

## Bioacumulación de cobre en la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin

J. ABALDE\*, A. CID, E. TORRES & C. HERRERO

Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias  
Universidad de La Coruña. Campus de La Zapateira s/n. 15071 La Coruña

### Resumen

ABALDE, J., CID, A., TORRES, E. & HERRERO, C. (1995). Bioacumulación de cobre en la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 5: 31-38

La bioacumulación de metales pesados por las microalgas marinas es de particular importancia ya que éstas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la mayor parte del cobre acumulado por las células de *Phaeodactylum tricorutum* se encuentra unido a la superficie de las mismas, con relaciones entre cobre adsorbido y cobre total retirado superiores al 90%, mientras que el porcentaje de cobre acumulado intracelularmente se sitúa entre el 3 y el 6% del cobre total retirado. La cantidad de cobre adherido a la superficie celular de esta diatomea aumenta con la concentración de cobre del medio, con un valor máximo de  $1.52 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ , para una concentración de cobre en el medio de  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . La capacidad de acumulación intracelular de cobre se satura a partir de  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de cobre en el medio, obteniéndose un valor máximo de cobre intracelular de  $0.037 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ .

**Palabras clave:** *Phaeodactylum tricorutum*, metal pesado, cobre, bioacumulación.

### Abstract

ABALDE, J., CID, A., TORRES, E. & HERRERO, C. (1995). Bioaccumulation of copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 5: 31-38

Bioaccumulation of heavy metals by marine microalgae is specially important since they constitute the first step of the marine food chain. The results obtained in the present study show that most of copper accumulated by *Phaeodactylum tricorutum* cells is located at the cell surface, with ratios between adsorbed copper and total removed copper higher than 90%, while the percentage of copper accumulated intracellularly is between 3% and 6% of the total removed copper. The proportion of adsorbed copper at the cellular surface increases with copper concentration in the medium, being maximum at  $1 \text{ mg Cu l}^{-1}$  with  $1.52 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ . The capacity for accumulating copper intracellularly is saturated with  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  of copper in the medium, with a maximum value of intracellular copper of  $0.037 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ .

**Key words:** *Phaeodactylum tricorutum*, heavy metal, copper, bioaccumulation.

### INTRODUCCION

Los metales pesados son agentes contaminantes de ecosistemas acuáticos, y como tales

alteran la estructura de los mismos, provocando cambios en las comunidades bióticas (KULSHRESTHA *et al.*, 1989). Son vertidos al medio a través de numerosas y diversas fuentes

\* Autor al que se enviará la correspondencia

antropogénicas y se les considera peligrosos para la vida acuática por su prolongada permanencia en los sedimentos y por su tendencia a bioacumularse en los tejidos y en las células vivas.

Los metales pesados se caracterizan por tener una distribución electrónica similar en el último nivel electrónico (por ejemplo,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Hg}^{+2}$ ) (VIARENGO, 1989). La mayoría de ellos son esenciales para el metabolismo de los seres vivos a bajas concentraciones, pero pueden ser tóxicos para los organismos cuando aparecen a elevadas concentraciones (EICHENBERGER, 1986; FURNES & RAINBOW, 1990; MERIAN, 1991; KENNISH, 1992).

Los microorganismos son, generalmente, rápidamente afectados por las descargas de metales pesados en el ambiente; los contaminantes ejercen directamente su efecto sobre ellos, alterando a su vez la comunidad a la que pertenecen (HUGHES & POOLE, 1989). Por otra parte, las microalgas han sido utilizadas como bioindicadores de los niveles de contaminación en el medio marino (HÖRNSTRÖM, 1990).

Se han propuesto diversos mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales pesados por las diferentes especies de algas. Las paredes de los microorganismos acuáticos, y en concreto las de las células microalgales, tienen una gran capacidad para ligar metales (PETERSON *et al.*, 1975). Este hecho resulta de una especial importancia ya que las microalgas marinas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica marina y, por tanto, a partir de estos microorganismos se produce la transmisión de los metales contaminantes a los organismos superiores. Además, la capacidad de bioacumulación es una propiedad que debe tenerse en cuenta cuando se analiza la posibilidad de utilizar biomasa microalgal para la retirada de los metales de los ecosistemas naturales (VOLESKY, 1990; MACASKIE, 1991).

