

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES DE ADAPTACIÓN DE LA MICROALGA *SCENEDESMUS SP* AL ESTRÉS INDUCIDO POR CADMIO Y VANADIO (Cd y V).**

Letty Marcano <sup>a\*</sup>, Ingrid Carruyo <sup>a</sup>, Carolina Morales <sup>a</sup>, Xiomara Montiel <sup>a</sup>, Patricia Moreno <sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología.

<sup>b</sup> Universidad del Zulia. Facultad de Medicina. Escuela de Medicina.

\*Autor de Correspondencia, Letty Marcano. Urb. Monte Bello. AV. 11<sup>a</sup> con calle Q N° 12-21. Cod. Postal 4002.

Telefax: 058-261-7483012/ 0414-3628377. E-mail: [lettymarcano@cantv.net](mailto:lettymarcano@cantv.net)

Recibido: Noviembre 2009. Aprobado: Febrero 2010.

Publicado: Noviembre 2010.

**RESUMEN**

Se determinaron los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus sp* al estrés inducido por cadmio y vanadio, con el propósito de su uso para detectar la presencia de estos metales en cuerpos de agua. Las cepas, aisladas de la laguna de estabilización de la Universidad del Zulia, Venezuela, fueron mantenidas en medio de cultivo algal a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12:12 h y expuestas por 10 días a 10 ppm de cada metal. Se determinó la viabilidad celular cuantificando la producción de pigmentos por espectrofotometría; la acumulación de cadmio y vanadio por espectrometría de absorción atómica (GFAAS) y los cambios ultraestructurales por microscopía electrónica de transmisión (MET). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, cada uno de ellos con su respectivo control donde la solución del metal fue sustituida por medio de cultivo. Los resultados mostraron que ambos metales producen inhibición en la producción de pigmentos, sin embargo los niveles de este parámetro indican viabilidad celular lo que demuestra adaptación de los cultivos a la concentración expuesta. También se da una acumulación significativa de los dos metales, parámetro requerido para un bioindicador ambiental. El análisis ultraestructural reveló cambios morfológicos como alteraciones en los organelos involucrados en la producción de pigmentos, así como en los encargados de almacenamiento de los metabolitos energéticos. Cambios por los que posiblemente los microorganismos logran superar las condiciones adversas del medio y mantener la viabilidad celular. Se concluye que esta especie podría ser utilizada como un modelo experimental para el monitoreo de contaminación de depósitos de agua por estos metales pesados.

**Palabras clave:** Microalgas, cadmio, vanadio, ultraestructura, bioindicador.

**EVALUATION OF THE ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF ADAPTATION OF THE ALGAE *SCENEDESMUS SP* TO THE STRESS INDUCED BY CADMIUM AND VANADIUM**

**ABSTRACT**

In this paper the adaptation capacity of the algae *Scenedesmus sp* to the stress induced by cadmium and vanadium was evaluated in order to use it to detect the presence of these metals in water ecosystems. Algae were obtained from the collection of the Universidad Del Zulia, Venezuela. The algae were maintained in an algal culture medium at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , a 12:12 h photoperiod and were exposed to 10 ppm of each metal during 10 days. The effect of metals on the cellular viability was determined by quantifying the production of pigments using the spectrophotometer, while the accumulation of cadmium and vanadium was determined by spectrometry of atomic absorption (GFAAS) and the ultrastructural changes were determined using TEM. All the bioassays were carried out for triplicate, each one with its own control. The results reflected that both metals produce an adverse effect on the pigment production. However, the levels of this parameter indicate cellular viability, which demonstrates adaptability of the cultures exposed to the metals. Furthermore, a significant metal accumulation was present, which is a parameter required for an environmental bioindicator. The ultrastructural analysis revealed morphologic changes which let to alterations in the organelles involved in the pigment production as well as in those in charge of the energetic metabolites storage. Through these changes the microorganisms might be able to overcome the adverse conditions of exposure and to maintain the viability cellular. Therefore, the species can be used as a experimental model to supervise the contamination by heavy metals.

