

BARBARA PAWLIK-SKOWROŃSKA

*Instytut Ekologii PAN w Dziekanowie Leśnym  
Zakład Ekotoksykologii i Ekologii Mikroorganizmów  
Niecała 18, 20-080 Lublin  
e-mail: pawlik@golem.umcs.lublin.pl*

## TAJEMNICE ODPORNOŚCI GLONÓW I SINIC NA TOKSYCZNE METALE CIĘŻKIE

### WPROWADZENIE

Grupa pierwiastków o gęstości większej niż  $5 \text{ g/cm}^3$  jest określana jako „metale ciężkie”. Jakkolwiek termin ten jest nieprecyzyjny, ponieważ obejmuje szereg pierwiastków o różnych właściwościach chemicznych i biologicznych, jest powszechnie stosowany dla określenia toksycznych metali i metaloidów spotykanych jako zanieczyszczenia środowiska. Jednym z negatywnych skutków działania podwyższonych stężeń tej grupy pierwiastków (tj. As, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn etc.) w ekosystemach wodnych jest spadek różnorodności oraz zmiana struktury gatunkowej zbiorowisk organizmów fotosyntetyzujących, takich jak eukariotyczne glony (Photobionta) i sinice (Cyanophyta, Cyanobacteria), odpowiedzialnych za produkcję pierwotną (FOSTER 1982, TAKAMURA i współaut. 1989, GENTER i współaut. 1987). Czynniki środowiskowe takie jak odczyn, temperatura, zasolenie, zasobność w substancje odżywcze, etc., odgrywają również bardzo istotną rolę w strukturze gatunkowej zbiorowisk glonów eukariotycznych i sinic w wodach (KAWECKA i ELORANTA 1994). Jednakże obecność podwyższonych stężeń metali ciężkich w strumieniach zanieczyszczonych

kwaśnymi odpływami kopalnianymi, może mieć niekiedy znacznie większy wpływ na dystrybucję w nich glonów niż niskie pH (ROUSCH i SOMMERFELD 1999). Na przykład, wzrost dwóch gatunków zielenic z rodzaju *Ulothrix* był silniej ograniczony przez obecność wysokich stężeń Mn, niż przez kwaśny odczyn wody. Główną przyczyną spadku różnorodności gatunkowej mikroflory w środowiskach zanieczyszczonych metalami jest ich toksyczne działanie na poziomie subkomórkowym i organizmalnym, takie jak: zaburzenia procesu fotosyntezy, oddychania, aktywności enzymatycznej, dezintegracja błon komórkowych, zaburzenia równowagi jonowej, stres oksydacyjny oraz zahamowanie tempa wzrostu, które w efekcie prowadzą do ograniczonego rozwoju i śmierci wrażliwych organizmów. Zagadnienie toksyczności metali ciężkich w stosunku do glonów i sinic zostało przedstawione w wielu pracach przeglądowych (SKOWROŃSKI 1988, VYMAZAL 1986, PAWLIK-SKOWROŃSKA i SKOWROŃSKI 1996); jednakże wrażliwość glonów eukariotycznych i sinic na metale ciężkie nie jest jednakowa.

### MIĘDZY- I WEWNĄTRZGATUNKOWE RÓŻNICE W ODPORNOŚCI GLONÓW I SINIC NA METALE CIĘŻKIE

Już niewielkie stężenia metali ciężkich lub metaloidów w wodzie, takie np. jak  $1 \mu\text{M}$  Zn i

Cu,  $15 \text{ nM}$  As, w warunkach długotrwałego ich działania prowadzą do przebudowy flory glono-

wej i sinicowej strumieni, rzek i jezior (TAKAMURA i współaut. 1990a, GENTER i współaut. 1987, KANUER i współaut. 1999). Gatunki, które są bardziej wrażliwe znikają zupełnie z zanieczyszczonych siedlisk lub ich liczebność spada i w efekcie dominujące stają się inne, nieliczne gatunki, które są lepiej przystosowane (LEHMANN i współaut. 1999). Na przykład w rzece zanieczyszczonej zarówno miedzią (0,07–0,22 mg/l), jak i cynkiem (0,13–0,55 mg/l) występowało jedynie 5 gatunków sinic, 3 gatunki okrzemek i 2 gatunki zielenic, które były odporne na cynk i miedź (TAKAMURA i współaut. 1990a). Obserwowano dużą zmienność w odporności glonów na metale ciężkie zarówno w fitoplanktonie jak i peryfitonie ekosystemów wodnych (PAYNE i PRICE 1999, TAKAMURA i współaut. 1989), i tak np., wśród 87 gatunków słodkowodnych zielenic, 1 gatunek był odporny na miedź, 12 – na ołów i 8 na cynk (FOSTER 1982). Niektóre gatunki charakteryzują się odpornością tylko na jeden metal, natomiast inne mogą być odporne na kilka jednocześnie, np. odporny na podwyższone stężenia chromu szczep *Scenedesmus acutus* wykazywał również większą odporność na miedź niż szczep wrażliwy (MORSI ABD-EL-MONEM i współaut. 1998). Różnice w odporności występują pomiędzy gatunkami należącymi do odległych systematycznie grup, np. niektóre okrzemki (Bacillariophyceae) wykazywały 10-krotnie wyższą odporność na miedź niż bruzdnice (Dinophlagellatae) (PISTOCCHI i współaut. 2000), jak również należącymi do tego samego rodzaju, np. *Euglena mutabilis* wykazywała dwukrotnie większą odporność na kadm, nikiel i glin i 18-krotnie większą odporność na żelazo niż *Euglena gracilis*, podczas gdy *E. gracilis* wykazywała dwukrotnie większą odporność na Cu niż *E. mutabilis* (OLAVESON i NALEWAJKO 2000). Przy czym, oba te gatunki wykazywały jednakową odporność na zakwaszenie wód i na cynk. Różną odporność na metale wykazują również populacje tego samego gatunku, zaadaptowane do życia w siedliskach charakteryzujących się między innymi odmienną zawartością metali ciężkich; np. makroglon morski *Enteromorpha compressa*, zasiedlający wody przybrzeżne wzbogacone w Cu, był bardziej odporny na miedź niż ten sam gatunek zasiedlający wody nie zanieczyszczone (CORREA i współaut. 1996). Z kolei populacje nitkowatej, peryfitonowej zielenicy *Stigeoclonium tenue*, wykazywały różną odporność na cynk, w zależności od jego stężenia w siedlisku

