

Monika ZDEB, Justyna ZAMORSKA

*Zakład Oczyszczania i Ochrony Wód
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Politechnika Rzeszowska*

BACILLUS SUBTILIS JAKO BIOSORBENT JONÓW METALI

BACILLUS SUBTILIS AS A BIOSORBENT OF METAL IONS

The removal of heavy metal ions, present in polluted waters in excessive numbers with the use of biomass is an alternative for commonly applied physical and chemical methods. In spite of very wide knowledge of the issue of the process of biological sorption itself, the research results are very often erroneous due to the methodology chosen incorrectly, mainly connected with the determination of metal ions and the amount of sorptive biomass. The aim of the research was to define a possibility of the application of Bacillus subtilis bacteria to remove ions of copper from water solutions. Water solutions of different concentrations of copper ions (5 – 200 mg/dm³) were examined, the optimal conditions (a temperature, pH) for the course of the biosorption process and the lethal concentrations of copper ions for B. subtilis were defined. Removability of copper ions was recorded on the level of about 30% in comparison to the initial concentration. The innovative methods of the determination of the amount of sorbent and sorbate were applied on all the stages of the experiment. The X-ray spectrometer S2 Picofox was used to determine the concentrations of copper ions in water solutions. In order to define the amount of sorptive biomass, the amount of organic carbon was defined with the use of the analyser of total organic carbon (TOC).

1. Wprowadzenie

Metale ciężkie stają się coraz poważniejszym problemem dla środowiska. Uwalniane są ze złóż naturalnych i dostępne dla organizmów żywych, nie tylko w wyniku naturalnych procesów jak: erupcje wulkanów, wietrzenie skał, parowanie z powierzchni oceanów czy pożary lasów, ale przede wszystkim za sprawą działalności człowieka. Ich źródła antropogeniczne to głównie ścieki miejskie i przemysłowe, spływy z wód z obszarów zurbanizowanych, pyły i aerozole przemysłowe, wody kopalniane, a także odcieki ze składowisk odpadów oraz transport drogowy. Najwyższe stężenia jonów metali ciężkich notuje się w ściekach przemysłu wydobywczego, elektrochemicznego, metalurgicznego, obróbki powierzchniowej metali, a także z zakładów celulozowo – papierniczych, hut i galwanizerni [1]. Większość metali zaliczana jest do tzw. mikroelementów i jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Na przykład miedź bierze udział w budowaniu tkanki łącznej i kostnej oraz jest niezbędna w procesach metabolizmu lipidów i tkanki nerwowej oraz syntezy hemoglobiny.

Notowane coraz wyższe stężenia metali ciężkich działają toksycznie, a nawet letalnie na organizmy żywe. Toksyczność ta wynika głównie ze stopnia wydalania i wchłaniania metali przez żywe organizmy (akumulacja) oraz stężenia w środowisku. Głównym problemem jest możliwość ich włączenia do poszczególnych ogniw łańcucha pokarmowego i kumulacja w organizmach. Ponadto metale, poprzez zachwianie równowagi pierwotnego stanu ekosystemów, stają się również zagrożeniem dla zdrowia i bytu populacji ludzkiej [2].

W związku z tym istnieje potrzeba usuwania nadmiaru metali ciężkich ze środowiska, głównie z gleby i z wody. Konwencjonalne metody, w tym głównie fizyczne i chemiczne jak: odparowywanie, odwrócona osmoza, chemiczne wytrącanie, wymiana jonowa, są zazwyczaj mało efektywne, bardzo kosztowne lub generują niebezpieczne odpady [3].

W ostatnich latach wzrasta ilość badań nad wykorzystaniem organizmów żywych, jak i martwej biomasy, jako sorbentów metali ciężkich ze środowiska wodnego, glebowego, z powietrza oraz ze ścieków. Jako biosorbenty stosuje się głównie: bakterie, grzyby, mszaki, widłaki, glony zielone oraz sinice [4, 5, 6].

Różnorodność stosowanych do biosorpcji mikroorganizmów, wynika głównie z różnic w ich budowie, preferencji środowiskowych czy fizjologii i związanymi z nią mechanizmami umożliwiającymi sorpcję. Na efektywność biosorpcji ma wpływ szereg czynników: budowa biosorbenta, stężenie biosorbenta, stężenie sorbatu, pH, temperatura, jednorodność roztworu, objętość roztworu.