**Key words:** Microalgae, cadmium, vanadium, ultrastructure, bioindicator.

**INTRODUCCIÓN**

La contaminación ambiental es uno de los problemas que se correlacionan directamente con el desarrollo industrial. Como producto de esta, los metales pesados

son uno de los grupos de contaminantes más peligrosos por su persistencia y toxicidad, además de que pueden incorporarse en los organismos a través de la cadena trófica, por lo que es de utilidad la búsqueda,

evaluación y factibilidad del uso de modelos biológicos para el monitoreo de la contaminación por metales.

Entre los metales pesados de interés toxicológico, el cadmio y el vanadio son considerados de relevancia por sus efectos fisiológicos en los organismos, en los cuales una vez que ha ingresado, se fijan rápidamente a los tejidos causando cambios estructurales en las proteínas que afectan varios procesos celulares, incluyendo el metabolismo energético y la síntesis de biomoléculas [1, 2].

Los organismos unicelulares, entre ellos las algas, a través del proceso de fotosíntesis incorporan oxígeno, contribuyendo de esta manera a la oxidación de la materia orgánica y a aumentar el oxígeno disuelto en el agua, el cual será utilizado por las otras comunidades u organismos que componen la flora y fauna del medio acuático, contribuyendo así al proceso de depuración ambiental [3]. Por otro lado, presentan la capacidad de inducir mecanismos de resistencia ante el estrés producido por la exposición a niveles tóxicos ambientales [4]. Según Phillips [5], para que un organismo pueda ser empleado como biomonitor debe reunir una serie de pre-requisitos tales como: ser abundante, sedentario y representativo del área de estudio, acumular grandes cantidades del contaminante sin experimentar efectos tóxicos, distribuirse en una amplia extensión geográfica, resultar de simple identificación y muestreo, además de proveer suficiente cantidad de tejido sin necesidad de concentrar previamente el microorganismo.

*Scenedesmus sp* es un alga unicelular, que cumple con casi todas estas características ya que es una especie ubicua presente en las costas Venezolanas [6], de simple identificación y manipulación en condiciones de cultivos, acumula grandes cantidades de metales [7], presenta buena proporción de volumen y masa y con una pared celular característica que facilita la adsorción de los metales actuando como una resina de intercambio iónico [8].

Fundamentado en lo expuesto, se valoró la ultraestructura de la microalga *Scenedesmus sp* expuesta a la intoxicación por cadmio y vanadio, con

miras a evaluar los cambios de adaptación al estrés inducido por los metales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa *Scenedesmus sp* fue aislada de la laguna de estabilización de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia-Venezuela; mantenida viable en medio de cultivo algal f/2 de Guillard [4], bajo condiciones controladas de temperatura ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ) y fotoperíodo de 12:12 h. Se procedió a preparar el cultivo madre (stock) de la cepa *Scenedesmus sp*, inoculando 50 ml de suspensión microalgal proveniente de la colección en 600 ml de agua enriquecida con medio algal a una concentración de 8 mM de  $\text{NaNO}_3$ , determinando su densidad celular en fase exponencial (aproximadamente  $10^6$  cel/ml) e inoculando a los medios de cultivo de cada bioensayo. Para valorar el efecto de los metales los cultivos fueron expuestos a 10 ppm de Cloruro de cadmio y de Pentóxido de vanadio por 10 días, Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, cada uno con su control donde la solución de los metales fue sustituida por medio de cultivo f/2.