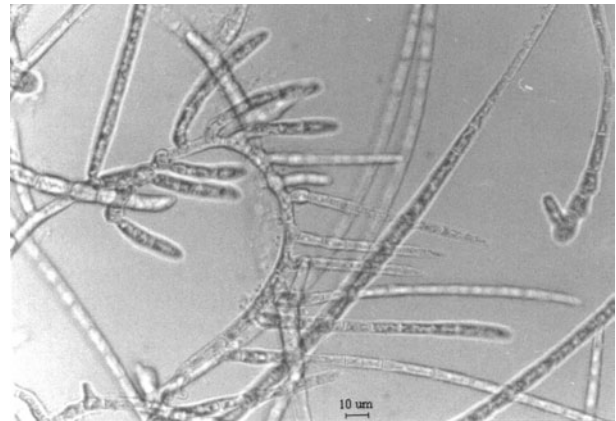
(HARDING i WHITON 1976, Pawlik-Skowrońska dane niepublikowane). Wśród dominujących glonów eukariotycznych w zanieczyszczonych wodach obserwowano występowanie, a nawet obfity rozwój, nierozgałęzionych, nitkowatych zielenic z rodziny Ulotrichales – np. *Ulothrix*, *Klebsormidium*, *Hormidium* i *Stichococcus* oraz rozgałęzionych, nitkowatych zielenic z rodziny Chaetophorales, takich jak *Stigeoclonium tenue*, *Stigeoclonium aestivale*, a także niektórych drobnych zielenic z rodzajów *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Chlamydocapsa*, *Oocystis*, *Scenedesmus* (MAC LEAN i BENSON-EVANS 1974; HARDING i WHITON 1976; KANUER i współaut. 1997, 1999; PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001). Wśród okrzemek wymienić można drobne gatunki z rodzajów *Achnanthes*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Suriella*, *Synedra*. (TAKAMURA i współaut. 1989, 1990a). Świadczyć to może o ich większej odporności na metale ciężkie niż innych gatunków. Co ciekawe, są to raczej gatunki szeroko rozpowszechnione, natomiast nie są typowe wyłącznie dla środowisk zanieczyszczonych. Na przykład różne populacje (ekotypy) *Stigeoclonium tenue* spotykane są zarówno w wodach czystych, jak i zanieczyszczonych metalami ciężkimi lub innymi substancjami mineralnymi (FRANCKE i RHEBERGEN 1982, PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001). Wskazuje to na znaczną plastyczność genotypową takich gatunków, stanowiącą podstawę ich zdolności adaptacyjnych.

W związku z faktem, że glony i sinice wykazują zróżnicowane reakcje na toksyczne metale, nasuwa się pytanie, jakie są uwarunkowania ich występowania w skażonych środowiskach i mechanizmy odporności istniejące u niektórych gatunków lub nawet niektórych tylko populacji (ekotypów). Pomimo wieloletniego zainteresowania tym problemem, nie zostały jak dotąd dostatecznie poznane mechanizmy leżące u podstaw obserwowanej w warunkach naturalnych zwiększonej odporności niektórych mikroorganizmów na chroniczne działanie toksycznych pierwiastków. Zjawisko to budzi stale rosnące zainteresowanie.

Bardzo nieliczne jednak doniesienia wskazują (HARDING i WHITON 1976, KELLY i WHITON 1989, KANUER i współaut. 1999), że np. zielenice pochodzące z wód charakteryzujących się wyższą zawartością metali ciężkich (ale także innymi zmiennymi ekologicznymi) wykazują wyższą odporność na metale.

Badania prowadzone z udziałem dwóch ekotypów, czyli populacji tego samego gatun-

ku *Stigeoclonium tenue* Kütz., pochodzących z wód o różnym stężeniu metali ciężkich wskazują, że ekotyp rozwijający się obficie w kanałach odprowadzających wody kopalniane z kopalni rud cynku i ołowiu (zawierające szereg metali ciężkich o bardzo zróżnicowanych stężeniach), jest zaadaptowany do chronicznego działania wysokich stężeń Zn ( $> 15 \mu\text{M}$ ) (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001). Stwierdzono również, że jest on zdolny do rozwoju i reprodukcji pomimo wysokiej, wewnątrzkomórkowej zawartości Zn, natomiast ekotyp *S. tenue* rosnący w wodach czystego jeziora w rezerwacie przyrody, jest bardzo wrażliwy i po krótkim czasie ekspozycji na podwyższone stężenia cynku lub ołowiu ulega zatruciu i obumiera (Pawlik-Skowrońska dane niepublikowane). Stwierdzono przy tym, że ekotyp odporny akumuluje wewnątrz komórek znacznie większe ilości zarówno cynku jak i ołowiu niż ekotyp wrażliwy, w takich samych warunkach środowiskowych. Badane ekotypy oprócz różnic fizjologicznych wykazują również różnice w morfologii części wzniesionej plech. Filamenty odpornego na cynk ekotypu *S. tenue* (Ryc.1) zbudowane są z komórek węższych i dłuższych niż filamenty ekotypu wrażliwego. Podobne zróżnicowanie fizjologiczne i morfologiczne



Ryc. 1. Pokrój morfologiczny filamentów w plechach tolerancyjnego na cynk ekotypu peryfitonowej zielenicy *Stigeoclonium tenue*.

wykazywały populacje gatunków *Stigeoclonium* zasiedlające wody o różnym zasoleniu (FRANCKE i CATE 1980). Świadczy to o dużej plastyczności genotypowej tych zielenic.

Występowanie danego gatunku lub ekotypu glonów w siedlisku skażonym metalami może być uwarunkowane małą biodostępnością metali pomimo ich wysokiego stężenia i/lub adaptacją organizmu opartą na wykształceniu odpowiednich mechanizmów biochemicznych i fizjologicznych.

