

ÉTUDE DE LA BIOSORPTION DU CUIVRE ET DU PLOMB PAR L'ALGUE VERTE UNICELLULAIRE *CHLAMYDOMONAS* *REINHARDTII*

Roula Flouty^{1,2}, Gaby Khalaf^{1,2} et Elie Najjar²

¹Université Libanaise, faculté des sciences, département de chimie, Fanar, Liban

² Conseil National de la Recherche Scientifique, Centre National des Sciences Marines,
Jounieh, Liban
rflouty@ul.edu.lb

(Received 11 April 2014 - Accepted 2 July 2014)

RÉSUMÉ

La biosorption impliquant la biomasse algale est l'une des nouvelles méthodes développées en bioremédiation, très prometteuse pour l'enlèvement des métaux des milieux aquatiques. Dans ce travail, la performance des cellules algales inertes de Chlamydomonas reinhardtii dans la biosorption des ions métalliques est évaluée dans des systèmes monométalliques simples et binaires contenant du cuivre et du plomb. Les expériences ont été effectuées dans des solutions contenant $5 \times 10^{-7} M$ d'ions métalliques libres à $30^{\circ} C$ et pH 6. La concentration du métal compétiteur variait de $5 \times 10^{-7} M$ à $10^{-6} M$. La concentration de la biomasse algale était de $0,2 g.L^{-1}$. Les résultats obtenus ont montré que la biomasse algale avait une plus grande capacité de biosorption et une plus grande affinité pour les ions Pb (II) que pour les ions Cu (II). A 65 min, la capacité de biosorption des cellules pour Pb (II) ($0,286 mg/g$) était deux fois plus élevée que celle obtenue pour Cu (II) ($0,109 mg/g$). D'autre part, aucun effet compétitif n'a été observé pour la biosorption du cuivre et du plomb par les cellules d'algues inertes en mélanges binaires. Ceci indique que les sites d'adsorption du cuivre et du plomb à la surface de la biomasse sont indépendants. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires afin d'améliorer la capacité de piégeage des métaux par les espèces algales, les résultats obtenus sont très prometteurs en tant que point de départ pour une utilisation potentielle de ces microorganismes dans le biotraitement des milieux aquatiques.

Mots-clés: biosorption, biomasse algale, plomb, cuivre, *Chlamydomonas reinhardtii*

ABSTRACT

Biosorption involving algal biomass is one of the new methods developed in bioremediation, very promising for the removal of metals from aquatic environments. In this work, the performance of inert algal cells Chlamydomonas reinhardtii in the biosorption of metal ions is evaluated in simple monometallic and binary systems containing copper and lead. The experiments were performed in solutions containing $5 \times 10^{-7} M$ of free metal ions at pH 6 and $30^{\circ} C$. The concentration of the metal competitor varied from $5 \times 10^{-7} M$ to $10^{-6} M$. The concentration of algal biomass was $0.2 g.L^{-1}$. Under studied conditions, dead cells showed

higher affinity for Pb (II) compared to Cu (II). At 65 minutes, the ability of cells for biosorption of Pb (II) (0.286 mg/g) was twice as high as that obtained for Cu (II) ions (0.109 mg/g). On the other hand, no competitive effect was observed for the biosorption of copper and lead by inert algal cells in binary metal systems. It seemed thus, that the adsorption sites for copper and lead on the surface of biomass were independent. Although further studies are needed to improve the trapping capacity of metals by algal cells, the results are very promising as a starting point for a potential application of these microorganisms in the bioremediation of aquatic environments.