En este trabajo se estudia la capacidad de bioacumulación de cobre que presenta *Phaeodactylum tricornerutum*, mediante la cuantificación de la cantidad de metal que es capaz de retirar del medio, así como en qué medida el cobre retirado es bioacumulado intracelularmente o bioadsorbido, en cultivos con diferentes concentraciones de este metal.

## MATERIALES Y METODOS

La especie microalgal utilizada ha sido *Phaeodactylum tricornerutum*, Bohlin (Bacillariophyceae), cedida por el Dr. Fábregas (Dpto. Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela), quien la aisló de aguas de la Ría de Arousa. Los cultivos se realizan con una iluminación de  $68.25 \mu\text{moles photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por tubos fluorescentes MAZDA fluor, aplicada con un ritmo nictimeral de 12:12 horas, en una cámara de temperatura controlada y constante a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los cultivos no son aireados ni agitados mecánicamente. El agua de mar utilizada se filtra con filtros de acetato de celulosa de  $0.45 \mu\text{m}$  (MF-Millipore), posteriormente se pasa por un cartucho de carbono activo y, por último, se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Se realizan cultivos de *P. tricornerutum* con una densidad celular inicial de  $24 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ , en botellas PYREX con 500 ml de agua de mar, sin adición de nutrientes inorgánicos, y diferentes concentraciones de cobre: 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 y  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Todos los cultivos se realizan por triplicado, incluidos los cultivos control a los que no se les adiciona cobre. El inóculo procede de cultivos «stock» que se lavan dos veces en agua de mar para eliminar los restos de medio de cultivo.

Con el fin de que todo el metal añadido al medio aparezca en forma de ion libre se utilizó agua de mar sin adición de nutrientes y todo el material fue lavado en ácido nítrico (10%), aclarado con agua destilada varias veces y esterilizado posteriormente a  $121^\circ\text{C}$  durante 10 minutos.

La densidad celular de los cultivos se determina diariamente mediante recuento en cámara Neubauer del número de células microalgales presentes en una alícuota tomada de cada uno de los cultivos. A las 72 horas de cultivo se calcula la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), expresada en doblajes  $\text{día}^{-1}$ , a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{(t - t_0) \cdot \ln 2}$$

donde  $t_0$  y  $t$  son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y

$N_t$  y  $N_0$  el número de células  $\text{ml}^{-1}$  en esos tiempos.

La determinación de la cantidad de cobre retirado del medio por la microalga ensayada, *Phaeodactylum tricornutum*, se realiza utilizando un método de espectrofotometría de absorción atómica basado en el descrito por STAUBER & FLORENCE (1985). Transcurridas 72 horas de exposición a las distintas concentraciones del metal, se separan dos fracciones con un número suficiente de células a partir del cultivo original: una de ellas se utiliza para medir el cobre total retirado por las células microalgales (cobre intracelular y cobre adsorbido a la superficie microalgal), y la otra se utiliza para medir el cobre intracelular. Para la determinación del cobre total retirado, se filtra una de las alícuotas del cultivo a través de filtros de ésteres de celulosa MF-Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro. Cada uno de los filtros se digiere con 1 ml de  $\text{HNO}_3$  15 M y 0.5 ml de  $\text{HClO}_4$  al 72%. Finalizado el proceso de digestión se diluye la muestra hasta 5 ml con agua filtrada por un sistema Milli-Q de Millipore. La concentración de cobre en la muestra se determina por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 2380. Para la determinación del cobre intracelular se recogen las células por centrifugación de la otra alícuota del cultivo y se resuspenden en una solución de EDTA 0.02 M en agua de mar, con el fin de eliminar el cobre adsorbido en la superficie microalgal. Después de 20 min, las células se centrifugan de nuevo y se digieren como se ha descrito anteriormente. La cantidad de cobre en la muestra se mide por espectrofotometría de absorción atómica. El cobre adsorbido a la superficie celular se calcula a partir de la diferencia entre las dos fracciones medidas anteriormente (STAUBER & FLORENCE, 1985).

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa informático de estadística SPSS/PC+ versión 4.10 (SPSS Inc), aplicándose un ANOVA unifactorial.