#### BIODOSTĘPNOŚĆ METALI DLA MIKROORGANIZMÓW WODNYCH

Biodostępność metali zgodnie z definicją ekotoksykologiczną to ta część ogólnej puli metali w środowisku, która wnika do komórek i może wywołać efekty toksyczne (SPACIE i współaut. 1995). Jest ona modyfikowana przez czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. Czynniki te mogą zmieniać formę chemiczną metali, ich stężenie równowagowe w wodzie, oraz wpływać na procesy zaangażowane w transport jonów metali przez błonę cytoplazmatyczną i na stan fizjologiczny organizmu (SKOWROŃSKI 1988, PAWLIK-SKOWROŃSKA i SKOWROŃSKI 1996). Do głównych czynników zmieniających formę chemiczną metali należą: pH, ligandy kompleksujące np. chlorki i substancje humusowe oraz ligandy tworzące związki nierozpuszczalne z metalami ciężkimi, np. fosforany. Z kolei zawieszona w wodach materia cząsteczkowa (organiczna i nieorganiczna), poprzez procesy sorpcji powierzchniowej, obniża stężenie równowagowe metali w wodzie. Czynniki abiotyczne wpływające na stan fizjologiczny oraz procesy transportu

przez błony to temperatura, pH i natężenie światła fotosyntetycznie czynnego, od którego zależy stan metaboliczny mikroorganizmów fotosyntetyzujących. Przeżywalność glonów i sinic obserwowana w naturalnych warunkach może być więc w znacznym stopniu zależna od interakcji metali z czynnikami środowiskowymi, ograniczającymi dostępność i akumulację wewnątrzkomórkową metali. Świadczy o tym np. występowanie sinic, które należą do mikroorganizmów najbardziej wrażliwych na szereg metali ciężkich, w wodach o podwyższonym stężeniu Cu i o alkalicznym odczynie (pH ok. 8), przy którym następuje spadek stężenia metalu w formie kationowej, najbardziej dostępnej i toksycznej (TAKAMURA i współaut. 1990a). Z kolei, jak stwierdzono u kilku gatunków zielenic i sinic, kwaśne pH (5–6) sprzyja obniżeniu zarówno powierzchniowego wiązania, jak i wewnątrzkomórkowej akumulacji kationów metali, w wyniku ich kompetycji z protonami na powierzchni komórek (SKOWROŃSKI 1988, PAWLIK-SKOWROŃSKA i SKOW-

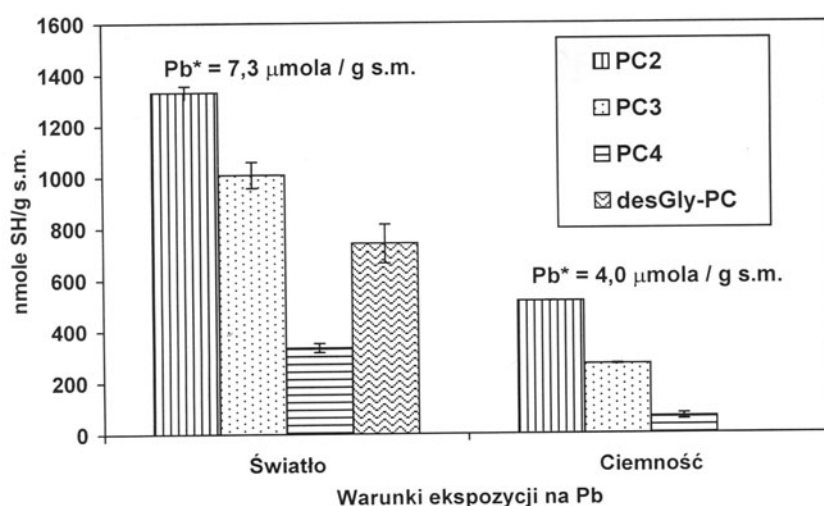


ROŃSKI 1996, FRANKLIN i współaut. 2000). Przyczyn, różne metale, mogą wchodzić w odmienne interakcje z tymi samymi czynnikami fizyko-chemicznymi środowiska, co dodatkowo komplikuje interpretację obserwowanych zjawisk.

Badając interakcje metali ciężkich z czynnikami abiotycznymi środowiska, które mogą być istotne dla przetrwania nitkowatych zielenic takich jak *Stichococcus bacillaris* i *Stigeoclonium tenue* w wodach o podwyższonym stężeniu ołowiu i cynku stwierdzono, że czynniki takie jak obecność materii zawieszanej w wodzie, wyraźnie kwaśny i alkaliczny odczyn wody, obecność substancji precypitujących lub kompleksujących (fosforany, cytryniany, chlorki), obecność kationów twardości wody (Ca, Mg) mogą znacznie ograniczać wnikanie nadmiernych ilości Zn i Pb do wnętrza komórek (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001, 2002). Stwierdzono także (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2000), że nawet w warunkach nieograniczonej dostępności Pb (tzn. w roztworach niekompleksujących, gdy większość stanowi forma kationowa metalu) i w warunkach optymalnego transportu przez błonę cytoplazmatyczną (na świetle, w temp. 23°C, przy pH 7), ponad 95 % ołowiu wiąże się w sposób odwracalny z powierzchnią komórek glonów, a jedynie kilka procent jest transportowane do wnętrza komórek.

Ze względu na złożoność środowiska wodnego, szereg czynników działających jednocześnie

wanie tych zmian stało się możliwe dzięki oznaczaniu poziomu indukowanych przez niektóre metale ciężkie i metaloidy, peptydów tiolowych – fitochelatyn. Peptydy te o strukturze  $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$ ,  $n=2-7$  (oraz 6 innych klas różniących się C- lub N-terminalnym aminokwasem) syntetyzowane są w komórkach roślin wyższych, eukariotycznych glonów i grzybów z glutationu (lub odpowiednich jego pochodnych) w odpowiedzi na nadmiar wnikających toksycznych metali i metaloidów (ZENK 1996). Ponieważ ich synteza uruchamiana jest po wniknięciu jonów metali do komórek przyjęto, że można je uznać za wskaźnik biodostępności metali dla glonów (SKOWROŃSKI i współaut. 1998). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2000, 2001), że zmianom dostępności oraz wewnątrzkomórkowej akumulacji cynku i ołowiu (zależnym od określonych warunków środowiskowych) w komórkach nitkowatych zielenic *S. bacillaris* i *S. tenue*, towarzyszył wzrost poziomu indukowanych peptydów o strukturze:  $(\gamma\text{GluCys})_n\text{Gly}$ ,  $n=2-4$  i  $(\gamma\text{GluCys})_n$ ,  $n=2-3$ , które były syntetyzowane w ciągu pierwszych kilkunastu godzin kontaktu z metalami. I tak np. aktywne pobieranie Pb przez komórki *S. bacillaris* zachodziło intensywniej na świetle niż w ciemności, ponieważ jest ono zależne od energii metabolicznej. Uwidoczniło się to w zwiększonej syntezie fitochelatyn w komórkach glonów (Ryc. 2), które pobrały na świetle więcej ołowiu niż w tych, które miały kontakt z ołowiem w ciemności (PAWLIK-SKOWROŃSKA



Ryc. 2. Poziom fitochelatyn syntetyzowanych w komórkach zielenicy *S. bacillaris* po ekspozycji na 10 μM Pb w różnych warunkach oświetlenia.

