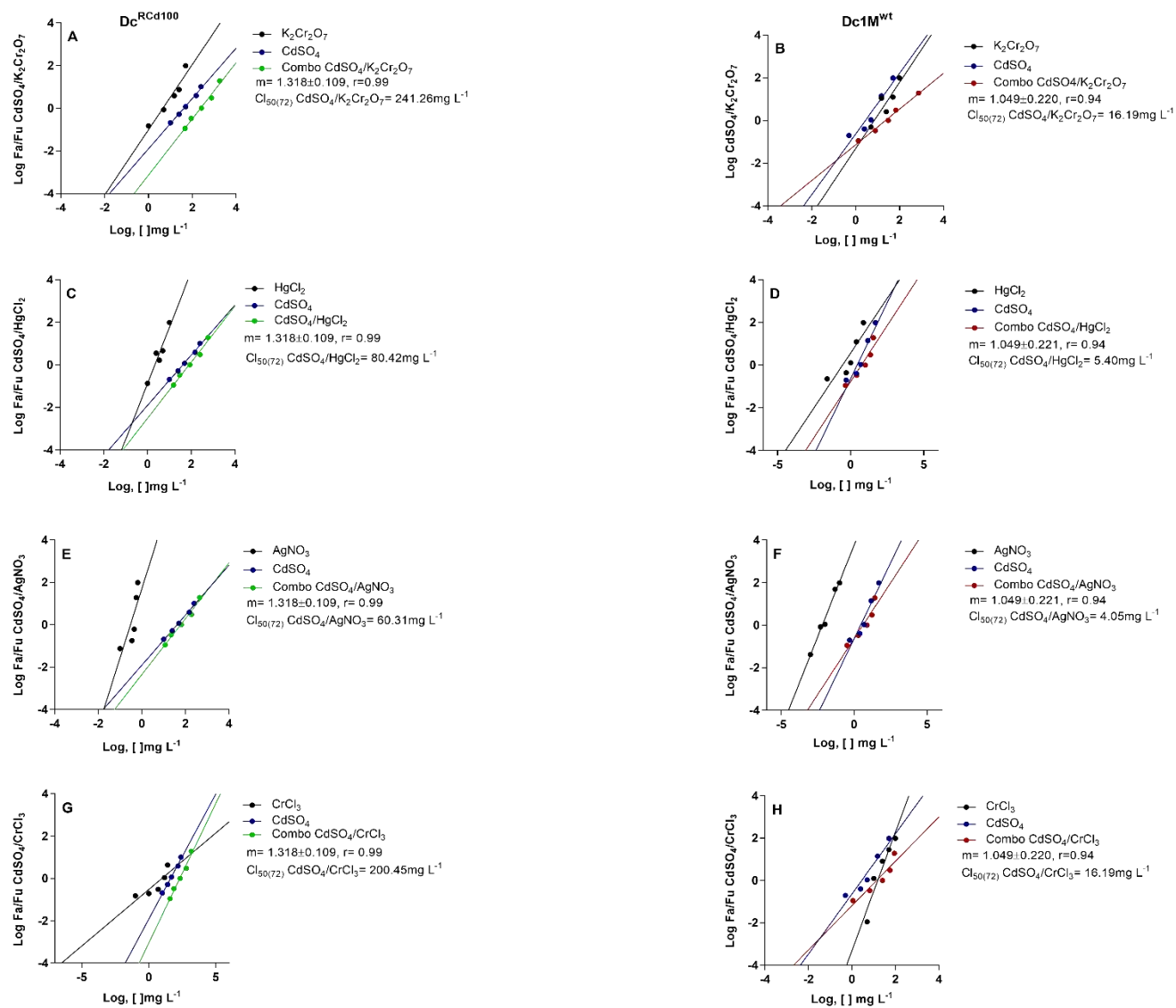


Gráfico 4.3.6. Principio de Efecto Medio (PEM) de la interacción binaria con el $CdSO_4$ en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

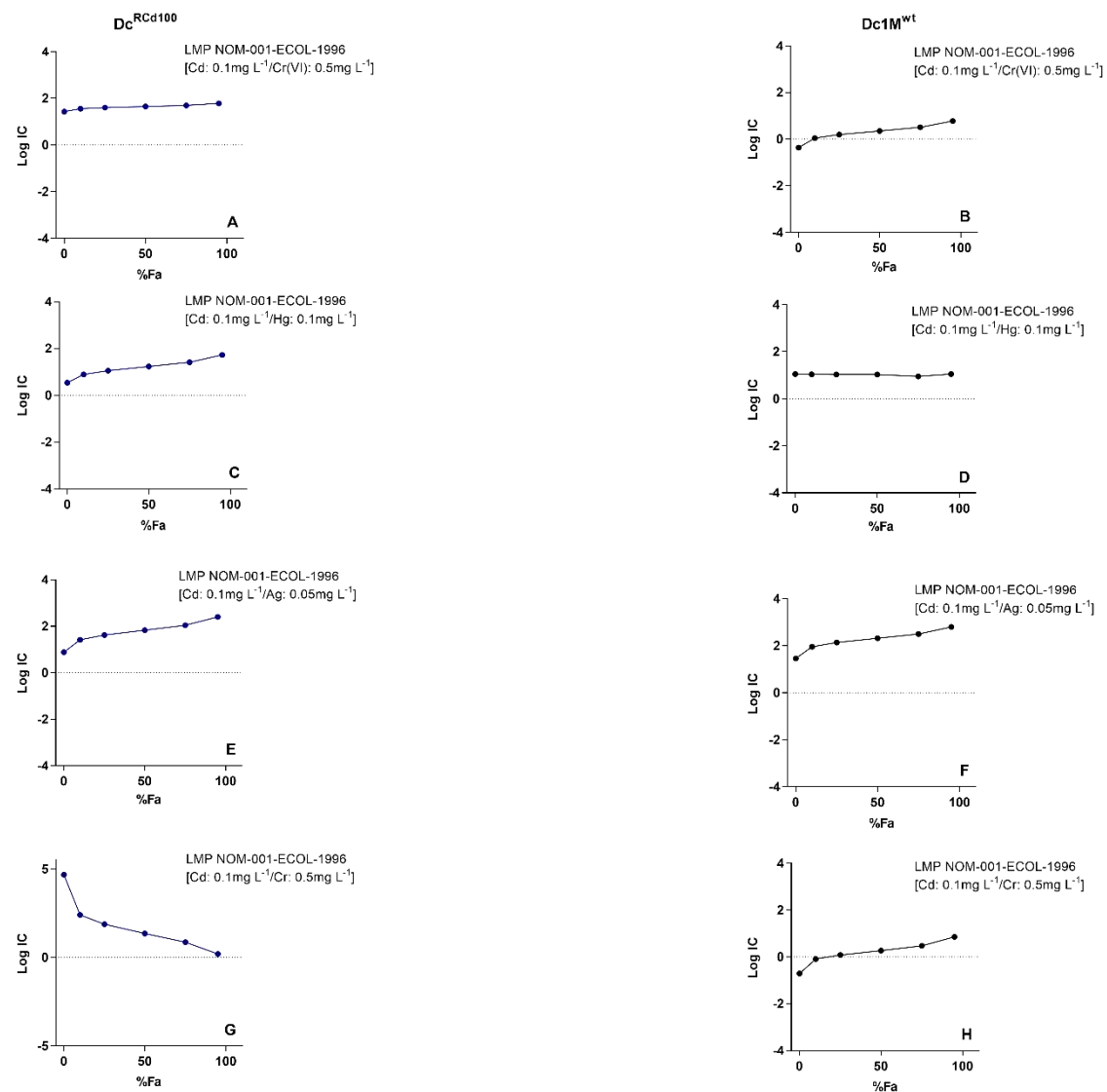


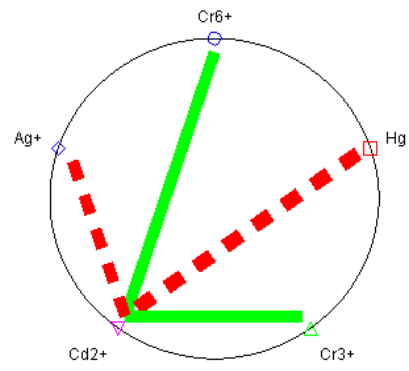
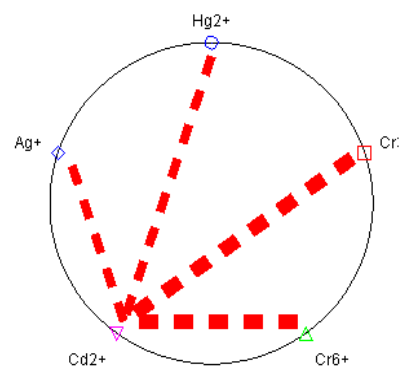
Gráfico 4.3.7. Curvas de Índice de Combinación (IC)-Fracción afectada (Fa) en interacción con CdSO₄ en Dc^{Rcd100} vs. $Dc1M^{wt}$

% Fa

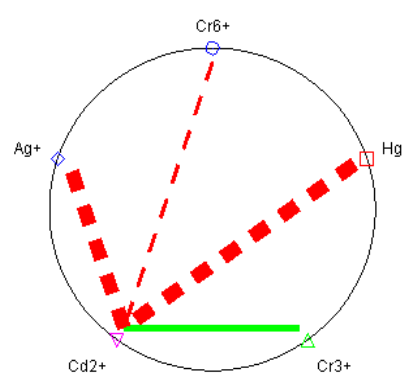
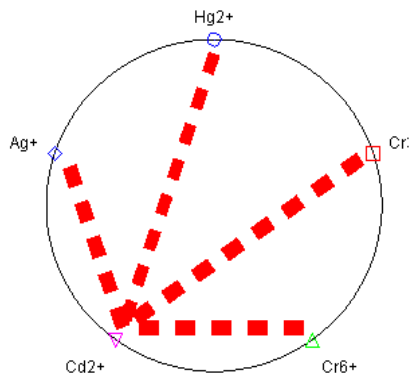
Dc^{RCd100}

Dc1M^{wt}

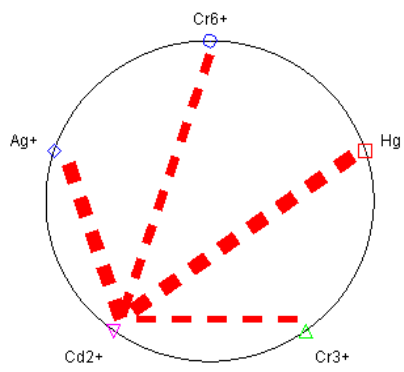
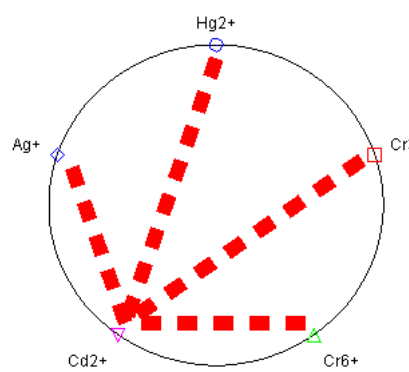
0.0



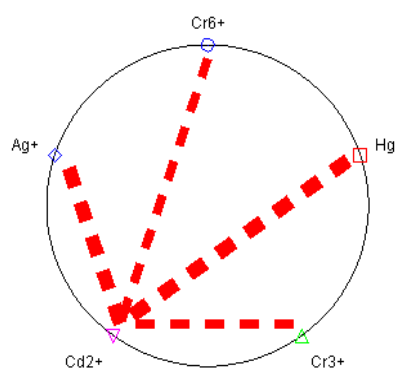
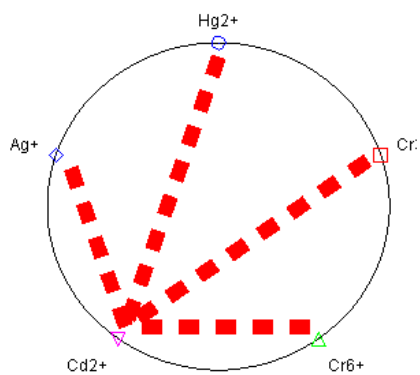
10.0



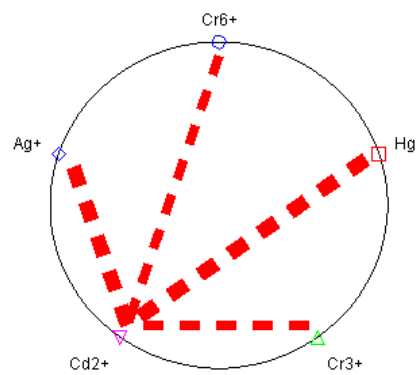
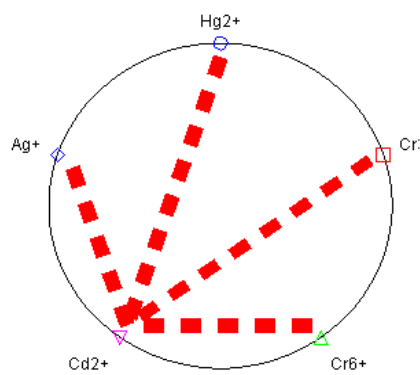
25.0



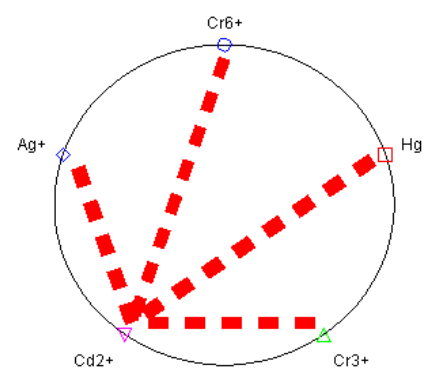
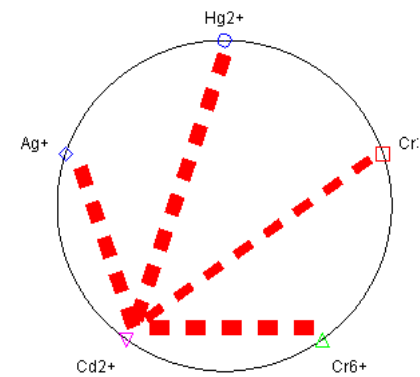
50.0



75.0



95.0



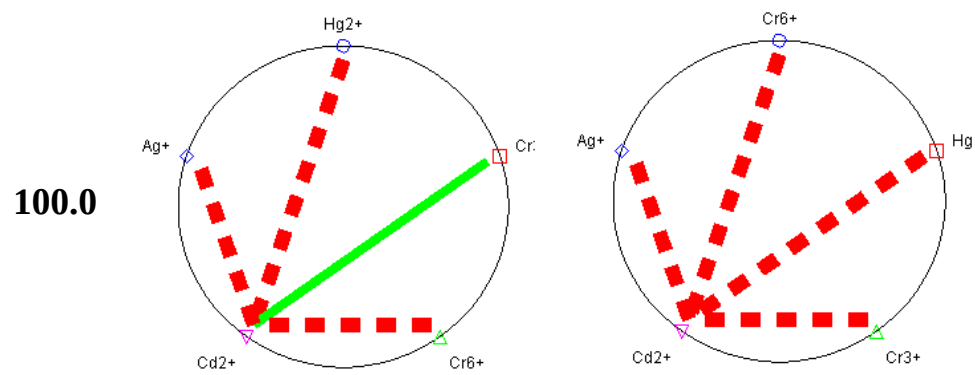


Gráfico 4.3.8. Poligonogramas de respuesta de la interacción metálica con el Cd en Dc^{RCd100} vs. $Dc1M^{wt}$

4.4. DISCUSIÓN

En la literatura científica, existen muy pocas investigaciones del comportamiento de cepas de microalgas resistentes a metales en interacción con otros contaminantes, esto es de suma importancia en el caso de que se presenten resistencias múltiples a más de un contaminante metálico. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que los metales son extremadamente tóxicos expuestos de forma individual sobre microalgas tanto *in vitro* como *in situ* con alteraciones sobre la fotosíntesis e inhibición de crecimiento (Knauer et al., 1999; Franklin et al., 2000; Lu et al., 2000; Knauert & Knauer, 2008; Baos et al., 2011). Por lo general, la secuencia en toxicidad individual en microalgas de los metales considerados tóxicos se da en el siguiente orden: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ag} > \text{Pb}$ (Ivanov et al., 2008).

Sin embargo, se pueden potenciar las respuestas tóxicas a través de sinergismo entre los metales incrementando el impacto ambiental de éstos, o por el contrario dos o más metales en interacción pueden actuar de forma antagónica (Shehata et al., 1999). Los cationes metálicos también pueden tener un efecto sinérgico en la captación de otro metal debido a la adsorción de un catión y facilitar la captación de otro probablemente debido a una mayor permeabilidad de la membrana celular (Fiore et al., 1998).

A principios de los 90's los estudios de Collard y Matagne fueron los pioneros en el aislamiento y la base en la identificación de cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* resistentes a Cd, los cuales reportaron mutaciones nucleares denominadas CadA^{R} y CadB^{R} que confieren la resistencia al Cd con posibles modificaciones a través de la reducción en la captación y adsorción del metal en la pared celular, inducción de una mayor síntesis de proteínas de unión a metales (las Met(III)), formación de complejos metálicos intracelulares insolubles, entre otros. Posteriormente, estos mismos autores indicaron que estas mutaciones (CadA^{R} y CadB^{R}) en *C. reinhardtii* confieren resistencia múltiple a otros metales como Zn, Cu, Ni, pero no al Co (Collard & Matagne, 1994). Años más tarde, Yoshida et al., 2006, identificaron y aislaron a una cepa de *Chlorella sorokiniana* resistente a Cd^{2+} con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 4 mM con mayor captación del mismo metal, pero también tolerante a Zn^{2+} y Cu^{2+} . Asimismo, al confrontar a la cepa de *C. sorokiniana* a la co-interacción de Zn^{2+} - Cd^{2+} , exhibió una alta selectividad al Cu^{2+} indicando entonces que el orden de selectividad fue de $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

En el 2007, Nacorda et al., aislaron dos cepas de *Chlorella vulgaris* de la Laguna de Bay en Filipinas (WB y SB) con resistencia múltiple a Cd, Cr, Pb y Cu; el orden de resistencia en WB resultó ser más resistente al Cd^{2+} ($\text{CE}_{50(12\text{d})}$ de 2.50 mg L^{-1}) $> \text{Cr}^{6+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$; para SB fue $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ ($\text{CE}_{50(12\text{d})}$ 1.85 mg L^{-1}) $> \text{Cr}^{6+} > \text{Cu}^{2+}$. Además, presentaron la remoción de los metales después de 12 días de exposición con modificaciones morfológicas en volumen celular, alteraciones en los pirenoides y cloroplastos. En este mismo año, Pawan, (2007), realizó una comparación entre una cepa de *Chlorella* sp. resistente a Ni (EMS-5) y una cepa tipo salvaje (WT) en la adsorción y los efectos del níquel, obteniendo un 25% más de tasa de crecimiento en la cepa EMS-5 con respecto a la WT ($\text{CI}_{50} \text{ Ni}^{2+}$ $45\mu\text{M}$ y $30\mu\text{M}$, respectivamente), además, la cepa EMS-5 demostró ser altamente eficaz en la remoción del 92% de Ni a una concentración en el medio de $50 \mu\text{M}$ de Ni^{2+} a los 15min. de exposición en el medio de cultivo. De igual forma, la cepa EMS-5 presentó mayor acumulación del Ni^{2+} a las 48h de exposición en la pared celular como en el interior de la célula 2 veces más que la cepa WT (5.01 y $3.83 \mu\text{M Ni}^{2+} 10^9 \text{ cel}^{-1}$, respectivamente).

En este contexto, el trabajo clave y que nuestro proyecto le da continuidad a este complejo conjunto de estudios en la cepa $\text{Dc}^{\text{RCd100}}$, es el realizado por Bartolomé et al., (2016), en este estudio se reporta que la cepa Cd-resistente tiene una elevada capacidad de remoción del Cd en un 90%, del cual el 70% se acumuló en la pared celular. Otro de los estudios base para el presente proyecto es el realizado por D'ors et al., (2016) sobre una cepa Cr^{6+} -resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides* ($\text{Dc}^{\text{RCr(VI)25}}$) comparada con la tipo salvaje de Dc1M^{wt} expuestas en un principio de forma individual a los metales Ag^+ , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} en el rendimiento cuántico del Fotosistema II (Φ_{PSII}) obteniendo el siguiente orden de toxicidad en ambas cepas: $\text{Ag}^+ > \text{Co}^{2+} > \text{Hg}^{2+} \gg \text{Cr}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Cd}^{2+}$ manteniendo una sensibilidad similar con Dc1M^{wt} , excepto con el Zn presentando diferencias significativas con Dc1M^{wt} ($\text{CI}_{50(72)\Phi_{\text{PSII}}}$ 8.57 y 6.13 mg L^{-1} en $\text{Dc}^{\text{RCr(VI)25}}$ y Dc1M^{wt} , respectivamente). En segundo lugar, establecieron sobre la interferencia en la actividad fotosintética en Φ_{PSII} interacciones binarias del Zn^{2+} con Cr^{6+} , Ag^+ , Cr^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} utilizando el Índice de Combinación de Chou & Talalay, 1984 y Chou, (2006), obteniendo respuestas antagónicas bajas en un rango del Índice de Combinación de 1 a 3 ($\text{IC} > 1$) al 10, 50 y 90% en $\text{Dc}^{\text{RCr(VI)25}}$.

No obstante, en nuestro estudio se determinó la exposición a través de su respuesta en inhibición de crecimiento poblacional a través de la CI_{50} a las 72h de exposición. De acuerdo con los

resultados de la actual investigación, se reporta que la cepa Cd-resistente Dc^{RCd100} expuesta de forma individual en inhibición de crecimiento poblacional es altamente resistente al $\text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, y en menor medida al $\text{Co}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$, pero no al Hg^{2+} ni a la Ag^+ . Mientras que, para la cepa control Dc1M^{wt} el orden de sensibilidad se manifestó de la siguiente manera: $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Cd}^{2+}$ y con tolerancia a Cr^{3+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} .

Según Shehata et al., (1999), en un estudio sobre varias microalgas (cepas tipo salvaje) como *Chlorella vulgaris*, *Oscillatoria mougeotii* y *Scenedesmus quadricauda* después de una exposición a largo plazo a la concentración de metales de 0.05 mg L⁻¹ de Cd, 0.1 mg L⁻¹ para Zn, Cu, Cr y Ni, mostraron la capacidad de tolerancia múltiple y acumulación en el siguiente orden: $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cr}^{6+}$.

Sin embargo, para interacciones binarias, en la mezcla de Zn/Cd Dc^{RCd100} es altamente resistente al Zn con respuesta altamente antagónica ($\text{CI}_{50(72)\text{Cd/Zn}} = 4061.17 \text{ mg L}^{-1}$ con $\text{IC}_{50\%}$ de 100.80) que se intensifica. Asimismo, nuestra cepa control de Dc1M^{wt} esta interacción presentó tolerancia al exhibir antagonismo que incrementa al aumentar el porcentaje de respuesta ($\text{CI}_{50(72)\text{Cd/Zn}} = 272.49 \text{ mg L}^{-1}$ con un $\text{IC}_{50\%}$ de 12.86). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wong et al., 2010, el Zn incrementa la expresión y síntesis de metalotioneínas de clase III y de transportadores específicos que también utiliza el Cd, debido a las características fisicoquímicas similares que comparten ambos metales, se genera competencia entre ambos cationes metálicos por lo que su respuesta en interacción es antagónica.

Así pues, retornando al estudio de D'ors et al., (2016), la interacción binaria del Cd^{2+} y Zn^{2+} en Φ_{PSII} exhibió una baja respuesta antagónica con un $\text{IC}_{10, 50, 90\%}$ de 2.25, 2.01 y 1.81, respectivamente. A principios de los 80's, se evaluó la interacción de Cd/Zn resultando en competitividad iónica como respuesta antagónica en la cianobacteria *Anacystis nidulans* cepa IU 625 (Singh & Yadava, 1983).

Por otra parte, acorde con el trabajo realizado por Pawlik-Skowrońska, (2003), en exposición por 8 días a 15 μM de Zn sobre dos cepas de Zn-tolerante (*S. tenue* (T)) y Zn-sensible (*S. tenue* (S)) de la clorofícea *Stigeoclonium tenue*, reportó elevada toxicidad para *S. tenue* (S) con una reducción del 50% en el contenido de *Chl*, mientras que, para la *S. tenue* (T) se redujo solo el 10% del contenido de *Chl*. No obstante, en este mismo estudio se estimó que la cepa Zn-tolerante al ser expuesta a 10 μM de Pb derivado del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y a 15 μM de Zn como $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, presentó la capacidad de entre 2 y 4 veces mayor acumulación de forma intracelular de ambos metales que con

respecto a la cepa sensible, es decir, la cepa *S. tenue* (T) presentó co-tolerancia en acumular al Pb en presencia del Zn. Además, se indicó que la cepa Zn-tolerante presentó la compartimentación del metal a través de depósitos en vacuolas como un mecanismo de resistencia.

En el 2008, Kalinowska y Pawlik-Skowrońska, aislaron diferentes especies de microalgas de las clases Chlorophyceae y Trebouxiophyceae: *Dictyococcus* cf. *varians* Gerneck em. Starr resistente a Zn y Pb, *Stichococcus minor* Nägeli y *Chlamydomonas boldii* Ettl co-resistentes a Cu, Zn y Pb. No obstante, estas microalgas fueron aisladas de balsas o lodos residuales contaminados con elevadas concentraciones de estos metales (17,200–18,400 mg Zn kg⁻¹, 3017–6566 mg Pb kg⁻¹ y 1420 mg Cu kg⁻¹), por lo que estas microalgas presentaban pre-adaptación metálica. Posteriormente, Massocato et al., (2018) determinaron la tolerancia a Zn, Mn y Ni que presenta la clorofícea filamentosa *Ulothrix* sp. cepa LAFIC 010, indicando que la tolerancia al Mn y Ni fue influenciada por la presencia de Zn, además, la interacción de los tres metales incrementó la presencia de gránulos electro densos en la pared celular.

Continuando con los resultados obtenidos en la interacción binaria de Cd/Cu en Dc^{RCd100} resultó en respuesta altamente antagónica (IC_{50%}= 263.82) magnificándose a respuestas y/o concentraciones elevadas (IC_{95%}= 588.02) sugiriéndose una resistencia múltiple al Cu que se intensifica con Cd. Para la cepa control (Dc1M^{wt}) esta combinación también resultó en antagonismo que se mantiene a lo largo de los porcentajes de respuesta (IC_{50 y 95%}= 90.05 y 90.95) con capacidad de tolerancia al Cu en presencia del Cd. En este contexto, Visviki y Rachlin, (1991) estudiaron la acción tóxica y la interacción del Cd y Cu en *Dunaliella minuta* (alelo tipo salvaje) en exposición a las 96h indicando que su combinación tiene una respuesta antagónica, además, la exposición a bajas concentraciones de ambos (7.57 µM Cu y 0.34 µM para Cd) presentó co-tolerancia a éstos. De acuerdo con Vasconcelos y Leal, (2001) la presencia de Cd y Pb afectan la captación de Cu en *Emiliana huxleyi* a través de interacciones antagónicas a 10 días de incubación. En este mismo estudio, se demostró que elevadas concentraciones de Cd (400 pM a 10 días de exposición) promueven la liberación de exudados principalmente de compuestos similares al glutatión con la consecuente quelación metálica.

Más tarde, Wei et al., (2003) estimaron en varios géneros de microalgas marinas (cepas sensibles) como *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1335), *Skeletonema costatum* (CCMP 1332) y *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320) las interacciones de Cd, Cu y Zn en exposición a 48h sobre la síntesis de fitoquelatinas PC's (metalotioneínas), estableciendo en *T. pseudonana* la mezcla de Cd/Zn

disminuye la síntesis de PC's reflejando antagonismo, al contrario de esta respuesta la adición de Cd/Cu fue sinérgica con incremento en la síntesis de PC's, y la mezcla de los 3 en esta microalga se produjo antagonismo. Para *D. tertiolecta* se presentó respuesta aditiva a la presencia de Cd/Cu en síntesis de PC's, mientras que para la mezcla de los tres metales fue antagónica; estas respuestas fueron similares en *S. costatum*. Por otro lado, Ilango et al., (2008) investigaron la respuesta de las interacciones de Cd/Cu, Cd/Zn y Cd/Cu/Zn sobre *Chlorella pyrenoidosa* (alelo tipo salvaje) a los 7 días de exposición, determinando que la interacción de Cd/Cu actuó de forma sinérgica en la inhibición de la síntesis de *Chl*, no obstante, la mezcla de Cd/Cu/Zn, el Zn antagonizó los efectos tóxicos de Cd y Cu; además, se incrementó la síntesis de RuBisCO en las tres interacciones.

Siguiendo el orden de resistencia múltiple para Dc^{RCd100} , en la interacción Cd/Ni inició en antagonismo y finalizó en una moderada adición ($IC_{0\%}$ y $100\% = 44.79$ y 1.36 , respectivamente) a pesar de que su $CI_{50(72)}$ de la mezcla fue elevada de 844.40 mg L^{-1} . En $Dc1M^{wt}$ exhibió tolerancia al Ni en presencia del Cd, iniciando en adición a bajos porcentajes de respuestas y antagónico a elevados ($IC_{0\%}$ y $100\% = 1.15$ y 27.52 , respectivamente). Esta interacción concuerda con lo reportado por Mo et al., (2016) los cuales utilizaron también el Índice de Combinación en la mezcla de Cd/Ni sobre cepas sensibles de *Chlorella pyrenoidosa* y *Selenastrum capricornutum* con valores de IC de 3.5 a 0.0, es decir, respuestas antagónicas en baja respuesta y sinérgico en altos porcentajes de respuesta. Posteriormente, estos mismos autores, evaluaron la toxicidad de la mezcla Cd/Ni en *Chlorella pyrenoidosa* (cepa tipo salvaje) esta vez utilizando el Concepto de Concentración Aditiva (CA), indicando adición a bajos efectos y sinergismo a elevados efectos (Mo et al., 2017).

Por otro lado, Nagai & Schamphelaere, (2016), determinaron el efecto de la interacción de mezclas binarias de Zn, Ni, Cu y Cd en la diatomea *Navicula pelliculosa* obteniendo una respuesta antagónica en las interacciones de Cd/Ni, Zn/Cu, Cu/Ni, Cd/Zn y Cd/Cu y la mezcla de Zn/Ni como sinérgica. Estos mismos autores sugieren que la interacción Cd/Ni al resultar antagónica, el mecanismo que parece estar implicado es que el Cd^{2+} altera el transporte de Ni^{2+} al interior de la célula, posiblemente como mecanismos de competencia entre los dos cationes.

Anteriormente, otra de las investigaciones realizadas en *Chlorella* sp. sobre la tolerancia y la captación de Cd y Ni, esta microalga (10^6 cel ml^{-1}) removi6 del medio de cultivo con una concentración de $5\mu\text{g ml}^{-1}$ de Cd^{2+} y Ni^{2+} a los 28 días de exposición entre 96% y 94%, respectivamente, presentando co-tolerancia a ambos (Rehman & Shakoori, 2004). En este mismo año, Awasthi y Rai, (2004) evaluaron la capacidad de adsorción de Ni, Cd y Zn en la cianobacteria

Anacystis nidulans y en dos clorofíceas *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris* (cepas sensibles), así como la interacción de los tres metales, obteniendo que en la interacción de Ni/Zn en los tres géneros se presentó una elevada adsorción y un efecto antagónico en la toxicidad de ambos, estimando que el Ni inhibe la adsorción del Zn, para la interacción de Cd/Ni se obtuvo que el Cd fue mayormente adsorbido que el Ni con respuestas sinérgicas y antagónicas, y para la mezcla de Zn/Cd a pesar de que el Cd fue mayormente adsorbido, la respuesta se tradujo en antagónica.

La interacción de Cd/Cr⁶⁺ en Dc^{RCd100} mostró un comportamiento antagónico que se mantiene (CI₅₀₍₇₂₎ Cd/Cr⁶⁺ de 241.26 mg L⁻¹ e IC_{50%} de 44.79) mostrando una multiresistencia a Cr⁶⁺. La cepa Dc1M^{wt} en esta interacción presentó las tres respuestas: sinergismo a la NOEC, adición a respuestas bajas y antagonismo a elevados porcentajes de respuesta (IC_{0, 10 y 100%} = 0.43, 1.11 y 10.60, respectivamente). La respuesta antagónica podría deberse a la reducción del Cr⁶⁺ a Cr³⁺, según Zhitkovich, (2011), esta forma reducida del cromo presenta una reducida toxicidad debido a una baja solubilidad y su incapacidad de internalizarse a la célula, su baja acumulación y elevada estabilidad en unión a compuestos dentados o a grupos funcionales (por ejemplo, NH⁻, COO⁻, (COO₂)²⁻), no obstante, esto se contradice cuando Dc^{RCd100} expuesta de forma individual al Cr⁶⁺ es altamente sensible (CI₅₀₍₇₂₎ K₂Cr₂O₇ = 5.02 mg L⁻¹) e incluso más sensible comparada con Dc1M^{wt} (CI₅₀₍₇₂₎ K₂Cr₂O₇ = 11.02 mg L⁻¹). Por otro lado, Barrera-Díaz et al., (2012) indican que la reducción del Cr⁶⁺ a Cr³⁺ se forman especies reactivas de oxígeno (ROS) como O₂^{•-}, OH^{•-}, H₂O₂^{•-} lo que incrementa el estrés oxidativo y la formación de aductos con el DNA. Anteriormente, Dive et al., (1989) estudiaron las interacciones entre Ni, Cd, Cu, Cr⁶⁺ y Zn en el protozoario *Colpidium campylum* mostrando respuestas aditivas entre Ni, Cu y Cr⁶⁺, sinérgico en Cu/Cd y Ni/Cr⁶⁺, y fuertemente antagónica entre Ni/Cd.