## RESULTADOS

*P. tricornutum* es capaz de acumular importantes cantidades de cobre adherido a su pared

celular (Fig. 1). La cantidad de cobre adherido a la superficie celular aumenta cuando la concentración del metal en el medio aumenta. En los cultivos con  $0.025 \text{ mg l}^{-1}$  de cobre en el medio la cantidad de metal que se adhiere a la superficie celular es  $0.018 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ , mientras que cuando la concentración de cobre en el medio es  $1 \text{ mg l}^{-1}$ , la cantidad de cobre adherido a la superficie celular es  $1.512 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ . A las concentraciones de cobre ensayadas no se alcanza la saturación en la capacidad de acumulación de cobre en la pared celular, aunque como se observa en la figura 1, se tiende a dicha saturación.

La adhesión del metal a la superficie celular es un proceso rápido que no depende de energía. Después de esta adsorción, una parte del cobre puede penetrar en la célula y acumularse en su interior, siendo éste un proceso que necesita energía. *P. tricornutum* acumula cobre intracelularmente y la concentración de metal acumulado aumenta con la cantidad de cobre en el medio (Fig. 2). La cantidad de cobre acumulado intracelularmente es proporcional a la cantidad de cobre del medio en los cultivos con concentraciones de cobre entre  $0.025$  y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ . Concentraciones superiores de cobre en el medio no producen un incremento en la cantidad de cobre acumulado en el interior de la célula; así, en los cultivos con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de cobre la concentración intracelular del metal es  $0.034 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ , mientras que cuando la concentración de cobre en el medio se duplica no se produce un incremento significativo en la cantidad de cobre intracelular ( $0.037 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$ ) (Fig. 2). Estos resultados indican que la capacidad de acumulación intracelular de cobre se satura a partir de  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de cobre en el medio.

Si representamos la cantidad de cobre adsorbido frente al cobre intracelular, expresado en  $\times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$  (Fig. 3) se obtiene de nuevo una curva asintótica, similar a la observada para el cobre acumulado intracelularmente, indicando que el cobre adsorbido todavía puede seguir aumentando mientras que el cobre intracelular permanece constante.

En la Tabla I se presentan las cantidades de cobre retiradas del medio por las células, expresadas en mg de cobre por litro de cultivo, así como la densidad celular final alcanzada por los distintos cultivos. Al aumentar la concentración

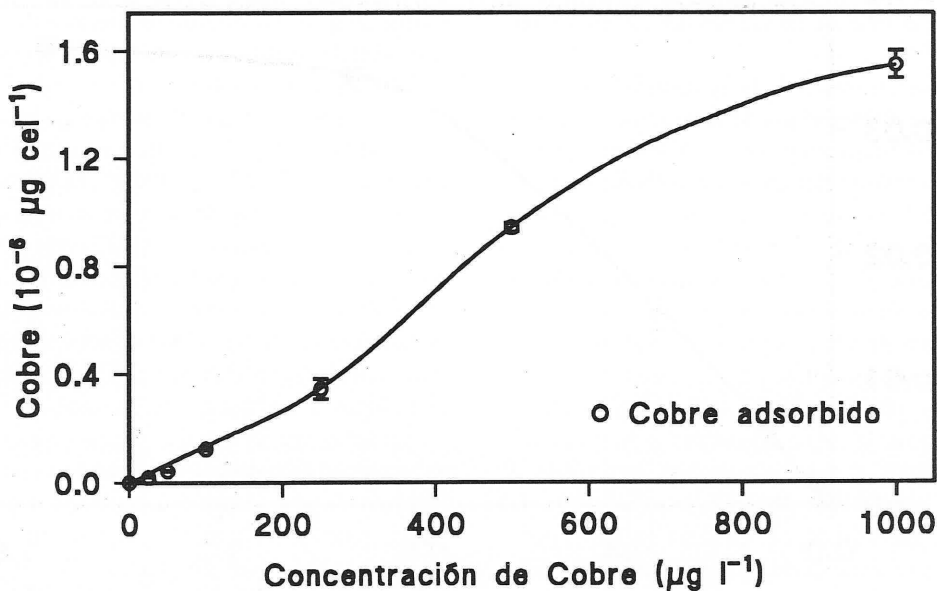


Fig. 1. Cobre adsorbido (expresado en  $10^{-6} \mu\text{g celula}^{-1}$ ) en la superficie de las células de *P. tricorutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