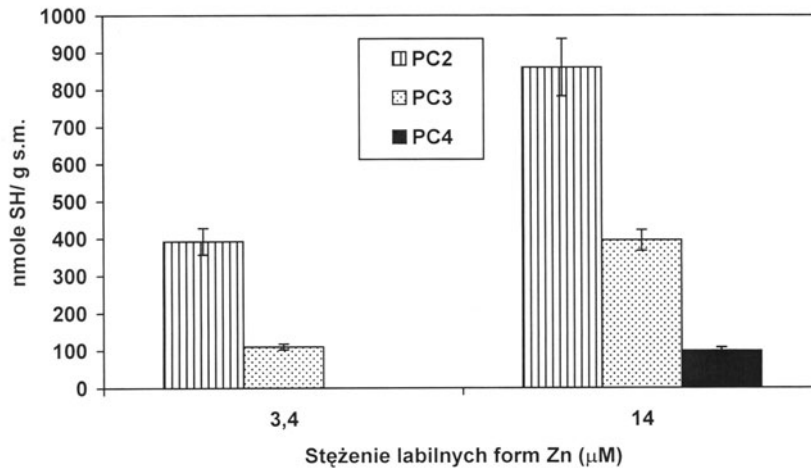
PC<sub>2-4</sub> – poszczególne oligomery fitochelatyn o wzorach  $(\gamma\text{Glu Cys})_{2-4}\text{Gly}$ ; desGly-PC – oligomery o wzorach  $(\gamma\text{Glu Cys})_{2-3}$ . \*Wewnątrzkomórkowe stężenie ołowiu po 24 godz. ekspozycji (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2000; dane zmodyfikowane).

powoduje, trudne do oszacowania w warunkach naturalnych, zmiany w dostępności toksycznych jonów metali dla komórek glonów. Zaobserwo-

2000). Z kolei inny czynnik, alkaliczny odczyn wody kopalnianej (pH 8,2), w istotny sposób obniżał stężenie labilnych form cynku i w ten spo-

sób ograniczał dostępność metalu dla komórek dwu różnych ekotypów peryfitonowej zielenicy *S. tenue*, co uwidaczniało się w postaci ograniczonego pobierania Zn i związanej z tym zmniejszonej syntezy fitochelatyn (Ryc. 3). Skutkiem

materia zawieszona okazała się bardzo istotnym czynnikiem ograniczającym dostępność metali ciężkich dla komórek glonów. Poziom peptydów tiolowych indukowanych pod wpływem metali ciężkich, których wnikanie do komórek



Ryc. 3. Zmiany w poziomie fitochelatyn syntetyzowanych w komórkach tolerancyjnej na cynk zielenicy *S. tenue* w zależności od stężenia labilnych form cynku w wodzie.

Czas ekspozycji 17 godz.; całkowite stężenie cynku wynosiło 15 µM; PC<sub>2-4</sub> – oligomery fitochelatyn o wzorach (γGlu Cys)<sub>2-4</sub> Gly (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001, dane zmodyfikowane).

ekspozycji glonów na cynk zawarty w wodzie o odczynie lekko kwaśnym (pH 6,8), przy którym stężenie labilnych (potencjalnie bardziej dostępnych) form metalu było 4-krotnie wyższe niż przy pH 8,2, była zwiększona ogólna synteza fitochelatyn, przy czym, wzrastał poziom poszczególnych oligomerów: PC<sub>2</sub> i PC<sub>3</sub> oraz pojawiały się cząsteczki o dłuższych łańcuchach PC<sub>4</sub>, co świadczy o wnikaniu do wnętrza komórek większych ilości metalu przy pH 6,8 niż przy pH 8,2. Jednakże dwa ekotypy *S. tenue* o różnej odporności, ekspozowane przez kilkanaście godzin na mieszaninę metali zawartą w wodzie kopalnianej (o naturalnym pH 8,2) produkowały podobne, niewielkie ilości fitochelatyn (ok. 0,6 µmola SH/g s.m.), co świadczy o niskiej dostępności metali w alkalicznej wodzie zawierającej między innymi znaczne stężenie wapnia i zawiesinę organiczno-mineralną (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001). Szczególnie w wodzie o alkalicznym odczynie,

glonów było w istotny sposób uzależnione od czynników abiotycznych środowiska, okazał się dobrym narzędziem służącym wyjaśnianiu skomplikowanych interakcji zachodzących w naturalnym środowisku. Rolę peptydów tiolowych w odporności glonów na metale przedstawiono w dalszej części artykułu.

Podsumowując rozważania o znaczeniu dostępności metali ciężkich dla zdolności przetrwania mikroorganizmów w skażonych siedliskach należy podkreślić, że im mniejsza dostępność metali w siedlisku, tym więcej gatunków ma szansę przeżycia. Jednakże dla uzyskania tolerancji na podwyższoną akumulację wewnątrzkomórkową metali muszą istnieć również specyficzne cechy biochemiczne i fizjologiczne organizmu, umożliwiające przystosowanie do życia w niesprzyjających warunkach.

#### MECHANIZMY BIOCHEMICZNE I FIZJOLOGICZNE ZWIĄZANE Z ODPORNOŚCIĄ GLONÓW I SINIC NA METALE CIĘŻKIE

Zgodnie z propozycją LEVITTA (1980), odporność na dostępne w nadmiarze pierwiastki może się opierać na unikaniu (tj. usuwaniu pierwiastka z organizmu lub niedopuszczaniu do jego pobrania) oraz na tolerancji, tzn. na zdolności do przetrwania, wzrostu i rozmnażania organizmu, pomimo znacznej ilości metalu w komórkach. Utrzymująca się przez kilka

lat odporność na metale u glonów eukariotycznych hodowanych w warunkach laboratoryjnych w podłożach bez nadmiernych stężeń metali (TAKAMURA i współaut. 1990b) świadczy o genetycznej stabilności tego zjawiska. W przypadku sinic cecha odporności nie jest tak stabilna i istnieją przypuszczenia co do plazmidowej jej kontroli (OLAFSON 1986).