Często stosowny w procesach biosorpcji jest szczep *Bacillus subtilis*. Naturalnym środowiskiem występowania tych mikroorganizmów jest gleba. Dzięki zdolności do wytwarzania endospor, może przetrwać w najbardziej niesprzyjających warunkach i rozprzestrzeniać się w środowisku. W obronie przed organizmami konkurencyjnymi, bakterie te potrafią wydzielać antybiotyki (subtilina) lub toksyny, powodując śmierć innych komórek. Bakterie tego rodzaju odgrywają ogromną rolę w obiegu węgla i azotu w przyrodzie, uczestnicząc w mineralizacji materii organicznej, poprzez degradację biopolimerów. Szczep *Bacillus subtilis* jest zdolny do usuwania jonów metali ciężkich ze środowiska. Ponadto jest bezpieczny dla człowieka, gdyż posiada status GRAS (Generally Recognized as Safe), który został przyznany przez Światową Komisję Żywności i Leków (FDA) [7]. Zdolność do biosorpcji w połączeniu z brakiem patogenności dla człowieka, wpływa na rozszerzenie badań z udziałem *Bacillus subtilis* w zakresie usuwania metali ciężkich z wody.

2. Metodyka badań

Proces biosorpcji przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. Do doświadczeń wybrano jako sorbat - miedź, jako sorbent – żywe komórki szczepu bakterii *Bacillus subtilis*.

Zgodnie z zaleceniami producenta, zliofilizowaną próbkę kultury wzorcowej ożywiono, poprzez przeniesienie na stałe podłoże agarowe i inkubację w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Mikroorganizmy przechowywano w temperaturze 4 °C. Do doświadczeń stosowano mikroorganizmy namnożone na pożywce bulionowej. Roztwory miedzi o stężeniach 5 – 800 ppm przygotowywano rozpuszczając odpowiednie naważki 3-hydratu azotanu miedzi (II) w wodzie destylowanej i sterylizację w temperaturze 121⁰C przez 10 minut.

Stężenie letalne jonów miedzi Cu^{2+} wyznaczono wprowadzając zawiesinę bakterii *B. subtilis* do roztworów miedzi o różnych stężeniach (50 – 800 ppm), na określony czas (60 minut). Ilość żywych komórek, w poszczególnych roztworach, określano za pomocą metody płytkowej i podawano jako ilość jednostek tworzących kolonie [jtk]. Próby wykonano w dwóch powtórzeniach.

Do określenia optymalnego czasu biosorpcji wykorzystano roztwory o stężeniach 30, 60 i 120 ppm. Do każdego z nich wprowadzono po 10 cm^3 zawiesiny bakteryjnej w pożywce bulionowej i wytrząsano (70 obr./min.). Maksymalny czas kontaktu komórek bakteryjnych z jonami miedzi wynosił 300 minut. Po upływie określonych czasów pobierano po 5 cm^3 roztworu, który następnie sączono przez sączek molekularny. Oznaczono stężenie jonów miedzi w przesączu za pomocą testu Copper Spectroquant Merc. Optymalną temperaturę biosorpcji dla żywych komórek *Bacillus subtilis* wyznaczono poprzez umieszczenie komórek bakteryjnych (10 cm^3 zawiesiny) w roztworach (50 cm^3) o stężeniu 50 ppm każdy i inkubowano w temperaturach optymalnych dla kriofile (4 °C), psychrofile (15 i 20 °C) i mezofile (25 i 37 °C) przez 15 minut.

Wyznaczanie ilości zaadsorbowanego metalu przez komórki bakteryjne, w zależności od stężenia początkowego (zakładane stężenia początkowe: 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 ppm), przeprowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 250 cm^3 . Do 50 cm^3 sterylnych roztworów azotanu miedzi przenoszono, w warunkach aseptycznych, po 10 cm^3 zawiesiny bakterii *Bacillus subtilis* i mieszało zachowując temperaturę 37°C. Stężenie jonów miedzi przed i po procesie biosorpcji oznaczano spektrofotometrycznie wykorzystując test Copper Spectroquant Merc oraz za pomocą spektrometru rentgenowskiego PICOFOX. Dodatkowo wykonywano pomiary pH roztworów przed i po procesie biosorpcji. Proces biosorpcji przeprowadzono w warunkach optymalnych dla zastosowanego szczepu bakteryjnego: temperatura 37°C, pH na poziomie 6,5. Na podstawie uzyskanych wartości stężenia jonów miedzi przed i po procesie biosorpcji, obliczono ilość jonów zasorbowanych Q według wzoru:

$$Q = ((C_o - C_b) \cdot V)/m \quad (1)$$

gdzie: C_o – początkowe stężenie jonów metalu w roztworze
 C_b – stężenie jonów metalu po procesie biosorpcji
 V – objętość roztworu
 m – biomasa

Ilość biomasy sorbującej jony miedzi, określono stosując dwie metody:

1. klasyczną metodę płytkową, gdzie ilość mikroorganizmów wyznaczały jednostki tworzące kolonie (jtk); ilość biomasy obliczono ze wzoru:

$$M_b = L \cdot M_k \quad (2)$$

gdzie: M_b – biomasa [mg]
 L – liczba jednostek tworzących kolonie [jtk]
 M_k – masa pojedynczej komórki bakteryjnej [mg]

2. metodę oznaczania węgla organicznego z wykorzystaniem analizatora TOC Innovox, skąd uzyskane wartości [mg/dm^3] wykorzystano do obliczenia biomasy:

$$M_b = (\text{TOC}/U_c) \cdot M_k \quad (3)$$

gdzie: TOC – zawartość węgla organicznego w zawieszynie [mg/dm^3]
 U_c – udział węgla w komórce bakteryjnej [mg]
 M_k – masa pojedynczej komórki bakteryjnej [mg]

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Odporność *Bacillus subtilis* na wysokie stężenia jonów miedzi

Wyniki badań odporności bakterii *Bacillus subtilis* na poszczególne stężenia jonów miedzi przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Ilość jednostek tworzących kolonie dla szczepu *Bacillus subtilis*, poddanego działaniu różnych stężeń jonów miedzi (Cu^{2+})

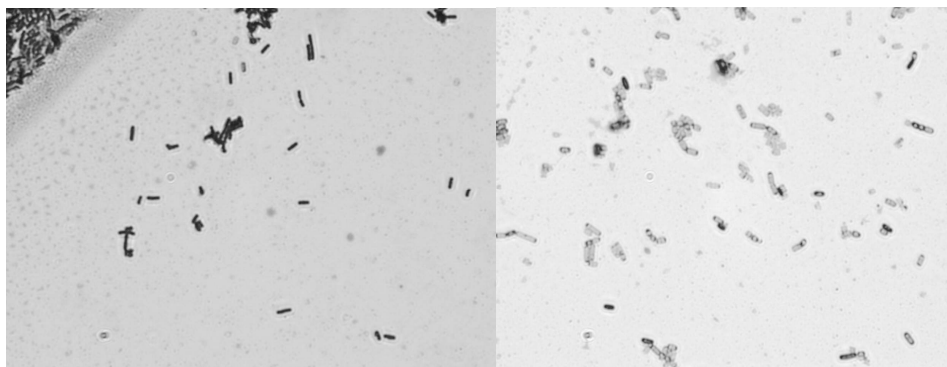
Tab. 1. Number of colony forming units of *Bacillus subtilis* strain, treated with various concentrations of copper ions (Cu^{2+})

Stężenie jonów miedzi Cu^{2+} [ppm]:	Ilość bakterii [jtk/cm ³]:	
	I	II
kontrola (bez jonów miedzi)	>300	>300
50	>300	>300
100	>300	>300
200	140	260
400	2	6
800	0	0

Szczep *Bacillus subtilis* wykazuje wysoką odporność na działanie jonów miedzi (Cu^{2+}) w stężeniach 50 i 100 ppm, o czym świadczy znaczna liczba wyrosłych kolonii (>300). Spadek liczebności kolonii, równoznaczny ze spadkiem ilości żywych komórek, zaobserwowano dopiero przy stężeniu 200, 400 i 800 ppm, z tym że przy stężeniu 400 ppm odnotowano bardzo dużą wrażliwość szczepu na jony miedzi (tylko nieliczne żywe komórki utworzyły kolonie). Stężenie jonów miedzi 800 ppm okazało się stężeniem letalnym. Dane literaturowe wskazują na zróżnicowaną reakcję mikroorganizmów na metale ciężkie. Różna reakcja drobnoustrojów na metale ciężkie wynika z różnic gatunkowych, warunków fizyczno-chemicznych, odmiennych układów enzymatycznych [8, 9]. Toksyczny wpływ metali ciężkich na drobnoustroje polega najczęściej na zahamowaniu wzrostu lub spadku liczebności i biomasy drobnoustrojów, a nasilenie tych procesów związane jest z wartościowością metali, ich formą, rozpuszczalnością, stężeniem oraz czynnikami środowiska [10].

Badania przeprowadzone na promieniowcach wykazały, że minimalne stężenia jonów metali, hamujące wzrost tych organizmów, wynoszą 100 ppm [11]. Wartości EC_{50} dla bakterii *Pseudomonas aeruginosa* wynoszą ok. 450 ppm, natomiast dla bakterii *Citrobacter freundii* EC_{50} wynosi tylko 50 ppm, czyli są to mikroorganizmy dużo bardziej wrażliwe na podwyższone stężenia jonów miedzi [12].