### *Determinación de viabilidad celular.*

Se valoró la viabilidad celular por la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenos) mediante la técnica de espectrofotometría (Spectronic 21D Milton Roy), para lo cual se provocó la ruptura de la pared celular utilizando un equipo de ultrasonido (Ultrasonic Processor GE 130) extrayendo y solubilizando el pigmento con metanol; la cuantificación se estableció utilizando las ecuaciones de Wellburn. 1994 [9]

### *Determinación de acumulación de los metales.*

Se procedió a centrifugar la muestra de cada cultivo, se colectó el pellet con filtros de membranas (millipore), se deshidrató y se liofilizó (Labconco model LYPH-LOCK) a  $-46^\circ\text{C}$  a una presión de  $3400 \times 10^{-3}$  mpa. Seguidamente, se realizó una digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  concentrado por cuatro horas en cápsulas de teflón y dentro de un dispositivo de acero inoxidable (Parr Instrument), a una temperatura de  $130^\circ\text{C}$ .

determinando la acumulación del metal en la biomasa por Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS) en un Perkin Elmer modelo 3100. Las muestras fueron analizadas por triplicado con sus respectivos controles y los resultados expresados en µg/gr [10]

*Análisis ultraestructural.*

Se centrifugaron las muestras en medio de cultivo algal y el pellet se fijó en glutaraldehído al 2% en buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 2 h., a temperatura ambiente y post-fijado en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer por 1 h. Posteriormente se deshidrató en una serie gradual de etanol (50% al 100%) y óxido de propileno, se infiltró en la resina poliéster Araldita 502. Los cortes finos (60 nm) se contrastaron con soluciones de acetato de uranilo y contrastaron con citrato de plomo para ser observados en un Microscopio Electrónico de Transmisión (Hitachi H-7000) a 100kV.

*Análisis estadístico.*

Los resultados se analizaron aplicando un ANOVA para valorar el efecto de la concentración y la prueba de Tukey para comparación de medias utilizando el programa estadístico SPSS versión 10 para Windows.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Producción de pigmentos.*

Una de las características requerida para que un microorganismo pueda ser utilizado para el monitoreo de la contaminación, es su capacidad de resistir altas concentraciones y largos períodos de exposición al contaminante [5]. En este contexto se determinó la viabilidad, valorada como la producción de pigmentos fotosintéticos de los cultivos de *Scenedesmus sp* expuestos a 10 ppm de cadmio (Cd) y vanadio (V) por 10 días.

La tabla 1 expresa la comparación de medias de los valores de clorofila y caroteno de los cultivos control y expuestos al cadmio, presentándose diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los controles (0 ppm) y la concentración ensayada (10 ppm), lo que refleja para el caso del cadmio, un efecto adverso sobre la producción

de clorofila y por ende sobre la viabilidad celular. Terry y Stone [11], establecen una no reducción del contenido de clorofila a en cultivos de *S. abundan* expuestas a 5 y 10 ppm por períodos menores de 72 h, reportando reducción del pigmento a concentraciones de 15 y 20 ppm. Similarmente, otros investigadores señalan que el  $Cd^{+2}$  induce cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos, posiblemente alterando la organización de los cloroplastos [12].

**Tabla 1.** Prueba de Tukey para muestras apareadas con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ) comparando los niveles de clorofila y caroteno inicial y los expuestos por 10 días a 10 ppm de cadmio en *Scenedesmus sp.*

	Clorofila (mg/L)	Caroteno (mg/L)
0	0,2599 ± 0,04	0,1898 ± 0,01
10	0,2010 ± 0,05*	0,1985 ± 0,04
p	< 0,05	> 0,05

\*: Diferencia significativa con respecto al control. ( $\alpha = 0.05$ )

Al valorar el efecto del cadmio sobre la producción de carotenos no se observa diferencia significativa en los niveles de pigmentos entre los controles y los cultivos expuestos a 10 ppm durante 10 días.

Similarmente, los resultados obtenidos del análisis del efecto del vanadio sobre la producción de pigmentos revelaron un efecto significativo del metal sobre la producción de clorofila pero no sobre el contenido de caroteno (Tabla 2).