Keywords: biosorption, algal biomass, lead, copper, *Chlamydomonas reinhardtii*

INTRODUCTION

La présence des métaux lourds dans les milieux aquatiques est devenue un problème majeur en raison de leurs effets nocifs sur la santé humaine, sur la faune ainsi que sur la flore. Les ions métalliques sont non biodégradables et se caractérisent par une grande persistance dans l'environnement. Même à l'état de traces, ces ions sont nocifs pour les organismes vivants (Buffle *et al.*, 2000; Malik, 2004). Du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, les métaux sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement. C'est pourquoi l'étude de leur mobilité et de leur transfert dans les différents compartiments de l'environnement est de première importance (Debelius *et al.*, 2009). Plusieurs méthodes physicochimiques ont été développées pour l'élimination des métaux lourds des milieux aquatiques (Gupta & Rastogi, 2008). Toutefois, ces méthodes sont souvent inefficaces et/ou coûteuses en particulier pour l'élimination des métaux lourds à des faibles concentrations (niveau ppm) (Qaiser *et al.*, 2009). En outre, la plupart de ces techniques reposent sur des processus physiques ou chimiques générant des produits secondaires comme les boues toxiques, créant par suite un nouveau problème environnemental. Le besoin des méthodes peu coûteuses et efficaces adaptées pour l'élimination des métaux lourds des eaux usées a suscité un intérêt dans l'étude des processus de biosorption (Chojnacka, 2010; Rehman *et al.*, 2006). L'utilisation du matériel biologique, y compris les micro-organismes vivants et non vivants, pour enlever et éventuellement récupérer les métaux toxiques ou les métaux précieux des eaux usées industrielles, a acquis une crédibilité importante au cours de ces dernières années, en raison de la performance parfaite et du faible coût de ces biomatériaux (Yuan *et al.*, 2009). Les gros avantages de ces méthodes sont les faibles coûts d'exploitation, la réduction du volume de produits chimiques et /ou de boues biologiques et le rendement élevé, même dans le cas d'effluents très dilués (Kaduková & Virčíková, 2005). Outre les polluants organiques, la biotechnologie a servi depuis toujours à l'élimination de la pollution métallique qui est l'un des problèmes environnementaux les plus importants de nos jours. Or, parmi les différentes biotechnologies, la biosorption peut être considérée comme une méthode alternative qui utilise divers matériaux naturels d'origine biologique. Les recherches sur la biosorption sont donc devenues un champ actif pour les stratégies d'élimination des ions métalliques ou des composés organiques. Un grand nombre de matériaux a été identifié comme biosorbants pour l'élimination des métaux de l'environnement. Les biosorbants testés peuvent être essentiellement classés dans la catégorie suivante: les bactéries, les champignons, les levures, les algues, les déchets industriels, les déchets agricoles (Wang & Chen, 2009). Ces biosorbants possèdent des propriétés de séquestration des métaux et peuvent par suite être utilisés pour diminuer la concentration des ions métalliques en solution du niveau ppm au niveau ppb. Les algues sont parmi les matériaux biosorbants qui sont facilement disponibles.

Elles sont produites en quantités abondantes dans la nature et constituent une source de biomasse peu coûteuse (Wang & Chen, 2009). Le processus de biosorption implique des interactions entre les ions métalliques toxiques et la biomasse (Chojnacka, 2010; Chojnacka *et al.*, 2005). Les mécanismes de sorption à la surface de la biomasse sont conditionnés par les interactions physico-chimiques entre le métal et les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire (Kaduková & Virčíková, 2005; Veglio & Beolchini, 1997; Volesky & Schiewer, 2000). De nombreuses études ont montré que les algues et les autres micro-organismes (levures, champignons et bactéries) sont des outils précieux pour l'élimination des métaux lourds. Les algues ont été largement étudiées en raison de leur omniprésence dans la nature (Wang & Chen, 2009). Souvent, les algues ont montré une grande capacité de biosorption des métaux parmi les différents micro-organismes utilisés dans ce domaine (Andrade *et al.*, 2005). De nombreuses études ont d'ailleurs été publiées au cours des dernières années, faisant état de la performance d'une grande variété d'algues à éliminer les métaux (Romera *et al.*, 2006; Tuzun *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1998). La capacité élevée de liaison du métal chez les algues est attribuée à la paroi cellulaire, qui joue un rôle important dans la fixation des métaux. Cela est dû à la présence de groupes fonctionnels sur cette paroi qui peuvent agir comme des sites de liaison pour les métaux. La surface des algues est un système complexe, car elle se comporte comme un ligand hétérogène et peut être considérée comme une macromolécule polyfonctionnelle (Rincon *et al.*, 2005).