Potwierdzeniem negatywnego wpływu wysokich stężeń jonów miedzi na komórki badanego szczepu jest ich obraz mikroskopowy. Barwienie komórek *Bacillus subtilis* metodą Grama unaocniło znaczny udział form przetrwalnych dopiero wśród komórek poddanych działaniu roztworu o stężeniu jonów miedzi Cu^{2+} 200 ppm (fot. 1, 2).



Fot. 1 i 2. Komórki wegetatywne *Bacillus subtilis* po procesie biosorpcji w roztworze o stężeniu jonów miedzi 50 ppm (z lewej), oraz formy przetrwalne po procesie biosorpcji w roztworze o stężeniu jonów miedzi 200 ppm (z prawej)

Pic. 1 & 2. *Bacillus subtilis* vegetative cells after the biosorption process in solution at a concentration of 50 ppm of copper ions (left picture) and the endospores after biosorption process in solution at a concentration of 200 ppm of copper ions (right picture)

3.2. Ustalanie optymalnej temperatury dla przebiegu biosorpcji z udziałem *B. subtilis*

Po przeprowadzeniu doświadczenia stwierdzono wpływ temperatury na efektywność usuwania jonów miedzi z roztworu wodnego. Zdecydowaną redukcję jonów miedzi z udziałem *B. subtilis* zaobserwowano w temperaturze 20°C. Jak podaje Nylanjana i in. [13] Temperatura w zakresie 20 – 35°C nie ma większego wpływu na przebieg procesu biosorpcji co potwierdzają też uzyskane wyniki (tabela 2). W temperaturach od 5 do 15°C stężenie jonów Cu^{2+} spadło nieznacznie. Zauważalny wpływ temperatury na ilość jonów miedzi wiązanych przez *Bacillus subtilis* w procesie biosorpcji, świadczy o zależności tego procesu od metabolizmu komórkowego. Jony miedzi są aktywnie sorbowane przez komórki badanego szczepu w optymalnych dla ich funkcjonowania warunkach temperaturowych. Dla *Bacillus subtilis* optymalna temperatura rozwoju wynosi 37°C, więc jest to typowa bakteria mezofilna [7]. Obniżenie temperatury powoduje spowolnienie bądź zahamowanie procesów metabolicznych w tym również procesu sorpcji aktywnej. Obniżenie temperatury tylko o 5°C od temperatury optymalnej, skutkowało znacznym obniżeniem efektywności biosorpcji (tabela 2). Dla różnych mikroorganizmów wykorzystywanych w biotechnologii do usuwania jonów metali ciężkich, optymalne temperatury rozwoju nie pokrywają się z optymalnymi temperaturami biosorpcji. Dla szeroko wykorzystywanej biotechnologicznie mezofilnej bakterii *Thiobacillus ferrooxidans* optymalna temperatura przeprowadzania biosorpcji miedzi wynosi 40 °C [14].

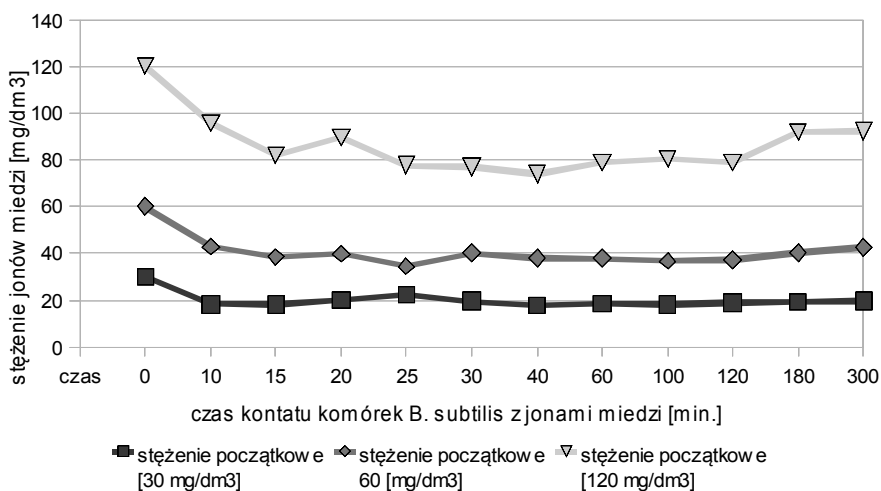
Tab. 2. Efektywność biosorpcji w zależności od temperatury

Tab. 2. Biosorption efficiency depending on the temperature

Temperatura [°C]	Stężenie jonów miedzi Cu ²⁺ [ppm]		Redukcja jonów miedzi Cu ²⁺ [%]
	początkowe	po biosorpcji	
5	50	47,1	5,8
15	50	48,3	3,4
20	50	42,8	14,4
25	50	43,5	13
37	50	43,7	12,6