## STRATEGIA UNIKANIA

Nieliczne doniesienia dotyczące odporności u glonów opisują głównie mechanizmy związane ze strategią unikania. Są to: (i) wiązanie większości metalu ze ścianą komórkową (SKOWROŃSKI 1984, XUE i współaut. 1988). Zjawisko to nie wydaje się jednak być wystarczające do wywołania tolerancji na zakumulowane wewnątrzkomórkowo metale takie jak Cd, Cu, Pb (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2000, MACFIE i WELBOURN 2000), ponieważ ilościowo przeważający proces wiązania powierzchniowego metalu występuje powszechnie również u organizmów wrażliwych; (ii) pozakomórkowe wydzielanie organicznych substancji kompleksujących metale, które mogą zmniejszać możliwość penetracji jonów metali przez plazmalemę, jak opisano u zielenic *Chlamydomonas reinhardtii* (MACFIE i WELBOURN 2000) i *Oocystis pussila* (MADOR i współaut. 1998); (iii) adaptacyjna regulacja systemu pobierania miedzi, zapobiegająca nadmiernemu wnikanu pierwiastka przy wzroście stężenia zewnętrznego, zaobserwowana u *Scenedesmus bijuga* (FAHTY i FALKNER 1997); (iv) obniżone powinowactwo permeaz błonowych do jonów Cd, prowadzące do obniżenia pobierania metalu, obserwowane u odpornych euglenin oraz zmniejszony aktywny transport Cd, Zn, Cu i Ni u mutantu *Chlamydomonas reinhardtii* (COLLARD i MATAGNE 1994); (v) zmniejszone wnikanie kationów metali (Al, Cd, Cu, La, Ni) dzięki dodatniemu potencjałowi zeta błony cytoplazmatycznej, związanemu z efektywnym usuwaniem protonów z cytoplazmy, np. za pomocą superaktywnych ATP-az błonowych u gatunków kwasolubnych, takich jak *Dunaliella acidophila* i *Chlorella vulgaris* (GIMMLER i współaut. 1991, RAI i współaut. 1994); (vi) usuwanie metalu z komórek w postaci jonów lub kompleksów organicznych, co obserwowano u zielenic *Scenedesmus acutus* f. *alterans* (NALEWAJKO i współaut. 1997) i sinicy *Anabaena doliolum* (RAI i współaut. 1991).

Można przypuszczać, że w zjawisku odporności oraz bardziej wąsko pojętej tolerancji na metale ciężkie u glonów i sinic, uczestniczy kilka mechanizmów działających jednocześnie. Na przykład w przypadku odpornych na arsen mutantów *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzono, że mechanizm odporności może polegać na zmniejszonym pobieraniu, wewnątrzkomórkowej detoksykacji w wyniku

transformacji As do form mniej toksycznych (np. metylowanie, połączenia ze związkami lipidowymi) oraz usuwaniu z komórek (FUJIWARA i współaut. 2000, NISSEN i BENSON 1982).

## TOLERANCJA NA WYSOKIE, WEWNĄTRZKOMÓRKOWE STĘŻENIA METALI

Tolerancja na zakumulowane w nadmiarze metale ciężkie w komórkach wydaje się być związana z efektywnymi mechanizmami detoksykacyjnymi. Wśród nich wyróżnić można mechanizmy konstytucjonalne (które funkcjonują we wszystkich fenotypach zarówno odpornych jak i wrażliwych) oraz adaptacyjne, charakterystyczne tylko dla fenotypów tolerancyjnych (MEHARG 1994).

## Detoksykacja z udziałem ligandów wiążących metale wewnątrz komórek

Wśród konstytucjonalnych mechanizmów obronnych istotną rolę odgrywa wiązanie metali przez wewnątrzkomórkowe ligandy peptydowe i białkowe. W komórkach prokariotycznych sinic, toksyczne metale wiązane są przez białka typu metaloprotein (OLAFSON 1986) oraz w granulach polifosforanowych (RACHLIN i współaut. 1985). W komórkach glonów eukariotycznych pierwszą linię obrony przed nadmiarem metali ciężkich, toksycznie działających na szereg procesów metabolicznych, stanowią przede wszystkim niebiałkowe związki tiolowe, t.j. glutation (GSH) oraz fitochelatyny (PC), syntetyzowane z niego przez konstytucyjny enzym syntazę fitochelatynową (GRILL i współaut. 1989). Zarówno GSH, jak i fitochelatyny tworzą stabilne kompleksy przy pH charakterystycznym dla cytoplazmy, jednakże fitochelatyny zawierające od 2 do 7 grup -SH cysteiny w cząsteczce, mają większą pojemność kompleksującą metale niż glutation (ZENK 1996). Glony należące do różnych grup systematycznych mogą różnić się ilością, jak również wielkością polimerów fitochelatyn syntetyzowanych w odpowiedzi na szereg metali ciężkich (GEKELER i współaut. 1988). U szeroko rozpowszechnionej zielenicy *S. bacillaris*, oprócz fitochelatyn o strukturze  $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{Gly}$ ,  $n=2-4$  ( $\text{PC}_{2-4}$ ) stwierdzono również indukcję syntezy peptydów tiolowych o strukturze  $(\gamma\text{Glu-Cys})_n$ ,  $n=2-3$  (PAWLIK-SKOW-