Posteriormente, D'ors et al., (2010) evaluaron sobre una cepa Cr(VI)-resistente de *Dictyosphaerium chlorelloides* (Dc^{RCr(VI)25}) las alteraciones sobre el rendimiento cuántico fotosintético del PSII (Φ_{PSII}) expuesta a Cr³⁺ y Cr⁶⁺ derivados del CrCl₃, K₂Cr₂O₇ y K₂CrO₄ resultando en valores de CI₅₀₍₇₂₎ de 13.06, 161.32 y 2573.59 mg L⁻¹, respectivamente, mientras que para la cepa control Dc1M^{wt} sus valores en CI₅₀₍₇₂₎ fueron 17.34, 8.87 y 12.36 mg L⁻¹, siendo Dc^{RCr(VI)25} altamente resistente al Cr(VI) pero no al Cr³⁺ con una sensibilidad similar a Dc1M^{wt}. Regresando a la investigación realizada por Mo et al., (2016), la respuesta de interacción Cd/Cr⁶⁺ en *Chlorella pyrenoidosa* y *Selenastrum capricornutum* (cepas sensibles) en inhibición de crecimiento poblacional se manifestó como sinérgica y antagónica (IC de 0.5 a 2.5) en C.

pyrenoidosa, al contrario de *S. capricornutum* como respuesta completamente sinérgica (con valores en IC de 0.0 a 0.5), indicando que esta respuesta se debe a un incremento en la concentración de Cr a medida que el Cd disminuyó de forma gradual. Un año más tarde, estos mismos autores realizaron la interacción de Ni-Cr⁶⁺ en *Chlorella pyrenoidosa* a las 96h de exposición presentando un efecto aditivo (Mo et al., 2017).

Sin embargo, la exposición del Cr³⁺ en Dc^{RCd100} de forma individual fue sensible, respuesta que comparte con Dc1M^{wt} (CI₅₀₍₇₂₎ de 0.80 y 0.62 mg Cr³⁺ L⁻¹, respectivamente). No obstante, en la interacción de Cd/Cr³⁺ en Dc^{RCd100} fue altamente antagónica en la NOEC y sinérgico al 100% de respuesta (IC_{0 y 100%}= 47066.90 y 0.55, respectivamente) con resistencia múltiple a bajos niveles de respuesta, pero sensible a elevadas concentraciones de Cd y Cr³⁺; para la cepa control Dc1M^{wt} el comportamiento de la interacción fue contraria, primero inició en sinergismo, pasó por adición y terminó en antagonismo (IC_{0, 50 y 100%}= 0.19, 1.87 y 61.94, respectivamente).

En comunidades del perifiton acuático (conjunto complejo de microorganismos que comprenden a bacterias, microalgas, hongos y protozoos embebidos en una matriz de polisacáridos) colectados del Río Monjolinho en Brasil, Bere et al., (2012) evaluaron los efectos de interacción entre Cr³⁺, Pb y Cd encontrando que la interacción de Cr/Pb reducen la toxicidad del Cd y los niveles de quelación del Cd por el perifiton expuesto a 7 días. En el 2013, Pereira et al., evaluaron la inhibición de crecimiento poblacional de una cepa Cr³⁺-resistente (Dc^{RCr(III)30}) de *D. chlorelloides* en exposición del CrCl₃ obteniendo una CI₅₀₍₇₂₎ de 1883.65 mg L⁻¹ frente al valor mostrado en Dc1M^{wt} de 53.58 mg L⁻¹, mostrando elevada resistencia al metal al cual se indujo la adaptación. Para D'ors et al., (2016), la interacción de Zn/Cr³⁺ en Dc^{RCr(VI)25} exhibió una reducida respuesta antagónica que se mantiene constante (IC_{10, 50 y 90%}= 2.01, 1.98 y 1.95) en respuesta al Φ_{PSII}.

Sin embargo, la interacción entre Cd/Fe²⁺ en Dc^{RCd100} resultó más tóxica con respuesta aditiva (CI_{50(72)Cd/Fe}= 160.84 mg L⁻¹ e IC_{50%}= 1.20) que la exposición individual (CI₅₀₍₇₂₎= 348.34 mg L⁻¹) con una reducción en la resistencia de hasta 3 veces más que de forma individual. De igual forma, para Dc1M^{wt} esta interacción también mostró mayor toxicidad con sinergismo a bajos niveles de respuesta, mientras que a altos un bajo antagonismo (IC_{0 y 100%}= 0.28 y 5.36). Esto concuerda con lo reportado por Siedlecka & Krupa, (1996), la interacción del Cd/Fe presenta una respuesta sinérgica en incrementar la inhibición de la actividad fotosintética denominado **“efecto de multiplicación”** con respuestas elevadas en la reducción de síntesis de Chl, incremento de la

actividad peroxidasa y estrés oxidativo, alteraciones sobre el PSII y el centro colector de luz del PSII, reducción en los niveles de plastoquinona (PQ), ATP por inhibición de la ATPasa, reducción en la actividad de la RuBisCO, entre otros (Siedlecka & Krupa, 1996).

No obstante, la presencia del Fe afecta la captación y toxicidad de otros metales en ciertas especies de microalgas, como es el caso de la cianobacteria *Anabaena doliolum* cepa tipo salvaje, el Fe muestra un efecto protector frente a la toxicidad de Cu y Ni (Mallick & Rai, 1989). Asimismo, Siedlecka & Krupa, (1999) reportaron que en presencia de elevadas concentraciones de Cd alteran la captación y transporte de Fe intracelular.

Así pues, la interacción de Cd/Co en Dc^{RCd100} presentó una baja respuesta antagónica con valores en el IC que van de 3 a 4, y co-resistencia reducida al Co en presencia del Cd. Según Sunda & Huntsman, (2000), esto puede suponer diferencias en comportamiento debido al ratio de las concentraciones, además, el Co podría alterar la captación del Cd. Conjuntamente, esta respuesta se comparte retornando al estudio de D'ors et al., (2016), la interacción de Zn/Co mostró antagonismo y este disminuye su magnitud conforme se incrementa en el porcentaje de respuesta (IC_{50} y $100\% = 1.99$ y 1.65 , respectivamente). En el 2018, Chen et al., indicaron que el Co^{2+} al igual que otros metales de carácter esencial, presenta el efecto de hormesis, es decir, a bajas concentraciones (por ejemplo, 0.2 mg L^{-1}) estimula el crecimiento poblacional de microalgas. En otros microorganismos acuáticos como la bacteria *Vibrio fischeri* se estimó la respuesta de interacción binaria de Cd, Co, Cu, Zn y Pb utilizando el test del Microtox®, obteniendo que la interacción de Cd/Co fue antagónica, para Zn/Co fue aditiva y en las interacciones de Cu/Co y Pb/Co resultaron sinérgicas a los 15min. de exposición (Fulladosa et al., 2005).

Por último, las interacciones Cd/ Hg^{2+} y Cd/Ag en Dc^{RCd100} a pesar de tener respuestas antagónicas con valores $CI_{50(72)}$ de 80.42 y 60.31 mg L^{-1} , respectivamente, la cepa mostró baja resistencia múltiple a éstos, incluso en exposición individual fue altamente sensible ($CI_{50(72)}$ 2.70 y 0.52 mg L^{-1}). En $Dc1M^{wt}$, la exposición tanto de forma individual como en interacción del Cd con Hg y Ag fue altamente sensible a ambos (Tabla 4.3.3 y Tabla 4.3.4). Gómez-Jacinto et al., (2015) reportaron que la presencia de Hg en exposición a Cu y Zn sobre una cepa de *Chlorella sorokiniana* existe competencia entre los metales con Hg en la síntesis de metalotioneínas, incluso detectando mayor incremento en las mismas, asimismo, el Hg^{2+} compete con el Cd en su unión a los grupos SH^- . En un estudio de bioacumulación realizado sobre la macroalga *Fucus vesiculosus* a 7 días de

exposición a la mezcla de Cd, Hg y Pb, se estimó una mayor acumulación del Hg en presencia de Cd y Pb (Henriques et al., 2017). En la cianobacteria *Nostoc calcicola* se presentaron respuestas sinérgicas en la interacción de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ con Cd (Singh & Yadava, 1983; Singh & Singh, 1992).

Por otro lado, la elevada sensibilidad a Ag en $\text{Dc}^{\text{RCd100}}$ de acuerdo con Leonardo et al., (2016) esta toxicidad se debe a su especiación siendo la forma iónica Ag^+ la más tóxica compitiendo junto con el Cd. Anteriormente, Sujak, (2005) evaluó las interacciones entre Cu^+ , Cd, Zn con Ag^+ sobre la respuesta en el transporte de electrones, reportando que la Ag^+ reemplaza a Cd, Zn y Cu^+ , uniéndose fuertemente la plastocianina y en el citocromo *b6f*, resultando en una potente inactivación fotosintética. Además, este metal induce metalotioneínas en microalgas, no obstante, la inducción es débil comparada con el Cd, además, se ha evaluado que la Ag^+ se acumula en cloroplastos, mitocondria y a lo largo de la membrana celular a través de la biosíntesis en nanopartículas de Ag por microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Coccomyxa actinabiotis* a través de los sistemas enzimáticos como la ATPasa, superóxido dismutasa, anhidrasa carbónica y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (Gekeler et al., 1988; Barwal et al., 2011; Leonardo et al., 2016).

Finalmente, como se muestra, la mayoría de las referencias citadas corresponden a evaluaciones de mezclas metálicas y su interacción en cepas sensibles (alelos tipo salvaje) y en otros microorganismos acuáticos como protistas y bacterias, por lo que comparar a nuestra cepa Cd-resistente de *D. chlorelloides* es complicado, no obstante, marca el punto de partida como estudio innovador en metodologías y mecanismos que sucedieron para incrementar e inducir la multiresistencia en $\text{Dc}^{\text{RCd100}}$. Además, el orden de tolerancia en la cepa sensible (Dc1M^{wt}) en las interacciones binarias concuerda con el orden de resistencia múltiple de $\text{Dc}^{\text{RCd100}}$, demostrando así que esta microalga a la exposición continua induce una pre-respuesta de tolerancia para posteriormente inducir mecanismos de adaptación y resistencia individual y cruzada/múltiple a los metales evaluados.

Esto supone (que en un futuro el desarrollo de un biosensor), utilizando tanto el alelo tipo salvaje como el resistente será altamente sensible, y además podría detectar otros metales en concentraciones elevadas en aguas contaminadas, como una alternativa en el monitoreo *in situ* de manera rápida.

4.5. CONCLUSIONES

En resumen, la cepa Dc^{RCd100} presenta resistencia además del Cd en exposición individual al Ni, Fe, Cd, Zn y en menor medida al Cu y Co. Sin embargo, en interacción metálica binaria con el Cd, este metal coadyuva a una mayor resistencia cruzada con tasas altas antagónicas en Zn, Cu, Ni (Ni en concentraciones por debajo del 50% de respuesta y que por encima se inhibe), y una menor resistencia en Co y Fe (con respuestas aditivas a altas concentraciones y que la combinación resulta más tóxica que de forma individual con reducción de resistencia hasta 3 veces menor).

Mientras que, en respuestas mostradas por la cepa control (Dc1M^{wt}), es altamente sensible en inhibición de su crecimiento al Cu, Co, Ni, Cd y menor para Zn y Fe (a pesar de ser metales esenciales, excepto el Cd) en exposición individual. En mezclas binarias con el Cd, la sensibilidad se reduce en Zn, Cu, Ni, pero se potencian sus efectos tóxicos con Fe y en menor con Co.

Por otro parte, el orden de sensibilidad en forma individual en Dc^{RCd100} se presentó como altamente sensible a la exposición Ag⁺, seguido del Hg²⁺, Cr⁶⁺ y al Cr³⁺, pero resistente al Cd como el metal al cual se estimuló tal capacidad.

Sin embargo, en interacción binaria con el Cd estimula la resistencia cruzada con una intensidad de 50 veces mayor al Cr⁶⁺ a través del antagonismo que se mantiene a lo largo de los porcentajes de respuesta, esto mismo sucede con Hg²⁺ y Ag⁺. No obstante, al igual que el Cr⁶⁺, para el Cr³⁺ se necesitó una concentración 17 veces más en combinación con el Cd para presentar el 50% de inhibición de crecimiento poblacional de la cepa Cd-resistente, inicia con altas tasas antagónicas en concentraciones por debajo del 50%, y por encima se reduce la resistencia resultando en un sinergismo.

Para la cepa control Dc1M^{wt}, su orden de sensibilidad en exposición individual fue el siguiente: Ag⁺ > Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Cd²⁺ > Cr³⁺, mientras que su respuesta en interacción binaria con el Cd resultó sin diferencias de valores de CI₅₀₍₇₂₎ similares a la respuesta individual con Cr⁶⁺ y Cr³⁺, con respuestas sinérgicas a valores por debajo del 50% y por encima su sensibilidad se reduce. Presentó tolerancia a Ag⁺ y Hg²⁺ con tasas antagónicas que se intensifican a lo largo de los porcentajes de interacción metálica.

4.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrhenius, Å., F. Grönvall, M. Scholze, T. Backhaus & H. Blanck. 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photo-system II in marine periphyton and epipsammic communities. *Aquat. Toxicol.*, 68(4): 351-367. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.002>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0547-2>
- Awasthi, M., Rai, L., 2004. Adsorption of nickel, zinc and cadmium by immobilized green algae and cyanobacteria: A comparative study. *Ann. Microbiol.* 54, 257–267.
- Bajguz, A., 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 406–416. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9551-0>
- Bakar, L.A., Amin, N.M., Zakeri, H.A., 2015. Impact of Mercury (II) Nitrate on Physiological and Biochemical Characteristics of Selected Marine Algae of Different Classes. *Procedia Environ. Sci., Environmental Forensics* 2015 30, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.10.040>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S096702620200392X>
- Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F., Costas, E., 2011. 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, 593–600. <https://doi.org/10.1017/S096702620200392X>
- Barrera-Díaz, C.E., Lugo-Lugo, V., Bilyeu, B., 2012. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *J. Hazard. Mater.* 223–224, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.054>
- Bartolomé, M.C., Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, A., Garnica-Romo, M.G., Sánchez-Carrillo, S., Sánchez-Fortún, S., 2016. Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. *Int. J. Phytoremediation* 18, 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>
- Barwal, I., Ranjan, P., Kateriya, S., Yadav, S.C., 2011. Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* 9, 56. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-56>
- Bere, T., Chia, M.A., Tundisi, J.G., 2012. Effects of Cr III and Pb on the bioaccumulation and toxicity of Cd in tropical periphyton communities: Implications of pulsed metal exposures. *Environ. Pollut.* 163, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.028>
- Bianchini, A., Martins, S.E.G., Barcarolli, I.F., 2004. Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model. *Int. Congr. Ser., Animals and Environments. Proceedings of the Third International Conference of Comparative Physiology and Biochemistry* 1275, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.074>
- Blaby-Haas, C.E., Merchant, S.S., 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of Metals* 1823, 1531–1552. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.010>

- Boonyapookana, B., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Singhakaew, S., 2002. Phytoaccumulation and Phytotoxicity of Cadmium and Chromium in Duckweed *Wolffia globosa*. *Int. J. Phytoremediation* 4, 87–100. <https://doi.org/10.1080/15226510208500075>
- Cadmus, P., Guasch, H., Herdrich, A.T., Bonet, B., Urrea, G., Clements, W.H., 2018. Structural and functional responses of periphyton and macroinvertebrate communities to ferric Fe, Cu, and Zn in stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/etc.4070>
- 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. <https://doi.org/10.1042/BJ20090655>
- Chen, H., Li, S., Liu, J., Diwan, B.A., Barrett, J.C., Waalkes, M.P. 2004. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 25, 1779–1786. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh161>
- Chen, X., Zhang, C., Tan, L., Wang, J., 2018. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae. *Environ. Pollut.* 236, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.081>
- Chia, M.A., Lombardi, A.T., da Graça Gama Melão, M., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquat. Toxicol.* 160, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.002>
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.*, 58(3): 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.*, 70(2): 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Chou, T.C. & P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Biol. Regul.*, 22: 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Chou, T. & N. Martin. 2005. Compusyn for drug combinations. PC software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations and the determination of IC50, ED50, and LC50 Values. Combosyn Paramuts, NJ.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s004250000458>
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P. & Schroeder, J.I. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(20), 12043–12048. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.12043>
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.*, 123(3), 825–832. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.825>
- Collard, J.-M., Matagne, R.F., 1994. Cd²⁺ resistance in wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Exp. Bot.* 34, 235–244. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)90044-2)
- Collard, J.M., Matagne, R.F., 1990. Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2051–2055.
- 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. <https://doi.org/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. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00343-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00343-9)
- Costa, M., Salnikow, K., Cosentino, S., Klein, C.B., Huang, X., Zhuang, Z. 1994. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 102, 127–130. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s3127>
- 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. <https://doi.org/10.1021/es00092a010>
- Das, S., Dash, H.R., Chakraborty, J., 2016. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2967–2984. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7364-4>
- Dash, H.R., Das, S., 2012. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 75, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>
- de Filippis, L.F., Hampf, R., Ziegler, H., 1981. The Effects of Sublethal Concentrations of Zinc, Cadmium and Mercury on *Euglena*. Growth and Pigments. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 101, 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(81\)80059-1](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(81)80059-1)
- Dive, D., Gabriel, L., Hanssens, O., Benga-Bengomme, A., 1989. Studies on interactions between components of electroplating industry wastes: Influence of nickel and calcium on interactions between cadmium, copper, chromium and zinc. *Sci. Total Environ., Trace Metals in Lakes* 87–88, 355–364. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90248-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90248-9)
- Domingos, R.F., Gélabet, A., Carreira, S., Cordeiro, A., Sivry, Y., Benedetti, M.F., 2015. Metals in the Aquatic Environment—Interactions and Implications for the Speciation and Bioavailability: A Critical Overview. *Aquat. Geochem.* 21, 231–257. <https://doi.org/10.1007/s10498-014-9251-x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00185-2](https://doi.org/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. <https://doi.org/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 *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81, 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.051>
- Echeveste, P., Croot, P., von Dassow, P., 2018. Differences in the sensitivity to Cu and ligand production of coastal vs offshore strains of *Emiliania huxleyi*. *Sci. Total Environ.* 625, 1673–1680. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.050>
- Echeveste, P., Silva, J.C., Lombardi, A.T., 2017. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.030>
- El-Sheekh, M.M., El-Naggar, A.H., Osman, M.E.H., El-Mazaly, E., 2003. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Braz. J. Plant Physiol.* 15, 159–166. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202003000300005>
- Faucheur, S.L., Campbell, P.G.C., Fortin, C., Slaveykova, V.I., 2014. Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1211–1224. <https://doi.org/10.1002/etc.2424>

- Fiore, M.F., Moon, D.H., Trevors, J.T., 1998. Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria, in: Wong, Y.-S., Tam, N.F.Y. (Eds.), *Wastewater Treatment with Algae*, Biotechnology Intelligence Unit. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 111–124. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10863-5_7
- 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, 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00042-9)
- Fulladosa, E., Murat, J.-C., Villaescusa, I., 2005. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 58, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.007>
- Gajewska, E., Skłodowska, M., 2008. Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regul.* 54, 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9240-9>
- Garbayo, I., Torronteras, R., Forján, E., Cuaresma, M., Casal, C., Mogedas, B., Ruiz-Domínguez, M.C., Márquez, C., Vaquero, I., Fuentes-Cordero, J.L., Fuentes, R., González-del-Valle, M., Vílchez, C., 2012. Identification and Physiological Aspects of a Novel Carotenoid-Enriched, Metal-Resistant Microalga Isolated from an Acidic River in Huelva (Spain). *J. Phycol.* 48, 607–614. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01160.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.002>
- García-Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sánchez-Martín, L., López-Rodas, V., Costas, E., 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algicide. *Water Res.* 38, 2207–2213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.036>
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatins complexes. *Arch. Microbiol.* 150, 197–202. <https://doi.org/10.1007/BF00425162>
- Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., Garbayo-Nores, I., Vílchez-Lobato, C., 2015. Elucidation of the defence mechanism in microalgae *Chlorella sorokiniana* under mercury exposure. Identification of Hg-phytochelatin. *Chem. Biol. Interact.* 238, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.013>
- Graevskaya, E.E., Antal, T.K., Matorin, D.N., Voronova, E.N., Pogosyan, S.I., Rubin, A.B., 2003. Evaluation of diatomea algae *Thalassiosira weissflogii* sensitivity to chloride mercury and methylmercury by chlorophyll fluorescence analysis. *J. Phys. IV Proc.* 107, 569–572. <https://doi.org/10.1051/jp4:20030367>
- 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 γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86(18), 6838–6842. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.6838>
- Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1985. Phytochelatin: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science*. 230(4726), 674–676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 133, 287–303. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00085-6)

- Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 1465(1-2), 190–198. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)
- Gupta, D.K. & Sandalio, L.M. 2012. *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 275. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22081-4>
- Gutknecht, J., 1981. Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 61, 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF01870753>
- Ha, S.-B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B. & Cobbett, C.S. 1999. Phytochelatase Synthase Genes from *Arabidopsis* and the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 11(6), 1153–1163. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1153>
- Han, X., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2006. Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *J. Colloid Interface Sci.* 303, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.08.028>
- Hanikenne, M., 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* 159, 331–340. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00788.x>
- Hanikenne, M., Motte, P., Wu, M.C.S., Wang, T., Loppes, R., Matagne, R.F., 2005. A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 28, 863–873. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01335.x>
- Henriques, B., Lopes, C.B., Figueira, P., Rocha, L.S., Duarte, A.C., Vale, C., Pardal, M.A., Pereira, E., 2017. Bioaccumulation of Hg, Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate. *Chemosphere* 171, 208–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.086>
- Heuillet, E., Moreau, A. & Halpern, S. 1986. Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl_2 : Electron probe microanalysis. *Biology of the cell*, 58(1), 79–86.
- Howe, G. & Merchant, S. 1992. Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLANT Physiol.*, 98(1), 127–136. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.127>
- Ilangovan, K., Salazar, M., Dash, S., Monroy, O.H., Ramos, C.A., 2008. Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorellapyrenoidosa* chick. *Environ. Technol.* <https://doi.org/10.1080/09593339209385144>
- Ivanov, J., Toncheva-Panova, T., Chernev, G., Samuneva, B., 2008. Effect of Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} containing hybrid nanomatrixes on the green algae *Chlorella keissleri* 34.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.007>
- Kalinowska, R., Pawlik-Skowrońska, B., 2008. Metal resistance of soil algae (Chlorophyta) occurring in post-flotation Zn/Pb- and Cu-tailing ponds. *Pol. J. Ecol.* 56, 415–430.
- Kiyono, M., Oka, Y., Sone, Y., Nakamura, R., Sato, M.H., Sakabe, K., Pan-Hou, H., 2013. Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Eng. J.* 71, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.007>
- Knauer, K., Ahner, B., Xue, H.B. & Sigg, L. 1998. Metal and phytochelatase content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(12), 2444–2452. <https://doi.org/10.1002/etc.5620171210>
- Knauer, K., Behra, R., Hemond, H., 1999. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquat. Toxicol.* 46, 221–230. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00131-3)

- Knauert, S., Knauer, K., 2008. The Role of Reactive Oxygen Species in Copper Toxicity to Two Freshwater Green Algae. *J. Phycol.* 44, 311–319. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00471.x>
- Kováčik, J., Dresler, S., 2018. Calcium availability but not its content modulates metal toxicity in *Scenedesmus quadricauda*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 664–669. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.022>
- Kukarskikh, G.L., Graevskaia, E.E., Krendeleva, T.E., Timofeev, K.N., Rubin, A.B., 2003. Effect of methylmercury on primary photosynthesis processes in green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biofizika* 48, 853–859.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.007>
- Le Jeune, A.-H., Charpin, M., Deluchat, V., Briand, J.-F., Lenain, J.-F., Baudu, M., Amblard, C., 2006. Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplanktonic communities. *Aquat. Toxicol.* 80, 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.09.004>
- Lee, J.A., Marsden, I.D., Glover, C.N., 2010. The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquat. Toxicol.* 99, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.006>
- Leonardo, T., Farhi, E., Pouget, S., Motellier, S., Boisson, A.-M., Banerjee, D., Rébeillé, F., den Auwer, C., Rivasseau, C., 2016. Silver Accumulation in the Green Microalga *Coccomyxa actinabiotis*: Toxicity, in Situ Speciation, and Localization Investigated Using Synchrotron XAS, XRD, and TEM. *Environ. Sci. Technol.* 50, 359–367. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03306>
- Lesser, M.P., 2006. OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Lu, C.M., Chau, C.W., Zhang, J.H., 2000. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis*--assessment by chlorophyll fluorescence analysis. *Chemosphere* 41, 191–196. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(99\)00411-7](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(99)00411-7)
- Lu, Y., Xu, J., 2015. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends Plant Sci.* 20, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Luis, P., Behnke, K., Toepel, J., Wilhelm, C., 2006. Parallel analysis of transcript levels and physiological key parameters allows the identification of stress phase gene markers in *Chlamydomonas reinhardtii* under copper excess. *Plant Cell Environ.* 29, 2043–2054. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01579.x>
- Macfie, S.M., Tarmohamed, Y., Welbourn, P.M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 454–458. <https://doi.org/10.1007/BF00214835>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s002440010122>
- Madden, E.F., Akkerman, M., Fowler, B.A. 2002. A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52 and human HK-2 kidney cell lines following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 24–32. <https://doi.org/10.1002/jbt.10015>
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., & Morin, B. 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin*, 64(12), 2663–2670. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009>
- Martins, C.D.M.G., Barcarolli, I.F., de Menezes, E.J., Giacomini, M.M., Wood, C.M., Bianchini, A., 2011. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus*

- acclimated to different salinities: In vivo and in vitro studies. *Aquat. Toxicol.* 101, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.005>
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1996. Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1835–1845. <https://doi.org/10.1021/es950373d>
- Massocato, T.F., Ramos, J.C., Bascuñan, V.L.F., Simioni, C., Rörig, L.R., Bonomi Barufi, J., 2018. Tolerance of *Ulothrix* sp. LAFIC 010 (Chlorophyta) against high concentration of metals from acid mine drainage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.045>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.004>
- 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. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150214.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.030>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00447.x>
- Miao, A.-J., Wang, W.-X., Juneau, P., 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2603–2611. <https://doi.org/10.1897/05-009R.1>
- Miao, A.-J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.-J., Luo, Z., Quigg, A., Santschi, P.H., 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* 157, 3034–3041. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>
- Miazeck, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23929–23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
- Mo, L., Zheng, M., Qin, M., Zhang, X., Liu, J., Qin, L., Zeng, H., Liang, Y., 2016. Quantitative Characterization of the Toxicities of Cd-Ni and Cd-Cr Binary Mixtures Using Combination Index Method. *BioMed Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4158451>
- Mo, L.-Y., Zhao, D.-N., Qin, M., Qin, L.-T., Zeng, H.-H., Liang, Y.-P., 2017. Joint toxicity of six common heavy metals to *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0837-x>
- Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A., Legrand, J., 2008. Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochem. Eng. J.* 39, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.009>
- Moore, C.M., Mills, M.M., Arrigo, K.R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P.W., Galbraith, E.D., Geider, R.J., Guieu, C., Jaccard, S.L., Jickells, T.D., La Roche, J., Lenton, T.M., Mahowald, N.M., Marañón, E., Marinov, I., Moore, J.K., Nakatsuka, T., Oschlies, A., Saito, M.A., Thingstad, T.F., Tsuda, A., Ulloa, O., 2013. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nat. Geosci.* 6, 701–710. <https://doi.org/10.1038/ngeo1765>
- 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 phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Environ. Res.*, 52(4), 383–395. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00093-9)
- Moroney, J.V., Bartlett, S.G., Samuelsson, G., 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 24, 141–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00669.x>
- Mylon, S.E., Sun, Q., Waite, T.D., 2010. Process optimization in use of zero valent iron nanoparticles for oxidative transformations. *Chemosphere* 81, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.045>
- Nacorda, J.O., Martinez-Goss, M.R., Torreta, N.K., Merca, F.E., 2007. Metal resistance and removal by two strains of the green alga, *Chlorella vulgaris* Beijerinck, isolated from Laguna de Bay, Philippines. *J. Appl. Phycol.* 19, 701–710. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9216-1>
- Nagai, T., Schamphelaere, K.A.C.D., 2016. The effect of binary mixtures of zinc, copper, cadmium, and nickel on the growth of the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* and comparison with mixture toxicity model predictions. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2765–2773. <https://doi.org/10.1002/etc.3445>
- Naorbe, M.C., Serrano, A.E., 2018. Effects of heavy metals on cell density, size, specific growth rate and chlorophyll a of *Tetraselmis tetraele* under controlled laboratory conditions. *AACL Bioflux* 11, 589–597.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2008. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>
- 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, 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00202-2)
- 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. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150308>
- Nicolardi, V., Cai, G., Parrotta, L., Puglia, M., Bianchi, L., Bini, L., Gaggi, C., 2012. The adaptive response of lichens to mercury exposure involves changes in the photosynthetic machinery. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 160, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.015>
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.025>
- Nordberg, G. (Ed.). 2007. *Handbook on the toxicology of metals*, 3rd ed. ed. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- OECD, 2006. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test - en - OECD [WWW Document]. URL <http://www.oecd.org/env/test-no-201-alga-growth-inhibition-test-9789264069923-en.htm> (accessed 7.27.16).
- Oliveira, L., Antia, N.J., 1984. Evidence of nickel ion requirement for autotrophic growth of a marine diatom with urea serving as nitrogen source. *Br. Phycol. J.* 19, 125–134. <https://doi.org/10.1080/00071618400650131>
- Olsson, S., Penacho, V., Puente-Sánchez, F., Díaz, S., Gonzalez-Pastor, J.E., Aguilera, A., 2017. Horizontal Gene Transfer of Phytochelatin Synthases from Bacteria to Extremophilic Green Algae. *Microb. Ecol.* 73, 50–60. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0848-z>

- Omar, H.H., 2002. Adsorption of Zinc Ions by *Scenedesmus Obliquus* and *S. Quadricauda* and its Effect on Growth and Metabolism. *Biol. Plant.* 45, 261–266. <https://doi.org/10.1023/A:1015157009150>
- Ortega, R., Fayard, B., Salomé, M., Devès, G., Susini, J., 2005. Chromium Oxidation State Imaging in Mammalian Cells Exposed in Vitro to Soluble or Particulate Chromate Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1512–1519. <https://doi.org/10.1021/tx049735y>
- Osman, M.E.H., El-Naggar, A.H., El-Sheekh, M.M., El-Mazally, E.E., 2004. Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 16, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2003.12.004>
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.020>
- Parker, D.L., Mihalick, J.E., Plude, J.L., Plude, M.J., Clark, T.P., Egan, L., Flom, J.J., Rai, L.C., Kumar, H.D. 2000. Sorption of metals by extracellular polymers from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* f. flos-aquae strain C3-40. *J. Appl. Phycol.* 12, 219–224. <https://doi.org/10.1023/A:1008195312218>
- Pätsikkä, E., Aro, E.-M., Tyystjärvi, E., 2001. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. *Physiol. Plant.* 113, 142–150. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130119.x>
- Pawan, R.S., 2007. Nickel Adsorption by Wild type and Nickel Resistant Isolate of *Chlorella* sp. | Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 8, 1–5.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.09.003>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00144-2](https://doi.org/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, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(02\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00175-4)
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Pereira, M., Bartolomé, M.C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.078>
- Perreault, F., Bogdan, N., Morin, M., Claverie, J., Popovic, R., 2012. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology* 6, 109–120. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.562325>