3.3. Określenie optymalnego czasu trwania biosorpcji

Wartości stężeń jonów miedzi w roztworach o różnych stężeniach początkowych, po procesie biosorpcji, przedstawiono na wykresie 1. Komórki badanego szczepu najefektywniej adsorbowały miedź w pierwszych 15 minutach trwania procesu biosorpcji. Po 20 minutach kontaktu komórek *Bacillus subtilis* z jonami metalu wartości stężeń miedzi zaczęły wzrastać, co prawdopodobnie jest wynikiem uruchomienia się mechanizmów obronnych bakterii, polegających na aktywnym usuwaniu jonów metali z komórki. Leung i inni [15] podają, że stosując bakterie *Pseudomonas pseudoalcaligenes* uzyskano 50% ubytek miedzi z roztworu już po 10 minutach trwania procesu. Także w badaniach z zastosowaniem komórek sinic *Microcystis aeruginosa* najlepsze efekty usuwania jonów miedzi uzyskano w pierwszych kilkunastu minutach prowadzenia procesu [16].

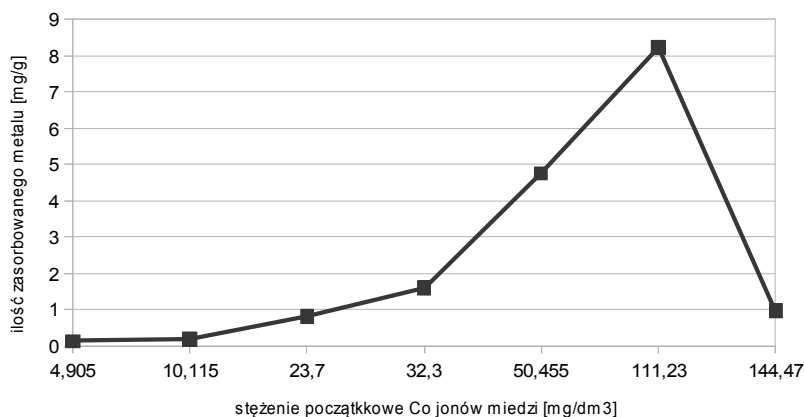


Rys. 1. Dynamika zmian stężenia jonów miedzi pod wpływem działania mikroorganizmów *Bacillus subtilis*

Fig.1. The dynamics of changes in concentration of copper ions by the action of microorganisms *Bacillus subtilis*

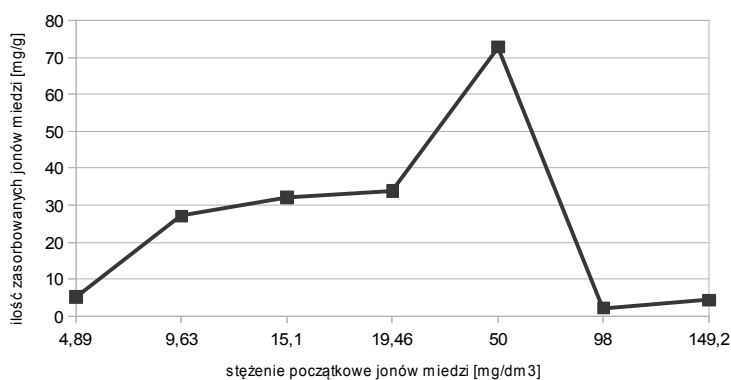
3.4. Efektywność procesu biosorpcji

Zależność efektywności biosorpcji (ilości zaabsorbowanego metalu) od początkowego stężenia jonów miedzi w badanych roztworach przedstawiono na wykresie 2 i 3. Zauważono spadek stężenia jonów miedzi Cu^{2+} , co oznacza, że badany szczep wykazuje zdolność ich usuwania z roztworów wodnych. Potwierdza to również wzrost wartości pH w roztworach po biosorpcji (wykres 4). Najwyższe ubytki jonów miedzi na poziomie 25 i 27% zanotowano dla stężeń początkowych 50 i 100 ppm.