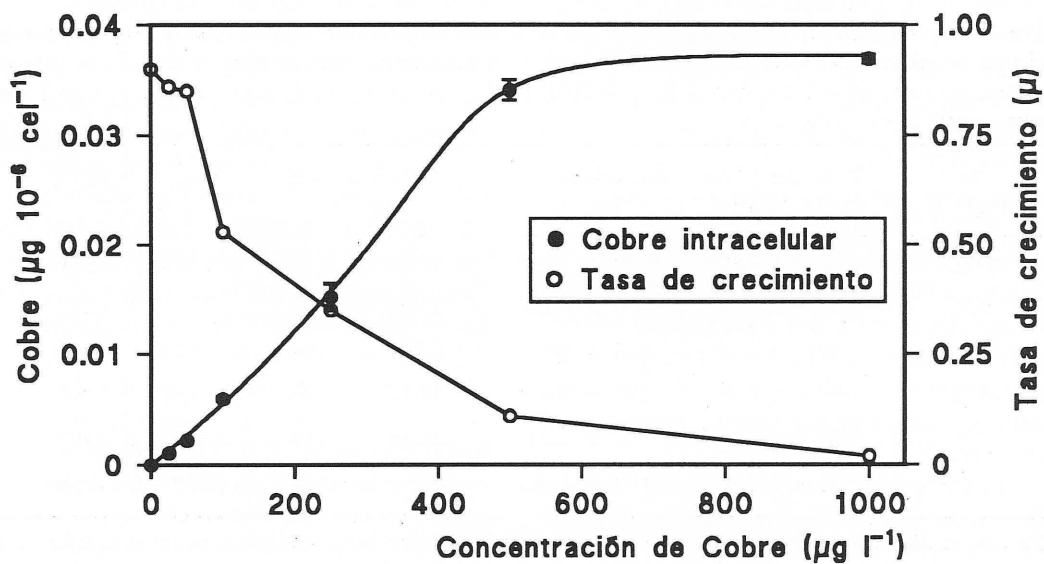


Fig. 2. Cobre intracelular (expresado en  $10^{-6} \mu\text{g celula}^{-1}$ ) y tasa de crecimiento ( $\mu$ ) (expresada en doblajes día $^{-1}$ ) de los cultivos de *P. tricorutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

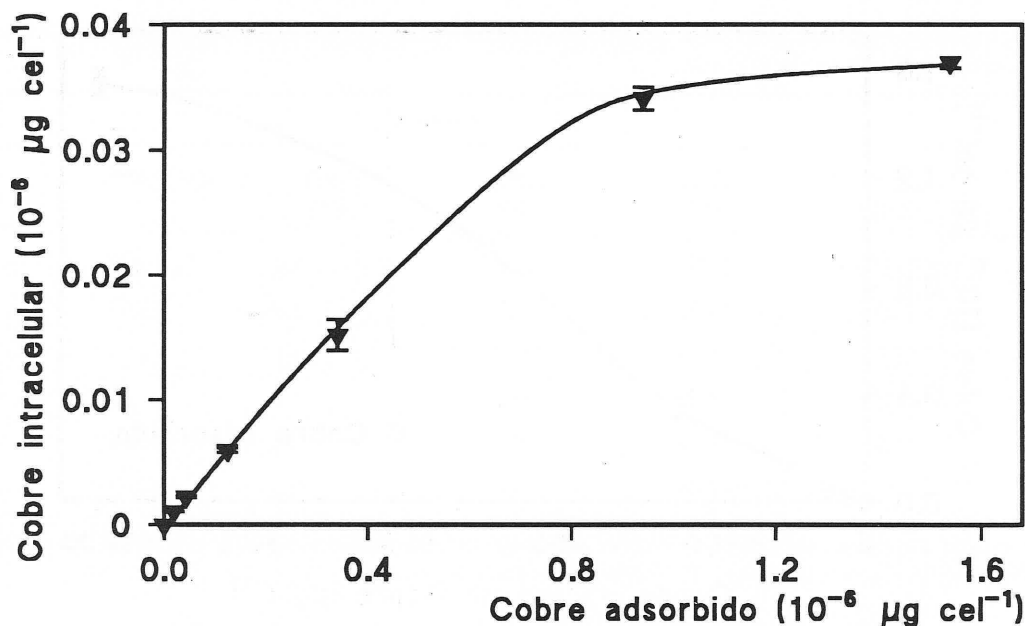


Fig. 3. Relación entre el cobre adsorbido e intracelular (expresados en  $10^{-6} \mu\text{g celula}^{-1}$ ) acumulado por las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