**Tabla 2.** Prueba de Tukey para muestras apareadas con un intervalo de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ) comparando los niveles de clorofila y caroteno inicial y los expuestos por 10 días a 10 ppm de vanadio en *Scenedesmus sp.*

	Clorofila (mg/L)	Caroteno (mg/L)
0	0,2827 ± 0,05	0,1695 ± 0,01
10	0,2023 ± 0,05*	0,1855 ± 0,03
p	< 0,05	> 0,05

\*: Diferencia significativa con respecto al control. ( $\alpha = 0.05$ )

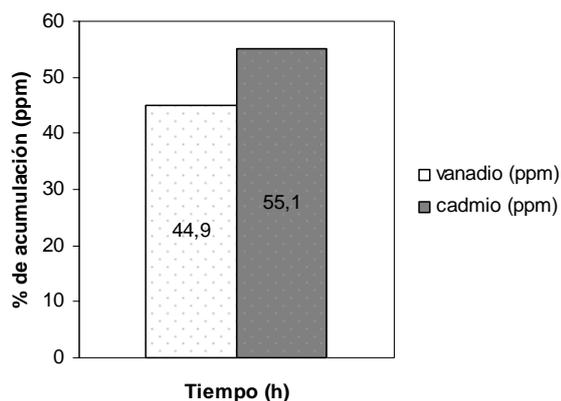
En general se puede establecer un efecto tóxico de estos dos metales sobre la producción de clorofila afectando la viabilidad celular de estos organismos por

disminución de la capacidad fotosintética, coincidiendo con lo reportado por otros autores quienes establecen la toxicidad ejercida por metales pesados en microalgas [4, 11, 12]. Sin embargo, se puede observar que, aún cuando la producción del pigmento fotosintético disminuye significativamente con respecto a los valores control, se mantiene en valores que permite inferir una viabilidad celular aún en presencia del tóxico; lo que demuestra la resistencia de esta especie a la presencia de metales como el Cd y V en el medio de cultivo. Posiblemente la adaptación se deba a un equilibrio en la producción de estos dos pigmentos, ya que se han dado reportes de la acción protectora de los carotenos sobre la fotooxidación de la clorofila ante un estrés tóxico [13].

*Acumulación de los metales.*

La acumulación del metal es otro parámetro a valorar cuando se considera la utilización de un modelo biológico como bioindicador de la contaminación por metales pesados.

La Fig. 1, muestra la relación porcentual de la acumulación de los dos metales en *Scenedesmus sp.*, se aprecia que ambos metales son bioacumulados, sin embargo se presenta un mayor porcentaje para el cadmio que para el vanadio (> 10 %).



**Fig. 1.** Representación gráfica de la relación porcentual de la acumulación de cadmio y vanadio en *Scenedesmus sp.*

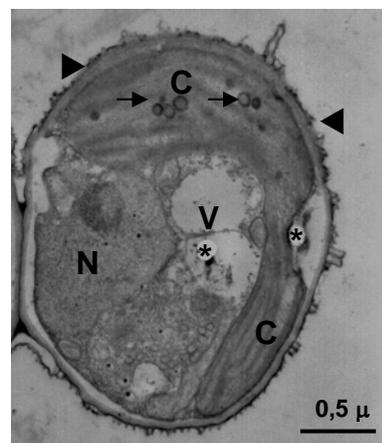
El ANOVA reveló una acumulación significativa de los dos metales en los cultivos expuestos ( $F = 86,041$ ;  $p < 0,01$ ). Al comparar las medias entre la acumulación

de cadmio con la de vanadio se presenta diferencias significativas ( $t = 2,729$ ;  $p > 0,05$ ), con una mayor afinidad para el cadmio que para el vanadio. Varios reportes señalan que una de las características que hace al cadmio en suspensión potencialmente tóxico, es su alta capacidad de acumulación y bajo nivel de excreción [7, 11, 14]; adicionalmente, son varios los factores bióticos y abióticos que influyen sobre la bioacumulación de los metales, entre los cuales se pueden mencionar la especiación y formación de compuestos orgánicos, pH del medio, salinidad, metabolitos intermediarios [11, 14, 15]. Por otra parte, el vanadio, a diferencia del cadmio, es un elemento traza con valores entre 0.2 y 100  $\mu\text{g/L}$  [16], por lo que se puede inferir que posiblemente esta característica le permita a los organismos un metabolismo mayor del metal y por consiguiente una menor acumulación.