- Philpott, C.C., 2006. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Biology of Metals* 1763, 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.008>
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae1. *J. Phycol.* 39, 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- 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. <https://doi.org/10.1023/A:1008162812651>
- Pluciński, B., Waloszek, A., Rutkowska, J., Strzałka, K., 2018. Copper excess-induced large reversible and small irreversible adaptations in a population of *Chlamydomonas reinhardtii* CW15 (Chlorophyta). *Acta Soc. Bot. Pol.* 87. <https://doi.org/10.5586/asbp.3569>
- Prasad, M.N.V., Drej, K., Skawińska, A., Strałka, K., 1998. Toxicity of Cadmium and Copper in *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Type (WT 2137) and Cell Wall Deficient Mutant Strain (CW 15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 306–311. <https://doi.org/10.1007/s001289900626>
- Price, N.M., Morel, F.M.M., 1991. Colimitation of phytoplankton growth by nickel and nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1071–1077. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.6.1071>
- Puente-Sánchez, F., Díaz, S., Penacho, V., Aguilera, A., Olsson, S., 2018. Basis of genetic adaptation to heavy metal stress in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *Aquat. Toxicol.* 200, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.020>
- Randall, S., Harper, D., Brierley, B., 1999. Ecological and ecophysiological impacts of ferric dosing in reservoirs. *Hydrobiologia* 395, 355–364. <https://doi.org/10.1023/A:1017046913027>
- Randhawa, V.K., Zhou, F., Jin, X., Nalewajko, C., Kushner, D.J., 2001. Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* 47, 987–993. <https://doi.org/10.1139/w01-103>
- Rashid, A., Camm, E.L., Ekramoddoullah, A.K.M., 1994. Molecular mechanism of action of Pb²⁺ and Zn²⁺ on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett.* 350, 296–298. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00789-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00789-6)
- Rehman, A., Shakoori, A., 2004. Tolerance and Uptake of Cadmium and Nickle by *Chlorella* sp., Isolated from Tannery Effluents. *Pak. J. Zool.* 36, 327–331. <https://doi.org/0030-9923/2004/0004-0327>
- Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J.A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* 466–467, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00188-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00188-6)
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Lee, K., 2017. Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 22, 68–75. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0628-0>
- Rodríguez, E., Majado, M.E., Meriluoto, J., Acero, J.L., 2007. Oxidation of microcystins by permanganate: Reaction kinetics and implications for water treatment. *Water Res.* 41, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.004>

- 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. <https://doi.org/10.1007/s10534-004-2481-4>
- Salt, D.E. & Wagner, G.J. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ 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. <https://doi.org/10.1897/08-489.1>
- Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001- ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/60197.pdf>
- Shanab, S., Essa, A., Shalaby, E., 2012. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signal. Behav.* 7, 392–399. <https://doi.org/10.4161/psb.19173>
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739–753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Shehata, S.A., Lasheen, M.R., Ali, G.H., Kobbia, I.A., 1999. Toxic Effect of Certain Metals Mixture on Some Physiological and Morphological Characteristics of Freshwater Algae. *Water. Air. Soil Pollut.* 110, 119–135. <https://doi.org/10.1023/A:1005058607002>
- Siedlecka, A., Krupa, Z., 1999. Cd/Fe Interaction in Higher Plants - Its Consequences for the Photosynthetic Apparatus. *Photosynthetica* 36, 321–331. <https://doi.org/10.1023/A:1007097518297>
- Siedlecka, A., Krupa, Z., 1996. Interaction between Cadmium and Iron and Its Effects on Photosynthetic Capacity of Primary Leaves of *Phaseolus Vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 833–841.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., 2011. Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L. *Protoplasma* 248, 503–511. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0197-6>
- Singh, C.B., Singh, S.P., 1992. Protective effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , and Ni^{2+} on mercury and methylmercury toxicity to a cyanobacterium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(92\)90016-V](https://doi.org/10.1016/0147-6513(92)90016-V)
- Singh, S.P., Yadava, V., 1983. Cadmium induced inhibition of nitrate uptake in *Anacystis nidulans*: interaction with other divalent cations. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29, 297–304. <https://doi.org/10.2323/jgam.29.297>
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002. Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell* 14, 2837–2847. <https://doi.org/10.1105/tpc.004853>
- Song, W.-Y., Park, J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., Martinoia, E., 2014. ABC Transporters and Heavy Metals, in: Geisler, M. (Ed.), *Plant ABC Transporters, Signaling and Communication in Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06511-3_1
- Steffens, J.C. 1990. The Heavy Metal-Binding Peptides of Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41(1), 553–575. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1080/01904168109362869>
- Sujak, A., 2005. Interaction between cadmium, zinc and silver-substituted plastocyanin and cytochrome b6f complex — heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus. Acta Physiol. Plant. 27, 61–69. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0037-z>
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. Limnol. Oceanogr. 45, 1501–1516. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1501>
- Sunda, W.G., 2012. Feedback Interactions between Trace Metal Nutrients and Phytoplankton in the Ocean. Front. Microbiol. 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00204>
- Sutak, R., Botebol, H., Blaiseau, P.-L., Léger, T., Bouget, F.-Y., Camadro, J.-M., Lesuisse, E., 2012. A Comparative Study of Iron Uptake Mechanisms in Marine Microalgae: Iron Binding at the Cell Surface Is a Critical Step. Plant Physiol. 160, 2271–2284. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204156>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., Shin, K.-H., 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Sotero-Santos, R.B., Rocha, O., Povinelli, J., 2007. Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms. Chemosphere 68, 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.049>
- Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., Waalkes, M.P. 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. Exp. Cell Res. 286, 355–365. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00062-4)
- Tallkvist, J., Bowlus, C.L., Lönnnerdal, B. 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. Toxicol. Lett. 122, 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00363-0)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80763-S](https://doi.org/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. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00034-9](https://doi.org/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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1021/es991110c>
- Tripathi, B.N., Mehta, S.K., Amar, A., Gaur, J.P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. Chemosphere 62, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.031>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., 2001. Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliania huxleyi*. Mar. Chem. 75, 123–139. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00029-9)

- Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D. 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.011>
- Visviki, I., Rachlin, J.W. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine Alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 271–275. <https://doi.org/10.1007/BF01055915>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF00203803>
- Wang, M.-J., Wang, W.-X., 2009. Cadmium in three marine phytoplankton: Accumulation, subcellular fate and thiol induction. *Aquat. Toxicol.* 95, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.08.006>
- Wei, L., Donat, J.R., Fones, G., Ahner, B.A., 2003. Interactions between Cd, Cu, and Zn Influence Particulate Phytochelatin Concentrations in Marine Phytoplankton: Laboratory Results and Preliminary Field Data. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3609–3618. <https://doi.org/10.1021/es0340026>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00133-4)
- Wong, S.W.Y., Leung, P.T.Y., Djurišić, A.B., Leung, K.M.Y., 2010. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 609–618. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3249-z>
- Wright, D.A. 1977. The Effect of Salinity on Cadmium Uptake by the Tissues of the Shore Crab *Carcinus Maenas*. *J. Exp. Biol.* 67, 137–146. <https://doi.org/0022-0949,1477-9145>
- Yoshida, N., Ikeda, R., Okuno, T., 2006. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation. *Bioresour. Technol.* 97, 1843–1849. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.08.021>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>
- Zhao, C.-M., Wang, W.-X., 2011. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 885–892. <https://doi.org/10.1002/etc.451>
- Zhitkovich, A., 2011. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1617–1629. <https://doi.org/10.1021/tx200251t>

ALCANCES Y PERSPECTIVAS

Este proyecto doctoral da las herramientas necesarias para el desarrollo de un sistema de monitoreo ambiental *in situ* en la detección rápida de contaminantes metálicos en diferentes cuerpos de aguas continentales como receptores finales de vertidos de diferentes actividades antropogénicas. Esto se lograría utilizando la plasticidad de microalgas clorofíceas de aguas dulces, a través de modificaciones estructurales y genéticas que presentan para incrementar la especificidad, sensibilidad a una gran variedad tóxicos metálicos.

Además, se establecería la respuesta de interacción de cepas metalo-resistentes entre factores abióticos en el proceso fotosintético como biomarcador directo en las respuestas de los organismos autótrofos. Esto también permite el desarrollo de procesos de fitorremediación utilizando a microalgas variantes resistentes sobre cuerpos de agua contaminados por metales, asimismo de la predicción de la interacción con otros contaminantes ya sean orgánicos e inorgánicos a través de respuestas de resistencia múltiple o en su caso mayor toxicidad en incremento de sensibilidad de cepas resistentes a un contaminante en específico.

Sin embargo, aún faltaría la identificación de eventos genéticos y moleculares que gobiernan la resistencia en especies representativas de cada ecosistema y género, no solamente en clorofíceas de agua dulce, sino en especies de microalgas tóxicas como cianobacterias y dinoflagelados, y su comportamiento en comunidad a través de respuestas de alelopatía y/o aleloquímica. Además, de la comparación de respuestas *in vitro* vs. *in vivo*.

ANEXOS

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- Publicación del artículo original como Co-autor del trabajo titulado “**Morphological and Physiological Changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* Strain and its Cadmium Removal Capacity**”. En la revista International Journal of Phytoremediation. Indexada en el Thompson Reuters-JCR con un factor de impacto de 2.237, Q2

Bartolomé, M.C., **Cortés, A.A.**, Sánchez-Fortún, A., Garnica-Romo, M.G., Sánchez-Carrillo, S., Sánchez-Fortún, S., 2016. Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. International Journal of Phytoremediation 18, 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>

- Publicación del trabajo en el XIV International Congress of Toxicology titulado “**Toxicity assessment of mixture Cr(VI)/Fe(II) on *Artemia franciscana* under pH variations**”. En la revista Toxicology Letters. Indexada en el Thompson Reuters-JCR con un factor de impacto de 3.858, Q1.

Cortés Téllez, A.A., Estévez Delgado, G., Sánchez-Fortún, S., Bartolomé Camacho, C., 2016. Toxicity assessment of mixture Cr(VI)/Fe(II) on *Artemia franciscana* under pH variations. Toxicology Letters, XIV International Congress of Toxicology 259, S97. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.243>

- Publicación del Artículo de Revisión titulado “**Mecanismos de resistencia a Metales tóxicos (Cd) bajo variaciones abióticas en Microalgas**”. En la revista Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Indexada en el Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT.

Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, S., Bartolomé, M.C., 2017. Mecanismos de resistencia a metales tóxicos (Cd) bajo variaciones abióticas en microalgas. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 21. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.005>

- Publicación del Artículo de Divulgación titulado “**Microalgas ¿Villanas o heroínas?**” en la Revista de SaberMás-UMSNH como artículo portada en el Año 8/ número 46/julio-agosto 2019. Indexada en el Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT.
- Publicación del Artículo original titulado “**Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains**”, en la revista LIMNETICA, Indexada en el Thompson Reuters-JCR con un factor de impacto de 0.842, Q3.

Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, S., García, M., Bartolomé, M.C., 2018. Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains. *Limnetica* 37, 229–238. <https://doi.org/10.23818/limn.37.19>

- Publicación del Artículo original titulado “**Toxicological assessment of binary mixtures and individually of chemical compounds used in reverse osmosis desalination on *Artemia franciscana* nauplii**”, en la revista Latin American Journal of Aquatic Research, Indexada en el Thompson Reuters-JCR con un factor de impacto de 0.482, Q3.

Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, S., García, M., Martínez, H., Bartolomé, M.C., 2018. Toxicological assessment of binary mixtures and individually of chemical compounds used in reverse osmosis desalination on *Artemia franciscana* nauplii. *Latin american journal of aquatic research* 46, 673–682. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-4>

- Publicación del artículo original titulado “**Evolution in the photosynthetic oxygen rate of a Cd-resistant strain of *Dictyosphaerium chlorelloides* by changes in light intensity and temperature**”, en la revista Chemosphere, Indexada en el Thompson Reuters-JCR con un factor de impacto de 5.108, Q1.

Cortés Téllez, A.A., Sánchez-Fortún Rodríguez, S., D’ors de Blas, A., García, L.C., Garnica-Romo, Ma.G., Bartolomé Camacho, M.C., 2020. Evolution in the photosynthetic oxygen rate of a Cd-resistant strain of *Dictyosphaerium chlorelloides* by changes in light intensity and temperature. *Chemosphere* 239, 124672. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124672>



Morphological and Physiological Changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* Strain and its Cadmium Removal Capacity

M. C. Bartolomé, A. A. Cortés, A. Sánchez-Fortún, M. G. Garnica-Romo, S. Sánchez-Carrillo & S. Sánchez-Fortún

To cite this article: M. C. Bartolomé, A. A. Cortés, A. Sánchez-Fortún, M. G. Garnica-Romo, S. Sánchez-Carrillo & S. Sánchez-Fortún (2016): Morphological and Physiological Changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* Strain and its Cadmium Removal Capacity, *International Journal of Phytoremediation*, DOI: [10.1080/15226514.2016.1189400](https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>



Accepted author version posted online: 24 May 2016.
Published online: 24 May 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 10



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Analysis of a strain of green algae resistant to cadmium

Morphological and Physiological Changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* Strain and its Cadmium Removal Capacity

Bartolomé, M.C.¹; Cortés, A.A.¹; Sánchez-Fortún, A.²; Garnica-Romo, M.G.³ Sánchez-Carrillo, S.⁴; Sánchez-Fortún, S.^{2*}

¹: School of Chemistry-Pharmacobiology, Michoacana de San Nicolás de Hidalgo University, 43 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), Mexico.

²: Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

³: Faculty of Civil Engineering, Michoacana de San Nicolás de Hidalgo University, 43 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), Mexico.

⁴: Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Natural Resources, Serrano St. 115 dpdo, 28006 Madrid, Spain.

*: Corresponding author: Dr. Sebastián Sánchez-Fortún, Dpto. Toxicología y Farmacología, Fac. Veterinaria, U.C.M. 28040 Madrid, Spain, Tlf: +34913943841, E-mail: fortun@ucm.es

Wild-type Dc1M previoexposed to Cd causes the appearance of resistant cells, Dc^{CdR100} cells exhibit morphological and photosynthetic changes, Dc^{CdR100} cells were found to have good accumulation properties for cadmium, This fact enables the use of these Dc^{CdR100} cells in bioremediation processes

ABSTRACT

Changes induced on freshwater microalga *Dictyosphaerium chlorelloides* (Dc^{wt}), acclimated in the laboratory until their survival in culture media enriched with cadmium 100 µM, have been

studied. Cadmium removal by living cells of this Cd-resistant (Dc^{CdR100}) strain was tested in cultures exposed to Cd 100 μ M during 30 days. Cell dimensions were measured under light microscopy, and cell growth was studied. Photosynthetic yield (Φ_{PSII}) was analyzed and the photosynthetic oxygen development and respiration response was obtained. Results show that Dc^{CdR100} strain exhibited significant cell morphology changes in comparison to Dc^{wt} cells, which affected both surface and cell biovolume. Malthusian fitness analysis showed that Dc^{CdR100} strain living in Cd-enriched culture had developed a lower capacity of nearly 50% growth, and its photosynthetic oxygen development and respiration response was significantly reduced in both light and dark photosynthetic phases. Dc^{CdR100} strain showed a very high capacity to remove cadmium from the aquatic environment (over 90%), although the most of the heavy metal removed ($\approx 70\%$) is adhered to the cell wall. These specific characteristics of Dc^{CdR100} cells suggest the possibility of using this strain in conjunction with Dc^{wt} strain as bioelements into a dual-head biosensor, and in bioremediation processes on freshwater polluted with Cd.

Key Words

Dictyosphaerium chlorelloides; Cd-resistant microalgae; morphological changes; photosynthesis activity; cadmium removal.

Introduction

The right balance of aquatic ecosystems is a key element in environmental studies. As water is an essential resource, its quality needs early warning systems for online and on-site monitoring contamination. Therefore, cell-based sensors as algal biosensors are increasingly replacing to chemical methods (Naessens et al., 2000) due to its usability, low cost and immediacy, among other advantages (Naessens et al., 2000; Sanders et al., 2001; Védérine et al., 2003).

Microalgae are used as bioindicators in the field of ecotoxicological studies. Because of its ubiquity, short life cycles, high sensitivity and ease of growth, they are used regularly in ecotoxicological screening of contaminated freshwater (Lewis, 1995). As primary producers, microalgae have an important role in nutrient cycling and balance of aquatic ecosystems (Raja et al., 2008).

The development of algae-based biosensors required to achieve high sensitivity, improved signal reception and optimization of cell immobilization methods. However, although these sensors have sufficient sensitivity, most of them exhibit low specificity and limited over a range of pollutants (D'Souza, 2001). Therefore, relatively few laboratory biosensors have become commercially viable methods (Bengtson Nash et al., 2005). Furthermore, use of highly selective biosensors can be complicated given the large number of potentially environmentally hazardous substances (Podola et al., 2004). Therefore, a combination of non-selective biosensor capable of detecting a wide range of contaminants, together with a selective biosensor capable of detecting a specific pollutant would be the jump for the gap that separates academic research from field applications.

Present alternatives to increase specificity in biosensors include expensive genetic modifications of these organisms, such as microalgae (Costas et al., 2001; López-Rodas et al., 2001; García-Villada et al., 2002). The most preferred biological process to assess the effects of contaminants on microalgae is the photosynthetic activity, estimated by chlorophyll a fluorescence of photosystem II (PSII), or oxygen production (Altamirano et al., 2004).

Large number of papers have reported high sensitivity of microalgae to heavy metals (Rai et al 1981; García-Villada et al 2004) and however some microalgal strains tolerate high concentrations of these contaminants through physiological and genetic mechanisms. This adaptive capacity displayed by some microalgae may have originated in previous exhibitions (Corradi et al 1995; Corradi et al., 1998) and could play an important role on the biological effects of heavy metal pollution.

Cadmium is a nonessential element that can be toxic and carcinogenic. On a global scale, the ratio anthropogenic to natural emissions of cadmium is approximately 7:1. Much of the cadmium added to aquatic systems accumulates in sediments where it presents a risk to benthic biota and under certain conditions may reenter the water column (Wright and Welbourn, 1994).

Previous studies demonstrated that wild-type *Dictyosphaerium chlorelloides* was very sensitive to the effect of heavy metals, but it was verified that after destruction of most algae following to these chromium exposures, some rare, resistant algal variants are able to grow in an environment with high levels of chromium (Sánchez-Fortún et al., 2009; D'ors et al., 2010).

For this reason, the aims of this work were to estimate the toxic effect of cadmium on Cd-sensitive (Dc^{wt}) and Cd-resistant (Dc^{CdR100}) strains of the green algae *D. chlorelloides*, and to study the specific tolerant level obtained by the Cd-resistant clone respect to the wild type strain.

With these data it will be possible to evaluate the potential Dc^{CdR100} strain to remove cadmium from aquatic ecosystems.

Material and Methods

Microalgae culture conditions

Cadmium sensitive (Dc^{wt}) and resistant (Dc^{CdR100}) strains of *Dyctiosphaerium chlorelloides*, from the algal culture collection of the Environmental Toxicology Laboratory (Toxicology and Pharmacology Department, UCM, Madrid, Spain), were used in these assays. Dc^{wt} strain (wild type Dc1M) axenically grew in culture flasks (Greiner 25 cm² 50 ml, Bio-One, Longwood, NJ, USA) with 20 ml of BG-11 medium (pH 7.1; Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), whereas Dc^{CdR100} strain, previously obtained from the wild type Dc1M strain by acclimation under laboratory conditions in cadmium-enriched medium, was cultured in BG-11 medium supplied with 29 mg L⁻¹ cadmium chloride (CdCl₂; Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) which is equivalent to Cd 100 µM concentration. Both strains were maintained at 21 °C under continuous light of 60 µmol m⁻² s⁻¹ over the 400 to 700 nm waveband. Cells were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of one-cell inoculums to fresh medium once a fortnight. Prior to the experiments, the cultures were re-cloned (by isolating a single cell) to avoid including any previous spontaneous mutants accumulated in the cultures. In order to unify experimentation criteria, all tests were performed while both microalgal strains were in exponential growth phase.

Biovolume Measurement

Cell samples from Dc^{wt} and Dc^{CdR100} strains were selected and analyzed using light microscopy. Samples were observed with an Olympus CK-2 microscope at x400 magnification in a Neubauer counting chamber.

Linear dimensions were measured according to Sun and Liu (2003). Biovolume (V) was obtained applying the following formula:

$$V = a^3 * \pi/6$$

where a is the cell diameter. Fifty individual cells of each strain were measured, and the information were then input into a Microsoft Excel worksheet which V±sd were calculated.

Malthusian Fitness Assay

Malthusian fitness (m) was calculated in accordance with Crow and Kimura (1970) in eight replicates of each *D. chlorelloides* strain as well as in eight controls, using the following equation:

$$m = \log_e(N_t/N_0)/t$$

where t is the number of days elapsed since the beginning of the experiment, and N₀-N_t are cell numbers at the start and the selected days of experiment, respectively.

Photosynthesis Activity

Photosynthetic yield (Φ_{PSII}) was analyzed by means of the dual-channel PAM chlorophyll fluorometer (ToxY-PAM, Heinz Walz GmbH, Germany). The ToxY-PAM dual-channel yield analyser obtains highly sensitive measurements of effective quantum yield of the algae pigment

system II centres via assessment of the chlorophyll fluorescence yield and the saturation pulse method (Schreiber et al 2002).

Effective quantum yields (Y1 and Y2) were calculated from the fluorescence parameters F1, F2, Fm1 and Fm2 according to the equation:

$$Y = (F_m - F) / F_m \text{ (Genty et al. 1989)}$$

where F_m corresponding to the maximal fluorescence yield measured during a saturation pulse, and F corresponding to the fluorescence yield measured shortly before application of a saturation pulse. Values are expressed as Dc^{CdR100} Φ_{PSII} inhibition (%) respect to values obtained from Dc^{wt}.

Gross photosynthesis rate (P_g) was estimated from the formula:

$$P_g = P_n + R$$

where P_g corresponding to the oxygen production rate of photosystem II, R (respiration) corresponding to the process by which in the presence of light microalgal cells consume oxygen and releases carbon dioxide, and P_n (net photosynthesis rate) is defined as the difference between P_g and R. The oxygen values were obtained employing a Clark-type electrode. Dissolved O₂ was measured in a 1 ml reaction chamber from a Chlorolab 2 System (Hansatech, Norfolk, UK). Chlorolab 2 provides a system for the study of respiration and photosynthesis from liquid samples under automated illumination from red (660 nm) LED light. In the toxicity assays, measurements were taken at 21 °C and 700 μmol m⁻² s⁻¹ irradiance.

The Φ_{PSII} activity was monitored on the software package ToxyWin v1.14 (Heinz Waltz GmbH, Germany), and oxygen measurements obtained both in darkness and in light conditions, were exported to a computerized chart recorder (O₂view, Hansatech, Norfolk, UK).

Determination of cadmium removed

The Cd removed by Dc^{CdR100} strain was evaluated using a modified method described by Stauber and Florence (1985). Total Cd in cells was determined from Dc^{CdR100} cultures into 20 ml culture flasks with initial cell densities adjusted to 10^4 cells ml^{-1} . Cultures were maintained during 30 days exposed to Cd^{2+} 100 μM under axenic growth up to a final cell concentration of 20×10^6 cells ml^{-1} . From these cultures, 4 ml aliquots of each were filtered through two superposed 1.2 μm MF-Millipore filters. Thus samples containing final concentrations of 80×10^6 cells ml^{-1} were obtained. Filters were separately digested at room temperature for 24 h with 1 ml of 15 M HNO_3 and 0.5 ml $HClO_4$. Cadmium was measured in both filters and the lower filter was used as blank.

Intracellular cadmium was measured from samples obtained by centrifugation at 4000xg for 5 min. Each pellet, contained a final cell concentration of 80×10^6 cells ml^{-1} , was resuspended for 20 min in 25 ml of a solution containing 0.02 M EDTA dissolved in deionized water. Afterwards, cells were centrifuged and washed twice with deionized water. The EDTA washing removed cadmium adsorbed onto the cell surface, thereby allowing only intracellular cadmium to be measured. The washed pellet was digested as in total Cd determination.

Digested samples were brought to final volume of 5 ml with Milli-Q water. Cadmium present in the samples was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) System in a 4300DV Perkin-Elmer ICP-MS (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA), according to Ward and Savage (1994). Cadmium bioadsorbed onto the cell surface was determined by subtracting the intracellular cadmium concentration from the total cadmium removed (bioadsorbed Cd = Total Cd - Intracellular Cd). The Cd removal percentage (%) was calculated on the basis of cadmium added to cultures (100 μM).

Data Analysis

Eight culture replicates were used for each experiment (n=8). Statistical analysis was performed using the computer software package GraphPad Prism v5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). A t-test analysis was used to compare the average between two groups ($p < 0.05$).

Results

The results show that cells from Dc^{CdR100} , obtained from Dc^{wt} populations growing under laboratory conditions in BG-11 medium supplemented with Cd 100 μ M, exhibit significant changes in their cell morphology in comparison to Dc^{wt} cells. Figure 1 shows a significant reduction of cell size in Dc^{CdR100} strain compared to Dc^{wt} . These changes affect both surface and cell biovolume.

Measurements made in a relevant number of Dc^{wt} and Dc^{CdR100} cells (n=50) displayed a significant reduction of cell surface exposed to the external environment, obtaining values of $1.82 \pm 0.59 \mu m^2$ and $0.71 \pm 0.22 \mu m^2$ to Dc^{wt} and Dc^{CdR100} cells, respectively. Similar results have been obtained to determine cell biovolume in both *D. chlorelloides* strains, obtaining values of $0.24 \pm 0.11 \mu m^3$ and $0.06 \pm 0.03 \mu m^3$ to Dc^{wt} and Dc^{CdR100} cells, respectively. In both cases, there are statistically significant differences ($p < 0.0001$) between the two *D. chlorelloides* strains (Figure 2).

Malthusian fitness analysis shows that Dc^{wt} and Dc^{CdR100} cells show m values of 2.53 ± 0.55 and 1.65 ± 0.33 doublings d^{-1} respectively. This reduced cell growth ability represents statistically significant differences ($p < 0.001$) between the two strains (Figure 3).

Chlorophyll fluorescence measurements, obtained by mean the dual-channel PAM fluorometer (ToxY-PAM) are summarized in Table 1. When Dc^{wt} strain was confronted with itself, Y1 and Y2 values were similar. However, when Dc^{wt} (channel 2, reference) and Dc^{CdR100} (channel 1, sample) were confronted, the effective quantum yield in channel 1 ($Y1=0.15\pm0.01$) was significantly lower than channel 2 ($Y2=0.44\pm0.01$), obtaining a Φ_{PSII} inhibition percentage of 64.87 ± 0.91 % in Dc^{CdR100} samples compared to Dc^{wt} samples. These results demonstrates that the changes in Dc^{CdR100} strain directly or indirectly affect the complex process of photosynthesis and thus lower the quantum yield of energy conversion at the photosynthetic reaction centers.

Analysis of production and consumption oxygen levels exhibited by both *D. chlorelloides* strains is summarized in Table 2. Oxygen balance displayed on gross photosynthesis activity of Dc^{CdR100} strain is $25.95 \pm 3.91\%$ lower than that exhibited by the wild type Dc^{wt} . When the results are broken down into those obtained during light (Pn) and dark (R) phases, can be seen that Dc^{CdR100} strain shows a higher deficit in O_2 consumption (55.81 ± 7.52 %) than O_2 production (25.64 ± 3.59 %), respect to values exhibited by Dc^{wt}

Our results show that Dc^{CdR100} strain cells are able to bioaccumulate and bioabsorb cadmium, allowing it to be removed from the medium. This microalgal strain showed a high ability for cadmium removal. Table 3 shows the cadmium removed from Dc^{CdR100} cultures after 30 days. Part of the total cadmium removed by cells was accumulated intracellularly and another part was adsorbed onto the cell surface. The amount of intracellular Cd^{2+} was $29.18 \mu M$, while bioadsorbed Cd^{+2} was $62.45 \mu M$. Thus, in cultures exposed to Cd $100\mu M$ the uptake of cadmium reached a value of $1.29\times10^{-4} \mu g \text{ cell}^{-1}$ in 30 days. These data show that Dc^{CdR100} strain has a very

high capacity to remove cadmium from the aquatic environment (over 90%), although the most of the heavy metal removed ($\approx 70\%$) is adhered to the cell wall.

Discussion

The aim of our study was to analyze the characteristics and degree of specificity exhibited by a Cd-resistant *D. chlorelloides* strain, obtained from the Cd-sensitive wild type strain long time grown in BG-11 culture medium with cadmium-enriched progressively until achieving a permanent population living in an environment containing Cd 100 μM , to be used in bioremediation processes and as bioelement in a whole-cell biosensor system. Cadmium is one of the most toxic metals with no described biological function. This heavy metal can produce serious hazards to aquatic organisms, including microalgae.

The significant effect of Cd 100 μM on Malthusian fitness of $\text{Dc}^{\text{CdR100}}$, respect to those obtained in Dc^{wt} populations living in growing in BG-11 without cadmium, suggests that the survival of this Cd-resistant strain could only be achieved by some kind of adaptation to these adverse conditions. Thus, after further incubation for several months, some cultures showed growth of cells that were resistant to the effect of Cd. The key to understanding adaptation of the wild type *D. chlorelloides* to these extremely adverse conditions is to analyze these rare algal variants that occur after the massive destruction of the sensitive cells by Cd.

Our results demonstrate that acclimatization of the wild type *D. chlorelloides* strain to live in a culture medium highly contaminated with Cd ($\text{Dc}^{\text{CdR100}}$) induced morphological changes mainly related to cell size. This fact are in agreement with other authors which have suggested that cell morphology of microalgal populations exposed to highly contaminated environments

rapidly evolving by successive beneficial mutations spreading rapidly through natural selection (Lenski and Travisano, 1994; Elena et al., 1996). This specific lower cell size exhibited by Dc^{CdR100} is according with the results obtained in *D. chlorelloides* strains resistant to TNT (López-Rodas et al. 2006), Cr^{+6} (D'ors et al. 2010) or Cr^{+3} (Pereira et al., 2013). However, no cell modifications were observed in *Scenedesmus intermedius* (Baos et al. 2002) or *Microcystis aeruginosa* (García-Villada et al. 2004) strains which survived in highly polluted aquatic environments. These differences could be due to the existence of different strategies exhibited by these organisms to survive in extreme environments.

Additionally, we propose the hypothesis based on the concept already tested by Altamirano et al (2004) through which different microalgae genotypes render distinct sensitivities to a particular toxicant. This concept can be applied on Dc^{CdR100} strain, which used in tandem in conjunction with the wild type strain (Dc^{wt}) would allow its potential application in a dual-head biosensor system for detecting Cd. Wild type *D. chlorelloides* (Dc^{wt}) strain exhibited high sensitivity to Cd whereas Dc^{CdR100} strain exhibited high resistance to Cd. Thus, Dc^{wt} strain would provide the biosensor sensitivity while its specificity arises from the different Dc^{CdR100} strain responses (Figure 4).

Although the practical advantages of biosensors are well known, their measurements should be verified and validated before being accepted. In this sense, some of the aspects described by Thevenot et al. (2001), such as sensitivity and detection limits, have been studied in this work through the photosynthetic activity exhibited by Dc^{wt} and Dc^{CdR100} strains. Thus, the results showed that Dc^{CdR100} has reduced its Φ_{PSII} activity about 65% compared to Dc^{wt} . This difference between the two strains could be used specifically for their inclusion into a dual head biosensor.

These results are consistent with the view taken by Schreiber et al. (2002) by which Φ_{PSII} is an excellent biomarker of risk associated with toxic pollutants on aquatic microalgae. This method provides no information on the photosynthetic performance of a sample to the continuous light. The quantum yield is affected by many more contaminants than those inhibiting the primary reactions near to photosystem II. So, because the specific Φ_{PSII} rate is considered a reproducible ecologically relevant response and not strongly test system specific, it was selected as an appropriate test endpoint.

In the present study, photosynthetic oxygen development and respiration response exhibited by $\text{Dc}^{\text{CdW100}}$ strain and differences compared to Dc^{wt} strain were also studied, and the results showed that the inhibition percentage measured on gross photosynthesis values were lower than those obtained on Φ_{PSII} activity, being higher the differences in dark phase (respiration) than light phase (net photosynthesis). These results indicate greater activity stability of the activity of photosystem I (PSI). As shown in some other studies, PSI showed the ability to maintain physiological activity under environmental stress (Li et al., 2006; Huang et al., 2010). Thus, these results showed the tolerance of PSI to Cd exposure. On the contrary, PSII was more susceptible to Cd exposure.

Many studies demonstrated that PSII was one of the most sensitive target sites for environmental stress, such as heavy metals (Qian et al., 2009; Zhang et al., 2010). Huang et al. (2010) demonstrated that exposures to 100 μM Cd had no inhibition on Φ_{PSI} whereas effective Φ_{PSII} showed significant decrease compared to the control. Results obtained by Atal et al. (1991) suggested that Cd caused the disassembly of PSII, and Tukaj et al. (2007) reported that Cd seriously inhibited oxygen evolution.

Some authors demonstrated the occurrence of Cd content as intramitochondrial granules, coupled with functional and structural changes, in selected strains of green algae exposed to heavy metal (Silverberg 1976). These effects was in accordance with the inhibition of respiratory O₂ consumption rate (Figure 4). Thus, modification of cell wall, cytoplasmic vacuolization and the degradation of chloroplast were the most striking modifications. These results suggest the localization of Cd in the cells and the role of cell wall and vacuole in conferring metal tolerance (Aguilera and Amils, 2005; Kola and Wilkinson, 2005)

Several authors have shown in their studies the ability of algae to absorb heavy metals (Megharaja et al., 2003) and monitor their concentration in aquatic environments (Sigg, 1987). This high capacity to sequester heavy metals from the environment is linked to bioaccumulation processes.