TABLA I. Densidad celular final (expresada en células  $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ) y cobre retirado del medio (expresado en  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) por las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio en cada una de las fracciones: cobre intracelular, cobre adsorbido y cobre total retirado del medio. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación típica

| Ta<br>( $\text{mg l}^{-1}$ ) | Densidad celular<br>( $\text{cel} \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ) | Intracelular (In)<br>( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) | Adsorbido (Ad)<br>( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) | Total retirado(Tr)<br>( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) |
|------------------------------|--|---|--|--|
| 0.025                        | $80.75 \pm 6.31$   | $0.69 \pm 0.00$                               | $12.27 \pm 0.00$                           | $12.93 \pm 0.000$                              |
| 0.05                         | $70.00 \pm 5.29$   | $1.38 \pm 0.002$                              | $25.72 \pm 0.02$                           | $27.10 \pm 0.021$                              |
| 0.1                          | $62.19 \pm 4.92$   | $3.14 \pm 0.004$                              | $62.61 \pm 0.04$                           | $65.74 \pm 0.045$                              |
| 0.25                         | $52.31 \pm 4.30$   | $5.93 \pm 0.010$                              | $128.14 \pm 7.57$                          | $134.07 \pm 7.587$                             |
| 0.5                          | $25.69 \pm 3.14$   | $9.99 \pm 0.023$                              | $266.35 \pm 3.59$                          | $276.34 \pm 3.671$                             |
| 1                            | $22.44 \pm 4.80$   | $10.04 \pm 0.027$                             | $410.93 \pm 11.21$                         | $420.97 \pm 11.249$                            |

Ta = cobre añadido a cada cultivo. In = cobre intracelular determinado en la biomasa microalgal. Ad = cobre adherido a las biomasa microalgal. Tr = cobre total retirado del medio.

TABLA II. Relaciones entre las distintas fracciones de cobre acumuladas por *P. tricornutum* cultivada con distintas concentraciones de cobre en el medio

| [Cu]  | Relaciones |           |           |       |
|-------|------------|-----------|-----------|-------|
|       | Tr/Ta (%)  | Ad/Tr (%) | In/Tr (%) | Ad/In |
| 0.025 | 51.72      | 94.6      | 5.4       | 17.63 |
| 0.05  | 54.20      | 94.9      | 5.0       | 18.63 |
| 0.1   | 65.74      | 95.2      | 4.8       | 19.93 |
| 0.25  | 53.62      | 95.6      | 4.6       | 21.57 |
| 0.5   | 55.26      | 96.4      | 3.5       | 26.68 |
| 1     | 42.09      | 97.6      | 2.3       | 40.93 |

Ta = cobre añadido a cada cultivo. In = cobre intracelular determinado en la biomasa microalgal. Ad = cobre adherido a las biomasa microalgal. Tr = cobre total retirado del medio.

de cobre desciende la densidad celular final, debido al efecto del cobre sobre la velocidad de crecimiento (Fig. 2), sin embargo aumenta la cantidad de cobre retirado del medio, tanto el intracelular como el adsorbido, debido a que, como hemos expuesto, las células aumentan su capacidad de acumular cobre en función de la concentración de este en el medio.

La cantidad de cobre total retirado por litro de cultivo (adsorbido a la superficie celular + intracelular) es aproximadamente el 50% del cobre añadido al medio para cualquiera de las concentraciones ensayadas (Tabla II). Los resultados obtenidos muestran que la mayor parte del cobre ligado a las células de *Phaeodactylum tricornutum* se encuentra unido a la superficie de las mismas, con relaciones entre cobre adsorbido y cobre retirado total superiores al 90% (94-97%), mientras que el porcentaje de cobre acumulado intracelularmente se sitúa entre el 3 y el 6% del cobre total retirado (Tabla II).

El cobre total retirado del medio de cultivo aumenta con la concentración de este metal en el medio; sin embargo, en los cultivos con concentraciones de cobre superiores a 0.1 mg l<sup>-1</sup> el porcentaje de cobre retirado con respecto al añadido desciende, lo que está relacionado con el hecho de que la densidad celular a las 72 horas de

exposición al metal es menor en estas concentraciones, debido a las tasas de crecimiento más bajas (Fig. 2). Así, el máximo porcentaje de cobre retirado respecto al total añadido alcanza valores del 65% en los cultivos con una concentración de cobre de 0.1 mg l<sup>-1</sup> (Tabla II).