Dans ce travail, la capacité des algues vertes unicellulaires pour la biosorption des ions métalliques est évaluée dans des systèmes monométalliques simples et dans des systèmes binaires à base de cuivre et de plomb. *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue verte unicellulaire, a été employée dans cette étude principalement en raison de la facilité relative de sa culture au laboratoire, de contrôler son état métabolique, sa taille et sa surface. Les algues vertes unicellulaires *C. reinhardtii* constituent un modèle relativement simple pour lesquelles des outils d'analyse et des études génomiques sont extrêmement bien développés. Même si elles sont au plus bas niveau trophique de la chaîne alimentaire, l'étude de la biosorption des métaux par les algues contribuera également à une meilleure connaissance pour les niveaux trophiques supérieurs. De plus, *Chlamydomonas reinhardtii* a récemment acquis une plus grande attention pour le traitement de la contamination des milieux aquatiques par les métaux lourds (Cai *et al.*, 1995). Le plomb et le cuivre ont été choisis en raison de leur toxicité et leur caractère essentiel contrastés. Le plomb est généralement reconnu pour être toxique, le cuivre peut à la fois jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire à des concentrations faibles et peut être toxique à des concentrations plus élevées. Ce sont deux métaux qui ont été identifiés comme étant problématiques dans les milieux aquatiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture des cellules algales de *C. reinhardtii* au laboratoire

Les algues ont été transférées par inoculation à partir d'une plaque de culture sur gélose dans une solution tris-acétate-phosphate (TAP) diluée (4x) ($I = 10^{-2}$ M). Les cellules ont été cultivées à une densité de $(2-3) \times 10^6$ cellules.mL⁻¹ pendant une semaine en utilisant une lumière 12h (50mmol photons⁻² s⁻¹)/12h régime obscurité à 20°C et 100 tr/min dans un système incubateur-agitateur (Harris, 1989). Les cellules ont été ensuite diluées dans des milieux de culture de densité cellulaire correspondante à $(1-2) \times 10^5$ cellules.mL⁻¹. Après une semaine de plus de croissance permettant aux cellules d'atteindre la phase de croissance logarithmique tardive $1-2 \times 10^6$ cellules.mL⁻¹, les cellules ont été récoltées par centrifugation

(3000xg, 12min) dans des tubes à centrifuger de 50 mL stériles (polypropylène), puis, lavées par une solution MES (Sigma) à 10^{-2} M et à pH 6. Tous les milieux de culture ont été stérilisés avant de les utiliser. Toutes les manipulations de cultures d'algues ont été réalisées sous une flamme. La croissance des cellules dans ces conditions, a été suivie en fonction du temps par observation microscopique des cellules algales.

Préparation des solutions expérimentales

Les solutions expérimentales sont des solutions MES 10^{-2} M (Sigma) contenant les concentrations du métal seul ou des mélanges binaires de cuivre et de plomb. Les solutions sont tamponnées à pH 6, afin de minimiser le rôle potentiel des ligands carbonates, qui sont prévus pour devenir importants dans la gamme de pH de 6 à 8. Les solutions de métaux ont été préparées en utilisant les nitrates de plomb et de cuivre $Pb(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (qualité analytique) dans l'eau ultra pure. Le nitrate a été choisi en raison de sa faible tendance à former des complexes métalliques. Les valeurs choisies pour les concentrations des métaux sont proches de celles trouvées dans les eaux naturelles. Le pH a été ajusté en utilisant des solutions concentrées d'acide nitrique (Suprapur, Sigma). Toute la verrerie a été trempée dans HNO_3 0,1% pendant au moins 24 heures, puis lavée 3 fois avec de l'eau distillée et 3 fois avec de l'eau ultra pure ($R > 18M\Omega cm$; $TOC < 2 mg.L^{-1}$). Toutes les solutions d'exposition ont été stérilisées et équilibrées 1 jour avant l'utilisation.