Our results reveal that much of Cd added to *D. chlorelloides* cultures appears bound to the cell wall. This adsorption process would be consistent with the fact that the cell wall is a first wall in the absorption of the heavy metal and plays a key role in the processes of tolerance to metal toxicity. Macfie and Welbourn (2000) reported that total amount of Cd uptaken by a walled-strain of *Chlamydomonas reinhardtii* was greater than the wall-less strain after 24 h.

Is widely known as an effort to protect themselves against metal toxicity, microalgae have developed mechanisms other than the adsorption phenomenon. Thus, although Dc^{CdR100} mainly accumulates Cd in cell walls, approximately 30% of removed Cd intracellularly appears. These results are in agreement with those obtained by other authors. Albergoni et al. (1980) demonstrated that the single-celled flagellate *Euglena gracilis* chelated and accumulated the

higher amount of cadmium into the cells. In the same way, Carr et al. (1998) observed that the green algae *Chlorella vulgaris* accumulated Cd intracellularly.

Conclusion

In summary, wild-type *D. chlorelloides* populations previously exposed to Cd causes the appearance of resistant cells by means rare spontaneous mutation to this specific heavy metal. These cells exhibit both morphological and photosynthetic activity changes compared with wild type cells, which can be exploited to obtain a specific microalgal biosensor able to determine cadmium in freshwater environments. Additionally, Dc^{CdR100} strain was found to have good accumulation properties for Cd. The high amount of Cd in its cells and its high Cd tolerance suggest the possibility of using these microalgae strains in bioremediation processes on freshwater polluted with this heavy metal.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of the Spanish Government (CTM2013-46870-C2-1-P and CTM2012-34757) and the Mexican UMSNH University (PI 26.8). The technical support of Juan José Garcia and Lara de Miguel is kindly acknowledged.

References

- Aguilera A, Amils R. 2005. Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquat Toxicol* 75: 316-329.
- Albergoni V, Piccini E, Coppelotti O. 1980. Response to heavy metals in organisms-I. Excretion and accumulation of physiological and nonphysiological metals in *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C* 67: 121-127.
- Altamirano M, Garcia-Villada L, Agrelo M, Sanchez-Martin L, Martin-Otero L, Flores-Moya A, Rico M, Lopez-Rodas V, Costas E. 2004. A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: An application to detect TNT. *Biosens Bioelectron* 19: 1319-1323.
- Atal N, Saradhi PP, Mohanty P 1991. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium: analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. *Plant Cell Physiol* 32: 943-951.
- Baos RL, 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: 593-600.
- Bengtson Nash SM, Quayle PA, Schreiber U, Müller JF. 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquat Toxicol* 72: 315-326.

- Carr HP, Cariño FA, Yang MS, Wong MH. 1998. Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. Bull. Environ. Contam Toxicol 60: 433-440.
- Corradi MG, Gorbi G, Bassi M. 1995. Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater algae *Scenedesmus acutus*. Ecotoxicol Environ Safety 30: 106-110.
- Corradi MG, Gorbi G, Abd-El-Monem HM, Torelli A, Bassi M. 1998. Exudates from the wild-type and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr(VI) toxicity to algae. Chemosphere 37: 3019-3025.
- Costas E, Carrillo E, Ferrero LM, Agrelo M, Garcia-Villada L, Juste J, López-Rodas V. 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea herbicide. Phycologia 40: 391-398.
- Crow JF, Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. Burgess Pub. Co., 591 p.
- D'ors A, Pereira M, Bartolomé MC, López-Rodas V, Costas E, Sánchez-Fortún S. 2010. Toxic Effects and Specific Chromium Acquired Resistance in Selected Strains of *Dictyosphaerium chlorelloides*. Chemosphere 81: 282-287.
- D'Souza SF. 2001. Microbial biosensors. Biosens Bioelectron 16: 337-353.
- Elena SF, Cooper VS, Lenski RE. 1996. Punctuated evolution caused by selection of rare beneficial mutations. Science 272: 1802-1804.
- García-Villada L, López-Rodas V, Bañares E, Flores-Moya A, Agrelo M, Martín- Otero L, Costas E. 2002. Evolution of microalgae in highly-stressing environments: an experimental model analysing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from

sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitotoluene (TNT) by rare pre-selective mutations. J Phycol 38: 1074-1081.

García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, Lopez-Rodas V, Costas E. 2004. Occurrence of copper-resistant mutants in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Characterization and future implications in the use of copper sulfate as an algacide. Water Res 38: 2207-2213.

Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim Biophys Acta 990: 87-92.

Huang W, Zhang SB, Cao KF. 2010. Stimulation of cyclic electron flow during recovery after chilling-induced photoinhibition of PSII. Plant Cell Physiol 51: 1922-1928.

Kola H, Wilkinson KJ. 2005. Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. Environ Sci Technol 39: 3040-3047.

Lenskil RE, Travisano M. 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. Proc Nat Acad Sci USA 91: 6808-6814.

Lewis MA. 1995. Algae and vascular plant tests, In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environment Fate, and Risk Assessment, Rand, G. M. (2nd Ed.), Taylors & Francis, Washington, DC, USA. pp. 135-170.

Li XG, Zhao JP, Xu PL, Meng JJ, He QW. 2006. Effects of cyclic electron flow inhibitor (antimycin A) on photosystem photoinhibition of sweet pepper leaves upon exposure to chilling stress under low irradiance. Agric Sci China 5: 506-511.

- López-Rodas V, Agrelo M, Carrillo E, Ferrero LM, Larrauri A, Martín-Otero L, Costas E. 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur J Phycol* 36: 179-190.
- López-Rodas V, Costas E, Flores-Moya A, García-Villada L. 2006. Phenotypic evolution in microalgae: a dramatic morphological shift in *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyta) after exposure to TNT. *Acta Bot Malacitana* 31: 141-147.
- Macfie SM, Welbourn PM. 2000. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 413-419.
- Megharaja M, Ragusa SR, Naidu R. 2003. Metal-algae interactions: implication of bioavailability. In: Naidu, R., Gupta, V.V.S.R., Rogers, S., Kookana, R.S., Bolan, N.S. and Adriano, D.C. (eds) *Bioavailability, Toxicity and Risk Relationships in Ecosystems*, Science Publishers, Enfield, New Hampshire pp. 109-144.
- Naessens M, Leclerc JC, Tran-Minh C. 2000. Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicol Environ Safety* 46: 181-185.
- Pereira M, Bartolomé MC, Sánchez-Fortún S. 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93: 1057-1063.
- Podola B, Nowack ECM, Melkonian M. 2004. The use of multiple-strain algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds, *Biosens Bioelectron* 19: 1253-1260.

- Qian HF, Li JJ, Sun LW, Chen W, Sheng GD, Liu WP, Fu ZW. 2009. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat Toxicol* 94: 56-61.
- Rai LC, Gaur JP, Kumar HD. 1981 Phycology and heavy-metal pollution. *Biol Rev* 56: 99-151.
- Raja R, Hemaiswarya S, Kumar N A, Sridhar S, Rengasamy R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit Rev Microbiol* 34: 77-88.
- 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: 1901-1905.
- Sanders CA, Rodriguez Jr M, Greenbaum E. 2001. Stand-off based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction. *Biosens Bioelectron* 16: 439-446.
- Schreiber U, Müller JF, Haugg A, Gademann R. 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Res* 74: 317-330.
- Shamsuddoha ASM, Bulbul A, Imamul Huq SM. 2006. Accumulation of arsenic in green algae and its subsequent transfer to the soil–plant system, *Bangladesh J Microbiol* 22: 148-151.
- Sigg L. 1987. Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. In W. Stumm [ed.], *Aquatic surface chemistry*. Wiley Interscience, pp 319-349.
- Silverberg BA. 1976. Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia* 15: 155-159.

- Stauber JL, Florence TM. 1985. The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat Toxicol* 6: 297-305.
- Sun J, Liu D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 25: 1331-1346.
- Tukaj Z, Bascik-Remisiewicz A, Skowronski T, Tukaj C. 2007. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: a study at low and elevated CO₂ concentration. *Environ Exp Bot* 60: 291-299.
- Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16: 121-131.
- Védrine C, Leclerc JC, Durrieu C, Tran-Mihn C. 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosens Bioelectron* 18: 457-463.
- Ward NI, Savage JM. 1994. Metal dispersion and transportational activities using food crops as biomonitors. *Sci Total Environ* 146: 309-319.
- Wright DA, Welbourn PM. 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ Rev* 2: 187-214.
- Zhang DY, Pan XL, Mu GJ, Wang JL. 2010. Toxic effects of antimony on photosystem II of *Synechocystis* sp. as probed by in vivo chlorophyll fluorescence. *J Appl Phycol* 22: 479-488.

Table 1. Results obtained by mean chlorophyll fluorescence measurements with the dual-channel PAM fluorometer ToxY-PAM. Values represent mean $\pm$ sd of eight independent assays (n=8).

		ToxY-PAM					
<i>D. chlorelloii</i> strains		Channel 1 (sample channel)			Channel 2 (reference channel)		
		F1	Fm1	Y1	F2	Fm2	Y2
Dc ^{wt} vs Dc ^{wt}	8	1475.22 $\pm$ 8.	1750.33 $\pm$ 14.	0.16 $\pm$ 0.	1354.90 $\pm$ 9.1	1604.52 $\pm$ 16.	0.16 $\pm$ 0.01
Dc ^{wt} vs Dc ^{CdR100}	8	1469.46 $\pm$ 5.	1737.29 $\pm$ 6.6	0.15 $\pm$ 0.	1093.15 $\pm$ 93.	1995.17 $\pm$ 161	0.44 $\pm$ 0.01
		56	65	01	1	37	
		97	5	01	30	.60	***

F1, F2: fluorescence yields measured shortly before application of a saturation pulse in Ch1 and Ch2, respectively.

Fm1, Fm2: maximal fluorescence yields measured during a saturation pulse in Ch1 and Ch2, respectively.

Y1, Y2: effective quantum yields of the samples in Ch1 and Ch2, respectively.

***: significant differences (p<0.0001) respect to Y1.

Table 2. Oxygen balance (Pg) exhibited by the wild type Dc^{wt} and Dc^{CdR100} strains and measurement of oxygen production (light phase, Pn) and consumption (dark phase, R) by both *D. chlorelloides* strains. Values represent mean $\pm$ sd of eight independent assays (n=8).

		<i>D. chlorelloides</i> strain		
photosynthesis parameter	n	Dc^{wt} (nmol O ₂ ml ⁻¹ min ⁻¹)	Dc^{CdR100} (nmol O ₂ ml ⁻¹ min ⁻¹)	inhibition (%)
Pg	8	72.39 $\pm$ 3.74	50.81 $\pm$ 5.31 ^{**}	29.95 $\pm$ 3.91
Pn	8	61.62 $\pm$ 2.40	45.98 $\pm$ 3.95 ^{**}	25.64 $\pm$ 3.59
R	8	-10.77 $\pm$ 1.38	-4.83 $\pm$ 1.36 ^{**}	55.81 $\pm$ 7.52

Pg: gross photosynthesis; Pn: net photosynthesis; R: respiration.

^{**}: significant differences (p<0.001) respect Dc^{wt} values.

Table 3. Cadmium removed by the 30th day in cultures of Dc^{CdR100} strain exposed to Cd 100 μ M.

Values represent mean $\pm$ sd of eight independent assays (n=8).

initial Cd⁺² added to cultures (μM)	intracellular Cd⁺² (μM)	bioadsorbed Cd⁺² on cell surface (μM)	Cd⁺² unremoved (μM)
100	29.18 $\pm$ 4.67	62.45 $\pm$ 5.22	8.36 $\pm$ 1.23



Figure 1.

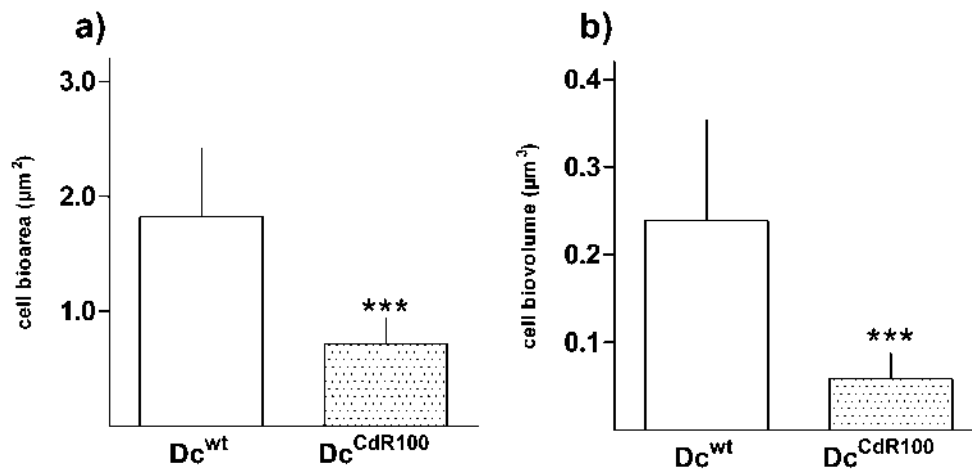


Figure 2.

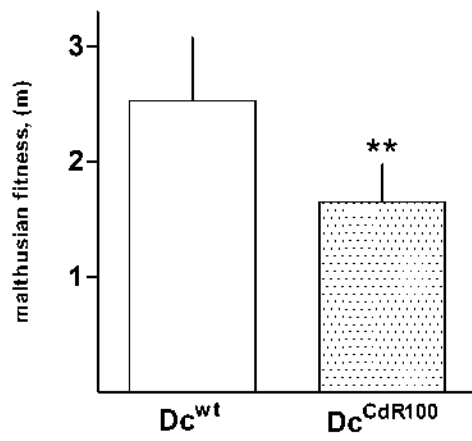


Figure 3.

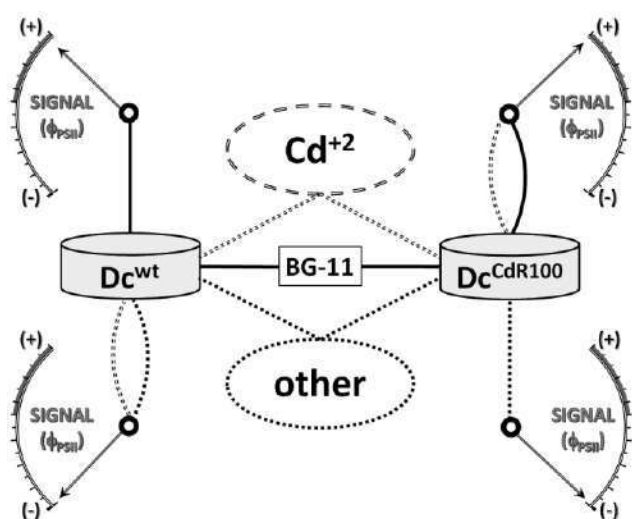


Figure 4.

PP5.1

Presence of emergent pollutants in sediments of a tropical coastal lagoon in Baja California Sur, Mexico

O.F. Becerra-Rueda¹, A. Sánchez-González¹, S. Díez-Salvador², A.J. Marmolejo-Rodríguez¹, G.M. Rodríguez-Figueroa¹

¹ Department of Oceanology, CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, Mexico

² Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Barcelona, Cataluña, Spain

Introduction: Since the last decades, human needs and technology development allowed synthesis of new substances, of which is not well understood the probable environmental risks. These new substances had been referred as emerging pollutants (EC), and in this group of pollutants we can find different compounds: flame retardants, pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), detergents, and new types of herbicides and pesticides. Particularly in Mexico, there are few studies for PPCPs because of the high cost-time for developing analytical methods for determining them. According to several studies, PPCPs on freshwater and marine environments, can affect the organisms living in these ecosystems. These compounds can affect some biological processes as growth and reproduction in some fish and mussels, moreover can cause significantly stress processes. There are some marine organisms of commercial interest that could be on threat by being exposed to PPCPs on this coastal lagoon.

Objective: The aim of this study is to know the actual situation of PPCPs in sediments of the tropical lagoon of La Paz.

Materials and methods: An extraction with methanol was performed to obtain the PPCPs from sediments. The determination of this compound was conducted by HPLC-MS.

Results: The expected results of this study show the existence of PPCPs on sediments of coastal lagoon of La Paz. The marine species of commercial interest (clams, mussels, and scallops) may be threatened by these PPCPs, due to possibly modifying biological processes as growth and sexual behaviour.

Financial support: CONACYT, COFAA-IPN, CSIC, SIP20160046 given to A. Sánchez.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.242>

PP5.2

Toxicity assessment of mixture Cr(VI)/Fe(II) on *Artemia franciscana* under pH variations

A.A. Cortés Téllez¹, G. Estévez Delgado¹, S. Sánchez-Fortún², C. Bartolomé Camacho²

¹ Laboratory of Toxicology, School of Chemistry-Pharmacobiology, UMSNH, Morelia, Michoacan, Mexico

² Toxicology & Pharmacology Department, Faculty of Veterinary, UCM, Madrid, Spain

Introduction: The industrial wastewaters contain combinations of metals at high concentrations that which be released into seawater. Within this context, chromium is found at contaminated sites, and exists in two main oxidation states Cr(VI)/Cr(III) characterized by different chemical behavior, bioavailability and toxicity. It is well known that the toxicity of metals is greatly influenced by water parameters like pH with effects on speciation, solubility, bioavailability and mobility. However, the form of Cr is changed by natural processes or through redox methods that involves injecting reducing agents like Fe(II) to reduce Cr(VI)–Cr (III). Nevertheless,

these metal interactions in pH changes conditions can represent a danger for aquatic organisms belonging to the first trophic levels with synergistic effects.

Objective: Prediction of the combined effects on the mixture toxicity of Cr(VI)/Fe(II) under pH variations on *Artemia franciscana*.

Materials and methods: To predecit the effect of interaction between Cr/Fe, the substances were FeSO₄/K₂Cr₂O₇. *Artemia franciscana* were exposed to exponential concentrations and a pH range of 4.5–8.5 to determine LC₅₀₍₂₄₎ and synergism and antagonism through Combination Index (CI) using the software package CompuSyn v 1.0.

Results: It was found that, the interaction of Cr/Fe at low pH (4.5, 5.5) and 6.5 the effect produced was synergistic at low concentrations, but at high levels it resulted in the addition. However, the control pH tested (8.5) the antagonism was intensified at low concentration and this behavior decline at higher level.

Conclusions: The present study indicate that the combined application with Fe(II) to reduce Cr in waters can intensify the toxicity response in mixture at low pH on marine organisms, and emphasize the pH determine the speciation and hence toxicity of these metals in the aquatic environment.

Financial support: Coordinación de la Investigación Científica.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.243>

PP5.3

Response of antioxidant and detoxification enzyme activities in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to acetamiprid

L.B. Parra Morales^{1,2}, R.A. Alzogaray^{3,4}, L. Cichón⁵, S. Garrido⁵, F. D'Hervé⁶, M. Montagna^{1,2}

¹ Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC)-CONICET-UNCo, Neuquén, Argentina

² Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina

³ UNIDEF, CITEDEF, CONICET, CIPEIN, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina

⁴ Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, (3iA-UNSAM), Buenos Aires, Argentina

⁵ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Alto Valle, General Roca, Argentina

⁶ Funbapa Laboratorio de Control Biológico, Villa Regina, Río Negro, Argentina

Introduction: Control strategies used against *Cydia pomonella* (L), includes application of neonicotinoid insecticides such as acetamiprid. In the valleys of Río Negro and Neuquén, non-target adults of the codling moth may be exposed to sublethal concentrations of pesticides. The stress, caused by this exposure might activate antioxidant and detoxification systems to maintain the redox homeostasis which are essential for the physiological health of the insect.

Objective: The objective of this study was to evaluate the effects of different sublethal concentrations of acetamiprid on cytochrome P450 monooxygenases (CYP450) activity and the antioxidant system in adults of *C. pomonella*.

Materials and methods: One-two days-old adult moths from a field population (FP) and a laboratory susceptible strain (LSS) were exposed for 24 h to dry residues of acetamiprid applied to glass cups and their lifts (1 mL of insecticide dissolved in acetone: 6.25, 25, 50, 100 and 200 ppm) or acetone alone. The enzymatic activities were



Tip Revista Especializada en Ciencias
Químico-Biológicas

ISSN: 1405-888X

revistatip@yahoo.com

Universidad Nacional Autónoma de
México
México

Cortés Téllez, Alondra A.; Sánchez-Fortún Rodríguez, Sebastián; Bartolomé Camacho,
Ma. Carmen

Mecanismos de resistencia a Metales tóxicos (CD) bajo variaciones abióticas en
Microalgas

Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 21, núm. 1, 2018, pp. 40-
52

Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43253401005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

© 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 Téllez¹, Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez²
y Ma. Carmen Bartolomé Camacho^{1*}

¹Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, #403 c/Santiago Tapia C.P. 58000 Morelia, Michoacán, México. ²Departamento 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 coresistencia 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

En 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; Ruangsomboon & 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 O₂ y fijación de CO₂ 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 Munoz *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 (Mt(III)), 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 (OH^- , SH^- , COO^- , PO_4^{3-} , $\text{NO}_3^-\text{RNH}_2^-$, RS^- y 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

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

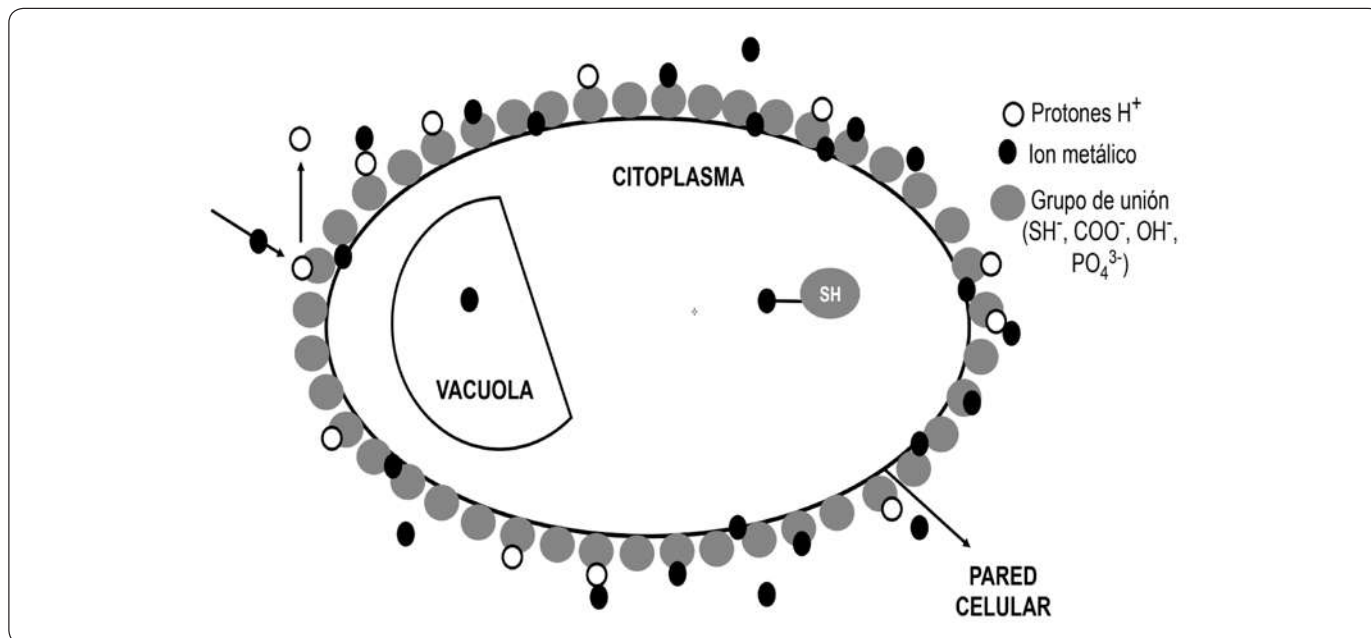


Figura 2. Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH^- , COO^- , OH^- , PO_4^{3-} , etc.) (Zeraatkar *et al.*, 2016).

CAX ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$) 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^+/H^+ 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, $-\text{COOH}$); 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^+ 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 & Collier, (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) ($\text{Dc1M}^{\text{Cr(VI)R25}}$) comparada con la variante tipo silvestre (Dc1M^{wt}), 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 traduciendo 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 NO₃ 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

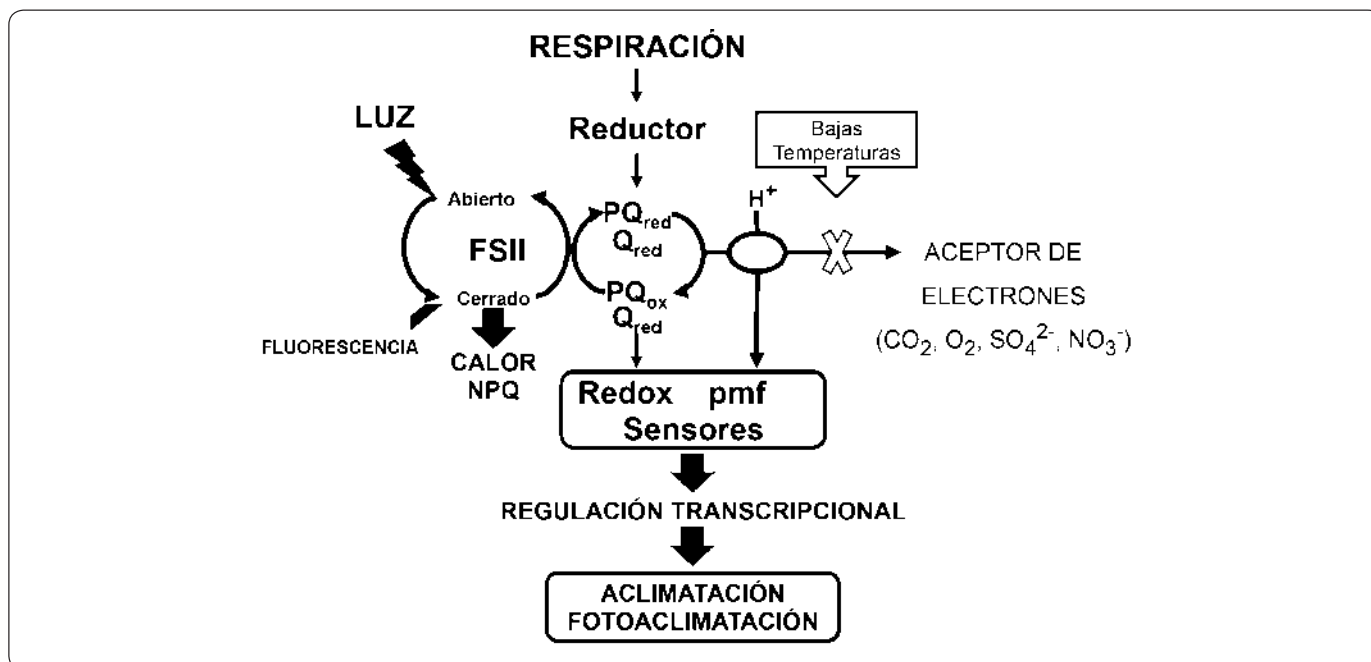


Figura 3. Sistema de transporte de electrones con actividad redox bajo variaciones en temperatura e intensidad lumínica. Fotosistema II (FSII), Procesos no fotoquímicos (NPQ-Calor), Plastoquinona reducida (PQ_{red}), Quinona reducida (Q_{red}), Plastoquinona oxidada (PQ_{ox}), Quinona reducida (Q_{ox}),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

($^1O_2$) (Okamoto *et al.*, 2001). En adición, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se genera durante la reducción del O_2 en el PSI, la SOD (superóxido dismutasa) dismuta el $O_2^{\cdot-}$ a O_2 y H_2O_2 y éste último tiene la capacidad de reaccionar con iones metálicos (ej., Cu(II), Fe(III)) produciendo el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), un oxidante fuerte que puede reaccionar y generar estrés oxidativo sobre proteínas, enzimas clave (ej. RUBISCO en la fijación de CO_2), 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, α -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_2) 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 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 273 nM comparada con el valor mostrado en *P. subcapitata* de 127 nM. 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; Jammers *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/es00164a002

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

Campbell, 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 cDNA LCT1 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). Phytochelatins 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).
- Fotovat, 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 γ -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/s0030000050275
- Heuillet, E., Moreau, A. & Halpern, S. (1986). Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: 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. & Höfheld, 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., Pocock, 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., Díaz-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 Cd²⁺/H⁺ 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., Ahmadvadeh, 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

Saber Más

Revista de Divulgación

de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Las microalgas ¿villanas o heroínas?

Las neuronas espejo
Lunares ¿amigos o enemigos?
Diferencias y similitudes entre el mezcal y el tequila
La naturaleza y la ciencia económica
El surgimiento de las etiquetas verdes

El aire que respiramos y los líquenes
¿Existen los desastres naturales?
El paciente obeso con peso normal
¿sabes como se crean las especies?

Año 8 / No. 46/ julio-agosto/ 2019
Morelia, Michoacán, México
U.M.S.N.H.



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

ISSN-2007-7041

CONTENIDO



Las Microalgas ¿Villanas o heroínas?

26

ARTÍCULOS

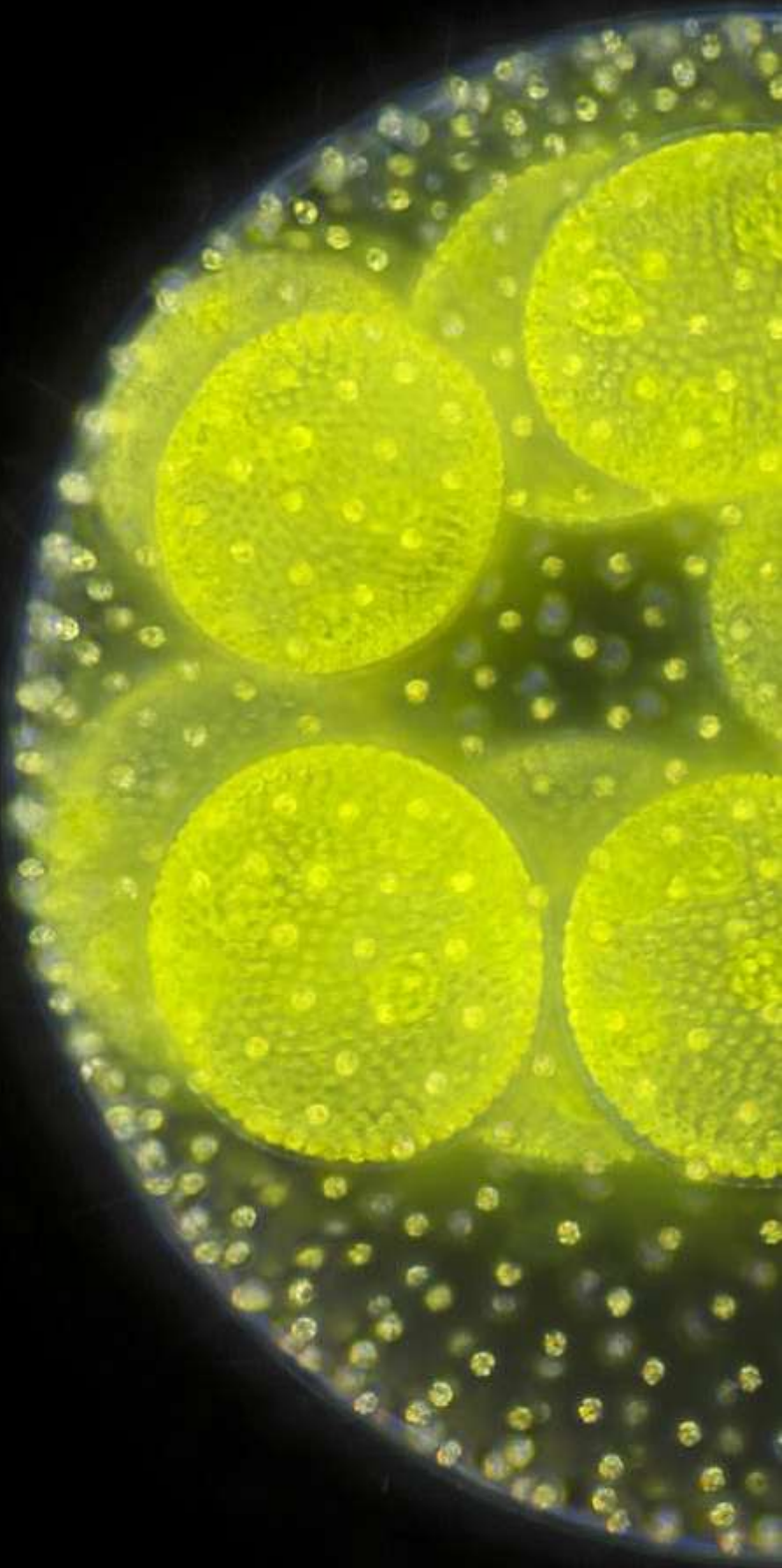
- Las neuronas espejo
- Lunares ¿amigos o enemigos?
- Diferencias y similitudes entre el mezcal y el tequila
- La naturaleza y la ciencia económica
- El surgimiento de las etiquetas verdes
- El aire que respiramos y los líquenes
- ¿Existen los desastres naturales?
- El paciente obeso con peso normal
- ¿sabes como se crean las especies?