*Análisis ultraestructural.*

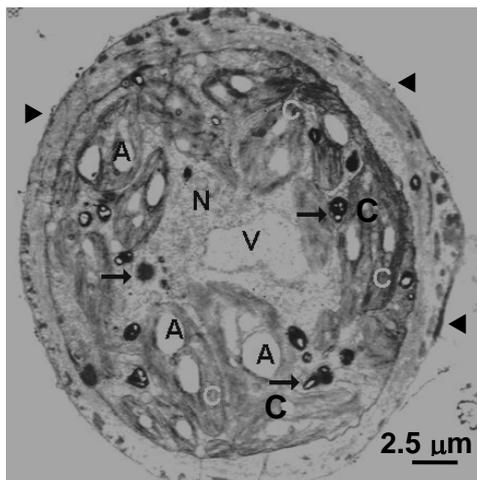
Una vez determinada la viabilidad y acumulación de ambos metales en *Scenedesmus sp.*, se valoraron los cambios ultraestructurales que permitieron dilucidar los mecanismos de adaptabilidad de la microalga al estrés ambiental causado por Cd y V bajo condiciones controladas de temperatura ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y fotoperíodo de 12:12 h.

En la Fig. 2 se observa en un corte las características ultraestructurales de la microalga *Scenedesmus sp* control, se aprecia el núcleo, los cloroplastos, vacuolas, almidón, gránulos de lípidos y pared celular.



**Fig. 2.** Micrografía electrónica de *Scenedesmus sp* control: N = Núcleo, C = cloroplastos, V = vacuola, Almidón (\*), Lípidos (↓) y pared celular (▼). 10.000 X

En las células expuestas al cadmio (Fig. 3), se presentan cambios en cuanto a la organización ultraestructural de los organelos. Se muestra vacuolización y desorganización de los cloroplastos con dilatación de los tilacoides, presentándose una redistribución del almidón y gránulos de lípidos que se insertan entre los cloroplastos. Se muestra un mayor engrosamiento de la pared celular, con la presencia de material electrodens, que se presume sea el metal que se acumula en la célula.

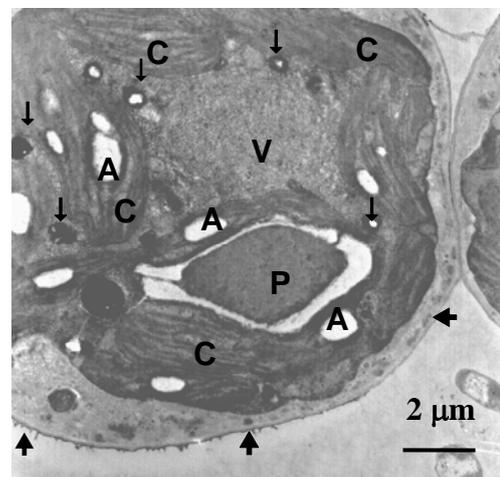


**Fig. 3.** Micrografía electrónica de *Scenedesmus* sp expuesta al cadmio (10 ppm): C = cloroplastos, V = vacuola, A = Almidón, Lípidos (↓) y pared celular (▼). 20.000 X.