Tests de biosorption

Après centrifugation et lavage, les cellules d'algues ont été lyophilisées à $-100^\circ C$ durant environ 2 jours. Après lyophilisation, les cellules d'algues inertes ont été broyées à une taille de particule de 1 mm puis transférées aux milieux expérimentaux à une concentration finale correspondante à une surface d'exposition de $1 cm^2.mL^{-1}$. Les zones de surface cellulaire ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La valeur du pH des solutions d'expositions est maintenue constante à pH 6. En effet la valeur du pH est l'un des facteurs environnementaux les plus importants dans les études de biosorption. La variation du pH de la solution influence fortement non seulement la dissociation des sites de la surface de la biomasse, mais aussi la spéciation chimique des métaux lourds en solution: l'hydrolyse, la complexation des métaux par des ligands organiques et /ou inorganiques, les réactions d'oxydo-réduction, la précipitation, la biodisponibilité ainsi que la biosorption des métaux lourds (Esposito *et al.*, 2002). Au cours du processus de biosorption, les flacons ont été agités sur un agitateur pendant environ 6h sous une température constante de $30^\circ C$. Des échantillons de 5mL ont été retirés du milieu d'exposition à des intervalles de temps réguliers et analysés. Les algues dans les solutions de l'échantillon ont été éliminées par centrifugation (10000xg, 5min). La capacité de biosorption q (ions métalliques mg/g de la biomasse sèche ou des cellules mortes) a été obtenue en utilisant l'équation suivante :

$$q = \frac{(C_0 - C)V}{m} \quad (1)$$

où C_0 et C sont respectivement les concentrations des métaux lourds dans la solution initiale ($mg.L^{-1}$) et après biosorption. V est le volume de la phase aqueuse (L) et m est le montant de la biomasse sèche (g). Les valeurs des concentrations C et C_0 ont été déterminées en utilisant une spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme (Rayleigh-WFX210). Afin de tenir compte de la variabilité biologique et analytique, les expériences ont été répétées, en deux exemplaires pour deux solutions de culture des algues différentes. Les résultats expérimentaux donnés sont des valeurs moyennes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Étude de la biosorption du métal par *C. reinhardtii*

Cas d'un métal simple

La Figure 1 montre les résultats de l'expérience menée en cinétique pour déterminer le temps d'équilibre de la biosorption des ions Pb (II) et Cu (II) par la biomasse de *C. reinhardtii*. Pour les deux ions Cu (II) et Pb (II), la biosorption est très rapide au début et ensuite des valeurs de plateau ont été progressivement obtenues après un certain temps d'équilibre. Des résultats comparables ont été observés dans la littérature (Tüzün *et al.*, 2005). La biosorption des ions métalliques par les micro-organismes se produit en deux étapes: une absorption initiale rapide à la surface sur les sites d'adsorption de la paroi cellulaire et une absorption ultérieure lente. Initialement, la biosorption rapide du Cu et du Pb est due à l'adsorption du métal à la surface de la biomasse sur les composants de la paroi cellulaire et une grande surface de biosorbant est disponible. Il existe plusieurs groupes fonctionnels qui agissent comme sites actifs de liaison pour les ions Cu (II) et Pb (II). Les surfaces des cellules de micro-organismes consistent en plusieurs polysaccharides, protéines et des lipides, et ainsi offrent plusieurs groupes fonctionnels capables de se lier à des ions de métaux lourds (Crist *et al.*, 1981; Yan & Viraraghavan, 2003). Avec l'occupation progressive des sites de surface de liaison, le processus de biosorption a été ralenti en raison de la disponibilité réduite des sites de fixation, d'où le système atteint un plateau (état d'équilibre). D'autre part, les résultats obtenus montrent que la biomasse des algues *C. reinhardtii* a une plus grande capacité de biosorption et une plus grande affinité pour les ions Pb (II) que pour les ions Cu (II). A un temps de contact de 65min, la capacité de biosorption des cellules pour les ions Pb (II) (0,286 mg/g) est 2 fois plus élevée que celle obtenue pour les ions Cu (II) (0,109 mg/g) (Fig. 1). Cela pourrait être attribué à la différence entre le rayon ionique de Pb^{2+} (1,21 Å) et Cu^{2+} (0,69 Å). Le rayon ionique de Pb (II) est supérieur à celui du Cu (II) et donc une plus forte affinité physique pour Pb (II) est prévue au niveau des sites d'adsorption sur les cellules (Yan & Viraraghavan, 2003).