15
18
22
36
40
44
48
52
55

ARTÍCULO PORTADA

Las Microalgas ¿villanas o heroínas?

Alondra Alelie Cortés Téllez y María Carmen Bartolomé Camacho





Las microalgas ¿hay buenas y malas?

Las microalgas son un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos con reproducción celular simple, permitiendo un mayor crecimiento celular, que es clave desde el punto de vista ecológico, ya que son la base que soporta la cadena trófica acuática, representando el 50% de la productividad fotosintética del planeta, lo que significa que de éstas proviene mucho del oxígeno que respiramos.

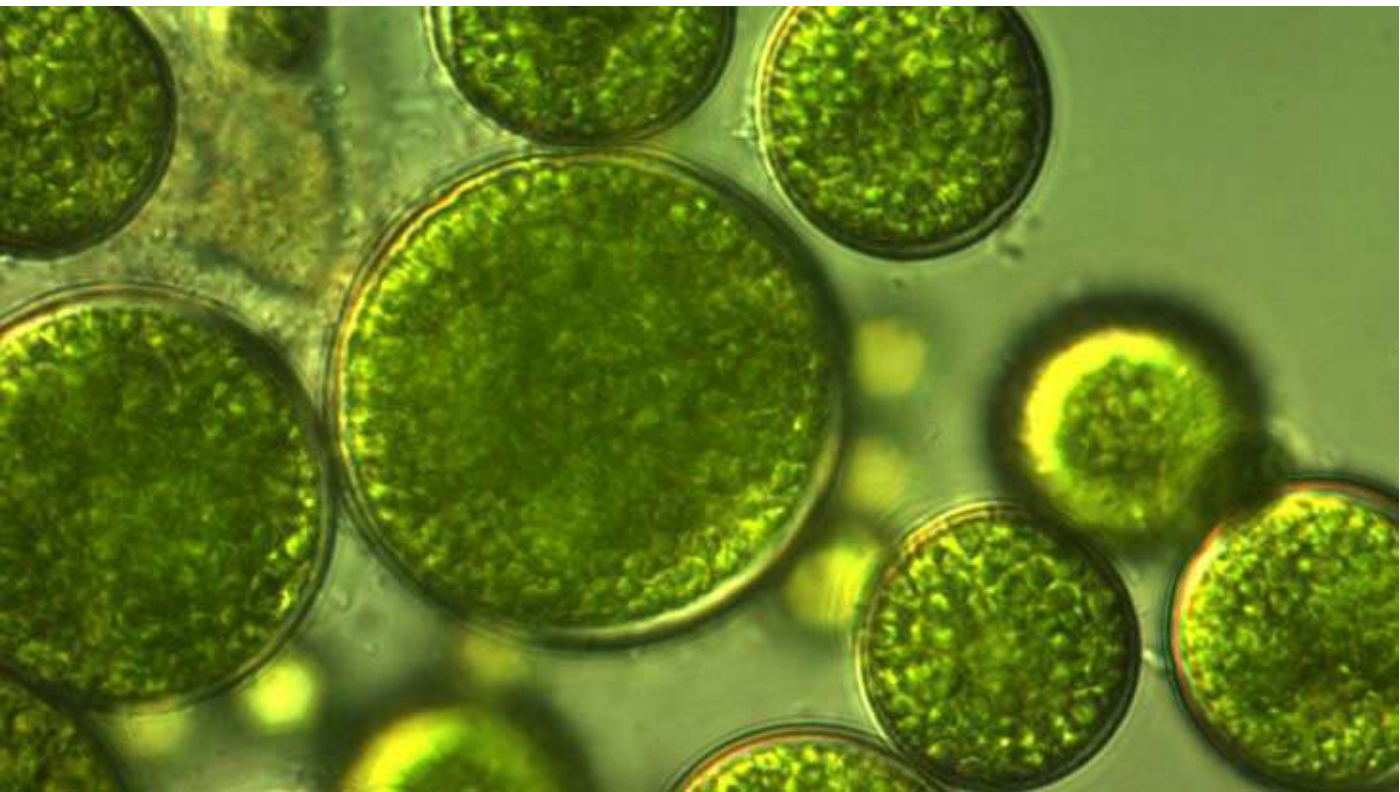
Existen más de cien mil especies diferentes de microalgas en los distintos cuerpos de agua (lagos, ríos, océanos) o incluso en suelos. Es por eso que, aunque muchas de ellas son benéficas –buenas- algunos tipos de algas como las cianobacterias (ej. verde-azules) son consideradas –villanas- debido a que producen toxinas peligrosas para el humano.

Bajo condiciones de altas temperaturas y concentraciones altas de nutrientes, entre otros factores, estas algas aumentan su crecimiento de forma explosiva, generando las llamadas “floraciones o blooms microalgales” tanto en aguas marinas como dulces. Desde la antigüedad, marineros relataban haber contemplado mares de colores o descritas en el Éxodo “...y toda el agua del río Nilo se convirtió en sangre”. Ahora sabemos que son las mareas rojas de dinoflagelados, que pueden cubrir cientos de kilómetros cuadrados de extensión, denominándolas “zonas muertas” por los niveles tan bajos de oxígeno y elevados de fósforo y nitrógeno.

En el 2014, sobre el Lago Erie en Ohio (Estados Unidos de América) se incrementó de forma alarmante su crecimiento, afectando por su toxicidad a más de cuatrocientos mil residentes del área que la utilizan como agua potable. Otro de los casos más conocidos, es la contaminación de toxinas microalgales en moluscos de consumo humano, es la saxitoxina, producida por dinoflagelados del género *Alexandrium*, de la que los mariscos se alimentan, acumulando la toxina lo cual provoca parálisis de quien los consume.

Las microalgas heroínas

Sin embargo, existen microalgas de otros géneros que podemos considerarlas como las heroínas de la película, ya que desde hace algunos años ha crecido el desarrollo de tecnologías que las utilizan como fuente de alimentación. Lo anterior porque contienen ácidos grasos esenciales poliinsaturados como el α -linoleico (ej. Omega-3) que tienen como principal función la reducción de enfermedades cardiovasculares (ej. arteriosclerosis) y proveen de pigmentos fotosintéticos antioxidantes como el β -caroteno. Varios tipos de microalgas (ej. *Chlorella*) a través de cambios en su ADN, facilitan una mayor síntesis de biomoléculas esenciales para el metabolismo celular como ciertas hormonas (ej. hormona del crecimiento) y proteínas con actividad bactericida como la lactoferrina que actúa contra infecciones diarreicas por *Salmonella* y *Escherichia coli*. También producen anticuerpos, vacunas





y otras proteínas terapéuticas con un alto atractivo en su manejo en la industria farmacéutica. Y ni de qué hablar, estas extraordinarias microalgas (ej. *Thalassiosira*) que han sido modelos de estudio en la investigación farmacéutica para el desarrollo de fármacos anti-oncológicos infantiles a través del intercambio del gen "enfermo" por uno correcto, para codificar a ciertos anticuerpos y unirse a células tumorales, actuando como "mochilas" para su administración.

Además, las microalgas se han utilizado en suplementos alimenticios por su alto contenido en vitaminas, carbohidratos (alginatos y agar de elevado interés farmacéutico y alimenticio), etc. Tanto las microalgas (ej. *Arthrospira* más conocida como *Spirulina*) como productos derivados, se venden en forma de cápsulas y tabletas, o en aditivos para mejorar el color y la calidad de productos alimenticios, cosméticos y fármacos. Igualmente, son utilizadas en acuicultura en piensos para la pigmentación de ciertos pescados de consumo humano, como el salmón, que en parte debe su color rosado al carotenoide astaxantina, con actividad antioxidante que acumulan microalgas de agua dulce del género *Haematococcus* cuando se encuentran "estresadas" por intensa radiación solar.

Spirulina como alimento

Por otra parte, el manejo de microalgas transgénicas permite un 30% mayor de producción de biocombustibles como el biodiesel (por mayor síntesis de lípidos) que los aceites de girasol en la reducción de emisiones de CO₂ y CO (ej. *Chlorella* y *Scenedesmus*), y otros productos derivados como el bioetanol, biopesticidas, biofertilizantes e incluso biopolímeros.

La mártir *Emiliana*

Estos microorganismos son tan sorprendentes como la peculiar microalga oceánica *Emiliana huxleyi*, que cuando hay un déficit de nutrientes (fósforo y nitrógeno) en el medio, además de estar en competencia con otras microalgas, muestra elementos de emergencia bloqueando su división celular controlando el suministro energético, pero lo más interesante es que cuando está en inanición, "digiere" sus propios componentes celulares, o estos mismos los pone a disposición de otras microalgas para aprovechar nutrientes al máximo y evolucionar a supermicroalgas resistentes a la carencia de nutrientes.



Edificio “Bio Intelligent Quotient” ubicado en Hamburgo, Alemania. Fuente: Slitter-Werk y ARUP



Detalle fachada edificio “Bio Intelligent Quotient”. Fuente: Slitter-Werk y ARUP

Microalgas como diseñadoras en arquitectura

Por otro lado, las microalgas se han utilizado en arquitectura ¡Espera! ¿En arquitectura? Si, son aislantes de temperatura en edificios a través de la fotosíntesis, tal es el caso del edificio “Bio Intelligent Quotient” ubicado en Hamburgo, Alemania. En la fachada muestra contenedores en forma de paneles de vidrio que albergan a microalgas ubicados de forma estratégica para absorber los rayos solares produciendo aislamiento térmico y energía verde, reduciendo notablemente emisiones de calor con efecto invernadero. El pabellón “Urban Algae Canopy” en Milán, Italia, que produce O2 equivalente a 4 hectáreas de bosque y en Londres, el proyecto H.O.R.T.U.S que funciona como un prototipo de jardín.

Las supermicroalgas

Las microalgas sobreviven a una variedad de condiciones, desde ambientes óptimos hasta escenarios extremos en temperatura, pH y luminosidad, entre otros más. Cambios que están ocurriendo en nuestro planeta de forma dramática, afectando negativamente a los ecosistemas, debido al rápido y alarmante crecimiento demográfico y de actividades como la industria, ocasionando reducción de recursos naturales.

La introducción de distintos contaminantes (ej. metales, plaguicidas, etc.) al ecosistema acuático, ocasiona la muerte de diversas especies acuáticas, produciendo alteraciones irreversibles en poblaciones y, por tanto, a la cadena trófica. Algunos contaminantes pueden detectarse, neutralizarse,

degradarse o eliminarse a través de tecnologías que implican el uso de microalgas y otros microorganismos como bacterias bajo condiciones específicas. Es aquí donde entran en acción las supermicroalgas.

En la actualidad, en varios países como España (siendo país pionero en la modificación genética de microalgas), Portugal, Italia, Estados Unidos, Chile, Brasil, y en nuestro país (como exploración emergente), se realizan investigaciones y se desarrollan tecnologías ambientales en microalgas para la remediación de ambientes acuáticos contaminados a través de la conservación y protección ambiental, esto impulsa biotecnologías de monitoreo ecológico para la conciencia y educación ambiental. Estos sistemas innovadores se presentan como procesos eficaces y económicos en la eliminación de contaminantes, y como un medio altamente sustentable. Muchos contaminantes como los metales duran de días hasta años en el ambiente, esta persistencia es un factor crítico en la eliminación de contaminantes, ya que interviene en la acumulación y transporte en los organismos.

Las supermicroalgas en la remoción de contaminantes

La clave en la función que desempeñas estas microalgas, está en acumular contaminantes (metales) a través de su absorción como una “esponja” y modificarlos a una forma menos nociva, secuestrando al metal que puede ser encerrado en una especie de burbuja llamada vacuola. Las mutaciones que anteceden a contaminantes a través de la “Teoría sintética neodarwinista” crean a las supermicroalgas resistentes.

Aprovechando esta capacidad, permitirían el diseño y desarrollo de nuevas cepas de microalgas genéticamente distintas con una mayor selectividad a contaminantes, para la detección y remoción de los mismos de los ecosistemas acuáticos. Estos seres fotosintéticos, convierten la energía luminosa en energía química, liberando O₂ y fijando el CO₂ atmosférico en la oscuridad en la elaboración de carbohidratos como glucosa, o de carbohidratos complejos como la celulosa, alginato, agar, y de proteínas con un elevado potencial para ser utilizados como “captadores” de metales en el tratamiento de aguas residuales.



*El prototipo de jardín “digital” a base de microalgas llamado H.O.R.T.U.S en Londres, Inglaterra.
Fuente: EcoLogicStudio por Claudia Pasquero y Marco Poletto*



Uso de las microalgas en la producción de biocombustibles.

En investigaciones hechas en España y otros países, reportan más del 80% en la captación y remoción de cadmio, plomo y arsénico usando a supermicroalgas. Así, ciertas ciencias aplicadas pueden crear proteínas con funciones “nuevas” o con mayor unión y transporte del metal dentro y fuera como un chaperón galante acompañando a la dama y ser “programadas” para eliminarlos.

¿Las microalgas como reactores nucleares?

En los años 70’s, el físico francés Francis Perrin descubrió, que ciertas supermicroalgas mutadas (Ej. *Chlamydomonas*) fueron los primeros reactores nucleares al acumular, sobrevivir y mantener reacciones de fisión nuclear a concentraciones muy altas de uranio radioactivo hace mil setecientos millones de años en aguas subterráneas de Oklo en Gabón, África.

Recapitulando, las microalgas son las verdaderas “Diosa Gaia” que ayudan y protegen al planeta, esta resistencia permitiría un sistema biotecnológico aportando mejores estimaciones en la detección rápida de contaminantes acuáticos a tra-

vés de un dispositivo que combinaría a las supermicroalgas vs. “microalgas originales” por medio de la fotosíntesis y de mecanismos que las supermicroalgas establecerían para su remoción.

Con esto, estamos ante un panorama en el que las microalgas abren todo un universo de posibilidades con mil y una aplicaciones para mejorar la calidad ecológica, energética y productiva de nuestro bello planeta. Por tanto, en un futuro cada vez más cercano, podríamos “cultivar” microalgas junto con las plantas que mamá tanto quiere en nuestras azoteas o terrazas y a la vez de tener un calentador solar, un tendedero, generaríamos verdadera energía verde, también tendríamos unas mascotas formidables que nos suministrarían “calor de hogar” como un talismán para combatir las energías “negativas” que llegan al planeta.

«Aunque existen microalgas villanas, la mayoría de ellas son benéficas y en un futuro no muy lejano, serán reconocidas como las heroínas de nuestro planeta»

En nuestro Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, realizamos investigaciones con microalgas con el propósito de evaluar la toxicidad de una gran cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, desde alteraciones en la fotosíntesis y crecimiento, debido a los efectos de los contaminantes en microalgas, hasta la inducción en microalgas

de resistencia a metales tóxicos y herbicidas, para desarrollar sistemas de monitoreo y de biorremediación. Lo anterior, con la finalidad de utilizar distintos géneros de microalgas tanto de agua salada como de agua dulce, para la detección en forma rápida de tales contaminantes en diferentes ecosistemas acuáticos, bajo diferentes condiciones de estrés ambiental.



M.C. Alondra Alelie Cortés Téllez, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción Biotecnología Alimentaria de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

aact886@hotmail.com

D.C. María Carmen Bartolomé Camacho, Profesor e Investigador Titular del Laboratorio de Toxicología Ambiental, de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

carbarcam@hotmail.com



Costas, E. y López-Rodas, V. (2015). Ingenieros nucleares microbianos. Polvo de Estrellas. Blog de Tendencias21 para explicar el Universo elegante en el que vivimos. https://www.tendencias21.net/bes/Ingenieros-nucleares-microbianos_a3.html

Grass, J.E. (2015). Algatectura: Sistemas para diseñar y alimentar a la ciudad por EcoLogicStudio. More than Green. La enciclopedia multimedia de la SOSTENIBILIDAD MEDIOAMBIENTAL, SOCIAL, ECONÓMICA Y CULTURAL en el medio urbano. <http://www.morethan-green.es/algatectura-por-ecologicstudio/>

De residuos agroalimentarios a aceite para producir biodiésel mediante cultivo de microalgas RETEMA. Revista

Técnica de Medio Ambiente. <https://www.retema.es/noticia/de-residuos-agroalimentarios-a-aceite-para-producir-biodiesel-mediante-cultivo-de-mic-nAcDq>

Entérate. (2015). Científicos mexicanos estudian microalgas para producir biocombustibles. Saber Más, 19:28. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/enterate/149-numero-19132/298-cientificos-mexicanos-estudian-microalgas-para-producir-biocombustibles.html>

Mora, V. (2013). SolarLeaf. Fachada de algas bio-reactivas. Sostenibilidad Medioambiental, Tecnología, Social, Económica y Cultural en el medio urbano. <http://www.morethangreen.es/solarleaf-solar-leaf-fachada-de-algas-bio-reactivas/>

Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains

Alondra A. Cortés¹, Sebastián Sánchez-Fortún², Martha García³ and M^a Carmen Bartolomé^{3,*}

¹ Ph.D. Student of Institutional Program in Biological Sciences, School of Chemistry-Pharmacobiology, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 403 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), México.

² Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

³ Environmental Toxicology Laboratory, School of Chemistry-Pharmacobiology, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 403 Santiago Tapia St., 58000 Morelia (Michoacán), Mexico.

* Corresponding author: carbarcam@hotmail.com; carbarcam@outlook.es

Received: 11/12/17

Accepted: 21/03/18

ABSTRACT

Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains

Environmental factors such as pH affect the growth rate, productivity, and the toxicity of metals in microalgae. This research reports the exponential growth of both wild-type (Dc1M^{wt}) and cadmium-resistant (DcRCd100) strains of *Dictyosphaerium chlorelloides* under different pH ranges at 1 to 15 days of exposure. The results reveal that DcRCd100 strain had a maximum growth rate at pH ranges close to neutrality as time increases (pH 8.0, $m = 0.93$ on 10th day), besides with limited growth capacity to moderately acidic pH (pH 4.0, $m = 0.67$ at 1st day; pH 5.0 $m = 0.16$, 0.13 at 10 and 15th days respectively). Whereas, Dc1M^{wt} strain grows with a maximum growth rate at pH 9.0, with an increase at longer exposure time ($m = 2.17$ on the 15th day). However, this strain was unable to maintain growth rates at the lowest pH tested at all exposure times. These results suggested that DcRCd100 shows changes in cell division as well as in the photosynthetic activity to cope with slightly acidic pH ranges, although it was unable to grow in alkaline environments.

Key words: *Dictyosphaerium chlorelloides*, cadmium resistance, exponential growth, pH

RESUMEN

Efectos del pH sobre la tasa de crecimiento exhibido por las cepas tipo salvaje y resistente a cadmio de *Dictyosphaerium chlorelloides*

Factores ambientales como el pH, afectan la tasa de crecimiento, la productividad y la toxicidad de los metales en microalgas. Esta investigación reporta el crecimiento exponencial de dos cepas de *Dictyosphaerium chlorelloides*, una tipo salvaje (Dc1M^{wt}) y otra resistente a cadmio (DcRCd100) bajo diferentes rangos de pH en el medio de cultivo en 1 a 15 días de exposición. Los resultados revelan que, la cepa DcRCd100 presentó una tasa de crecimiento máxima en rangos de pH cercanos al neutro a medida que se incrementa en el tiempo (pH 8.0, $m = 0.93$ al décimo día), además, con una capacidad de crecimiento limitada a valores de pH moderadamente ácidos (pH 4.0, $m = 0.67$ al 1er día de exposición, pH 5.0 $m = 0.16$, 0.13 a los 10 y 15 días, respectivamente). Mientras que, la cepa Dc1M^{wt} presentó su máximo crecimiento a pH de 9.0, conforme se incrementa en el tiempo de exposición ($m = 2.17$ al día 15). Sin embargo, esta cepa no puede mantener una tasa de crecimiento a los valores de pH más bajos ensayados en todos los tiempos de exposición. Estos resultados sugieren que, la cepa DcRCd100 muestra cambios en la división celular, así como en la actividad fotosintética para hacer frente a las condiciones en los rangos de pH moderadamente ácidos, pero no puede crecer en entornos alcalinos.

Palabras clave: *Dictyosphaerium chlorelloides*, resistencia a cadmio, crecimiento exponencial, pH

INTRODUCTION

Some metals are essential as biological components for metabolism at low concentrations (i.e. Cu, Fe) (Canli & Atli, 2003). However, aquatic ecosystems are often receptors of toxic metals derived by anthropogenic activities (Cd, Pb). They are a source of aquatic pollution with severe environmental implications such as bioaccumulation causing structural changes in populations and planktonic communities with evolutionary consequences (Qian *et al.*, 2009; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009). However, some phytoplankton species are sensitive to these contaminants while others become resistant, transforming these signs into extremely harmful to the aquatic food web (Guanzon *et al.*, 1994; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009). Toxic metals can induce alterations in the photosynthetic activity and productivity and changes in population growth rate (Yan & Pan, 2002). Resistant phytoplanktonic organisms may survive in chemically contaminated environments because of two different processes: physiological acclimation, which usually results from modifications of gene expression, and genetic adaptation by natural selection due to the occurrence of mutations that provide the resistance to several pollutants (Belfiore & Anderson, 2001; Sánchez-Fortún *et al.*, 2009; Gupta & Sandalio, 2012). According to Macfie & Welbourn, (2014) among the main mechanisms that photosynthetic cells present to maintain concentrations of free metal ions at levels that do not exceed cellular needs include binding in the cell wall, ion exchange, biotransformation, extra and intracellular chelation, or compartmentalization. On the other hand, the uptake and accumulation of metal ions by microalgae generally occurs in two stages: (1) first by a reversible and passive initial adsorption on the cell surface (e.g., to different functional groups OH⁻, SH⁻, COO⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, RNH₂⁻, RS⁻, and RO⁻) through electrostatic interactions, and (2) followed by a much slower, irreversible process, involving the active transport through the cell membrane into the cytoplasm, with subsequent binding to intracellular biomolecules (Monteiro *et al.*, 2012).

In this way, several physical-chemical environmental variables, such as pH fluctuations can

influence in the toxicity and resistance to metals in microalgae cells. In aquatic systems, the hydrogen ion concentration has frequently demonstrated to affect metal toxicity, in part through its influence on metal speciation (as a free metal ion in solution M⁺, organic metal complexation, and metal precipitation) rather than to the total metal concentration (Macfie *et al.*, 1994). Further, pH is the most important parameter influencing metal adsorption by microalgal biomass (Suresh Kumar *et al.*, 2015). This variable influences the metal resistance in microalgae, it affects cell surface metal binding and microalgae flocculation (Brinza *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013). At low pH, cell wall ligands are associated with the hydronium H₃O⁺ and H⁺ ions, thereby restricting the approximation of metal cations due to the repulsive forces (Çetinkaya Dönmez *et al.*, 1999). When the pH increases, functional groups such as carboxyl, phosphate and amino groups are exposed (negative charges) producing attraction of metallic ions via biosorption on the cell surface (Çetinkaya Dönmez *et al.*, 1999). Likewise, several chemical functional groups are available for binding metal cations in according to pH ranges: at pH 5.0-9.0 metals are joined by phosphate groups, whereas at pH 9.0-12.0, carboxyl, hydroxyl and amine groups would also be suitable (Monteiro *et al.*, 2012; Suresh Kumar *et al.*, 2015). Other functional groups, like thiol (R-SH) plays an important role in sorption of metals like Cd at lower pH (>2.0) (Mehta & Gaur, 2005). The study of genetic adaptation of microalgae to extreme environments (i.e. characterized by extreme values of pH and exposure to metals) could be use adequately to assess the origin of favored mutants and the process of microalgal resistance (Sánchez-Fortún *et al.*, 2009). Some researchers have suggested that eukaryotic microalgae are resistant to acidic (pH 1.7–2.5) and metal-rich waters (Costas *et al.*, 2007; López-Rodas *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013). The pH fluctuations involve changes in the concentration gradients of H⁺ ions, with effects on transport through the cell membrane (i.e. metabolic and photosynthetic activities such as PSII and photorespiration; Weisse & Stadler, 2006; Pereira *et al.*, 2013). Alkaline pH increases the flexibility of the cell wall of mother cells, which prevents its

rupture and inhibits autospore release, thus increasing the time for cell cycle completion (Guckert & Cooksey, 1990). The pH is one of the important parameters that affect the composition and phytoplanktonic production (Cabello *et al.*, 2015). However, the tolerance in green microalgae to changes in environmental variables subsequent to the evolution of microalgae to resistance to metals is still poorly documented, and therefore not sufficiently understood.

The aim of the present study is to assess the effect of pH on the growth rate of the two strains of the Chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides*, wild-type (Dc1M^{wt}) and Cd-resistant strain (DcRCd100), under different pH values through the assessment of the maximum growth rate by the Malthusian fitness parameter using the fluorescence emitted by the Chlorophyll of Dc1M^{wt} and DcRCd100 strains. This may explain of mechanisms on the growth rate that rule the tolerance to fluctuations in pH in association with the resistance to cadmium on microalgae.

MATERIAL AND METHODS

Experimental organisms and culture conditions

Laboratory experiments were performed using two strains of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman, wild-type variant (Dc1M^{wt}) and resistant variant to 100 µM cadmium (DcRCd100) from the Algal Culture Collection of the Environmental Toxicology Laborato-

ry (Chemical-Pharmacobiology School, U.M.S.N.H). Dc1M^{wt} strain (wild-type) grew axenically in culture flasks (Greiner, Bio-One, Longwood, NJ, USA) with 20 ml of BG-11 medium at pH 7.1 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), while DcRCd100 strain was cultured in BG-11 medium supplied with 11.57 mg/L cadmium sulfate (CdSO₄; Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) which is equivalent to Cd 100 µM concentration.

This value corresponded to IC₅₀₍₇₂₎ i.e. the concentration that inhibited population growth by 50 % after 72h of exposure to CdSO₄ in Dc1M^{wt}. DcRCd100 strain obtained from Dc1M^{wt} by selection of spontaneous mutants that showed an increased resistance to Cd in previous studies (Bartolomé *et al.*, 2016). Both strains were maintained at 21 °C under continuous light of 60 µmol m⁻² s⁻¹ over the 400 to 700 nm waveband in a 16:8h light-dark photoperiod. Cells were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of one-cell inoculums to fresh medium once a fortnight. All tests were performed while both microalgal strains were in exponential growth phase.

pH behavior on microalgal growth rate

To determine the inhibition of the algal growth rates, the changes in Malthusian fitness (*m*) on Dc1M^{wt} and DcRCd100 strains of *D. chlorelloides* were measured. Both strains were tested in 5 ml polystyrene sterile double sealing cultured tubes (Sarstedt Co., Nümbrecht, Germany) filled with BG-11 medium, with initial cell densities adjust-

Table 1. Malthusian fitness parameter values of the different exposure days (1, 3, 6, 10 and 15 days) at the different pH values selected (4.0, 5.0, 6.0, 7.1, 8.0, 9.0 and 10.0) on the rate of growth in wild-type (Dc1M^{wt}) and Cd-resistant (DcRCd100) strains of *D. chlorelloides*. The results are represented as the sample mean ± standard deviation (n = 6). *Valores del parámetro maltusiano de aptitud biológica de los distintos días de exposición (1, 3, 6, 10 y 15 días) a los diferentes valores de pH seleccionados (4.0, 5.0, 6.0, 7.1, 8.0, 9.0 y 10.0) sobre la tasa de crecimiento en las cepas tipo salvaje (Dc1M^{wt}) y Cd-resistente (DcRCd100) de D. chlorelloides. Los resultados se representan como la media muestral ± desviación estándar (n=6).*

Malthusian fitness d ¹ <i>D. chlorelloides</i>											
		1 st day		3 rd day		6 th day		10th day		15 th day	
pH	N	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}	Dc1M ^{wt}	Dc ^{RCd100}
4.0	6	-1.18±0.80	0.67±0.15**	-2.40±0.40	-0.28±0.13***	-3.43±1.00	-0.47±0.22**	-4.00±0.51	-0.14±0.10***	-5.24±0.67	-0.51±0.16 ***
5.0	6	-0.11±0.09	-0.28±0.004*	-0.22±0.10	0.005±0.013 **	-0.41±0.13	-0.50±0.14 ns	-0.62±0.19	0.16±0.08 ***	-0.42±0.12	0.13±0.06 ***
6.0	6	0.018±0.005	0.031±0.009*	-0.07±0.19	0.41±0.11**	-0.05±0.08	0.21±0.02 ***	-0.09±0.03	0.75±0.19 ***	0.28±0.08	0.76±0.10 ***
7.1	6	-0.24±0.15	0.089±0.058**	0.10±0.05	0.12±0.04 ns	0.05±0.03	-0.43±0.11***	0.20±0.06	0.03±0.02 **	0.32±0.09	0.12±0.03 **
8.0	6	0.17±0.087	0.19±0.080 ns	0.37±0.22	0.72±0.16*	0.30±0.08	0.35±0.15 ns	0.57±0.11	0.93±0.31 *	0.61±0.20	0.90±0.23 ns
9.0	6	-0.43±0.19	-0.57±0.27 ns	1.05±0.31	0.04±0.14***	1.33±0.59	-0.30±0.31**	1.87±0.88	-1.93±0.40***	2.17±0.24	0.04±0.02***
10.0	6	-0.52±0.12	-0.50±0.24ns	-0.67±0.19	-0.02±0.05 ***	-2.01±0.15	-0.36±0.11***	0.15±0.62	-0.08±0.53 ***	0.68±0.34	-0.079±0.06**

*, **, ***: significant differences ($p < 0.05$) with respect to Dc1M^{wt}

ed to 10^4 cells/ml for both variants and the control. To estimate the stress induced in both *D. chlorellooides* strains by the pH variation in the medium, HCl and NaOH 0.1M buffers were added to the culture medium achieve final pH ranges of 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 9.0, 10.0 and pH 7.1 as control. In order to estimate the growth rate, the samples of the culture medium were maintained at 0, 1, 3, 6, 10, 15 days' time intervals to keep the exponential growth at 21 °C in a 16:8h light-dark photoperiod in a thermostatically controlled chamber (Thermo Fisher Scientific Inc., EE.UU.) at $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the 400 to 700 nm waveband to ensure exponential algal growth. Each assay was repeated six times ($n=6$). To estimate the maximal algal growth rate, we estimated the growth rate as the Malthusian parameter m which was calculated as $m = \log_e (N_t/N_0)/t$ (Crow & Kimura, 1970). Where N_t are the cell numbers at the end of the experiment, N_0 are the cell numbers at the beginning of the experiment, and $t = 0, 1, 3, 6, 10$ and 15 days. The Malthusian fitness parameter was estimated through the fluorescence emitted by the chlorophyll of the both strains of *D. chlorellooides* with excitation-emission filters of 485-670 nm using a Tecan Genios plate reader (Tecan Group Ltd., Switzerland).

Statistical analysis

The effects of the pH on the maximum growth rate in DcRCd100 and Dc1M^{wt} strains was determined by the Malthusian fitness parameter described above. Each test was repeated six times ($n=6$), and of which the sample mean and its standard deviation ($\bar{X} \pm \sigma$) were obtained. D'Agostino and Pearson test assessed data normality. The statistical differences were obtained by applying unpaired T-test by the correction by the Welch test for distinct variances and the differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the computer software package GraphPad Prism v6.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

RESULTS

After different exposure times, Dc1M^{wt} was unable to maintain exponential growth rates at

moderately acidic conditions (pH values of 4.0 and 5.0) showing negative values of m of different magnitude, which increased according to the increase in the exposure times on this strain. Dc1M^{wt} presents statistically significant differences (Table 1) with respect to DcRCd100 ($p < 0.001$; $p > 0.0001$). At pH 10.0, the strain Dc1M^{wt} does not present growth rate, response that it shares with the DcRCd100 variant at the first, third and sixth day of exposure (Table 1, Fig. 1A-1C). Nevertheless, at 10 and 15 days, Dc1M^{wt} exhibited a growth rate in this pH, with the consequent induction phase initiating division and cell growth. Indeed, its maximal growth rate results in the pH value of 9.0 increasing this fitness to longer exposure time (15th day, $m = 2.17$, Table 1, Fig. 1E).

In contrast, DcRCd100 strain on the 1st day of the exposure to pH 4.0 ($m = 0.67$), had statistically significant growth rate compared to Dc1M^{wt} ($p < 0.0001$) (Table 1, Fig. 1A). Nevertheless, at 10 and 15 days ($m = 0.16$ and 0.13 respectively), DcRCd100 grew at pH 5.0, but the growth was slow due to longer lag phase in the culture medium (Table 1, Fig. 1D and 1E). Even though this strain had limited and slowly growth in moderately acidic environments. However, cell division and growth rate of DcRCd100 started at pH 6.0, peaking at day 10 ($m = 0.93$) to pH 8.0 (Fig. 1D). The main differences between both strains are that DcRCd100 does not grow in alkaline environments (pH values of 9.0 and 10.0), whereas Dc1M^{wt} preferred alkaline conditions where it shows its maximum growth rate (Table 1, Fig. 1B-1E).