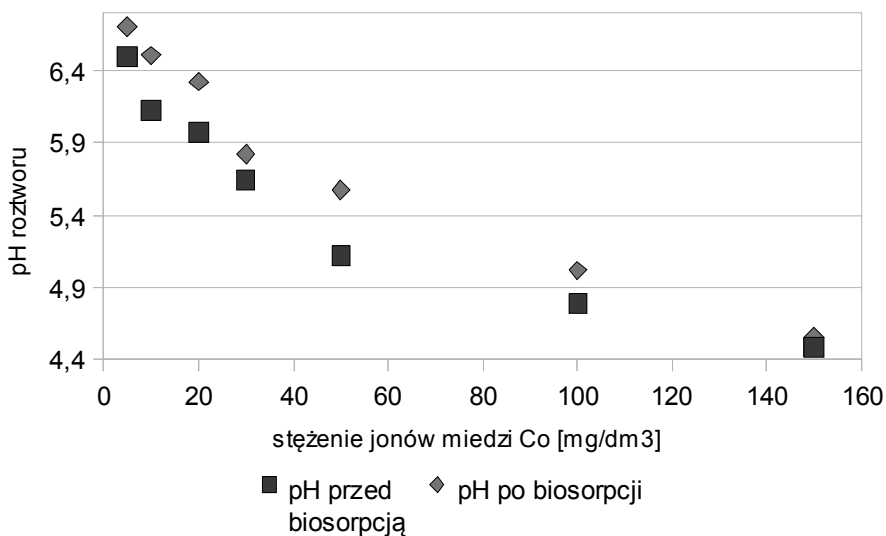
Rys. 2. Zależność ilości zasorbowanego metalu [Q] od stężenia początkowego roztworu [C₀]. Ilość jonów miedzi oznaczano za pomocą spektrometru rentgenowskiego PI-COFOX; ilość biomasy oznaczono za pomocą analizatora TOC na poziomie 133,7 mg/dm³

Fig.2. The dependence of the quantity of metal zasorbowanego [Q] on the concentration of the initial solution of [C₀]. The amount of copper ions was determined by X-ray spectrometer PICOFOX; quantity of biomass was determined by TOC analyzer at 133.7 mg/dm³



Rys. 3. Ilość zaabsorbowanego metalu w zależności od stężenia początkowego roztworu (jony miedzi oznaczano za pomocą testu Spektroquant Merck; ilość biomasy oznaczono metodą płytkową - 4,672mg/dm³)

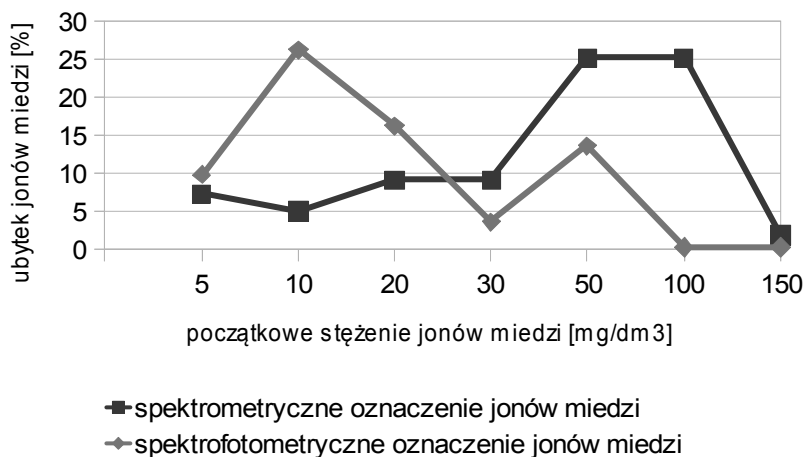
Fig3. The amount of metal absorbed depending on the initial concentration of the solution (copper ions measured by a test Spektroquant Merck; quantity of biomass was determined by plate count - 4.672 mg/dm³)



Rys. 4. Zmiany pH dla roztworów jonów miedzi przed i po biosorpcji

Fig.4. Changes in pH of the solutions of the copper ions before and after the biosorption

Według Hassen i in. żywe komórki *Bacillus thuringiensis* sorbują 34% jonów miedzi z roztworu, przy czym czas kontaktu mikroorganizmów z jonami metalu to 48 godzin [17]. Przy krótszym czasie (15 minut) wartości te sięgają 25% [18]. Podobne ubytki jonów miedzi otrzymano w przeprowadzonych doświadczeniach. Po 15 minutach procesu, zanotowano spadki ilości jonów miedzi w roztworach nawet powyżej 25% (wykres 5). Najefektywniej proces przebiegał dla stężenia początkowego 50 ppm. Najlepsza sorpcja jest wyznaczona dla stężeń początkowych do 50 ppm oraz powyżej 120 ppm. Równie niskie wartości, na poziomie do 6,5%, otrzymywał Babak i in. w przeprowadzonych badaniach nad biosorpcją miedzi z udziałem *Geobacillus thermocatenulatus*, właśnie dla stężeń powyżej 100 mg/dm³ [19]. Duże rozbieżności w procentowych wartościach zaadsorbowanych jonów miedzi wynikają z różnych metod oznaczania tych jonów. Wyższe wartości odpowiadają oznaczeniom z zastosowaniem testu Copper Spectroquant Merck. Wyższe wartości notowano dla prób oznaczanych za pomocą spektrometru rentgenowskiego PICOFOX. Jego zastosowanie spektrometru rentgenowskiego umożliwia oznaczenie wszystkich jonów miedzi, łącznie z tymi związanymi w kompleksach. Test miedziowy pozwala na oznaczenie tylko wolnych jonów miedzi.