ROŃSKA 2000, 2002). Kompleksowanie toksycznego metalu, jakim jest ołów, przez indukowane peptydy tiolowe może być efektywnym procesem obronnym, jedynie przy niskich jego stężeniach wewnątrzkomórkowych i wolnym tempie akumulacji. Jak zaobserwowano u *S. bacillaris* (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2000) jedynie przy stężeniu zewnętrznym 0,1  $\mu\text{M}$  Pb, stosunek stężenia grup tiolowych do stężenia ołowiu był równy 2 i każda cząsteczka  $\text{PC}_2$  wiązała jeden jon Pb. Jednakże już po 8 godz. ekspozycji na 2,5  $\mu\text{M}$  Pb lub po 2 godz. ekspozycji na 20  $\mu\text{M}$  Pb w wodzie, wewnątrzkomórkowe stężenie metalu przeważało nad stężeniem indukowanych peptydów tiolowych i pomimo wzmożonej syntezy GSH oraz indukowanych tioli, obserwowano efekty toksyczne w postaci spadku zawartości chlorofilu i zaburzeń wzrostu populacji (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2002). Również w dwu ekotypach nitkowatej, peryfitonowej zielenicy *Stigeoclonium tenue*, zasiedlających wody o różnym stężeniu metali ciężkich, w odpowiedzi na wysokie stężenia cynku, kadmu, ołowiu oraz na ich mieszaninę obecną w wodach pokopalnianych, jako pierwsza linia obrony następowała głównie synteza fitochelatyn  $\text{PC}_{2-4}$  (PAWLIK-SKOWROŃSKA 2001). Obserwowano również niewielką produkcję pewnych niezidentyfikowanych peptydów tiolowych, które stanowiły 10–20% ogólnej puli peptydów tiolowych indukowanych w odpowiedzi na podwyższone stężenia cynku i ołowiu. Jednakże w czasie długotrwałej ekspozycji (nawet do 6 tyg.) na wysokie stężenia cynku, którą przeżywał jedynie ekotyp odporny, w jego komórkach następowała bardzo wzmożona synteza tych, różnych od fitochelatyn, peptydów tiolowych. W wyniku szczegółowych analiz chromatograficznych i spektrometrii masowej stwierdzono, że są to pochodne fitochelatyn wzbogacone o jedną resztę cysteinową w cząsteczce, a więc charakteryzujące się potencjalnie większą pojemnością kompleksującą niż typowe fitochelatyny (PAWLIK-SKOWROŃSKA – w druku). Ich stężenie w komórkach odpornego na cynk ekotypu *S. tenue*, występującego obficie w kanałach odprowadzających wody pokopalniane z zakładów przeróbki rud cynkowo-ołowiowych, było 6-krotnie wyższe niż stężenie fitochelatyn. Jednocześnie ekotyp odporny na cynk był zdolny do akumulacji znacznie większych ilości zarówno cynku, jak i ołowiu niż ekotyp wrażliwy, w takich samych warunkach ekspozycji na metale (Pawlik-Skowrońska

dane niepublikowane). Ekotyp odporny, zdolny do wzrostu i reprodukcji przy stężeniach większych niż 15  $\mu\text{M}$  Zn, okazał się więc ekotypem tolerancyjnym na cynk, a zdolność do produkcji związków o większej pojemności wiążącej niż zwykle syntetyzowane fitochelatyny jest szczególnym mechanizmem jego adaptacji do wysokich stężeń metalu wewnątrz komórek.

#### Rola wakuoli w detoksykacji metali

Innym mechanizmem detoksykacji, sprzyjającym tolerancji glonów eukariotycznych na metale ciężkie, mogłaby być kompartmentacja metali w wakuolach. Jak stwierdzono w krótkotrwałych eksperymentach, u *Chara corallina* cynk jest szybko przenoszony z cytoplazmy do wakuoli (REID i współaut. 1996). Jednakże pomimo to, glon ten był wrażliwy na podwyższone stężenia cynku (10  $\mu\text{M}$ ) i jego wzrost uległ zahamowaniu. Los metali w wakuolach glonów nie jest znany, chociaż analogicznie do roślin wyższych można by przypuszczać, że są one wiązane przez organiczne ligandy, takie jak kwasy organiczne (RAUSER 1999). Istnieje również hipoteza, że w przenoszeniu nadmiaru metali z cytoplazmy do wakuoli uczestniczą fitochelatyny tworzące kompleksy z metalami. W przypadku glonów przemawiać mogłoby za tym doniesienie wskazujące, że Cd w wakuolach zielenicy *Dunaliella bioculata* był związany z siarką (HEUILLET i współaut. 1986). Z kolei, w wakuolach innej zielenicy *Chlorella fusca* występowały granule polifosforanowe, w których identyfikowano obecność Cu, Zn, Fe i Al (WONG i współaut. 1994). Jednakże ten sposób nie był również wystarczającym mechanizmem detoksykacji, ponieważ chloroplasty komórek glonu wykazywały symptomy silnego uszkodzenia. Również u *Stigeoclonium* stwierdzono gromadzenie się ołowiu w peryferyjnych wakuolach (SILVERBERG 1975). W przypadku glonów, nieliczne jak dotąd doniesienia nie dają podstaw do stwierdzenia, że gromadzenie metali w wakuolach jest efektywnym mechanizmem detoksykacji i tolerancji na metale ciężkie. Potwierdziły to badania przeprowadzone z udziałem dwóch ekotypów *S. tenue* o różnej tolerancji na cynk. Stosując nową metodę cytochemiczną stwierdzono (Pawlik-Skowrońska, dane niepublikowane), że dwa ekotypy o różnej tolerancji gromadzą cynk w wakuolach, jednakże ekotyp tolerancyjny, któ-

ry ma zdolność do produkcji dużych ilości specyficznych peptydów tiolowych w wyższej pojemności wiążącej niż fitochelatyny, rośnie i rozwija się, podczas gdy ekotyp wrażliwy obumiera w obecności podwyższonych stężeń cynku.

#### Transformacja wewnątrzkomórkowa metali

Mikroorganizmy są zdolne do chemicznej transformacji niektórych metali ciężkich w wyniku procesów utleniania, redukcji, alkilacji i dealkilacji. Istnieją sugestie (WOOD i WANG 1983), że przemiany te, zachodzące w komórkach, są odpowiedzialne za odporność na metale. Nieliczne doniesienia dotyczą transformacji w komórkach glonów, np. u odpornej na rtęć zielenicy *Chlorella sp.* stwierdzono enzymatyczna redukcję i ulatnianie rtęci (DE FILIPPIS i PALLAGHY 1976), a u odpornej na arsen *Chlorella vulgaris* – metylację i usuwanie arsenu z komórek (MAEDA i współaut. 1992). W komórkach *Ankistrodesmus falcatus* obserwowano debutyłację lub demetylację organicznych związków cyny i ołowiu (MAGUIRE i współaut. 1984). Istnieją również dane (WONG i współaut. 1997; PAWLIK-SKOWROŃSKA i współaut. 1997, 1998) wskazujące, że organiczne związki takich metali ciężkich jak Sn, Pb, As są bardziej toksyczne w stosunku do glonów niż ich formy nieorganiczne, a więc przemiany wewnątrzkomórkowe metali do form mniej toksycznych mogłyby zwiększać odporność organizmu na ich działanie.