DISCUSSION

The pH of the medium growth is important in the context of metal speciation (i.e. complexes formation of different solubility and toxicity, or in free ion form) and can influence the binding of metals to cell walls. This process involves displacement of protons, which is dependent on the protonation degree as determined by the pH of the surrounding medium (Macfie *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2017). On the other hand, pH parameter can influence the growth of phytoplankton through an increase in the absorption of inorganic

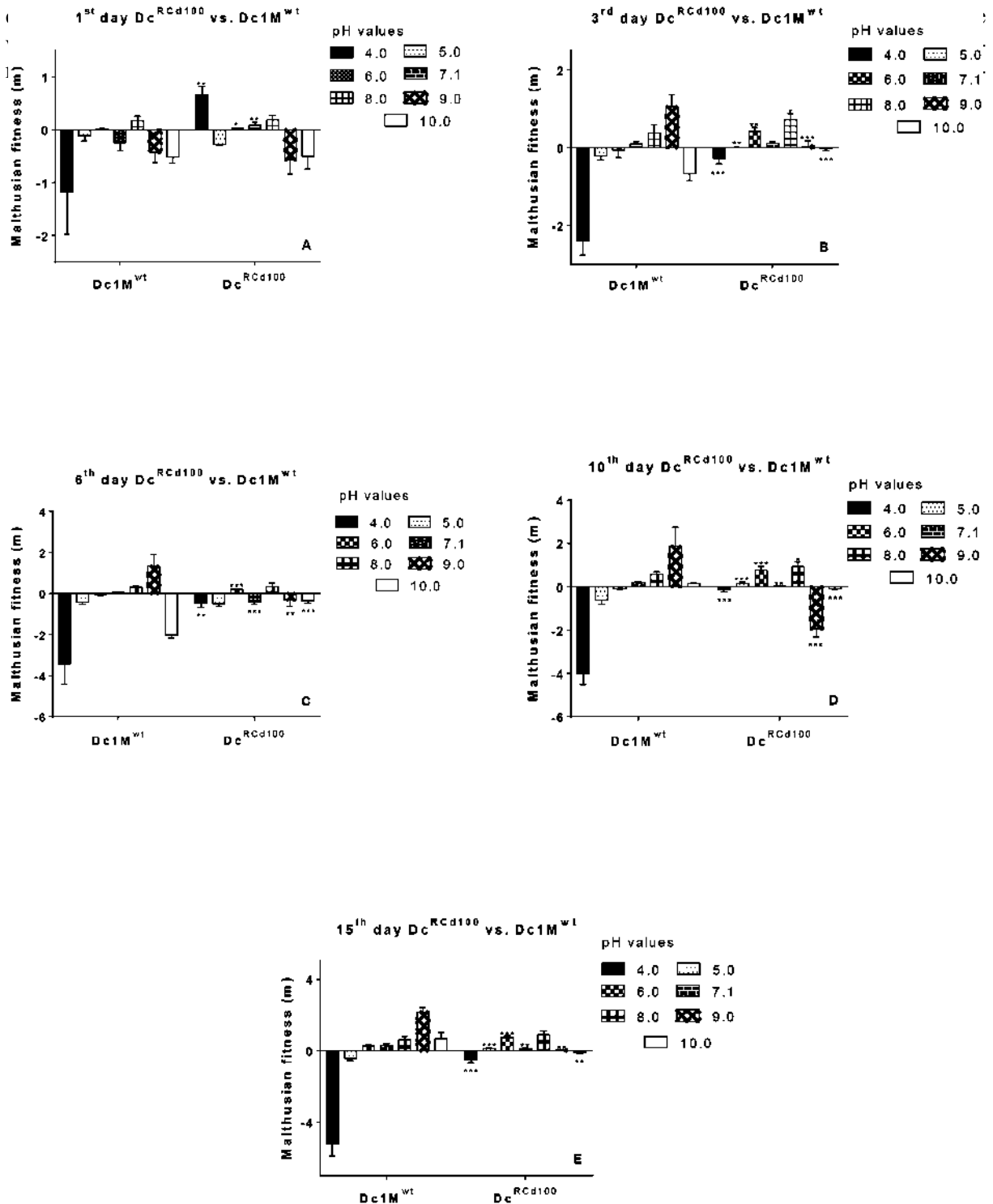


Figure 1. pH fluctuation effect of culture medium on fitness of Cd-resistant strain (*Dc^{RCd100}*) vs. wild type strain of *D. chlorelloides* (*Dc1M^{wt}*). (A): First day of exposure (1st Day), (B): 3rd day, (C): 6th day, (D): 10th day, (E): 15th day. (n=6). *Efecto de la fluctuación del pH en el medio de cultivo sobre la aptitud biológica de la cepa Cd-resistente (*Dc^{RCd100}*) vs. cepa tipo salvaje (*Dc1M^{wt}*) de *D. chlorelloides*. (A): Primer día de exposición (1er día), (B): 3er día, (C): 6to día, (D): 10mo día, (E) 15to día. (n=6).*

gae (e.g. *Chlorella*) can grow under extreme pH and temperature conditions (Visviki & Santikul, 2000; Sakarika & Kornaros, 2016).

Our results show that DcRCD100 strain did not grow in alkaline conditions and exhibits its maximum growth rate in the pH range closer to neutrality (6.0 and 8.0) with limited capacity to survive in moderately acidic conditions (pH 4.0 and 5.0). On the other hand, the Dc1M^{wt} strain preferred alkaline (pH 9.0 and 10.0) and neutral environments. The results obtained in this study are consistent with other studies where most species of microalgae grow maximally around neutral pH (7.0–7.6), although the optimal pH is the initial culture pH at which microalgae adapts to grow (lag phase; Visviki & Santikul, 2000; Hansen, 2002). Bartley *et al.*, (2014), investigated the pH influence on the growth and lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* and showed that the highest growth rates were at pH 8.0 and 9.0 (0.19 ± 0.008 and 0.19 ± 0.011 , respectively), but this microalga was not able to grow at pH 10.0, and the maximum cell densities were reached around 21 days into the experiment.

Several authors reported the effect of pH in different genera of both freshwater and marine microalgae (*Thalassiosira pseudonana* and *Chlorella pyrenoidosa*), namely on the growth rate and photosynthetic productivity from pH values of 5.7, 6.5, 8.3 to 8.8; nonetheless, above pH 9.0 growth could not be maintained (Chen & Durbin, 1994, Tan *et al.*, 2016.) Therefore, the changing of pH in the media may limit algal growth via metabolic inhibition (Juneja *et al.*, 2013). In bioassays performed by Touloupakis *et al.*, (2016), using a cyanobacterium strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, it was determined the photosynthetic productivity, growth yield, and biomass in light energy declined by 32, 28, and 26 % respectively at pH 11.0. In our study, the pH 7.1 is the optimum pH value in the Dc1M^{wt} strain showed growth after being exposed to the lowest values. However, the maximum growth rate was at pH 9.0, which agrees with Eaton-Rye *et al.*, (2003) and Kurian *et al.*, (2006), which showed that the optimal pH for microalgal growth is higher than 7.5 and close to 10.0. In this context, Moheimani, (2013) informed in green microalgae *Chlorella* sp. and *Tetraselmis suecica*, that the

highest biomass productivity had the following order: pH 7.0 > pH > 7.5 > pH 6.5 > pH 8.0 > pH 6.0 > pH 5.5. For *Dunaliella salina* it was reported that the maximum growth rate on the 2nd to 5th day of exposure at pH 7.0–8.0 was of 0.5 $\mu\text{m}/\text{day}$ (specific growth rate/day); whereas, from 5 to 10 days the specific maximum growth rate reached a low value of 0.1 $\mu\text{m}/\text{day}$ (Ying *et al.*, 2014).

In acidic conditions the nutrient uptake can altered and thus affect the microalgal growth (Juneja *et al.*, 2013). *Chlamydomonas acidophila*, exposed to pH 4.4 denature V-lysine, a proteolytic enzyme that facilitates the release of daughter cells from the parental wall (Visviki & Palladino, 2001). Visviki & Santikul, (2000) reported the tolerance of *Chlamydomonas applanata* at pH 3.4 with mucilage production, presenting an optimal exponential growth rate after 5 days at pH 7.4. However, the tolerance reached at low pH for our resistant strain differs from reported by Pereira *et al.*, (2013), in the wild-type and Cr-resistant *D. chlorelloides* strains, both are able to survive in acidic pH conditions (pH 4.25). Our DcRCD100 strain was able to grow, though limited capacity at moderately low pH levels, but exhibited a better growth rate than Dc1M^{wt} when both were subjected to pH 4.0 and 5.0 in the culture medium. Several authors (Gehl & Colman, 1985, Juneja *et al.*, 2013 and Cabello *et al.*, 2015), reported that for maintaining an intracellular neutral pH in acidic environments, additional energy cost are required to pump protons out of the cell (e.g. the acid-tolerant microalga *Chlorella saccharophila* can change intracellular pH in response to changing external pH), or in correlation to low irradiances, the release of O₂ is not generated indicating that sufficient ATP is not obtained from photophosphorylation to compensate for the energy needs of the cells, including the maintenance of a high H⁺ extracellular gradient.

Another adaptation was observed by Tatsuza-wa *et al.*, (1996) under acidic conditions in *Chlamydomonas* sp., with an increase in saturated fatty acid content, which reduces membrane fluidity and inhibits high proton concentrations at pH 2.7. In previous studies, Lavoie *et al.*, (2012) the changes in the permeability of the cell membrane as a function of pH were evaluated in three species of green algae (*Chlamydomonas*

reinhardtii, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella fusca*) estimating that these microalgae were adapted to pH 5.5 with a lower rate of growth than at pH 7.0. For Gerloff-Elias *et al.*, (2006) the accumulation of heat-shock proteins (Hsp) in *Chlamydomonas acidophila* was dependent on changes at low levels of pH (pH 2.6-6.0) and high levels of temperature (29 °C). These results suggest that heat-shock proteins might play a role in the adaptation of *C. acidophila*, and possibly other microalgae to acidic environments.

Despite the lack of information on tolerance to extreme pH values with respect to resistance to metals in microalgae, other researchers reported that *Scenedesmus* sp. strain R-16 exhibited strong tolerance to a wide range of pH (4.0-11.0), and informed that this strain has the potential for using for the wastewater treatment in a wide pH range (Ren *et al.*, 2013).

Therefore, the present study showed that the strain Dc^{RCd100} in relation to Dc1M^{wt} exhibited a maximum growth rate at pH near the optimum (pH 8.0) and a higher fitness in slightly acidic conditions than Dc1M^{wt}, the wild-type strain presented its maximum growth rate at alkaline pH values (pH 9.0), unlike Dc^{RCd100}, which begins to grow at pH 9.0 at 15d (stationary phase) showing a low value of the growth rate but not grow at pH 10.0.

CONCLUSIONS

In summary, the results obtained in this study showed that the Cd-resistant strain of *D. chlorelloides* at different times of exposure tends to grow slowly in acidic and slightly alkaline environments. However, its maximum biological fitness at each exposure were observed at pH values close to the optimum (6.0 and 8.0).

For the wild-type strain (Dc1M^{wt}) it is evident that its growth rate intensified in neutral and alkaline pH. Therefore, it is not suitable for growing in acid environments, with clear differences with the resistant strain of *D. chlorelloides*. Therefore, it requires the development of new research to reveal the mechanism in the correlation of metal resistance in their influence on tolerance extreme environmental parameters (such as

pH, temperature, high light intensity, among others). This provides an alternative for the development of biotechnological models in the environmental monitoring (such as development biosensor using metal resistant and wild-type strains of several genera of microalgae) of toxic metals presented in the polluted waters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Coordination Scientific Research (CIC) (PI 26.8) at the Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (U.M.S.N.H.).

REFERENCES

- BARTLEY, M.L., W.J. BOEING, B.N. DUNGAN, F.O. HOLGUIN & T. SCHAUB. 2014. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26 (3): 1431–14. DOI: 10.1007/s10811-013-0177-2
- BARTOLOMÉ, M.C., A.A. CORTÉS, A. SÁNCHEZ-FORTÚN, M.G. GARNICA-ROMO, S. SÁNCHEZ-CARRILLO, S. SÁNCHEZ-FORTÚN. 2016. Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. *International Journal of Phytoremediation*, 18(12): 1171–1177. DOI: 10.1080/15226514.2016.1189400
- BELFIORE, N.M. & S.L. ANDERSON. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, 489 (2-3): 97–122. DOI: 10.1016/S1383-5742(01)00065-5
- BRINZA, L., M.J. DRING & M. GAVRILESCU. 2007. Marine micro and macro algal species as biosorbents for heavy metals. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*. 6(3), 237-251.
- CABELLO, J., A. TOLEDO-CERVANTES, L. SÁNCHEZ, S. REVAH & M. MORALES. 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by

- Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology*, 181: 128–135. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.034
- CANLI, M. & G. ATLI. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, 121 (1): 129–136. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00194-X
- ÇETINKAYA DÖNMEZ, G., Z. AKSU, A. ÖZTÜRK & T. KUTSAL. 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, 34 (9): 885–892. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00005-9
- CHEN, C.Y. & E.G. DURBIN. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 109 (1): 83–94. DOI: 10.2307/24846171
- CHEN, J.P., L.K. WANG, Y.-T. HUNG, K.N. SHAMMAS & M.H.S. WANG. 2017. Remediation of Heavy Metals in the Environment Advances in Industrial and Hazardous Wastes Treatment. *CRC Press Taylor & Francis Group*. Boca Raton, Florida, 540.
- COSTAS, E., A. FLORES-MOYA, N. PERDIGONES, E. MANEIRO, J.L. BLANCO, M.E. GARCÍA & V. LÓPEZ-RODAS. 2007. How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist*, 175 (2): 334–339. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02095.x
- CROW, J.F. & M. KIMURA. 1970. An introduction to population genetics theory. *New York, Evanston and London: Harper & Row, Publishers*. New York, USA. 591. DOI: 10.1002/tera.1420050318
- EATON-RYE, J.J., J.A. SHAND & W.S. NICOLL. 2003. pH-dependent photoautotrophic growth of specific photosystem II mutants lacking lumenal extrinsic polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters*, 543 (1-3): 148–153. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00432-0
- GEHL, K.A. & B. COLMAN. 1985. Effect of External pH on the Internal pH of *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiology*, 77 (4): 917–921.
- GERLOFF-ELIAS, A., D. BARUA, A. MÖLICH & E. SPIJKERMAN. 2006. Temperature- and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*: Hsp accumulation in *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiology Ecology*, 56 (3): 345–354. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00078.x
- GUANZON, N.G., H. NAKAHARA. & Y. YOSHIDA. 1994. Inhibitory Effects of Heavy Metals on Growth and Photosynthesis of Three Freshwater Microalgae. *Fisheries science*, 60 (4): 379–384. DOI: 10.2331/fishsci.60.379
- GUCKERT, J.B. & K.E. COOKSEY. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology*, 26 (1): 72–79. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x
- GUPTA, D.K. & L.M. SANDALIO. 2012. Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation. *Springer Berlin Heidelberg*. Berlin, Heidelberg. 268. DOI: 10.1007/978-3-642-22081-4
- HANSEN, P.J. 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquatic Microbial Ecology*, 28 (3): 279–288. DOI: 10.3354/ame028279
- JUNEJA, A., R.M. CEBALLOS & G.S. MURTHY. 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*, 6(9): 4607–4638. DOI: 10.3390/en6094607
- KURIAN, D., K. PHADWAL & P. MÄENPÄÄ. 2006. Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PROTEOMICS*, 6 (12): 3614–3624. DOI: 10.1002/pmic.200600033
- LAVOIE, M., S. LE FAUCHEUR, A. BOULLEMANT, C. FORTIN & P.G.C. CAMPBELL. 2012. The influence of pH on algal cell membrane permeability and its implications for the uptake of lipophilic metal complexes. *Journal of Phycology*, 48 (2): 293–302. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01126.x

- LIU, J., Y. ZHU, Y. TAO, Y. ZHANG, A. LI, T. LI, M. SANG & C. ZHANG. 2013. Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for Biofuels*, 6 (1): 98. DOI: 10.1186/1754-6834-6-98
- LÓPEZ-RODAS, V., F. MARVÁ, M. ROUCO, E. COSTAS & A. FLORES-MOYA. 2008. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere*, 72 (5): 703–707. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.009
- MACFIE, S.M., Y. TARMOHAMED & P.M. WELBOURN. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27 (4): 454–458. DOI: 10.1007/BF00214835
- MACFIE, S.M. & P.M. WELBOURN. 2014. The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39 (4): 413–419. DOI: 10.1007/s002440010122
- MEHTA, S.K. & J.P. GAUR. 2005. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions from Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25 (3): 113–152. DOI: 10.1080/07388550500248571
- MOHEIMANI, N.R. 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 25 (2): 387–398. DOI: 10.1007/s10811-012-9873-6
- MONTEIRO, C.M., P.M.L. CASTRO & F.X. MALCATA. 2012. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28 (2): 299–311. DOI: 10.1002/btpr.1504
- PEREIRA, M., M. CARMEN BARTOLOMÉ & S. SÁNCHEZ-FORTÚN. 2013. Influence of pH on the survival of *Dictyosphaerium chlorelloides* populations living in aquatic environments highly contaminated with chromium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 82–87. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.020
- QIAN, H., J. LI, L. SUN, W. CHEN, G.D. SHENG, W. LIU & Z. FU. 2009. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquatic Toxicology*, 94 (1): 56–61. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.05.014
- REN, H.-Y., B. -F. LIU, C. MA, L. ZHAO & N.-Q. REN. 2013. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 143. DOI: 10.1186/1754-6834-6-143
- SAKARIKA, M. & M. KORNAROS. 2016. Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation. *Bioresource Technology*, 219: 694–701. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.033
- SÁNCHEZ-FORTÚN, S., V. LÓPEZ-RODAS, M. NAVARRO, F. MARVÁ, A. D'ORS, M. ROUCO, D. HAIGH-FLOREZ & E. COSTAS. 2009. Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (9): 1901–1905. DOI: 10.1897/08-489.1
- SÁNCHEZ-FORTÚN, S., F. MARVÁ, M. ROUCO, E. COSTAS & V. LÓPEZ-RODAS. 2009. Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. *Ecotoxicology*, 18 (5): 481–487. DOI: 10.1007/s10646-009-0303-8
- SURESH KUMAR, K., H.-U. DAHMS, E.-J. WON, J.-S. LEE, K.-H. SHIN. 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 329–352. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.019
- TAN, X.-B., Y.-L. ZHANG, L.-B. YANG, H.-Q. CHU, J. GUO. 2016. Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia. *Bioresource Technology*, 200: 606–615. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.095

- TATSUZAWA, H., E. TAKIZAWA, M. WADA & Y. YAMAMOTO. (1996). Fatty Acid and Lipid Composition of the Acidophilic Green Alga *Chlamydomonas* sp. *Journal of Phycology*, 32 (4): 598–601. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1996.00598.x
- TOULOUPAKIS, E., B. CICCHI, A.M.S. BENAVIDES & G. TORZILLO. 2016. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (3): 1333–1341. DOI: 10.1007/s00253-015-7024-0
- VISVIKI, I., J. PALLADINO. 2001. Growth and Cytology of *Chlamydomonas acidophila* Under Acidic Stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(5), 623–630. DOI: 10.1007/s001280054
- VISVIKI, I., D. SANTIKUL. 2000. The pH Tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38 (2): 147–151. DOI: 10.1007/s002449910018
- WEISSE, T. & P. STADLER, P. 2006. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. *Limnology and Oceanography*, 51 (4): 1708–1715. DOI: 10.4319/lo.2006.51.4.1708
- YAN, H. & G. PAN. 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, 49 (5): 471–476. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00285-0
- YING, K., W.B. ZIMMERMAN & D.J. GILMOUR. 2014. Effects of CO and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6 (3): 167–173. DOI: 10.4172/1948-5948.1000138

Research Article

Toxicological assessment of binary mixtures and individually of chemical compounds used in reverse osmosis desalination on *Artemia franciscana* nauplii

Alondra A. Cortés¹, Sebastián Sánchez-Fortún², Martha García¹
Héctor Martínez¹ & María Carmen Bartolomé¹

¹School of Chemistry-Pharmacobiology, Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo Morelia, Michoacán, México

²Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Corresponding author: María Carmen Bartolomé (carbarcam@hotmail.com)

ABSTRACT. The Reverse Osmosis desalination has become a technological option to guarantee an adequate drinking water supply in zones with water scarcity. Nevertheless, the process is accompanied by potential adverse impacts on the coastal ecosystem, mainly due to chemical discharges. Taking into account the environmental risk presented by these chemical mixtures, in this work we used a short-term toxicity bioassay with *Artemia franciscana* nauplii expressed in lethality to exposures individually and their combinations. Results showed that toxicity degree from single exposures was $C_5H_8O_2 > NaClO > CuSO_4 > KMnO_4 > FeCl_3$, indicated that $C_5H_8O_2$ was the most toxic biocide. However, all compounds in combination with $C_5H_8O_2$ exhibited a very strong antagonism. Except, in mixtures, $NaClO/FeCl_3$ and $CuSO_4/KMnO_4$ resulted in an additive effect. This environmental assessment will allow reducing risk significantly on the concentrate considering the sensitivity of the marine ecosystem to the application of chemical agents during the desalination process.

Keywords: *Artemia franciscana*, chemical hazards, desalination process, mixture analysis, combination index.

INTRODUCTION

Most of the acute toxicity bioassays in the aquatic ecosystems are focused on the individual effects of individual pollutants (Forget *et al.*, 1999). In this context, there are key factors which influence the environmental toxicity of different chemical compounds the dose-response relationship, mode(s) of action, evaluation criteria, environmental factors (such as organic carbon, pH, and temperature), and potential for additive or interactive effects of pollutant mixtures (Nowell *et al.*, 2014). Within this context, the marine and estuarine environments are composed of a variety of biological communities, which are exposed to complex chemical residual mixtures, which varies in concentration ratios (Arrhenius *et al.*, 2004; Cruzeiro *et al.*, 2017).

These chemical pollutants enter into marine environment indirectly through municipal, industrial wastewater or directly through fertilizer application to

agriculture and aquaculture farm agents (Schlüsener & Bester, 2006; Yang *et al.*, 2008). Desalination of seawater involves the use of complex chemical treatments associated with the application of two or more chemicals simultaneously. However, this technology has disadvantages on the discharge of the brine rejection corresponding which is then returned to the sea containing chemical residuals used in water treatment systems (Einav & Harussi, 2002). This spill is continuous and accumulative in the discharge zone (mainly in coastal areas), which are at constant risk of discharge of saline and chemical concentrates, thereby affecting the performance and integrity of the biota of coastal ecosystem and causing additive and synergistic toxicity in conjunction with other chemical spills (Lattemann & Höpner, 2008).

As a consequence, risk assessment techniques for contaminants that affect aquatic ecosystems (in a particular marine environment), should no longer be restricted to single toxicants and instead have to consi-

der the combined effects resulting from multiple chemical exposures (Backhaus *et al.*, 2003). In most cases, the toxicity of chemicals in mixtures is additive. Even many types of interactions on aquatic toxicology may co-occur, and it is possible that any potentiation or synergism that occurs will be masked by antagonism (Könemann & Pieters, 1996; Silva *et al.*, 2002; DeLorenzo & Fleming, 2007). Exposure to mixtures involving multiple components may induce toxicological responses even if the dose levels of the individual compounds are at or below their no-effect levels (NOEC). The greatest difficulty in analyzing and evaluating the mixture toxicity of is the high concentration variability in both temporal and spatial scales, especially when marine environments are involved in the process. Thus, the assays of the all possible mixtures of environmental pollutants, even when focusing on only one group of chemicals, is merely impossible (Backhaus *et al.*, 2004).

The effects due to the chemical mixture (*e.g.*, heavy metals) can be bioaccumulated and transferred through to aquatic food chains (Wilson *et al.*, 2003). Given the importance of this link in the marine food chain, it is necessary to establish the environmental hazards of the pollutant mixtures to predict the bioavailability and toxicity of various chemicals associated with their use in water treatment and their presence in the salt concentrate used in desalination plants. In this scenario, mutual interactions (synergistic/antagonistic) among the co-occurring compounds can also take place, further complicating environmental assessment (Ginebreda *et al.*, 2013). Thus, bioassays offer the possibility of monitoring the overall response from multiple chemicals in an environmental sample by assessing the impact on different levels of biological organization, such as individuals, community, and populations (Carvalho *et al.*, 2014).

Artemia sp. (brine shrimp) is found in estuarine ecosystems (saline water environments). It has gained popularity as a test organism because of its ease culture, short life-cycle, resistance to manipulation, cosmopolitan distribution and the commercial availability of its latent eggs (cysts). *Artemia* sp. is used in standardized bioassays mainly due to the reduced test variability since test animals hatching from cysts are of similar age, genotype and physiological condition (Vanhaecke *et al.*, 1981; Persoone *et al.*, 1989; Barahona & Sánchez-Fortún, 1999; Nunes *et al.*, 2006). However, their use in predictive hazard assessments of multicomponent mixtures is limited. Indeed, this kind of studies requires modeling approaches using the available knowledge regarding the toxicities of single substances.

In the literature, there are many models and theories in substance combination analysis, which has been exhaustively described in many review articles such as those by LePelley & Sullivan (1936), Plackett & Hewlett (1948), Loewe (1953), and Greco *et al.* (1990). These theories have often been defined as confusing. However, Chou & Talalay (1984), and subsequently Chou (2006) proposed a simple way to determine synergism or antagonism by introducing an explicit mass-action law based on enzyme kinetics models and receptor binding theories. This method also uses mathematical induction and deduction, through automated computerized simulation of synergism and antagonism involving the Median Effect Principle (MEP) and Combination Index (CI).

This research aims to predict the potential interactions of the different binary chemical mixtures used in the desalination process by Reverse Osmosis (RO) on the lethality of *Artemia franciscana* nauplii.

MATERIALS AND METHODS

Test chemicals

Five chemicals were selected, based on their use for different maintenance work on desalination plants, to carry out this study (Table 1). All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). In all assays, the working solutions were freshly prepared each time.

Experimental organisms

The *Artemia franciscana* cysts were purchased from Argent Chemical Laboratories, Washington, USA (Argentemia Silver Grade). The method of Persoone *et al.* (1989) to obtain *Artemia* nauplii for the test was modified according to the following procedure: *A. franciscana* cysts were hydrated in distilled water at 4°C for 12 h, followed by washing to separate the cysts that float from those that sink. The hydrated cysts were collected and incubated in a graduated glass cylinder in 100 mL of seawater medium. The synthetic seawater was prepared by mixing 35 g L⁻¹ synthetic sea salts (Sera Premium, Germany) with distilled and deionized (Milli-Q) water, stirring for 24 h with suitable aeration and filtering through 30 µm Millipore cellulose filters. The parameters for this study were: temperature at 28°C, pH 8.4 ± 0.2, the light intensity was 18.5 µmol m⁻² s⁻¹ and as light aeration was maintained by a small tube in contact with the bottom of the cylinder. Under these conditions, the time required for the cysts to hatch was 24 h.

Table 1. Desalination by Reverse Osmosis (RO): Chemical products and their function.

Compound	Molecular formula	Function on desalination process by RO
Sodium hypochlorite solution 40%	NaClO	Disinfectant and oxidant chemical
Potassium permanganate	KMnO ₄	Oxidant chemical
Ferric chloride	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Coagulant and flocculant chemical
Copper sulfate pentahydrate	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Algaecide
Glutaraldehyde solution (Grade I, 25% in H ₂ O)	C ₅ H ₈ O ₂	Non-oxidizing biocide
Potassium dichromate	K ₂ Cr ₂ O ₇	As reference substance

Assessment of single toxicities

To determine lethal concentrations at 50% of the population of nauplii *Artemia franciscana* was according to the methodology proposed by Sánchez-Fortún *et al.* (1995) and the Mexican Norm NMX-AA-110-1995-SCFI of each compound individually, assays were performed in sterile 24-well polystyrene tissue culture plates (Sarstedt Inc., USA). In each well, ten ($n = 10$) *Artemia nauplii* were included and exposed to exponential concentrations of each of the chemicals used in the various desalination treatments in a total volume of 1000 μ L. Preliminary 24 h static toxicity tests were performed to define the range of concentrations that include 0% and 100% lethality. Test concentrations, chosen on the basis, preliminary range finding tests, covered the range of 1-100 mg L^{-1} for five chemical products. Test series consisted of five dilutions of the test compound and a seawater control (no compound). As a reference substance K₂Cr₂O₇ (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) was used in individual exposures on *Artemia franciscana* nauplii.

At least four replicate test series were performed to each concentration of the compound. Assay plates were placed in an incubator under standard conditions for a period of 24 h. Larvae were considered dead if they did not exhibit any internal or external movement during 10 s of observation in a stereoscope (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Assessment of mixture toxicities

The assessment of binary mixture toxicity was performed using the Median-Effect/Combination Index (CI)-equation described by Chou & Talalay (1984). This quantitative assessment allows evaluating the combination of two substances taking into account the potency of each product. If two xenobiotics having similar mechanisms of action are presented in a Combination Index (CI) $\text{CI} < 1$, they show a synergistic effect. However, if they have completely different mechanisms, they will exhibit an antagonistic effect, and the CI will be > 1 . When the combination index is $\text{CI} = 1$, it means that they have an additive effect. This

analysis was performed through the software package CompuSyn v 1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA) developed by Chou & Martin (2005) and Chou (2010).

Data analysis

The concentration causing 50% of lethality on *Artemia franciscana* nauplii was expressed as $\text{LC}_{50(24)}$ which was estimated with 95% confidence limits for each compound. Linear regression analysis determined the $\text{LC}_{50(24)}$ values, and all the results were expressed as mean $\pm$ SD values. The LC_{50} estimates were subjected to a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test in contrast with reference substance K₂Cr₂O₇. Differences were considered significant with a probability level of $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the computer software package GraphPad Prism version 5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

RESULTS

Single toxicity assays

Obtained results show that the acutest toxicity was exhibited by glutaraldehyde (GA) showing close to 1 mg L^{-1} $\text{LC}_{50(24)}$ values (Table 2), followed by sodium hypochlorite with an $\text{LC}_{50(24)}$ of 5.92 mg L^{-1} ; while the ferric chloride was the compound less toxic with a median lethal concentration above 100 mg L^{-1} (202.77 mg L^{-1}) on *Artemia franciscana* nauplii. However, the 24 h-NOEC value of copper sulfate was seven times lower than that of the $\text{LC}_{50(24)}$, i.e., the highest concentration of this metal that which had no lethality was 4.15 mg L^{-1} . Analysis of $\text{LC}_{50(24)}$ values showed the following rank order for acute single toxicity on *A. franciscana*: $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2 > \text{NaClO} > \text{CuSO}_4 > \text{KMnO}_4 > \text{FeCl}_3$. However, there are no statistically significant differences ($P > 0.05$; $P = 0.7264$) respect to the reference substance K₂Cr₂O₇ which exhibited an $\text{LC}_{50(24)}$ value 19 mg L^{-1} (15.99-22.44) and 24 h-NOEC value of 4.03 mg L^{-1} (2.76-5.35).

According to the Environmental Protection Agency (EPA, 1986) classification for acute toxicity, which determines the environmental risk of pollutants

Table 2. Twenty-four-hour Median Lethal Concentration ($LC_{50(24)}$) values with 95% confidence limits (CL 95%; $n = 4$ bioassays) and the highest concentration of each compound tested which has no effect (24 h-NOEC) on 24 h-*Artemia franciscana*. Values are mean 24-h LC_{50} (95% C.L.; $n = 4$ bioassays) in $mg\ L^{-1}$, ns = $P > 0.05$.

Compound	n	$LC_{50(24)}\ mg\ L^{-1}$ (CL 95%)	24 h-NOEC $mg\ L^{-1}$ (CL 95%)
Glutaraldehyde	4	0.97 (0.86-1.08) ns	0.48 (0.37-0.57)
Sodium hypochlorite	4	5.92 (5.44-6.30) ns	3.50 (2.76-4.03)
Copper sulphate	4	28.91 (23.23-36.14) ns	4.15 (2.43-6.04)
Potassium permanganate	4	36.06 (27.86-43.25) ns	12.05 (6.12-17.49)
Ferric chloride	4	202.77 (171.40-224.90) ns	167.50 (98.17-188.79)
Potassium dichromate	4	19.00 (15.99-22.44)	4.03 (2.76-5.35)
(Reference substance)			

(EPA, 1996); both $C_5H_8O_2$ and NaClO were categorized as highly toxic; $KMnO_4$ and $CuSO_4$ were classified as moderately hazardous chemicals to the aquatic environment, and finally the ferric coagulant ($FeCl_3$) was classified as slightly toxic.