Rys. 5. Ilość zaabsorbowanego metalu w zależności od stężenia początkowego roztworu w procentach

Fig.5. The amount of metal absorbed depending on the initial concentration of the solution in percent

Do oceny efektywności procesu biosorpcji wartości biomasy wyznaczano 2 metodami. Metoda płytkowa dała wyniki znacznie niższe od metody z zastosowaniem analizatora węgla organicznego. Odpowiednio były to wartości 4,672 mg/dm³ oraz 133,7 mg/dm³. Potwierdzałyby to doniesienia o tym, iż na garze odżywczym rozwija się tylko od 2-10% mikroorganizmów znajdujących się w badanej próbce [20].

W porównaniu z innymi mikroorganizmami ilość usuwanej miedzi jest stosunkowo niska. Może to być spowodowane wykorzystaniem żywych mikroorganizmów, których komórki w reakcji na wyższe stężenie metalu bądź długi czas ekspozycji uruchamiają mechanizmy obronne (aktywne usuwanie metali z komórki lub produkcja metabolitów ograniczających dostępność metali dla komórek).

W roztworach o niższych stężeniach jonów miedzi zaobserwowano większe ilości zaabsorbowanego metalu niż dla roztworów o stężeniach wyższych. Ograniczenia zdolności sorpcyjnej przy wyższych stężeniach są spowodowane wysyceniem miejsc aktywnych (grup funkcyjnych) znajdujących się na ścianie komórkowej bakterii, które wiążą jony miedzi. Spadek zdolności sorpcyjnej wraz ze wzrostem stężenia jonów metalu może być powiązany również ze wspomnianymi wcześniej mechanizmami obronnymi komórek bakteryjnych. Ponadto badany szczep wykazuje pełną aktywność metaboliczną w stężeniach jonów miedzi do około 100 ppm. Podobne wartości dla tego samego szczepu uzyskiwał [21].

Stosunkowo niewielkie ilości zaabsorbowanego metalu dla stężeń początkowych 5 i 10 mg/dm³ wynikają z mniejszej dostępności niewielkich ilości jonów w stosunku do objętości roztworu dla wykorzystywanych mikroorganizmów. W związku ze spadkiem ilości zaabsorbowanego metalu w wysokich jego stężeniach można wnioskować, że biosorpcja ma charakter zależny od metabolizmu.

Wartości pH sporządzonych roztworów miedzi maleją wraz ze wzrostem stężenia jonów Cu^{2+} . Wynika to z większych dawek tri hydratu azotanu (V) miedzi (II), który ma odczyn kwaśny. Wartości pH dla roztworów wyjściowych są niższe niż dla roztworów po biosorpcji. Prawdopodobnie to potwierdza ubytek jonów miedzi z roztworów w procesie biosorpcji.

4. Wnioski

1. Jony miedzi w stężeniach od 200 mg/dm^3 działały hamująco na rozwój bakterii *Bacillus subtilis*
2. Optymalną dla procesu biosorpcji jonów miedzi z udziałem badanego szczepu bakterii jest temperatura 20°C .
3. Komórki *Bacillus subtilis* najefektywniej adsorbowały miedź w pierwszych 15 minutach trwania procesu. Po 20 minutach kontaktu wartości stężeń miedzi zaczęły wzrastać, co prawdopodobnie jest wynikiem uruchomienia się mechanizmów obronnych bakterii.
4. Niskie stężenia jonów miedzi Cu^{2+} nie sprzyjają efektywnej biosorpcji z powodu małej dostępności jonów metali dla komórek bakteryjnych.
5. Metoda płytkowa daje wyniki ilości biomasy znacznie niższe od metody z zastosowaniem analizatora węgla organicznego
6. Bakterie *Bacillus subtilis* wykazywały zdolność usuwania jonów miedzi z roztworów wodnych w ilości ok. 25%. Najefektywniej proces przebiegał dla stężenia początkowego 50 ppm.