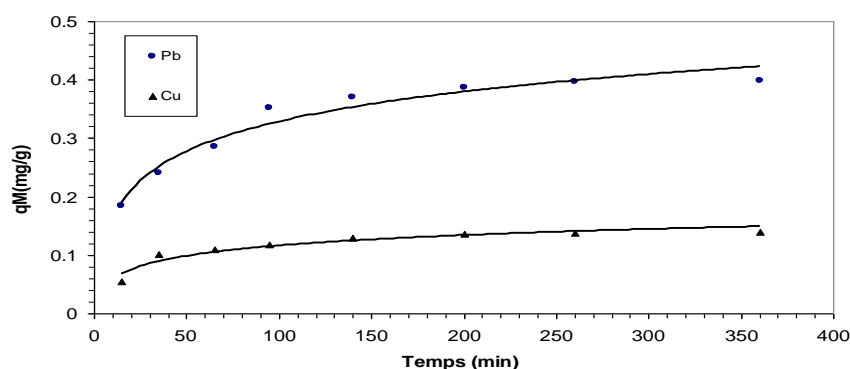


Figure 1. Capacités de biosorption de la biomasse algale *C. reinhardtii* pour les ions métalliques Cu (II) et Pb (II) en fonction du temps.

Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature selon laquelle Pb (II) a été préférentiellement adsorbé par rapport à d'autres ions métalliques (Ferraz & Teixeira,

1999; Tuzun *et al.*, 2005). D'autre part, Ferraz et Teixeira (1999) ont montré que les espèces de champignons unicellulaires, *S. cerevisiae*, avaient une plus grande affinité pour l'ion Pb (II), et une plus grande capacité de biosorption de Pb (II) par rapport à d'autres ions métalliques. Nakajima et Sakaguchi (1986) ont rapporté que les ions Pb (II), Cu (II) et Hg (II) ont été plus facilement biosorbés par les actinomycètes que les ions Zn (II), Ni (II) et Cd (II). Outre les propriétés structurales de la biomasse, qui jouent un rôle important dans le processus de biosorption, il y a plusieurs paramètres déterminant le taux de biosorption, tels que le montant de la biomasse, le pH, la température et la nature du milieu d'exposition, la concentration initiale des ions métalliques et l'existence d'autres ions compétiteurs dans le milieu expérimental.

Cas d'un mélange binaire Cu-Pb Influence du Cu sur la biosorption du Pb

La Figure 2 montre l'effet du cuivre sur la biosorption de plomb par la biomasse algale. La concentration de Pb est maintenue constante ($5 \times 10^{-7} \text{M}$) en présence de différentes concentrations du métal compétiteur Cu (10^{-7} , 5×10^{-7} et 10^{-6}M). Les résultats obtenus montrent que la capacité de biosorption de plomb par les algues *C. reinhardtii* n'est pas affectée par la présence de cuivre (Fig. 2).

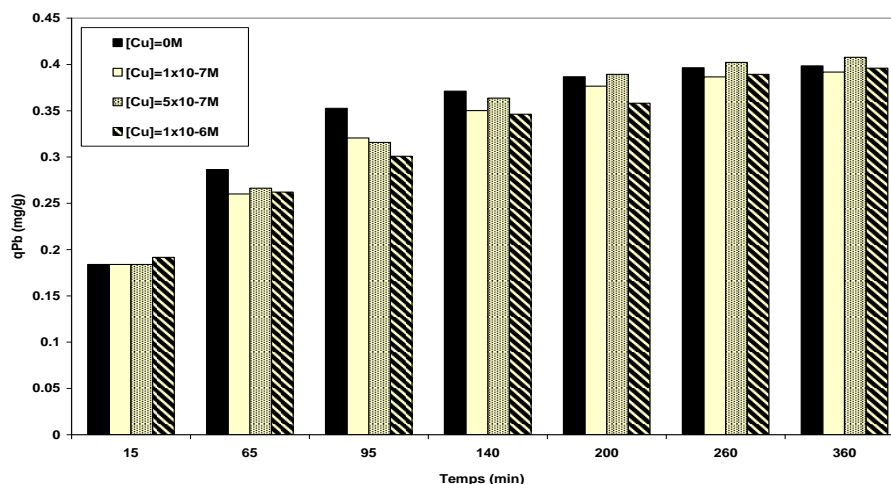


Figure 2. Influence du Cu sur la biosorption du Pb par la biomasse algale *C. reinhardtii*.