La vacualización observada puede ser resultado del efecto del metal sobre los sistemas de transportes responsables del mantenimiento de la osmolaridad celular [17]; Koizumi y col. [18], establecen que el cadmio produce inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^{+2} - \text{K}^{+2}$ , originando un incremento del sodio intracelular lo cual ocasiona retención de agua e histólisis celular. La desorganización de los cloroplastos, con membranas de tilacoides dilatadas mostrada, se relaciona con la disminución de pigmentos obtenida en los resultados, posiblemente por el efecto del metal en el sistema de transporte de electrones por disminución de la relación de citocromo/clorofila [19]. También se presentó desorganización del pirenoide, lo cual puede ser una señal de inhibición del crecimiento por la imposibilidad de las células de producir moléculas almacenadoras de energía. Los cambios observados son similares a los reportados por otros autores en otras especies

sometidas a intoxicación crónica con este y otros metales pesados [19, 20, 21].

Con respecto a los cultivos expuestos al vanadio, se observa que las alteraciones en la morfología son menos drásticas (Fig. 4), se observa vacuolas (V) pronunciadas, pero no se aprecia vacuolización citoplasmática, por lo que se puede inferir que, aún cuando también se han dado reportes de que el vanadio es un potente inhibidor de la enzima  $\text{Na}^{+2} - \text{K}^{+2}$  ATPasa [22], de alguna forma, el vanadio puede ser metabolizado mas eficientemente que el cadmio, quizás por su condición de elemento esencial reportada para algunos microorganismos [23].



**Fig. 4.** Micrografía electrónica de *Scenedesmus* sp expuesta al vanadio (10 ppm): C = cloroplastos, V = vacuola, P = Pirenoide, A = Almidón, Lípidos (↓) y pared celular (▲). 25.000 X.

En general los cloroplastos se observan más organizados que en las células expuestas al cadmio, sin embargo se siguen apreciando ensanchamiento de los tilacoides con depósitos de almidón en su interior. Se muestra también variación en la organización del pirenoide, estructura responsable de la síntesis de almidón, observándose el almidón irregularmente inserto en los cloroplastos. Los gránulos de lípidos se presentan menos numerosos pero de mayor tamaño, también en relación con las estructuras involucradas con los procesos fotosintéticos y la pared celular engrosada.

Una manifestación relevante del efecto de los metales en los cultivos expuestos, es la presencia de una pared

celular engrosada con respecto al control, posiblemente por la liberación de exopolisacáridos, los cuales se han descrito son producidos por las algas cuando son sometidas a condiciones de estrés contribuyendo a su adaptabilidad a la presencia del tóxico [24]. En general los resultados presentados coinciden con los obtenidos por Visviki y Rachlin, [19], que establecen un aumento en el volumen celular con un relativo incremento en el volumen de lípidos y reducción de pirenoide con respecto a los controles de las células provenientes de cultivos expuestos al cadmio y cobre.

Mecanismos de adaptabilidad por parte del alga al estrés causado por los metales se pusieron de manifiesto en el análisis ultraestructural, originándose alteraciones en los organelos involucrados en la producción de pigmentos, así como en los encargados de almacenamiento de los metabolitos energéticos, cambios por los que posiblemente los microorganismos logran superar las condiciones adversas del medio y mantener la viabilidad celular.

## CONCLUSIONES

Los resultados permiten inferir que la especie *Scenedesmus* sp presenta mecanismos de adaptación al estrés causado por ambos metales por lo que se puede sugerir su utilización como modelo biológico para estudios en ecotoxicología. Se recomienda la aplicación de la microscopia electrónica en conjunto con el microanálisis elemental, lo que aportaría información cualitativa y cuantitativa de la presencia de los metales y por ende del uso del microorganismo como bioindicador y/o biorremediador de la contaminación en cuerpos de agua.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia. Venezuela.

## REFERENCIAS

[1] Rodríguez-Mercado J y Altamirano-Lozano M (2006). “Vanadio: Contaminación, Metabolismo Y

Genotoxicidad” *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (4) 173-189.