## DISCUSION

Las células son capaces de adsorber metales en su superficie celular, pero una fracción de este metal entra en la célula y sólo una fracción puede ser atrapada de forma inactiva, por ejemplo unido a fitoquelatinas (GRILL *et al.*, 1987; RACHLIN *et al.*, 1982). El exceso de cobre que entra en la célula es el responsable de todas las alteraciones que se producen a nivel celular, y como consecuencia de ello anula o reduce el crecimiento celular (Fig. 2).

La acumulación de metales traza y sus radioisótopos por microalgas planctónicas ha sido objeto de numerosos estudios, que muestran que las algas unicelulares pueden captar elevadas concentraciones de metales pesados (NAKAJIMA *et al.*, 1981; REED & GADD, 1990). Dos son los mecanismos principales mediante los cuales pueden llevar a cabo este proceso: la

unión de los metales a superficies celulares (bioadsorción) y la acumulación intracelular (bioacumulación).

La incorporación de metales por las microalgas es un proceso que se lleva a cabo en dos fases: una fase rápida, independiente del metabolismo, que consiste en la unión del metal a la superficie celular; y una fase más lenta de incorporación al interior de la célula, que se debe al efecto simultáneo de la incorporación activa y la difusión pasiva del metal (GARNHAM *et al.*, 1992).

La pared celular de la mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos y microalgas) constituye una barrera externa definida, que se sitúa exteriormente a la membrana citoplasmática celular, y protege a los microorganismos frente a las condiciones ambientales, controla los flujos existentes entre el citoplasma y el medio que rodea a la célula, y determina la forma y la rigidez celular. Dado que está directamente relacionada con el medio, interactúa con las sustancias solubles de éste; esta interacción puede ser particularmente pronunciada en el caso de los iones metálicos, debido a las características aniónicas de la pared celular (REMACLE, 1990). En concreto, las superficies celulares de las microalgas juegan un importante papel en la retirada de los metales pesados (SIGG, 1987; WHITFIELD & TURNER, 1987). Las microalgas presentan amplias áreas superficiales con una alta afinidad por estos agentes. Las paredes celulares microalgales tienen numerosos poros en su estructura que permiten que tanto las moléculas como los iones las atraviesen (KUYUCAK & VOLESKY, 1990).

El cobre, en particular, es un metal que muestra una elevada afinidad por los grupos funcionales de la superficie de las microalgas, con altas constantes de formación de complejos (XUE *et al.*, 1988). Las células microalgales poseen en su superficie varios grupos funcionales: carboxilo, amino, tio, hidroxilo e hidroxycarboxílico, que pueden interactuar con los iones metálicos (XUE *et al.*, 1988) formando complejos de elevada estabilidad. PETERSON *et al.* (1975) han calculado que la diatomea *Phaeodactylum* posee  $6.7 \times 10^8$  lugares en su superficie celular capaces de ligar átomos de plomo.

Estos hechos permiten explicar por qué en el presente estudio la mayor parte del cobre (el 90% del cobre retirado aparece como adsorbido, Tablas I y II) se encuentra ligado a la superficie microalgal, siendo éste uno de los mecanismos más importantes de defensa que presentan estos microorganismos contra la contaminación por éste y otros metales pesados que se encuentren en el medio.

Sin embargo, a pesar de este mecanismo, cierta cantidad de cobre se incorpora al interior de la célula, ya que éste es un elemento esencial para la fisiología celular, pero cuando su concentración intracelular se eleva por encima de un determinado umbral comienza a ejercer su toxicidad. La concentración intracelular de cobre se satura a  $0.037 \times 10^{-6} \mu\text{g célula}^{-1}$  (Tabla I; Fig. 2), lo que indica que la cantidad de cobre que provoca los efectos tóxicos a nivel celular es mínima. Por esta razón, a medida que aumenta el cobre intracelular se observa un descenso de la tasa de crecimiento. La retirada de metales tóxicos del medio por quelación de los iones metálicos, muestra una fuerte correlación entre la tasa de crecimiento microalgal y la concentración de cobre iónico libre en el medio (MOREL & MORGAN, 1972). Numerosos autores han encontrado que cuando aumenta la asimilación y se sobrepasan ciertos niveles de acumulación intracelular de un metal, disminuye el crecimiento (COLEMAN *et al.*, 1971; KUYUCAK & VOLESKY, 1990). En los resultados obtenidos en este estudio, se observa que las células que acumulan más cobre son las que se cultivan en un medio con una cantidad elevada de cobre y presentan una mínima tasa de crecimiento.