Wydaje się, że dla wystąpienia tolerancji na metale ciężkie, oprócz funkcjonowania konstytucjonalnych mechanizmów służących przede wszystkim utrzymaniu homeostazy pierwiast-

ków istotnych dla metabolizmu (np. szybka i precyzyjna regulacja syntezy glutationu i fitochelatyn oraz gromadzenie metali w wakuolach), niezbędne jest także istnienie specyficznych, efektywnych mechanizmów do zwalczania aktywności nadmiernych stężeń metali (zarówno tych istotnych dla metabolizmu, jak i zbędnych).

Podsumowując należy podkreślić, że występowanie i rozwój glonów eukariotycznych i sinic w różnorodnych wodach zanieczyszczonych metalami wydają się więc być uwarunkowane istnieniem i współdziałaniem kilku następujących czynników: (i) ograniczoną biodostępnością najbardziej toksycznych form (zwykle kationowych) w wyniku szeregu interakcji metali z czynnikami środowiskowymi; (ii) ograniczoną akumulacją wewnątrzkomórkową spowodowaną funkcjonowaniem mechanizmów unikania; (iii) funkcjonowaniem konstytucjonalnych (obecnych u większości fenotypów) mechanizmów obronnych polegających na wewnątrzkomórkowej detoksykacji; (iv) funkcjonowaniem adaptacyjnych (obecnych tylko u fenotypów tolerancyjnych) mechanizmów służących ograniczaniu dostępu nadmiernych stężeń pobranych metali do miejsc metabolicznie aktywnych, jak np. inna lub bardziej wzmożona aktywność enzymatyczna, prowadząca do bardziej efektywnej obrony, której nie posiadają populacje wrażliwe. Dzięki temu, w siedliskach charakteryzujących się obecnością czynnika selekcyjnego jakim jest nadmiar metali ciężkich, np. w wodach kopalnianych, zanieczyszczonych rzekach i jeziorach, obserwować można populacje mikroorganizmów o szczególnych cechach, które umożliwiają im sukces w nieprzychylnych warunkach.

## MYSTERY OF ALGAL RESISTANCE TO HEAVY METALS

### S u m m a r y

It is known that heavy metal pollution in aquatic environments causes significant changes in algal diversity and community structure. Some species or only some populations are able, however, to survive in the presence of elevated metal concentrations. The observed algal resistance to toxic metals seems to be dependent on a range of factors limiting toxic metal bioavailability, but mainly on intrinsic features of the organisms. Many

different mechanisms of metal resistance were reported, however, the phenomenon is still not fully understood, because it seems to be both species/ecotype and metal-dependent. The author of the article tries to make some progress in explaining of the mechanisms of algal survival and adaptation to environments of high metal concentrations, by studying production with thiol peptides in different ecotypes.



## LITERATURA

- COLLARD J. M., MATAGNE R. F., 1994. *Cd<sup>2+</sup> resistance in wild-type and mutant strains of Chlamydomonas reinhardtii*. Env. Exp. Bot. 34, 235–244.
- CORREA J. A., GONZALES P., SANCHEZ P., MUNOZ J., ORELLANA M. C., 1996. *Copper-algae interactions: inheritance or adaptation?* Env. Mon. Assess. 40, 41–54.
- DE FILIPPIS L. F., PALLAGHY C. K., 1976. *The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on Chlorella. III. Development and possible mechanisms of resistance to metals*. Z. Pflanzenphysiol. 79, 323–335.
- FATHY A. A., FALKNER G., 1997. *Adaptation to elevation of the concentration of the trace element copper during growth of Scenedesmus bijuga is reflected in the properties of the copper uptake system*. J. Trace Microb. Techn. 15, 321–333.
- FOSTER P. L., 1982. *Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals*. Freshwat. Biol. 12, 17–19.
- FRANCKE J. A., CATE H. J., 1980. *Ecotypic differentiation in response to nutritional factors in the algal genus Stigeoclonium Kütz. (Chlorophyceae)*. Br. phycol. J. 15, 343–355.
- FRANCKE J. A., RHEBERGEN L. J., 1982. *Euryhaline ecotypes in some species of Stigeoclonium Kütz.* Br. phycol. J. 17, 135–145.
- 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. Toxic. 48, 275–289.
- FUJIWARA S., KOBAYASHI I., HOSHINO S., KAISE T., KHIMOGAWARA K., USUDA H., TSUZUKI M., 2000. *Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol. 41, 77–83.
- 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.
- GENTER R. B., CHERRY D. S., SMITH E. P., CAIRNS J., Jr., 1987. *Algal – periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms*. Hyrobiol. 153, 261–275.
- GIMMLER H., TREFFNY B., KOWALSKI M., ZIMMERMANN U., 1991. *The resistance of Dunaliella acidophila against heavy metals: the importance of the zeta potential*. J. Plant Physiol. 138, 708–716.
- GRILL E., WINNACKER E.-L., ZENK M. H., 1989. *Phytochelatins the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatins synthase)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6838–6842.
- HARDING J. P. C., WHITTON B. A., 1976. *Resistance to zinc of Stigeoclonium tenue in the field and the laboratory*. Br. phycol. J. 11, 417–426.
- HEUILLET H., MOREAU A., HALPERN S., JEANNE N., PUISSEUX-DAO S., 1986. *Cadmium-binding to a thiol molecule in vacuoles of Dunaliella bioculata contaminated with CdCl<sub>2</sub>: electron probe microanalysis*. Biol. Cell. 58, 79–86.
- KAWECKA B., ELORANTA P. V., 1994. *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- KELLY M. G., WHITTON B. A., 1989. *Relationship between accumulation and toxicity of zinc in Stigeoclonium (Chaetophorales, Chlorophyta)*. Phycol. 28, 512–517.
- KNAUER K., BEHRA R., SIGG L., 1997. *Effects of free Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions on growth and metal accumulation in freshwater algae*. Envir. Toxic. Chem. 16, 220–229.
- KNAUER K., BEHRA R., HEMOND H., 1999. *Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient*. Aquat. Toxic. 46, 221–230.
- LEHMANN V., TUBBING G. M. J., ADMIRAAL 1999. *Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads*. Arch. Env. Contam. Toxic. 36, 384–391.
- LEVITT J., 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Tom 1, Academic Press: New York.
- 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. Env. Contam. Toxic. 39, 413–419.
- MAEDA S., KUSADOME K., ARIMA H., OHKI A., NAKA K., 1992. *Biomethylation of arsenic and its excretion by the alga Chlorella vulgaris*. Appl. Organom. Chem. 6, 407–413.
- MAGUIRE R. J., WONG P. T. S., RHAMEY J. S., 1984. *Accumulation and metabolism of tri-n-butyltin cation by a green alga Ankistrodesmus falcatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41, 537–540.
- MCLEAN R. O., BENSON - EVANS K., 1974. *The distribution of Stigeoclonium tenue Kütz. in south Wales in relation to its use as an indicator of organic pollution*. Br. phycol. J. 9, 83–89.
- MADOR J. P., SIBLEY T. H., SWARTZMAN G. L., TAUB F. B., 1998. *Copper tolerance by the freshwater algal species Oocystis pusilla and its ability to alter free-ions copper*. Aquat. Toxic. 44, 69–82.
- MEHARG A. A., 1994. *Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment*. Plant, Cell and Env. 17, 989–993.
- 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*. Env. Exp. Bot. 40, 59–66.
- NALEWAJKO C., COLMAN B., OLAVESON M., 1997. *Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three Scenedesmus strains*. Env. Exp. Bot. 37, 153–160.
- NISSEN P., BENSON A. A., 1982. *Arsenic metabolism in freshwater and terrestrial plants*. Physiol. Plant. 54, 446–450.
- OLAFSON R. W., 1986. *Physiological and chemical characterization of cyanobacterial metallothioneins*. Env. Health Persp. 65, 71–75.