- [2] USEPA. U.S. (2001). Chronic Toxicity Summary. Cadmium and Cadmium Compounds. CAS Registry Number: 7440-43-9.
- [3] Cordero J., Guevara M., Morales E. (2005) “Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae)”. *Rev. biol. trop sep.* 53 (3-4): 325-330.
- [4] Romero Y., Lodeiros C., Esclapés M., Marín N., Guevara M y Morales, E. (2002). “Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del Nororiente de Venezuela”. *Interciencia* 27(3): 104-109.
- [5] Phillips D.J.H. (1997). “The use of biological indicator organisms to monitor traces metal pollution in marine and estuarine environments. A review” *Environ. Pollut.* 13: 281-317.
- [6] Vegas Vilarrubia T y Riehl W. 2001. “Contribución al conocimiento de las especies de Fitoplancton del Embalse de Guri (Venezuela)”. *Acta Bot. Venez.* 24 (2): 93-132.
- [7] Marcano L., Carruyo I., Montiel X., Morales E., Moreno P. (2006) “Determinación de la acumulación de cadmio en *Scenedesmus* sp”. Memorias del IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo – República Dominicana, pp. 611.
- [8] Macfie S. y Welbourn P. (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(4):413-9.
- [9] Wellburn A. (1994). “The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, Using various solvents with Spectrophotometers of different Resolution”. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- [10] Bodenseewerk J. (1984). Analytical techniques for Grafite Furnace Atomic Absorption Spectofometry

- Perkin-Elmer GMGH. Verberlinge. Republic Federal of Germany.
- [11] Terry P., y Stone W. (2002). "Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*." *Chemosphere* 47(3): 249-255.
- [12] Fernández Leborans, F. y Novillo, A. (1996). "Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae)". *Wat. Rev.* 30 (1):57-62.
- [13] Marin N., Morales F., Lodeiros C. y Tamigneaux, E. (1998). "Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities". *J Appl Phycol* 10 (4):405-411.
- [14] Pempkowiak, J. y Kosakowska, A. (1998). "Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances". *Environ. Inte.* 24 (5-6):583-588.
- [15] Matsunaga T., Takeyamah H., Nakao T. y Yamazawa A. (1999). "Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium – polluted seawater". *J. Biotechnol.* 70(1-3): 33-8.
- [16] Hamada T. (1998) "High vanadium content in Mount Fuji groundwater and its relevance to the ancient biosphere". In: Nriagu J, Ed. *Vanadium in the environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry*, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 97-123.
- [17] Korotkov S., Skuiskii I & Giazunov V. (1998). "Cd<sup>2+</sup> effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations". *J. Inorg. Biochem.* 70:17 - 23.
- [18] Koizumi T., Shirakura, H., Kumagai H., Tatsumoto H & Suzuki. T (1996). "Mechanism of cadmium induces cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium induce active oxygen - related permeability changes of the plasma membrane". *Toxicology.* 114:125 - 134.
- [19] Visviki I., y Rachlin, J. (1992). "Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute chronic exposure to copper and cadmium". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23(4):420-5.
- [20] Fernández – Pinas, F., Mateo P. y Bonilla, I. (1995). "Ultrastructural changes induced by selected cadmium concentration in the cyanobacterium *Nostoc UAM 208*". *Journal Plant Physiology* 11: 353-359.
- [21] Nishikawa K., Yamakoshi Y., Uemura I y Noriko T. 2003 "Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism". *Microbiology Ecology* 44, (2): 253-259.
- [22] Amezcua-Allieri M. A. and Salazar-Coria L. (2008). "Nickel and Vanadium Concentrations and Its Relation with Sediment Acute Toxicity". *Bull Environ Contam Toxicol.* 80(6): 555-560.
- [23] Crans D.C., Robin I. y Theisen L.A. (1989). "Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems". *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7597- 7607.
- [24] Nicolaus B., Panico A., Lama L., Romano I., Manca C., De Giulio A. y Gambacorta, A. (1999). "Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of hetero cystous cyanobacteria". *Phytochemistry* 52. 639-647.