Ces résultats montrent que les ions Cu (II) et Pb (II) ne sont pas en concurrence pour les mêmes sites d'adsorption à la surface des cellules algales. D'après la littérature, les groupes carboxyles et hydroxyles peuvent se combiner de préférence avec les ions Pb (II), tandis que les groupes aminés sont impliqués majoritairement dans la biosorption du cuivre (Ashkenazy *et al.*, 1997 ; Liping *et al.*, 2007). La concurrence entre plusieurs métaux a été rapportée dans la littérature pour un grand nombre de biosorbants. Puranik et Paknikar (1999) ont étudié l'influence du cadmium, du cuivre, du cobalt et du nickel sur la biosorption de plomb et de zinc par les espèces *Streptoverticillium cinnamomeum* et *Penicillium chrysogenum* comme biomasses. L'effet compétitif de la présence des co-cations sur la biosorption du plomb a été moins prononcé que sur la biosorption du zinc. Figueira *et al.*

(1997) ont étudié la biosorption de Cd et de Fe par la biomasse *Sargassum*. Ils ont montré que la présence de fer réduit l'absorption de cadmium à 75% de la valeur d'origine. De même, l'absorption de fer est très fortement affectée par la présence de cadmium. Mohapatra et Gupta (2005) ont rapporté la compétition entre les ions zinc (II), cuivre (II) et cobalt (II) lors de la biosorption par les espèces des cyanobactéries (*Oscillatoria augustissima*). Le cuivre réduit à la fois la biosorption du zinc et de cobalt. Un effet compétitif antagoniste est observé pour le système binaire (Zn-Co). En revanche la biosorption de cuivre est restée presque inchangée en présence de différentes concentrations de Co et de Zn.

Influence du Pb sur la biosorption du Cu

La capacité de biosorption de Cu par la biomasse algale en présence de différentes concentrations de Pb (10^{-7} , 5×10^{-7} et 10^{-6} M) est représentée par la Figure 3. De même, quelque soit la concentration de plomb dans le milieu de biosorption, aucun mécanisme de compétition avec les ions Cu (II) n'a été identifié (Fig. 3). Ces résultats confirment que plusieurs groupes fonctionnels sur la paroi cellulaire des algues participent à la biosorption et que la biosorption des ions métalliques Cu (II) et Pb (II) se produit sur des sites différents. Ces résultats ne sont pas en corrélation avec les résultats trouvés dans la littérature. En effet, Tuzun *et al.* (2005), ont étudié la capacité de biosorption de la biomasse algale *C. reinhardtii* dans des systèmes métalliques mixtes contenant du Pb (II), Cd (II) et Hg. Ils ont montré que dans les systèmes binaires, la présence d'un co-cation réduit la biosorption de métal par rapport aux systèmes métalliques simples, indiquant l'existence d'une liaison compétitive sur les sites d'adsorption à la surface des cellules algales. De même, dans les systèmes multi-métaux, la capacité de biosorption de *C. reinhardtii* pour les ions Pb (II), Cd (II) et Hg (II) a été plus faible que dans le système métallique simple, indiquant que les interactions complexes entre plusieurs facteurs tels que la charge ionique et le rayon ionique du métal peuvent affecter la biosorption des ions métalliques sur la biomasse algale (Li *et al.*, 2004 ; Yan & Viraraghavan, 2003). D'autre part, Tzesos *et al.* (1996) ont relié les interactions entre les métaux à leur classification selon la théorie de Pearson. Il a été observé que les éléments intermédiaires sont affectés par la présence d'éléments de la classe dure ou de la classe douce alors que les éléments appartenant soit à la classe dure ou à la classe douce présentent des effets de concurrence entre les membres de leur classe.