- OLAVESON M. M., NALEWAJKO C., 2000. *Effects of acidity on the growth of two Euglena species*. Hydrobiol 433, 39–56.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., 2000. *Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga Stichococcus bacillaris*. Aquat. Toxic. 50, 221–230.
- 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. Toxic. 52, 241–249.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., 2002. *Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga Stichococcus bacillaris*. Env. Poll. 119, 119–127.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., *When adapted to high zinc concentrations the periphytic green alga Stigeoclonium tenue produces high amounts of novel phytochelatin-related peptides*. Aquat. Toxic. (w druku).
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., SKOWROŃSKI T., 1996. *Sinice i ich interakcje z metalami ciężkimi*. Wiad. Bot. 40, 17–30.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., KACZOROWSKA R., SKOWROŃSKI T., 1997. *The impact of inorganic tin on the planktonic cyanobacterium Synechocystis aquatilis: the effect of pH and humic acid*. Env. Poll. 97, 65–69.
- PAWLIK-SKOWROŃSKA B., KACZOROWSKA R., SKOWROŃSKI T., 1998. *The impact of some organotins on the unicellular cyanobacterium Synechocystis aquatilis*. Oceanol. Stud. 1, 79–90.
- PAYNE C. D., PRICE N. M., 1999. *Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton*. J. Phycol. 35, 93–302.
- 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, 469–477.
- RACHLIN J. W., JENSEN T. E., WARKENTINE B., 1985. *Morphometric analysis of the response of Anabaena flos-aquae and Anabaena variabilis (Cyanophyceae) to selected concentrations of zinc*. Arch. Env. Contam. Toxic. 13, 143–151.
- RAI L. C., MALLICK N., SINGH J. B., KUMAR H. D., 1991. *Physiological and biochemical characteristics of a copper tolerant and a wild type strain of Anabaena doliolum under copper stress*. J. Plant Physiol. 138, 68–74.
- RAI P. K., MALLICK N., RAI L. C., 1994. *Effect of nickel on certain physiological and biochemical behaviours of an acid tolerant Chlorella vulgaris*. BioMetals 7, 193–200.
- RAUSER W. E., 1999. *Structure and function of metal chelators produced by plants*. Cell Biochem. Biophys. 31, 19–48.
- REID R. J., BROOKES J. D., TESTER M. A., SMITH F. A., 1996. *The mechanism of zinc uptake in plants*. Planta 198, 39–45.
- ROUSCH J. M., SOMMERFELD M. R., 1999. *Effect of manganese and nickel on growth of selected algae in pH buffered medium*. Wat. Res. 33, 2448–2454.
- SILVERBERG B. A., 1975. *Ultrastructural localization of lead in Stigeoclonium tenue (Chlorophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis*. Phycol. 14, 265–274.
- SKOWROŃSKI T., 1984. *Uptake of cadmium by Stichococcus bacillaris*. Chemosphere 13, 1385–1389.
- SKOWROŃSKI T., 1988. *Wpływ kadmu na glony jednokomórkowe*. Post. Mikrob. XXVII, 77–94.
- SKOWROŃSKI T., DE KNECHT J. A., SIMONS J., VERKLEIJ J. A. C., 1998. *Phytochelatin synthesis in response to cadmium uptake in Vaucheria (Xanthophyceae)*. Eur. J. Phycol. 33, 87–91.
- SPACIE A., MCCARTY L. S., RAND G. M., 1995. *Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems*. [W:] *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. RAND G. M. (red.). Taylor and Francis, Washington, 493–521.
- TAKAMURA N., KASAI F., WATANABE M. M., 1989. *Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae*. J. Appl. Phycol. 1, 39–52.
- TAKAMURA N., HATAKEYAMA S., SUGAYA Y., 1990a. *Seasonal changes in species composition and production of periphyton in a urban river running through an abandoned copper mining region*. Jpn. J. Limnol. 51, 225–235.
- TAKAMURA N., KASAI F., WATANABE M. M., 1990b. *Unique response of Cyanophyceae to copper*. J. App. Phycol. 2, 293–296.
- VYMAZAL J., 1986. *Occurrence and chemistry of zinc in freshwaters – its toxicity and bioaccumulation with respect to algae: a review. II. Toxicity and bioaccumulation with respect to algae*. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 14, 83–102.
- WONG S. L., NAKAMOTO L., WAINWRIGHT J. F., 1994. *Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters*. J. App. Phycol. 6, 405–414.
- WONG S. L., NAKAMOTO L., WAINWRIGHT J. F., 1997. *Detection of toxic organometallic complexes in wastewaters using algal assays*. Arch. Env. Contam. Toxic. 32, 358–366.
- WOOD J. M., WANG H. K., 1983. *Microbial resistance to heavy metals*. Env. Sci. Technol. 17, 583–590.
- XUE H. B., STUMM W., SIGG L., 1988. *The binding of heavy metals to algal surfaces*. Wat. Res. 22, 97–926.
- ZENK M. H., 1996. *Heavy metal detoxification in higher plants: a review*. Gene 179, 21–30.