Mixture toxicity assays

The results of the toxicity data for chemical binary mixtures (Table 3, Fig. 1) showed that combinations between NaClO and $FeCl_3$ using the dosage of desalination plants, resulted in the sum of their individual effects in the mixture (CI: 1.46), i.e., an additive effect. This same behavior resulted for the mixture between $CuSO_4/KMnO_4$ according to the reverse osmosis (RO) doses (Table 3). Interesting, NaClO/ $CuSO_4$ mixture showed a tendency to an enhancement in toxicity producing synergism at higher concentrations (Figs. 1b, 2). Nevertheless, in reverse osmosis, this does not occur in the mixture with $CuSO_4$ showing an antagonism (CI > 1) (Table 3). The mixture of NaClO/ $KMnO_4$ showed a CI = 2.37, manifesting a slight antagonistic interaction between oxidizing agents.

The rest of combinations showed antagonistic effects (CI > 1) on the different magnitude, but remaining in the same plane of antagonistic force to the doses used in reverse osmosis (Figs. 1-2, Table 3). Even all inorganic compounds in combination with glutaraldehyde (GA) exhibited a very strong antagonism (CI >>> 1) showed in the Fig. 2. This result means that the individual toxic response of this biocide is stronger than binary combinations (Table 2).

DISCUSSION

Single substance toxicity

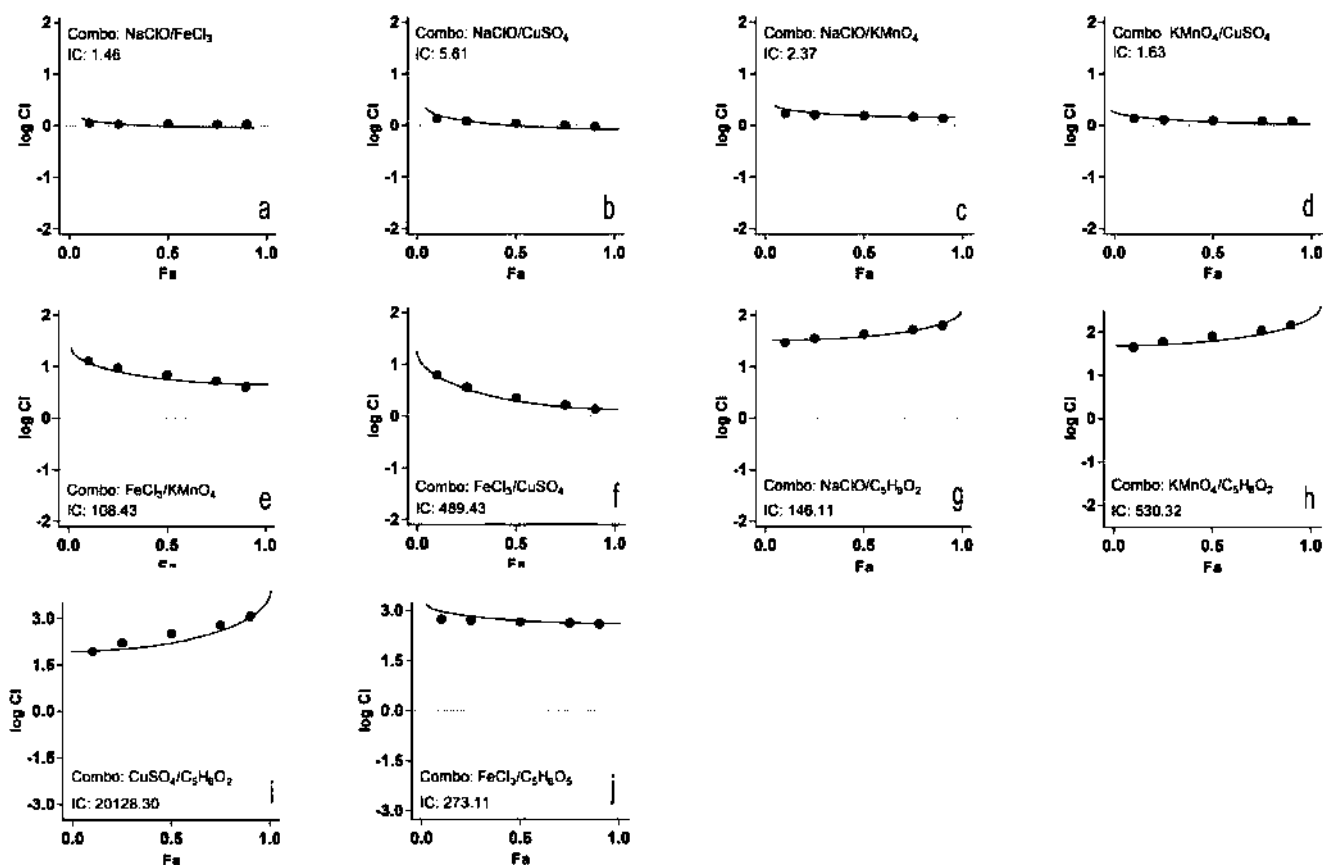
The effluent discharges from RO plants of seawater have a high concentration of chemical discharges which may adversely impair the coastal water quality and the functioning of marine ecosystems (Areiqat & Mohamed,

2005; Lattemann & Höpner, 2008). The acute single toxicity assays performed in this study showed that *A. franciscana* is more sensitive to GA exposures than the other inorganic chemicals tested. These results agree to those reported in previous assays by Bu-Olayan & Thomas (2006) seem to indicate that this compound induced the lethal effect in approximately LC_{50} range ($0.01534\ mg\ L^{-1}$ at 96 h) for *Artemia franciscana*. However, it is clear that their estimate was more sensitive, which agrees with that indicated by Barahona-Gomariz *et al.* (1994) and Sánchez-Fortún *et al.* (1995) where the naupliar stage of *Artemia* at 72 and 96 h are more sensitive to various xenobiotics. Sodium hypochlorite was also considered as highly toxic. In RO plants, chlorine is added to the intake water to reduce biofouling and as a disinfectant, and many toxicological studies have confirmed its toxicity. In previous research, on *Brachionus plicatilis* and *A. franciscana*, researchers obtained an LC_{50} at 24 and 96 h of $1.23\ mg\ L^{-1}$ and $0.00696\ mg\ L^{-1}$ respectively (Bu-Olayan & Thomas, 2006; López-Galindo *et al.*, 2010). Furthermore, this residual disinfectant has synergistic effects with high temperatures resulting from stream rejection (EU, 2007). Thereby, its toxicity is based by the production of trihalomethanes (THM's) as persistent organic pollutants and represent a severe hazard to aquatic life (EPA, 1991; Sorlini & Collivignarelli, 2005; Belluati *et al.*, 2007).

Concerning the response produced by the $CuSO_4$, on previous data, the effect of metal on the hatching of *A. franciscana* was evaluated getting an $EC_{50(48)}$ of $0.0118\ mg\ L^{-1}$ on the cysts significantly below that the dose needed to cause death stage naupliar (Brix *et al.*, 2006). Copper concentrations in the brine of desalination plants are expected to be in the range of 0.015 - $0.1\ mg\ L^{-1}$, and it does not necessarily mean that it will adversely affect the environment, but in a continuous discharge, copper can be accumulated in sediments and consequently benthic organisms (Lee *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012). As to the ferric ion (Fe^{+3}) from $FeCl_3$, *A. franciscana* was less sensitive to this

Table 3. Combination Index (CI) values of chemicals binary mixtures with respect to $LC_{50(24)}$ on *A. franciscana* of each chemical and the RO dosage. *CI: CI > 1 Antagonism, CI < 1 Synergism and CI = 1 Addition.

Binary mixture	*CI according to $LC_{50(24)}$	RO dosage in $mg\ L^{-1}$	*CI according to the dose in RO
NaClO/FeCl ₃	1.08	1.5/5.0	1.46
NaClO/CuSO ₄	1.11	1.5/1.0	5.61
NaClO/KMnO ₄	1.54	1.5/5.0	2.37
CuSO ₄ /KMnO ₄	1.25	1.0/5.0	1.63
FeCl ₃ /KMnO ₄	7.00	5.0/5.0	108.43
FeCl ₃ /CuSO ₄	2.29	5.0/1.0	489.43
C ₅ H ₈ O ₂ /NaClO	43.22	10.0/1.5	146.11
C ₅ H ₈ O ₂ /KMnO ₄	81.10	10.0/5.0	530.32
C ₅ H ₈ O ₂ /CuSO ₄	466.94	10.0/1.0	20128.30
C ₅ H ₈ O ₂ /FeCl ₃	321.55	10.0/5.0	273.11

**Figure 1.** Fa-Log CI plot. Effects of the chemicals binary mixtures on Combination Index (CI). a, b, c), represent the combination of sodium hypochlorite with ferric chloride, copper sulfate, and potassium permanganate, d, e), both symbolize the mix of potassium permanganate with copper sulfate and the ferric chloride, f) represent the combination of ferric chloride and copper sulfate, g, h, i, j) denote combinations of glutaraldehyde with sodium hypochlorite, potassium permanganate, copper sulfate and ferric chloride. Fa (Fraction affected): represent the effect on *Artemia franciscana*. CI values represent the doses customarily handled in desalination plants.

metal. It is believed that iron salts have low acute toxicity due to rapid oxidation to insoluble forms (FeOH₃) and can be readily precipitated (Van Anholt *et al.*, 2002). Iron is not a toxic component to marine life by

itself, but at high concentrations might impact the environment (*e.g.*, anoxia, turbidity, high-suspended solids and harmful algae bloom) (Safrai & Zask, 2006; Lattemann & Höpner, 2008). On the other hand, the

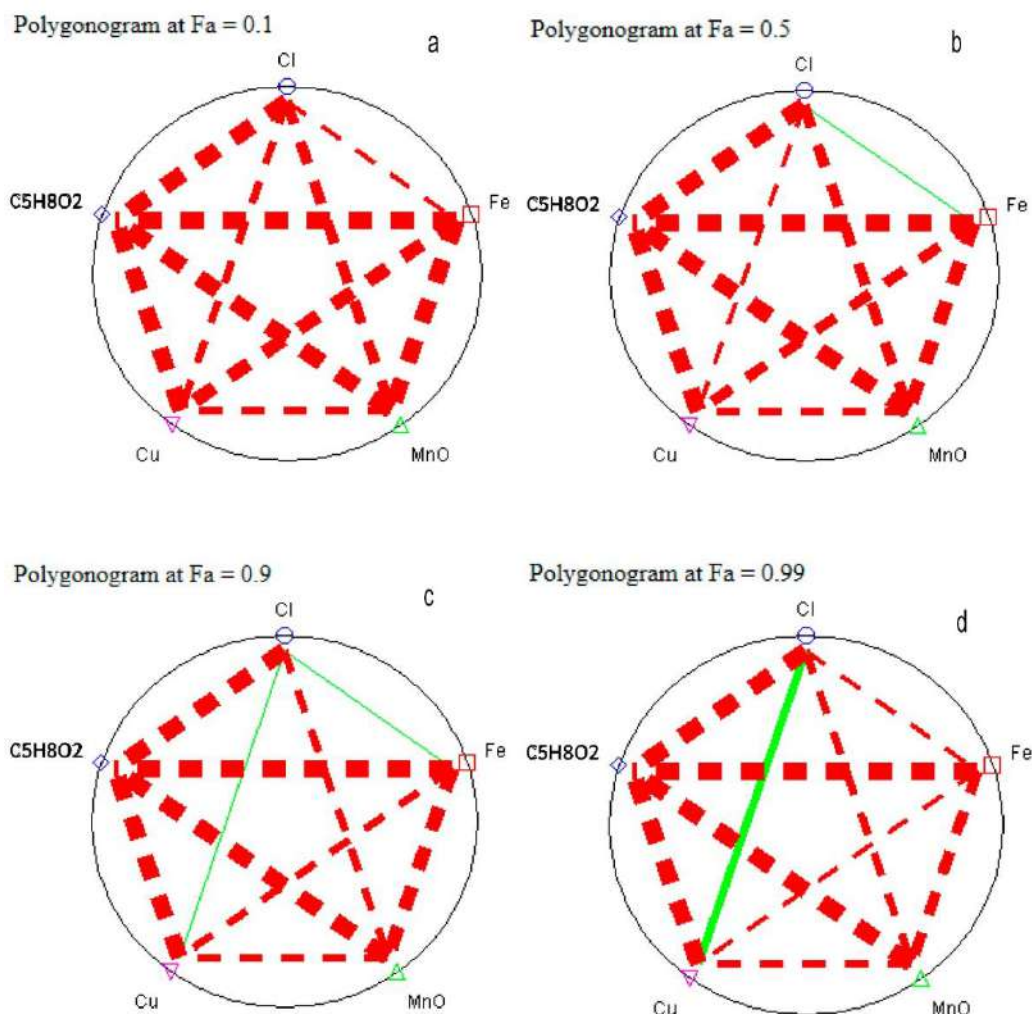


Figure 2. Pentagonal polygonograms for the five chemicals in the mixture on *Artemia franciscana*. Fa corresponding to the effect of a) 10%, b) 50%, c) 90 and d) 100%. Thin green line: represent addition effect; Solid green-tone: Synergism; Broken red-tone line: represent great antagonism among the chemicals tested; thin dotted line: symbolize moderate antagonism. The thickness of the line represents the strength of synergism or antagonism.

KMnO₄ used as an oxidizing agent of organic matter, for instance, the deposition of algae on the membranes, and in the removal of certain metals (Sorlini & Gialdini, 2010). Unfortunately, the partial oxidation of contaminants may result in the formation of intermediates more toxic than the parent compound (Rizzo, 2011). The toxicity exhibited was less toxic on *A. franciscana* compared to the toxicity in freshwater organisms (*Daphnia magna* LC₅₀₍₉₆₎ 2.13 mg L⁻¹) (Hobbs *et al.*, 2006). In other studies, this agent is toxic to some marine fish species (Kori-Siakpere, 2008).

Mixture toxicity assays

It is well known that in the environment, aquatic organisms are exposed to mixtures of pollutants, and very seldom to single substances (Backhaus *et al.*, 2003; Breitholtz *et al.*, 2008). Initially, in desalination

plants, chemical mixtures are employed at concentrations in which the individual compounds are believed to be safe, even though if their mixtures can represent a danger for aquatic organisms belonging to the first trophic levels (Lattemann & Höpner, 2008). Also, EPA (1986) recommends an evaluation of whether toxicological interactions among the components are likely to result in higher (or lesser) hazard or risk than would be expected from additivity alone. Nevertheless, in the scientific literature, the knowledge about the toxicological potential of interactions is limited as well as their direct applicability to mixtures associated with hazardous wastewater sites (ATSDR, 2004). Within of the tested mixtures, the combination between NaClO/C₅H₈O₂ showed a great antagonism at the dosage used in RO (CI: 146.11). These results seem to be in contradiction to the findings of Bu-Olayan &

Thomas (2006) who reported a synergistic effect in the same mixture on *A. franciscana* (CI: 0.91). Moreover, the other substances here tested, that was mixed with GA exhibited higher antagonism. In other similar studies, Emmanuel *et al.* (2005) and Wang *et al.* (2010) investigated the effect of other chemicals on the toxicity of GA and did not affect the toxicity of this biocide. Indeed, it has been demonstrated that mixtures, could have different modes of action and different target sites. The $\text{FeCl}_3/\text{CuSO}_4$ and $\text{NaClO}/\text{CuSO}_4$ mixtures had a high antagonistic behavior. However, the RO brine may contain traces of iron, copper, nickel, lead, cadmium, zinc, chromium, interacting together and will antagonize or enhance the effects of other metals both *in vitro* and *in vivo* (Wong *et al.*, 1982; Enserink *et al.*, 1991; Sagripanti *et al.*, 1991; Lattemann & Höpner, 2008; Xu *et al.*, 2011). The effect of these mixtures was evident as the redox-active metals $\text{Cu}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ could enhance the sensitivity of cells to other toxicants (Xu *et al.*, 2011). The following mixtures: $\text{NaClO}/\text{FeCl}_3$ and $\text{CuSO}_4/\text{KMnO}_4$ (IC 1.46 and 1.63 respectively), indicated slight additive effects in both cases. Bao *et al.* (2008), reported that the combined effects of copper with other substances like antifouling agents resulted in a synergistic effect. So, the mixtures of metal compounds with oxidizing agents could be highly reactive, and the additive effect is related to an enhancement in the production of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, and reduction of the cellular antioxidant capacity (Chen & Yeh, 2005; Wu *et al.*, 2009). The former agrees with the finding by Sotero-Santos *et al.* (2007), were mentioned that the sludge from the treatment containing metals combined with other substances might have an additive or synergistic effect on the ecosystem where they are discharged. In other studies, found that metal mixtures (e.g., copper and zinc) gave additive toxicity that influenced the tendency of recolonization of estuarine sediments (Fukunaga *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2014). In the same context, Vijver *et al.* (2011) and Cedergreen (2014) reported synergy among $\text{Cd}+\text{Zn}$, $\text{Cd}+\text{Cu}$, and $\text{Cd}+\text{As}$ on *Daphnia magna* and the shrimp *Penaeus setiferus*. In recent researches, it was reported that salinities of 35 g L^{-1} , the binary mixture of Zn and Ni was additive, however, at low concentrations of salinity between 10 and 17 g L^{-1} this metal mixture presented an antagonistic response (Damasceno *et al.*, 2017).

Hence, the effects of chemical mixtures on the aquatic ecosystem should consider concepts such as the bioavailability of the mixture on the environment together with its exposure on nontarget species. Additionally, it is important to take into account the mixture accumulation by its toxicokinetics and its

toxicodynamics which is related to the receptor interactions and the chemical interactions. Also include cases where one chemical may affect speciation, binding, and transport of the other (Spurgeon *et al.*, 2010). Also, low salinity levels influence the decrease in toxicity of mixtures of different xenobiotics (Damasceno *et al.*, 2017). Overall, the main differences between this study and other investigations found in the literature are the difference between the trophic level of organisms and the biological complexity; the concentrations ratios which are different and also the chemical nature of the chemical agents. The development of methods for modeling and predicting the toxicity of various ratios of mixtures at different concentrations on *Artemia franciscana* produce reliable results which can be extrapolated to other aquatic biological communities.

CONCLUSIONS

In summary, the results of the present study indicate a correct dynamic use of these compounds, based on the combined application of selected items at certain times of system maintenance can significantly reduce the ecotoxicological risk of discharge points derived from these routine practices in desalination plants by the reverse osmosis. Nevertheless, the effects of these combinations used in desalination should directly evaluate its presence in coastal water samples to determine and achieve a better assessment of the ecotoxicological potential of waste on the marine aquatic environment. So, several other questions remain to be investigated regarding mixture toxicity of these chemicals and their effects on marine communities.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the support of the Coordination of Scientific Research (CIC), U.M.S. N.H. (PI 26.8). The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Areiqat, A. & K.A. Mohamed. 2005. Optimization of the negative impact of power and desalination plants on the ecosystem. *Desalination*, 185(1-3): 95-103.
- Arrhenius, Å., F. Grönvall, M. Scholze, T. Backhaus & H. Blanck. 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammic communities. *Aquat. Toxicol.*, 68(4): 351-367.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004. Guidance manual for the assessment

- of joint toxic actions of chemical mixtures. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service from [<http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles-ippga.html>]. Reviewed: 15 October 2016.
- Backhaus, T., R. Altenburger, Å. Arrhenius, H. Blanck, M. Faust, A. Finizio & L. Horst-Grimme. 2003. The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Cont. Shelf Res.*, 23(17-19): 1757-1769.
- Backhaus, T., M. Faust, M. Scholze, P. Gramatica, M. Vighi & L.H. Grimme. 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(2): 258-264.
- Bao, V.W., K.M. Leung, K.W. Kwok, A.Q. Zhang & G.C. Lui. 2008. Synergistic toxic effects of zinc pyriithione and copper to three marine species: implications on setting appropriate water quality criteria. *Mar. Pollut. Bull.*, 57(6-12): 616-623.
- Barahona, M.V. & S. Sánchez-Fortún. 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA, and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environ. Pollut.*, 104(3): 469-476.
- Barahona-Gomariz, M.V., F. Sanz-Barrera & S. Sánchez-Fortún. 1994. Acute toxicity of organic solvents on *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52(5): 766-771.
- Belluati, M., E. Danesi, G. Petrucci & M. Rosellini. 2007. Chlorine dioxide disinfection technology to avoid bromate formation in desalinated seawater in potable waterworks. *Desalination*, 203(1-3): 312-318.
- Beyer, J., K. Petersen, Y. Song, A. Ruus, M. Grung, T. Bakke & K.E. Tollefsen. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Mar. Environ. Res.*, 96(Suppl. C): 81-91.
- Breitholtz, M., J.R. Nyholm, J. Karlsson & P.L. Andersson. 2008. Are individual NOEC levels safe for mixtures? A study on mixture toxicity of brominated flame-retardants in the copepod *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, 72(9): 1242-1249.
- Brix, K., R. Gerdes, W. Adams & M. Grosell. 2006. Effects of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 514: 580-583.
- Bu-Olayan, A.H. & B. Thomas. 2006. Assessment on biocides bioaccumulation in mullet liza klunzingen in Kuwaiti waters, off the Arabian Gulf. *Am. J. Environ. Sci.*, 2(3): 109-113.
- Bu-Olayan, A. & B.V. Thomas. 2006. A tool to study biocides toxicity in Kuwait Bay, off the Arabian Gulf. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.*, 1(1): 1-7.
- Carvalho, R.N., A. Arukwe, S. Ait-Aissa, A. Bado-Nilles, S. Balzamo, A. Baun & T. Lettieri. 2014. Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: how safe are they? *Toxicol. Sci.*, 141(1): 218-233.
- Cedergreen, N. 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE*, 9(5): e96580.
- Chen, J.J. & H.H. Yeh. 2005. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal. *Water Res.*, 39(18): 4420-4428.
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.*, 58(3): 621-681.
- Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.*, 70(2): 440-446.
- Chou, T.C. & P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Biol. Regul.*, 22: 27-55.
- Chou, T. & N. Martin. 2005. Compusyn for drug combinations. PC software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations and the determination of IC50, ED50, and LC50 Values. Combosyn Paramuts, NJ.
- Cruzeiro, C., S. Amaral, E. Rocha & M.J. Rocha. 2017. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 145: 126-134.
- Damasceno, É.P., L.P. de Figuerêdo, M.F. Pimentel, S. Loureiro & L.V. Costa-Lotufo. 2017. Prediction of toxicity of zinc and nickel mixtures to *Artemia* sp. at various salinities: from additivity to antagonism. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 142(Suppl. C): 322-329.
- DeLorenzo, M.E. & J. Fleming. 2007. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(2): 203-210.
- Einav, R. & K. Harussi. 2002. The footprint of the desalination processes on the environment. *Desalination*, 152(1-3): 141-154.
- Emmanuel, E., K. Hanna, C. Bazin, G. Keck, B. Clément & Y. Perrodin. 2005. Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. *Environ. Int.*, 31(3): 399-406.

- Enserink, E.L., J.L. Maas-Diepeveen & C.J. Van Leeuwen. 1991. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. *Water Res.*, 25(6): 679-687.
- Environmental Protection Agency. (EPA). 1986. Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. EPA/630/R-98/002; Risk Assessment Forum, Washington, D.C.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1991. Sodium and calcium hypochlorite salts. EPA 738-F-91-108; Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Technical overview of ecological risk assessment - analysis phase: ecological effects characterization. Ecotoxicity categories for terrestrial and aquatic organisms. Federal register guidelines for ecological risk assessment; Risk Assessment Forum, Washington, 63(93): 26846-26924.
- European Union (EU). 2007. Sodium hypochlorite. European Union Risk Assessment, EINECS N°231-668-3, European Commission. Rome [<http://echa.europa.eu/documents/-10162/330fee6d3220-4db1-ad d3-3df9bbc2e5e5>]. Reviewed: 2 October 2016.
- Forget, J., J.F. Pavillon, B. Beliaeff & G. Bocquené. 1999. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(5): 912-918.
- Fukunaga, A., M. Anderson & J. Webster-Brown. 2010. Assessing the nature of the combined effects of copper and zinc on estuarine infaunal communities. *Environ. Pollut.*, 159: 116-124.
- Ginebreda, A., M. Kuzmanovic, H. Guasch, M. Lopez de Alda, J. Lopez-Doval, I. Muñoz, M. Ricart, A. Romaní, S. Sabater & D. Barcelo. 2013. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *Sci. Total Environ.*, 468-469: 715-723.
- Greco, R.W., H.S. Park & Y.M. Rustum. 1990. Application of a new approach for the quantitation of drug synergism to the combination of cis-diamminedichloroplatinum and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, 50(7): 5318-5327.
- Hobbs, M.S., R. Grippo, J. Farris, B. Griffin & L. Harding. 2006. Comparative acute toxicity of potassium permanganate to nontarget aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(11): 3046-3052.
- Könemann, W.H. & M.N. Pieters. 1996. Confusion of concepts in mixture toxicology. *Food Chem. Toxicol.*, 34(11-12): 1025-1031.
- Kori-Siakpere, O. 2008. Acute toxicity of potassium permanganate to fingerlings of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Afr. J. Biotechnol.*, 7(14): 2514-2520.
- Lattemann, S. & T. Höpner. 2008. Environmental impact and impact assessment of seawater desalination. *Desalination*, 220(1-3): 1-15.
- Lee, J.A., I.D. Marsden & C.N. Glover. 2010. The influence of salinity on copper accumulation and its toxic effects in estuarine animals with differing osmoregulatory strategies. *Aquat. Toxicol.*, 99(1): 65-72.
- LePelley, R.H. & W.N. Sullivan. 1936. Toxicity of rotenone and pyretherins, alone and in combination. *J. Econ. Entomol.*, 29(4): 791-797.
- Loewe, S. 1953. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel-Forschung*, 3(6): 285-290.
- López-Galindo, C., M.C. Garrido, J.F. Casanueva & E. Nebot. 2010. Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds: sodium hypochlorite and an alkylamine surfactant. *Sci. Total Environ.*, 408(8): 1779-1785.
- Nowell, L.H., J.E. Norman, P.W. Moran, J.D. Martin & W.W. Stone. 2014. Pesticide toxicity index-a tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. *Sci. Total Environ.*, 476-477: 144-157.
- Nunes, B.S., F.D. Carvalho & G. Van Stappen. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ. Pollut.*, 144(2): 453-462.
- Persoone, G., A. Van de Vel, M. Van Steertegem & B. De Nayer. 1989. Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquat. Toxicol.*, 14(2): 149-167.
- Plackett, R.L. & P.S. Hewlett. 1948. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides. *Ann. Appl. Biol.*, 35(3): 347-358.
- Rizzo, L. 2011. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res.*, 45(15): 4311-4340.
- Safrai, I. & A. Zask. 2006. Reverse osmosis desalination plants-marine environmentalist regulator point of view. *Desalination*, 220(1-3): 72-84.
- Sagripanti, J.L., P.L. Goering & A. Lamanna. 1991. Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110(3): 477-485.
- Sánchez-Fortún, S., F. Sanz-Barrera & M.V. Barahona-Gomariz. 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(1): 76-82.

- Schlüsener, M.P. & K. Bester. 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin, and salinomycin in soil. *Environ. Pollut.*, 143(3): 565-571.
- Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. 1995. NMX-AA-110-1995-SCFI. Water analysis-acute toxicity evaluation with *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea-Anostraca) - Test method. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 26. [https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2011/01/nmx-aa-110-scfi-1995.pdf].
- Silva, E., N. Rajapakse & A. Kortenkamp. 2002. Something from "Nothing" -eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.*, 36(8): 1751-1756.
- Sorlini, S. & C. Collivignarelli. 2005. Trihalomethane formation during chemical oxidation with chlorine, chlorine dioxide and ozone of ten Italian natural waters. *Desalination*, 176(1-3): 103-111.
- Sorlini, S. & F. Gialdini. 2010. Conventional oxidation treatments for the removal of arsenic with chlorine dioxide, hypochlorite, potassium permanganate and monochloramine. *Water Res.*, 44(19): 5653-5659.
- Sotero-Santos, S., O. Rocha & J. Povinelli. 2007. Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms. *Chemosphere*, 68(4): 628-636.
- Spurgeon, D.J., O.A. Jones, J.L. Dorne, C. Svendsen, S. Swain & S.R. Stürzenbaum. 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ.*, 408(18): 3725-3734.
- Van Anholt, R.D., F.T. Spanings, A.H. Knol, J.A. Van der Velden & S.E. Wendelaar-Bonga. 2002. Effects of iron sulfate dosage on the water flea (*Daphnia magna* Straus) and early development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42(2): 182-192.
- Vanhaecke, P., G. Persoone, C. Claus & P. Sorgeloos. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 5(3): 382-387.
- Vijver, M.G., E.G. Elliott, W.J.G.M. Peijnenburg & G.R. de Snoo. 2011. Response predictions for organisms water-exposed to metal mixtures: a meta-analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30(6): 1482-1487.
- Wang, L.J., S.S. Liu, J. Zhang & Wei-Ying Li. 2010. A new effect residual ratio (ERR) method for the validation of the concentration addition and independent action models. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 17(5): 1080-1089.
- Wilson, B.A., V.H. Smith, F. deNoyelles & C.K. Larive. 2003. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environ. Sci. Technol.*, 37(9): 1713-1719.
- Wong, P.T., Y.K. Chau & D. Patel. 1982. Physiological and biochemical responses of several freshwater algae to a mixture of metals. *Chemosphere*, 11(4): 367-376.
- Wu, T.M., Y.T. Hsu, M.S. Sung, Y.-T. Hsu & T.-M. Lee. 2009. Expression of genes involved in redox homeostasis and antioxidant defense in a marine macroalga *Ulva fasciata* by excess copper. *Aquat. Toxicol.*, 94(4): 275-285.
- Xu, X., Y. Li, Y. Wang & Y. Wang. 2011. Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicol. In vitro*, 25(1): 294-300.
- Yang, L.H., G.G. Ying, H.C. Su, J.L. Stauber, S.A. Merrin & M.T. Binet. 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(5): 1201-1208.
- Zhong, H., L. Kraemer & D. Evans. 2012. Effects of aging on the digestive solubilization of Cu from sediments. *Environ. Pollut.*, 164: 195-203.

Received: 21 November 2016; Accepted: 20 November 2017



Evolution in the photosynthetic oxygen rate of a Cd-resistant strain of *Dictyosphaerium chlorelloides* by changes in light intensity and temperature

Alondra A. Cortés Téllez ^a, Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez ^b, Ana D'ors de Blas ^b, Luis Chacón García ^c, Ma. Guadalupe Garnica-Romo ^d, M. Carmen Bartolomé Camacho ^{a,*}

^a Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Chemistry-Pharmacobiology, Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 403 Santiago Tapia St., 58000, Morelia, Michoacán, Mexico

^b Environmental Toxicology Laboratory, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

^c Molecular Design Laboratory, Chemical-Biological Sciences Institute, Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 403 Santiago Tapia St., 58000, Morelia, Michoacán, Mexico

^d Faculty of Civil Engineering, Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 403 Santiago Tapia St., 58000, Morelia, Michoacán, Mexico

H I G H L I G H T S

- The effect of light intensity and temperature in photosynthesis on a Cd-resistant strain of *D. chlorelloides* was evaluated.
- High light intensities induce photo-inhibition of Dc^{Rcd100} .
- Respiratory rate of Dc^{Rcd100} increases at high temperatures.
- At low temperatures Dc^{Rcd100} does not show photosynthetic activity.
- The resistance to the Cd induces adaptation to high temperatures.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 23 May 2019

Received in revised form

23 August 2019

Accepted 24 August 2019

Available online xxx

Handling Editor: T Cutright

Keywords:

Dictyosphaerium chlorelloides

Cadmium resistance

Light threshold saturation

Photon intensity

Photosynthetic efficiency

Temperature

A B S T R A C T

Environmental factors such as temperature and light are the most determinants in the photosynthetic productivity in microalgae. However, under extreme of these conditions, certain resistant microalgae strains possess additional abilities such as growth in the presence of high concentrations of metals and some can improve in combinations of more than one abiotic stress. Therefore, the aim of this research was to evaluate the efficiency in photosynthetic production through the oxygen balance to variations in photon intensity, and under temperature changes in a Cd-resistant strain (Dc^{Rcd100}) compared to the wild-type strain ($Dc1M^{wt}$) of *Dictyosphaerium chlorelloides*. The results showed that the Dc^{Rcd100} strain has the maximum efficiency at $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on photosynthesis net (Pn) ($96.32 \pm 3.63\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) as the threshold light saturation, and an adaptation to maintain this maximum photosynthetic gross (Pg) rate at 30°C ($94.99 \pm 10.03\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) due to possible modifications in the photosynthetic apparatus that is reflected in the net evolution rate of O_2 to deal with such evaluated conditions. While, $Dc1M^{wt}$ strain its maximum photosynthetic efficiency was at $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 21°C (97.72 ± 2.99 and $99.85 \pm 0.30\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively) and in optimal response to the oxygen balance that is normally achieved by this mesophilic genus. These results provide a new prediction of mechanisms in the oxygen evolution in photosynthesis that rules the correlation between resistance and adaptation to extreme abiotic conditions in metal resistant strains of eukaryotic microalgae.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Chemistry-Pharmacobiology, Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo U.M.S.N.H., 403 Santiago Tapia St., 58000, Morelia, Michoacán, Mexico.