Bibliografia

- [1] *Seńczuk W. (red.): Toksykologia, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999*
- [2] *Urbańska M.: Biosorpcja z wykorzystaniem biomasy alg jako metoda usuwania jonów $\text{Cr}(\text{VI})$ i $\text{Cr}(\text{III})$ ze ścieków przemysłowych. przegląd naukowy, *Inżynieria i kształtowanie środowiska*, nr 61, 2013: 323–335 (prz. nauk. inż. kszt. środow. 61, 2013)*
- [3] *Al-qodah Z.: Biosorption of heavy metals ions from aqueous solutions by activated sludge. *Desalination*, 196, 2006, 164–176.1*
- [4] *Uluozlu O.D., Sari A., Tuzen M., Soylak M.: Biosorption of $\text{Pb}(\text{II})$ and $\text{Cr}(\text{III})$ from aqueous solution by lichen (*Parmelina tiliaceae*) biomass. *Bioresource technology*, 99, 2008, 2972–2980*
- [5] *Urbańska M., Kłosowski G.: Algi jako materiał biosorpcyjny – usuwanie i odzysk metali ciężkich ze ścieków przemysłowych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 2012 51: 62–77.*
- [6] *Vijayaraghavan K., Yun Y.: Bacterial biosorbents and biosorption *Biotechnology Advances* 26 (2008) 266–291*
- [7] *Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna t. 2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.*

- [8] Insam H., Hutchinson T.C., Reber H.H.: 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.* 28, 691–94.
- [9] Słaba M., Długoński J.: 2002. Mikrobiologiczne usuwanie i odzyskiwanie metali ciężkich. *Post. Mikrobiol.* 41, (2), 167–183.
- [10] Wyszowska J., Zaborowska M.: 2002. Aktywność enzymów w glebie zanieczyszczonej cynkiem. [W:] *Rola drobnoustrojów w kształtowaniu środowiska*. Red. Wyszowska J., Jastrzębska E., UWM Olsztyn, s.125.
- [11] Lenart – Boroń A., Boroń P., Banach T., Wpływ wybranych metali ciężkich na wzrost i namnażanie promieniowców z rodzaju *Streptomyces* z izolowanych z gleb. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 2013, 16, nr 1, s. 8191
- [12] Hassen A, Saidi N., Cherif M, Boudabous a. effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresouce technology*. 1998;65:73– 82.
- [13] Nilanjana D., Vimala R., Karhtika P.: Biosorption of heavy metals – an overview, *Indian Journal of Biotechnology* 2008, vol. 7, pp. 159-169
- [14] Hossain S. M., Anantharaman N.: Studies on copper (II) biosorption using *Thiobacillus ferrooxidans*, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 2005, vol. 40, 3, pp 227-234.
- [15] Leung Wa. C., Chua H., Lo W.: Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 91-92, pp. 171-184..
- [16] Subhashree P., Rai L. C.: Copper removal by immobilized *Microcistis aeruginosa* in continuous flow columns at different bed heights: study of the adsorption/desorption cycle, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, vol. 17, pp. 829-832.
- [17] Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. , 64:7–15
- [18] Boyer A, Magnin J.P., Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. *Biotechnol. Lett.*, 1998;20(2):187–90.
- [19] Babák, P., Šupinová M., Zichová M., Burdychová R. , Vitová E., Biosorption of Cu, Zn and Pb by thermophilic bacteria – effect of biomass concentration on biosorption capacity, *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2012, vol. 60, no.5, s. 9-18
- [20] Siebel E., Wang Y., Egli T., Hammes F., Correlation between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial of drinking water. *Drinking Water Engineering and Science*, 2008,1,1-6
- [21] Sivaprakash A., Aravindhan R., Raghavarao J., Unninair B., Kinetics and equilibrium studies on the biosorption of hexavalent chromium from aqueous solutions using *Bacillus subtilis* biomass. *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 2009, 7: 45–57.
- [22] Tuzena M., Meleka E., Soylyk M.: Solid-phase extraction of copper, iron and zinc ions on *Bacillus thuringiensis israelensis* loaded on Dowex optipore V-493, *Journal of Hazardous Materials* 2008 vol.158, s. 335-341

- [23] Pagnanelli F., Petrangelli M., Toro L., Trifoni M., Veglio F.: Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp.: Biomass characterization and biosorption modeling. *Environmental Science & Technology*, 2000, vol. 34, no. 13, s.2773-2778
- [24] Pagnanelli, F. et al., 2003: Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus natans*: Langmuir-type empirical model. *Water Research.*, 37, 3: 627–633. ISSN 0043-1354.
- [25] Ozturk, A., Artan, T., Ayar, A., 2004: Biosorption of nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Colloids surf B Biointerfaces*, 34, 2: 105–111. ISSN 0927-7765.