Todos estos mecanismos permiten a las células actuar como bioacumuladores, retirando del medio el metal que se encuentra en exceso (KUYUCAK & VOLESKY, 1990). Esta capacidad de bioacumulación de las células será tanto mayor cuanto mayor sea su resistencia a la toxicidad por el metal, puesto que si el metal inhibe su crecimiento, las posibilidades de retirada son menores. Esto se puede observar en nuestros resultados en los que a las concentraciones más altas de cobre ensayadas se produce un descenso del porcentaje de cobre retirado, precisamente debido a que existe un menor número de células que puedan ejercer la función de retirada (Fig. 2).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia a través del proyecto XUGA-10302B90.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- COLEMAN, R.D., COLEMAN, R.L. & RICE, E.L. (1971). Zn and Co bioconcentration and toxicity in selected algal species. *Bot. Gaz.*, **132**: 102-107.
- EICHENBERGER, E. (1986). The interrelation between essentiality and toxicity of metals in the aquatic ecosystems. In: Sigel, H. (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems. vol. 20. Concepts on Metal Ion Toxicity*: 67-100. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- FURNESS, R.W. & RAINBOW, P.S. (Eds.) (1990). *Heavy metals in the marine environment*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- GARNHAM, G.W., CODD, G.A. & GADD, G.M. (1992). Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**: 270-276.
- GRILL, E., WINNACKER, E.L. & ZENK, M.H. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:439-443.
- HÖRNSTRÖM, E. (1990). Toxicity test with algae. A discussion on the batch method. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **20**: 343-353.
- HUGHES, M.N. & POOLE, R.K. (1989). *Metals and Micro-organisms*. Chapman and Hall Ltd. London, UK.
- KENNINSH, M.J. (1992). *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. CRC Press Inc. Boca Ratón Florida, USA.
- KULSHRESTHA, S.K., ADHOLEA, U.N., KHAN, A.A., BHATNAGAR, A., SAXENA, M. & BAGHAIL, M. (1989). Community structure of plankton and macrozoobenthos, with special reference to pollution in the River Khan (India). *Int. J. Environ. Stud.*, **35**: 83-96.
- KUYUCAK, N. & VOLESKY, B. (1990). Biosorption by algal biomass. En: VOLESKY, B. (Ed.), *Biosorption of Heavy Metals*: 173-198. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- MACASKIE, L.E. (1991). The application of biotechnology of the treatment of wastes from the nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as a means of treating radionuclide containing streams. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **11**: 41-112.
- MERIAN, E. (Ed.) (1991). *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance*. VCH. Weinheim, Germany.
- MOREL, F. & MORGAN, J.J. (1972). A numerical method for computing equilibria in aqueous chemical systems. *Environ. Sci. Technol.*, **6**: 58-62.
- NAKAJIMA, A., HORIKOSHI, T. & SAKAGUCHI, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**: 76-83.
- PETERSON, S.L., BENNETT, L.G. & TORNABENE, T.G. (1975). Effects of lead on the lipid composition of *Micrococcus* cells. *Appl. Microbiol.*, **29**: 669-679.
- RACHLIN, J.W., WARKENTINE, B. & JENSEN, T.E., 1982. The growth responses of *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium. *Bull. Torrey Bot. Club*, **109**:129-135.
- REED, R.H. & GADD, G.M. (1990). Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. In: Shaw, J. (Ed.), *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*: 105-118. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- REMACLE, J. (1990). The cell wall and metal binding. In: Volesky, B. (Ed.), *Biosorption of Heavy Metals*: 83-92. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- SIGG, L. (1987). Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. In: Stumm, W. (Ed.), *Aquatic surface chemistry, chemical processes at the particle-water interface*: 319-349. Wiley-Interscience. New York, USA.
- STAUBER, J.L. & FLORENCE, T.M. (1985). The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.*, **6**: 297-305.
- VIARENGO, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci.*, **1**: 295-299.
- VOLESKY, B. (Ed.). (1990). *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- WHITFIELD, M. & TURNER, D.R. (1987). The role of particles in regulating the composition of seawater. In: Stumm, W. (Ed.), *Aquatic surface chemistry, chemical processes at the particle-water interface*: 457-493. Wiley-Interscience. New York, USA.
- XUE, H.-B., STUMM, W. & SIGG, L. (1988). The binding of heavy metals to algal surfaces. *Wat. Res.*, **22**: 917-926.