E-mail addresses: aact886@outlook.com (A.A. Cortés Téllez), fortun@ucm.es (S. Sánchez-Fortún Rodríguez), anadors@gmail.com (A. D'ors de Blas), Ichacon@umich.mx (L.C. García), gromar05@hotmail.com (Ma.G. Garnica-Romo), carbarcam@hotmail.com, carbarcam1107@outlook.com (M.C. Bartolomé Camacho).

1. Introduction

The microalgae are essential, because as primary producers provide the 50% oxygen and energy transfer along the aquatic food web. These phytoplanktonic organisms contain chlorophyll (*Chl a*, *b*) and other pigments for photosynthesis, which convert the light energy into chemical energy (Singh and Singh, 2015; Wong et al., 2015). The microalgal biomass productivity is the net result of photosynthesis and endogenous respiration.

The efficiency of the photosynthetic process is ruled by various environmental factors such as light, temperature, nutrients such as phosphate, and the CO₂ concentration (Béchet et al., 2013b), the latter being the main photosynthetic substrate in the biochemical phase. However, an increase in the concentration of CO₂ as a result of climate change and different anthropogenic activities (e.g. the emission of pollutants such as pesticides and toxic metals), can produce synergistic responses in combination of these environmental factors in extreme conditions on the photosynthetic activity (i.e. among the temperature, O₂ evolution rate, CO₂ and light intensity) (Rai and Gaur, 2001).

Indeed, light is one of the main determinants of productivity in microalgae. Thus, an increase in light intensity can lead an increase in the maximum growth rate, but also in the evolution of the photosynthetic oxygen (Huesemann et al., 2016). However, at high light intensities are negatively causing reduction in photosynthetic rate, and therefore in photoinhibition (Ragni et al., 2008). At low light intensities, the photosynthesis is usually proportional to the light intensity, because this process is limited by the rate of uptake of photons and low electron transfer speed (Chang et al., 2016). When the light intensity reaches a saturation threshold in microalgae, their photosynthesis rate is now limited by the speed of uptake after photon reactions. Under this condition, the photosynthesis is usually maximum and independent of the light intensity (Béchet et al., 2013b).

In the same way, the light intensity interferes with the content of photosynthetic pigments in the light-harvesting complexes (e.g. chlorophyll *a*). Changes in light quantity occur in seconds and can easily lead to overexcitation of the photosynthetic machinery, inducing photodamage or even leading to the death of the microalga (Croce and Amerongen, 2014). These changes also induce an adaptation to the variations in the light intensity producing modifications either in an increase of chlorophyll (*Chl*) to maximize the photonic uptake at low light intensities, otherwise at high light intensities, the microalgae reduce the content of *Chl* thereof to minimize the photoinhibition risk (Béchet et al., 2013a).

Likewise, temperature strongly influences cell chemical composition, nutrient uptake, CO₂ and growth rates of microalgae (Singh and Singh, 2015). The response of photosynthesis to temperature is dependent upon the amount of light available, with the response at subsaturating light levels. Although the initial photochemical reactions (e.g. the maximum quantum yield product) are independent of temperature, many photosynthetic reactions (such as ATPase in photophosphorylation, electron transport, RuBisCO activity and plastoquinone reactions) are temperature dependent (Moreno et al., 2008). In contrast, the respiration rate, efflux organic carbon and the amount of fixed carbon rises when the temperature increases (Davison, 1991). However, other authors suggest that, during dark respiration, an increase in temperature causes loss of cellular biomass due to higher energy costs in the maintenance of metabolism (Edmundson and Huesemann, 2015). The temperature fluctuations directly influence on the fluidity of the cell membranes in microalgae, affecting the degree of lipid saturation and integration of transmembrane proteins by increasing the output of ions and other solutes (Jeffrey Morris, 2014).

The first response to stress caused by high temperatures is

protein denaturation (e.g. ATPase or RuBisCO enzymes) resulting in loss of photosynthetic activity, formation of protein aggregates or apoptosis induction (Slabas et al., 2006). In addition, the accumulation of *Chl* from the light-harvesting complexes is also affected by temperature. It has been shown that at 20 °C the accumulation of *Chl* occurs more slowly, while at 30 °C this accumulation occurs quickly on certain genera of microalgae (*Haematococcus*) (Giannelli et al., 2015).

In this context, toxic metals affect the planktonic communities, cause alterations in photosynthesis, growth, inhibition of enzymatic activity and respiration (Yan and Pan, 2002). Though, the property of persistence and accumulation of metals generates that some photosynthetic species are sensitive, while in others induce bioaccumulation, adaptation and resistance responses (Gupta and Sandalio, 2012).

Nevertheless, under extreme environmental conditions like high light intensities and temperatures affect the toxicity and accumulation of cadmium in microalgae. However, the microalgae can grow, reflecting the ability to adapt in presence of this toxic metal concentrations and some can thrive in combinations of more than one stress (Varshney et al., 2015). This ability results in the development and occurrence of resistant strains in two main microalgae groups Chlorophyceae and Cyanobacteria (Rai and Gaur, 2001). Hence, this response has a key role in the structuring of ecological communities (Singh and Singh, 2015).

Despite this, there is no information in the scientific literature about the response that would occur in strains of metal-resistant microalgae under variations in light intensity, i.e. the saturation point where the maximum photosynthetic productivity occurs, and the adaptation to changes from low to high temperatures in the rate of oxygen evolution.

Therefore, the aims of this research were: 1) to evaluate the efficiency in photosynthetic activity in light phase as a function of absorbed photons through the variations in photon intensity, and 2) to estimate the efficiency in the photosynthesis gross rate (Pg) under temperature changes and exposure to the light saturation point (light threshold saturation) where the maximum photosynthetic efficiency is presented in a Cd-resistant strain (Dc^{RCd100}) compared to the wild-type strain (Dc1M^{wt}) of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides*.

2. Material and methods

2.1. Experimental organisms and culture conditions

Laboratory experiments were performed using two strains of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman, wild-type strain (Dc1M^{wt}) and resistant strain to 100 μM of cadmium (Dc^{RCd100}) from the Algal Culture Collection of the Environmental Toxicology Laboratory (Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary at the Universidad Complutense de Madrid, Spain). Dc1M^{wt} strain grew axenically in culture flasks (Greiner, Bio-One, Longwood, NJ, USA) with 20 ml of BG-11 medium at pH 7.1 (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), while Dc^{RCd100} strain was cultured in BG-11 medium supplied with 11.57 mg L⁻¹ cadmium sulfate (CdSO₄; Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) which is equivalent to Cd 100 μM concentration. This value corresponded to IC₅₀₍₇₂₎ i.e. the concentration that inhibited population growth by 50% after 72 h of exposure to CdSO₄ in Dc1M^{wt}. Dc^{RCd100} strain obtained from Dc1M^{wt} by selection of spontaneous mutants after 60 days in incubation with CdSO₄ exposure through the modified fluctuation analysis by López-Rodas et al. (2001), that showed an increased resistance to Cd in previous studies by Bartolomé et al. (2016). Both strains were maintained at 21 °C under continuous light of 60 μmol m⁻² s⁻¹ over the

400–700 nm waveband in a 16:8 h light-dark photoperiod to ensure exponential algal growth in a thermostatically controlled chamber (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU). Cells were maintained in mid-log exponential growth by serial transfers of one-cell inoculums to fresh medium once a fortnight. All tests were performed while both microalgal strains were in exponential growth phase.

2.2. Photosynthetic efficiency due to variations in photonic intensity

To assess the photosynthetic efficiency, the oxygen balance in light/dark phases on both strains of *D. chlorelloides* (Dc^{Rcd100} and Dc1M^{wt}) was measured through of the estimate the photosynthesis gross rate (as $P_g = R + P_n$). Where P_g is the Photosynthesis gross, R corresponds to Respiration and P_n is the Photosynthesis net. Photonic incidence values of 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were applied in Dc^{Rcd100} and Dc1M^{wt} to reach the light saturation point (light threshold saturation), this treatment is independent of the temperature changes with cell densities adjusted to $1 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ for each strain using Clark's electrode through the Chlorolab 2 system (Hansatech Instruments, Norfolk, England). Each assay was repeated six times ($n = 6$).

2.3. Oxygen balance with the saturation point of maximum photosynthetic rate under temperature variations

To estimate the oxygen balance due to temperature variations in light/dark phases, the photonic incidence values were applied once obtained the light threshold saturation estimated in the previous methodology, where the Cd-resistant and wild-type strains (Dc^{Rcd100} and Dc1M^{wt}) have the maximum photosynthetic rate on different cultures of the both strains of *D. chlorelloides* under increasing temperature set values at 5, 10, 15, 21, 25, 30 and 35 °C by a water recirculator (Thermo Fischer Scientific Inc., USA), using Clark's electrode through the Chlorolab 2 system Hansatech Instruments, Norfolk, England), with cell densities adjusted to $1 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ for each strain and each assay was repeated six times ($n = 6$).

2.4. Experimental data analysis

The oxygen quantification in both strains was performed in $\text{nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ through Oxigraph Plus V. 1.01 software (O2view, Hansatech, Norfolk, UK). The determination of the photosynthetic rates due to the selected photon intensities as $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and temperature range in Dc^{Rcd100} and Dc1M^{wt} is expressed by showing their mean and standard deviation of each value (mean $\pm$ SD) with six replicates ($n = 6$). D'Agostino-Pearson test assessed data normality. The Multiple comparisons between Dc^{Rcd100} with respect to the Dc1M^{wt} were examined by unpaired T-test through the correction by the Welch test for different variances, and the differences are considered significant at $p < 0.05$, the analysis of all data is established through the statistical software Graphpad Prism v 7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

3. Results

3.1. Photosynthetic efficiency under photonic intensities range

In the dark phase, Dc^{Rcd100} the oxygen balance rate was less than Dc1M^{wt} with an efficiency rate, i.e., a reduction in O_2 fixation of 46.28% with value of $11.27 \pm 3.64\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Table 1, and Fig. 1B).

Nevertheless, at low light intensities of 50 and 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Dc^{Rcd100} showed higher efficiency in the photosynthetic rate

compared to Dc1M^{wt} (at 42.73 ± 18.27 and $74.30 \pm 12.44\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ efficiency, respectively) with statistically significant differences ($p < 0.05$). At 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Dc^{Rcd100} presented the maximum efficiency in photosynthetic productivity ($96.32 \pm 3.63\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$), that is, the threshold light saturation; while Dc1M^{wt} presented its maximum efficiency at 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($97.72 \pm 2.99\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) showed in Table 1 and Fig. 1A.

On the other hand, at light intensities above the light saturation point, Dc^{Rcd100} exhibited a decrease in photosynthetic efficiency being more pronounced at 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table 1) as an inhibition effect. However, this response is less pronounced in Dc1M^{wt} with an efficiency with significant statistical differences ($p < 0.0001$) that it shares with Dc^{Rcd100} ($66.75 \pm 9.10\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Fig. 1A).

3.2. Photosynthetic efficiency under light saturation point and temperature fluctuations

In photosynthesis gross (P_g) and net CO_2 fixation or Photosynthesis net (P_n), at the lowest temperature of 5 °C and a photonic intensity at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (the threshold light saturation of Dc^{Rcd100}), the resistant strain showed a marked reduction in photosynthetic efficiency ($p < 0.05$) of $6.25 \pm 1.81\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for P_g and $5.07 \pm 2.44\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for P_n , with respect to Dc1M^{wt} (at 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as the light saturation point of Dc1M^{wt}) of $27.18 \pm 7.51\%$ and $25.02 \pm 9.80\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively (Table 2). However, at 10 °C and 15 °C the photosynthetic efficiency in P_g and P_n did not show differences between both strains (Table 2).

At 21 °C the control strain (Dc1M^{wt}) showed its maximum photosynthetic efficiency both in P_g of $99.85 \pm 0.30\%$ and in P_n of $81.89 \pm 5.20\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$, as would normally occur in this mesophilic genus (native allele of *D. chlorelloides*) in optimum range of temperatures at 21–25 °C in photosynthetic productivity and growth rate (Fig. 2A). While this response is not shared by Dc^{Rcd100} since its efficiency reached only $56.10 \pm 5.83\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in P_g and $35.93 \pm 2.17\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in P_n ($p < 0.0001$), exhibited in Table 2 and Fig. 2B.

Nevertheless, at 30 °C Dc^{Rcd100} exhibited its maximum efficiency in P_g and P_n (94.99 ± 10.00 and $68.82 \pm 7.42\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively) with modifications that follow the resistance of the Cd in this strain on photosynthetic productivity (Fig. 2B). On the other hand, Dc1M^{wt} at 30 °C and 35 °C was unable to sustain the photosynthetic reactions.

In the respiratory process, Dc1M^{wt} presented a maximum O_2 fixation at 25 °C (Table 2). Whereas, Dc^{Rcd100} presented a higher respiration rate at 30 °C (Table 2 and Fig. 2B).

On the other hand, at 35 °C there were statistical differences ($p < 0.05$) where Dc^{Rcd100} presents a low O_2 fixation rate of $18.18 \pm 6.49\% \text{ nmol O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$, different by Dc1M^{wt} ($1.55 \pm 0.45\%$) as lethal temperature for this wild-type strain.

4. Discussion

It is evident that environmental factors such as light intensity and temperature impact directly in the photosynthetic activity of microalgae. However, in metal-resistant microalgae, the modifications on the photosynthetic efficiency (in photosynthetic oxygen evolution rate both in net CO_2 fixation and respiration rate) are not known in order to cope with extreme temperature and light intensity conditions. Nevertheless, in the present study the control strain of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Dc1M^{wt}) as mesophilic species its maximum photosynthetic efficiency rate was at 21 °C and 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photon intensity, but at 30 and 35 °C it was lethal for this control strain, according to the rate lethal

Table 1
Photosynthetic efficiency in Photosynthesis net and Respiration ($P_g = P_n + R$) through the oxygen balance represented as % nmol O_2 ml^{-1} min^{-1} in the strain resistant to 100 μM of Cd (Dc^{Rcd100}) compared to $Dc1M^{wt}$ as a control strain of *D. chlorelloides*. The results are represented as the mean $\pm$ SD ($n = 6$).

Efficiency of <i>D. chlorelloides</i> strains on Photosynthesis net (Pn) (% nmol O_2 ml^{-1} min^{-1})			
Photon intensity $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$	<i>n</i>	$Dc1M^{wt}$	Dc^{Rcd100}
50	6	3.68 $\pm$ 7.35	42.73 $\pm$ 18.27**
75	6	25.68 $\pm$ 3.61	74.30 $\pm$ 12.44***
100	6	92.40 $\pm$ 4.10	93.45 $\pm$ 13.10 ^{ns}
200	6	94.56 $\pm$ 11.55	96.32 $\pm$ 3.63 ^{ns}
300	6	97.72 $\pm$ 2.99	89.52 $\pm$ 11.51 ^{ns}
400	6	92.50 $\pm$ 7.50	73.68 $\pm$ 8.20**
500	6	86.90 $\pm$ 5.34	66.75 $\pm$ 9.10**

Efficiency of <i>D. chlorelloides</i> strains on Respiration (R) % nmol O_2 ml^{-1} min^{-1}			
Photon intensity $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$	<i>n</i>	$Dc1M^{wt}$	Dc^{Rcd100}
–	6	24.35 $\pm$ 4.79	11.27 $\pm$ 3.64**

, *: Significant differences at $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively; compared to $Dc1M^{wt}$ strain.

ns: No significant differences ($p > 0.05$) with respect to $Dc1M^{wt}$ strain.

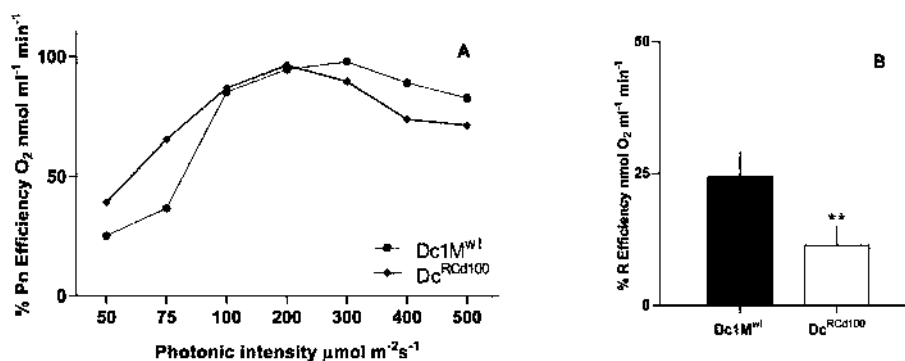


Fig. 1. Oxygen balance of Dc^{Rcd100} vs. $Dc1M^{wt}$ at different photonic intensities in $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. **A)** % Efficiency in photosynthesis net (Pn), and **B)** % respiration efficiency (R); ** statistical differences at $p < 0.05$.

Table 2
Photosynthetic through oxygen balance on Photosynthesis gross ($P_g = P_n + R$) as % nmol O_2 ml^{-1} min^{-1} at temperature fluctuations and the values of threshold light saturation in the Cd-resistant strain (Dc^{Rcd100}) compared to $Dc1M^{wt}$ control strain of *D. chlorelloides*. The results are represented as the mean $\pm$ SD ($n = 6$).

Efficiency production of <i>D. chlorelloides</i> strains on Photosynthesis gross (P_g) (% nmol O_2 ml^{-1} min^{-1})							
$P_g = P_n + R$		Photosynthesis gross (P_g)		Photosynthesis net (Pn) ^a		Respiration (R)	
Temperature ($^{\circ}C$)	<i>n</i>	$Dc1M^{wt}$	Dc^{Rcd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{Rcd100}	$Dc1M^{wt}$	Dc^{Rcd100}
5	6	27.18 $\pm$ 7.51	6.25 $\pm$ 1.81**	25.02 $\pm$ 9.80	5.07 $\pm$ 2.44*	2.11 $\pm$ 0.68	2.99 $\pm$ 1.47 ^{ns}
10	6	25.46 $\pm$ 7.86	19.26 $\pm$ 4.74 ^{ns}	19.84 $\pm$ 6.84	15.74 $\pm$ 6.57 ^{ns}	1.85 $\pm$ 1.48	4.95 $\pm$ 0.73*
15	6	31.29 $\pm$ 5.64	27.59 $\pm$ 5.77 ^{ns}	38.98 $\pm$ 4.68	22.94 $\pm$ 6.34**	6.42 $\pm$ 3.63	5.56 $\pm$ 1.55 ^{ns}
21	6	99.85 $\pm$ 0.30	56.10 $\pm$ 5.83***	81.89 $\pm$ 5.20	35.93 $\pm$ 2.17***	17.93 $\pm$ 3.18	18.94 $\pm$ 2.97 ^{ns}
25	6	91.29 $\pm$ 8.37	75.74 $\pm$ 6.09*	66.59 $\pm$ 10.60	56.33 $\pm$ 5.87 ^{ns}	20.76 $\pm$ 7.05	21.84 $\pm$ 1.37 ^{ns}
30	6	28.79 $\pm$ 7.98	94.99 $\pm$ 10.03***	19.42 $\pm$ 6.16	68.82 $\pm$ 7.42***	16.97 $\pm$ 5.71	26.17 $\pm$ 6.76 ^{ns}
35	6	10.00 $\pm$ 1.15	42.43 $\pm$ 8.46**	8.42 $\pm$ 1.52	28.54 $\pm$ 5.32**	1.55 $\pm$ 0.45	18.18 $\pm$ 6.49*

*, **, ***: significant differences at $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively; compared to $Dc1M^{wt}$ strain.

ns: no significant differences ($p > 0.05$) with respect to $Dc1M^{wt}$ strain.

^a The values of Photosynthesis net (Pn) correspond to exposure to light intensities at 300 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ and 200 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ for $Dc1M^{wt}$ and Dc^{Rcd100} strains, respectively; as the photon intensity with maximum photosynthetic efficiency (threshold light saturation).

temperatures of this mesophilic genus of microalgae have been stated from 30 to 35 $^{\circ}C$ (Ragsdale and Clebsch, 1970; Butterwick et al., 2005). However, with respect to the Cd-resistant strain Dc^{Rcd100} exhibited its maximum photosynthetic efficiency at 30 $^{\circ}C$ and at 200 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (light threshold saturation) as a temperature adaptation. According to Avendaño-Coletta and Schubert (2005) and subsequently Cabello et al. (2014), indicated that the excitation energy redistribution between photosystems and non-photochemical mechanism (release of energy as heat) operate to adjust the amount of light energy delivered to Photosystem II (PSII) in microalgae.

Despite this, very little research has been done on these strains of microalgae of which authors as Sánchez-Fortún et al. (2009); D'ors et al. (2010); Pereira et al. (2013) and Bartolomé et al. (2016) investigated on *Dictyosphaerium chlorelloides* strains resistant to metals like Cr(VI), Cr(III) and Cd(II) the photosynthetic activity, and establishing that there are indeed alterations on the function of PSII (reduction in photosynthetic quantum yield Φ_{PSII}) and in the oxygen balance in decreasing the fixation thereof on respiration rate, supporting high concentrations of these metals of the which resistance was generated compared to the lows required to inhibit photosynthesis in the sensitive strain ($Dc1M^{wt}$).

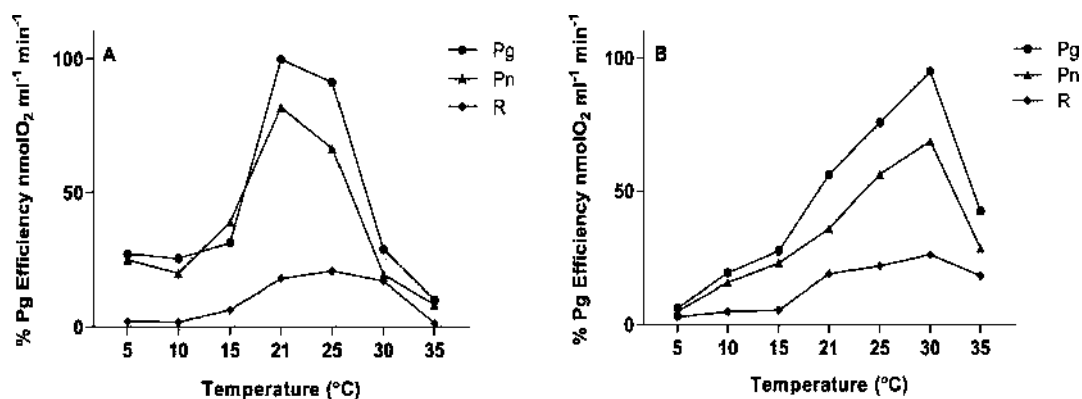


Fig. 2. Photosynthetic efficiency in oxygen balance (% nmol O₂ ml⁻¹ min⁻¹) at different temperature values (°C). **A)** Dc1M^{wt} at photon intensity of 300 μmol m⁻² s⁻¹ and, **B)** DcRcd100 at 200 μmol m⁻² s⁻¹. Pg: corresponds to Photosynthesis gross, Pn: Photosynthesis net, and R: Respiration.

On the other hand, certain species of Chlorophyceae microalgae are tolerant with maximum growth rates at exposure to high temperatures of 36 °C and light intensities of 300 μmol m⁻² s⁻¹ as does strains of *Chlorella sorokiniana*, but declined to up 500 μmol m⁻² s⁻¹ most likely due to photoinhibition (Huesemann et al., 2016b). Besides, these same authors indicated that other species such as *Nannochloropsis salina* have a maximum correlation in photosynthetic productivity rate between very high light intensities (2000 μmol m⁻² s⁻¹) and at 32 °C. Moreover, Rosenberg et al. (2008), determined on genetically modified strains of *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 high resistance to photodisruption and increased photon absorption showing greater efficiency in energy conversion. The most common effects of high temperatures and light intensities values in native alleles of microalgae are photoinhibition due to ROS (OH•, H₂O₂, ¹O₂, O₂⁻) and chlorophyll triplet production which cause fatty acid peroxidation, the inhibition of charge separation activity of PSII, protein denaturation or enzyme inactivation (i.e. ATPase, ferredoxin inhibition) and functional changes in the thylakoid membrane (Pospíšil, 2016).

In research conducted on *Scenedesmus obtusiusculus* due to the effect of light intensity and temperature, Cabello et al. (2014) estimated that at a photon intensity at 336 μmol m⁻² s⁻¹ and an increase in the culture temperature, the O₂ rate is increased by 21% and the maximum value of photosynthetic efficiency it is reached at a temperature of 35 °C, in addition, at 505 μmol m⁻² s⁻¹ increases the cellular biomass as a photoadaptation phase. Other studies carried out by Hancke et al. (2008) in the marine microalga *Prochlorocentrum minimum* determined that the maximum rate of photosynthesis is strongly induced at 25 °C and a photon intensity of 500 μmol m⁻² s⁻¹.

Thus, microalgae have different adaptation mechanisms to these conditions including: synthesis of antioxidant molecules and enzymes (i.e. superoxide dismutase (SOD), aspartate peroxidase (APX), peroxidases (PRX), and thioredoxins), accessory pigments synthesis to maximize the absorption of energy excess such as carotenoids (β and α carotenes) and zeaxanthin, resynthesis of protein D1 of PSII, Heat shock proteins (isoform Hsp 70) synthesis, flavoproteins (FlvA to Flv D, PGRL-1, PGR5 on cyanobacteria *Synechocystis* and green microalga genus of *Chlamydomonas*) and changes in the membrane lipids conformation, among others (Ehling-Schulz et al., 1997; Lea-Smith et al., 2013; Ras et al., 2013; Bersanini et al., 2014; Croce and Amerongen, 2014; Allahverdiyeva et al., 2015; Giannelli et al., 2015; Kurpan Nogueira et al., 2015). Even in some species of microalgae such as *Chroococcidiopsis thermalis*, the presence of *Chl f* has been identified as an antenna pigment mitigating photodisruption due to excess energy and

temperatures above 40 °C (Nürnberg et al., 2018).

Also, relatively high temperatures increase carbon fixation by the carboxylase activity of by the RuBisCO and low respiration rate (Davison, 1991; Sakshaug et al., 1997). On the other hand, Wong et al. (2015) indicated that the repair constant in the PSII increases with increasing temperature under high light exposure. Microalgae strains also have physiological adjustments to extreme temperatures through generational adaptations, this was observed by Huertas et al. (2011), on *Scenedesmus intermedius* could adapt to 30 °C after 15 generations, to 35 °C after 30 generations and to a maximum of 40 °C after 135 generations.

Nevertheless, the effects on metal resistance microalgae exposed to extreme conditions previously discussed has not been studied. Therefore, this study is a pioneer in this field and sets the guidelines for further research in these strains of resistant microalgae that carry out oxygenic photosynthesis, and later elucidate the modifications in the photosynthetic apparatus after the metal adaptation.

5. Conclusions

In summary, the Cd-resistant strain (DcRcd100) exhibits maximum efficiency in photosynthetic rate at 30 °C and tolerance to low light intensities with a light threshold saturation at 200 μmol m⁻² s⁻¹ and photoinhibition at high values (500 μmol m⁻² s⁻¹), however, these results tentatively indicate that this adaptation is due to possible modifications in the photosynthetic apparatus that is reflected in the net evolution rate of O₂ to deal with such evaluated conditions.

Therefore, for the control strain under study (Dc1M^{wt}) its maximum photosynthetic efficiency was at 300 μmol m⁻² s⁻¹ and 21 °C in optimal response to the oxygen balance that is normally achieved by this mesophilic genus of microalgae.

Declarations of interest

The authors declare that there are none interest conflicts.

Acknowledgements

We like to thanks to Mexican National Council for Science and Technology CONACYT (No. 286260), the Scientific Coordination Research (CIC PI.26.8) at the Mexican University the Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, and the Universidad Complutense de Madrid, Spain for the project support.

References

- Avendaño-Coletta, D., Schubert, H., 2005. Oxygen evolution and respiration of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under two different light regimes applying light/dark intervals in the time scale of minutes. *Physiol. Plant.* 125, 381–391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00562.x>.
- Allahverdiyeva, Y., Suorsa, M., Tikkanen, M., Aro, E.M., 2015. Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. *J. Exp. Bot.* 66, 2427–2436. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru463>.
- Bartolomé, M.C., Cortés, A.A., Sánchez-Fortún, A., Garnica-Romo, M.G., Sánchez-Carrillo, S., Sánchez-Fortún, S., 2016. Morphological and physiological changes exhibited by a Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strain and its cadmium removal capacity. *Int. J. Phytoremediation* 18, 1171–1177. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1189400>.
- Béchet, Q., Muñoz, R., Shilton, A., Guieysse, B., 2013a. Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 118–126. <https://doi.org/10.1002/bit.24603>.
- Béchet, Q., Shilton, A., Guieysse, B., 2013b. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol. Adv.* 31, 1648–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>.
- Bersanini, L., Battchikova, N., Jokel, M., Rehman, A., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Aro, E.M., 2014. Flavodiiron protein Flv2/Flv4-related photoprotective mechanism dissipates excitation pressure of PSII in cooperation with phycobilisomes in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 164, 805–818. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231969>.
- Butterwick, C., Heaney, S.I., Talling, J.F., 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshw. Biol.* 50, 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01317.x>.
- Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2014. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. *Chem. Eng. J.* 252, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.073>.
- Chang, H.-X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., Zhu, X., 2016. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresour. Technol.* 206, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.087>.
- Croce, R., Amerongen, H. van, 2014. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat. Chem. Biol.* 10, 492–501. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1555>.
- Davison, I.R., 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x>.
- 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, 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.051>.
- Edmundson, S.J., Huesemann, M.H., 2015. The dark side of algae cultivation: characterizing net biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Res.* 12, 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012>.
- 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, 1940–1945. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1940-1945.1997>.
- Giannelli, L., Yamada, H., Katsuda, T., Yamaji, H., 2015. Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.002>.
- Gupta, D.K., Sandalio, L.M., 2012. Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation, vol. 275. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22081-4>.
- Hancke, K., Hancke, T.B., Olsen, L.M., Johnsen, G., Glud, R.N., 2008. Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and ¹⁴C Assimilation. *J. Phycol.* 44, 501–514. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00487.x>.
- Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2011. Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* 278, 3534–3543. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0160>.
- Huesemann, M., Crowe, B., Waller, P., Chavis, A., Hobbs, S., Edmundson, S., Wigmosta, M., 2016. A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Res.* 13, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.008>.
- Jeffrey Morris, J., 2014. In: A1 - Srivastava, A.K., A1 - Rai, A.N., A1 - Neilan, B.A. (Eds.), *Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses*. PB - CRC Press, Boca Raton, FL, p. 375. *J. Phycol.*, 50(4), 770–770. <https://doi.org/10.1111/jpy.12201>.
- Kurpan Nogueira, D.P., Silva, A.F., Araújo, O.Q.F., Chaloub, R.M., 2015. Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. *Biomass Bioenergy* 72, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.017>.
- Lea-Smith, D.J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D.S., Dennis, J.S., Scott, S.A., Smith, A.G., Howe, C.J., 2013. Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol.* 162, 484–495. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210260>.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179–190. <https://doi.org/10.1080/09670260110001735328>.
- Moreno, S.G., Vela, H.P., Alvarez, M.O.S., 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 119–129.
- Nürnberg, D.J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., Antonaru, L.A., Ruban, A.V., Cardona, T., Krausz, E., Boussac, A., Fantuzzi, A., Rutherford, A.W., 2018. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science* 360, 1210–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aar8313>.
- Pereira, M., Bartolomé, M.C., Sánchez-Fortún, S., 2013. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: a mechanism for chromium resistance. *Chemosphere* 93, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.078>.
- Pospíšil, P., 2016. Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01950>.
- Ragni, M., Ains, R.L., Leonardos, N., Geider, R.J., 2008. Photoinhibition of PSII in *Emiliania huxleyi* (haptophyta) under high light stress: the roles of photorepair, photoprotection, and photorepair. *J. Phycol.* 44, 670–683. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00524.x>.
- Ragsdale, H.L., Clebsch, E.E.C., 1970. Temperature and light intensity effects on growth of *Dictyosphaerium pulchellum*. *Am. J. Bot.* 57, 234–238. <https://doi.org/10.2307/2440518>.
- Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), 2001. *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59491-5>.
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-9310-6>.
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.008>.
- Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P.G., Kiefer, D.A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J., Takahashi, M., 1997. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *J. Plankton Res.* 19, 1637–1670. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.11.1637>.
- 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, 1901–1905. <https://doi.org/10.1897/08-489.1>.
- Singh, S.P., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>.
- 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, 845–864. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500196>.
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., Wangikar, P.P., 2015. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. *Bioresour. Technol.* 184, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.040>.
- Wong, C.-Y., Teoh, M.-L., Phang, S.-M., Lim, P.-E., Beardall, J., 2015. Interactive effects of temperature and UV radiation on photosynthesis of *Chlorella* strains from polar, temperate and tropical environments: differential impacts on damage and repair. *PLoS One* 10, e0139469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139469>.
- Yan, H., Pan, G., 2002. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere* 49, 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00285-0).