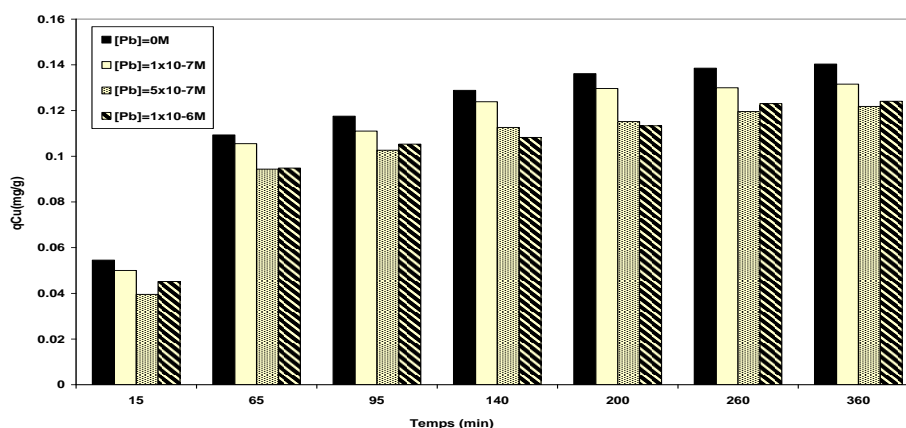


Figure 3. Influence de Pb sur la biosorption du Cu par les algues vertes *C. reinhardtii*.

CONCLUSION

Dans les conditions étudiées, la biomasse non viable des espèces d'algues *C. reinhardtii* a montré une efficacité dans la biosorption des ions métalliques Cu (II) et Pb (II). De plus, les cellules mortes possèdent une plus grande affinité pour Pb (II) par rapport à Cu (II). Aucun effet compétitif n'a été observé pour la biosorption de cuivre et de plomb par les cellules d'algues inertes en mélanges binaires. Ces résultats indiquent que les sites d'adsorption de cuivre et de plomb à la surface de la biomasse algale sont indépendants. Les conditions expérimentales telles que le pH, la méthode utilisée pour préparer la biomasse, la concentration initiale des ions métalliques et la concentration de la biomasse semblent avoir une grande influence sur le processus de biosorption. L'optimisation de ces conditions pourrait augmenter l'affinité des cellules algales pour ces métaux. Cependant, les études réalisées dans ce travail ne se rapportent pas directement à des eaux usées réelles composées d'un mélange de métaux et des ligands organiques et inorganiques. C'est pourquoi, afin de trouver les conditions optimales pour la meilleure capacité de piégeage des métaux par les espèces algales *C. reinhardtii*, il serait nécessaire d'effectuer d'autres études dans des systèmes multi-métalliques et dans des milieux naturels et de tester plusieurs types des eaux usées.

Bien que des études supplémentaires soient nécessaires, ces résultats sont très prometteurs en tant que point de départ pour une application potentielle de ces microorganismes comme biosorbants des métaux lourds pour le biotraitement des milieux aquatiques.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le Conseil National de la Recherche Scientifique du Liban (No 05-12-08). Nous remercions l'École Doctorale des Sciences et de Technologies à l'Université Libanaise.

RÉFÉRENCES

- Andrade, A.D., Rollemberg, M.C.E., Nobrega, J.A. 2005. Proton and metal binding capacity of the green freshwater alga *Chaetophora elegans*. *Process Biochemistry*, 40: 1931-1936.
- Ashkenazy, R., Gottlieb, L., Yannai, S. 1997. Characterization of acetone-washed yeast biomass functional groups involved in lead biosorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 55: 1-10.
- Buffle, J., Parthasarathy, N., Djane, N.K., Matthiasson, L. 2000. *IUPAC Series*, Buffle, J. and Horvai, G., Eds, Wiley, Chichester UK, vol. 6, ch. 10.
- Cai, X.H., Logan, T., Gustafson, T., Traina, S., Sayre, R.T. 1995. Applications of eukariotic algae for the removal of heavy metals from water. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4: 338-344.
- Chojnacka, K. 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International*, 36: 299-307.
- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H. 2005. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*, 59: 75-84.

- Crist, R.H., Oberholser, K., Shank, N., Nguyen, M. 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.*, 15: 1212-1217.
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, A., Lubian, L.M. 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1503-1513.
- Esposito, A., Pagnanelli, F., Veglio, F. 2002. pH-related equilibria models for biosorption in singlemetal systems. *Chem. Eng. Sci.*, 57: 307-313.
- Ferraz, A.I., Teixeira, J.A. 1999. The use of flocculating brewer's yeast for Cr(III) and Pb(II) removal from residual wastewaters. *Bioproc. Eng.*, 21: 431-437.
- Figueira, M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T. 1997. Assessment of interference in biosorption of heavy metals. *Biotechnology and Bioengineering*, 54: 344-350.
- Gupta, V.K., Rastogi, A. 2008. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies. *J. Hazard. Mater.*, 152: 407-414.
- Harris, E.H. 1989. *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press, San Diego, xiv, pp. 780.
- Kaduková, J., Virčíková, E. 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environment International*, 31: 227-232.
- Li, Q., Wu, S., Liu, G., Liao, X., Deng, X., Sun, D., Hu, Y., Huang, Y. 2004. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Sep. Purif. Technol.*, 34: 135-142.
- Liping, D., Yingying, S., Hua, S., Xinting, W., Xiaobin, Z. 2007. Sorption and desorption of lead (II) from wastewater by green algae *Cladophora fascicularis*. *Journal of Hazardous Materials*, 143: 220-225.
- Malik, A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30: 261-278.
- Mohapatra, H., Gupta, R. 2005. Concurrent sorption of Zn(II), Cu(II) and Co(II) by *Oscillatoria angustissima* as a function of pH in binary and ternary metal solutions. *Bioresource Technol.*, 96: 1387-1398.
- Nakajima, A., Sakaguchi, T. 1986. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 59-64.
- Puranik, P.R., Paknikar, K.M. 1999. Influence of co-cations on biosorption of lead and zinc – a comparative evaluation in binary and multimetal systems. *Bioresource Technology*, 70: 269-276.
- Qaiser, S., Rasheed, A.S., Umar, M. 2009. Biosorption of lead from aqueous solution by *Ficus religiosa* leaves: Batch and column study. *Journal of Hazardous Materials*, 166: 998-1005.
- Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori, A.R. 2006. Uptake of heavy metals by a ciliate, *Tachysoma pellionella*, isolated from industrial effluents and its potential use in bioremediation of toxic wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 77: 469-476.
- Rincon, J., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L., Munoz, J.A. 2005. Biosorption of heavy metals by chemically-activated alga *Fucus vesiculosus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80: 1403-1407.
- Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez M.L., Munoz, J.A. 2006. Biosorption with algae: a statistical review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 26: 223-235.
- Tüzün, I., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başarana, G., Çelik, G., Arica, M.Y. 2005. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management*, 77(2): 85-92.

- Tsezos, M., Remoudaki, E., Anglelatou, V. 1996. A study of the effects of competing ions on the biosorption of metals. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38: 19-29.
- Veglio, F., Beolchini, F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44: 301-316.
- Volesky, B., Schiewer, S. 2000. *Biosorption, metals*. Encyclopedia of Bioprocess Technology (Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation), pp. 433-453.
- Wang, J., Chen, C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27: 195-226.
- Yan, G., Viraraghavan, T. 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxi*. *Water Research*, 37: 4486-4496.
- Yuan, H., Zhang, J., Lu, Z., Min, H., Wu, C. 2009. Studies on biosorption equilibrium and kinetics of Cd²⁺ by *Streptomyces* sp. K33 and HL-12. *Journal of Hazardous Materials*, 164: 423-431.
- Zhou, J.L, Huang, P.L, Lin, R.G. 1998. Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Environ. Pollut.*, 101: 67-75.