한국환경농학회지 제24권 제4호 (2005)
Korean Journal of Environmental Agriculture Vol. 24, No. 4, pp. 379-385

연구보문

중금속으로 오염된 토양에서 분리한 중금속 내성 미생물의 수용액내 중금속 흡착

김성은 · 최익원[1] · 서동철[2] · 한명훈 · 강병화 · 허종수[2] · 손보균 · 조주식*

순천대학교 생명환경과학부, [1]오사카부립대학 화학공학과, [2]경상대학교 응용생명과학부

(2005년 7월 2일 접수, 2005년 12월 19일 수리)

Biosorption of Heavy Metal in Aqueous Solution by Heavy Metal Tolerant Microorganism Isolated from Heavy Metal Contaminated Soil

Sung-Un Kim, Ik-Won Choi[1], Dong-Cheol Seo[2], Myung-Hoon Han, Byung-Hwa Kang, Jong-Soo Heo[2], Bo-Kyoon Shon, and Ju-Sik Cho* (Division of Applied life and Environmental Sciences, Sunchon National University, 315, Maegok-dong, Sunchon, 540-742, Korea, [1]Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University, Sakai, 599-8531, Japan, [2]Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, 900, Gajwa-dong, Jinju, 660-701, Korea)

ABSTRACT: This study was conducted to find out a useful bioremediation technology for heavy metal contaminated soil and water. We isolated strain CPB from heavy metal contaminated soil and evaluated the tolerance level and adsorption capacity of strain CPB to heavy metals (Strain is not determined yet). Strain CPB showed variable tolerance limit to different kinds heavy metal or concentrations of heavy metals. The growth of strain CPB was significantly inhibited by mixed heavy metals (Cd+Cu+Pb+Zn) than that of by single heavy metal. Strain CPB showed high binding capacity with Pb (Pb>Cd>Cu>Zn). In general, strain CPB showed high uptake of heavy metals such as Pb, Cd and Cu. It was obseved that the capacity of heavy metal uptake from mixture of heavy metals was reduced in comparison with single heavy metal treatment. But total contents of heavy metal bound with cell in mixed heavy metal showed higher than in single heavy metal treatment. Heavy metal adsorption in cells was affected by several external factors, such as temperature and pH etc.. The optimum temperature and pH of the adsorption of heavy metal into cells were ca. 25~35℃ and pH ca. 5~7, respectively. A large number of the electron dense particles were found mainly on the cell wall and cell membrane fractions, which was determined by transmission electron microscope. Energy dispersive X-ray spectroscopy revealed that the electron dense particles were the heavy metal complexes the substances binding with heavy metals.

Key Words: Biosorption, heavy metal tolerance, electron dense particles, heavy metal complexes

서 론

최근 활발한 산업 활동으로 인한 자연계, 특히 수계에 유입되는 중금속 양의 증가는 생태계를 위협하고 있다. 이를 해결하기 위한 전통적 물리·화학적 처리 방법으로는 침전법, 이온교환법, 흡착법, 산화환원법, 전기분해법 등이 있으나 이는 처리효율이 매우 낮고 처리부산물로 다량의 슬러지가 생성되는 등 이차오염물의 방출 및 사회·경제적으로 많은 문제점을 야기 시키고 있다[1,2]. 따라서 이러한 물리화학적 처리방법을 대체 할 수 있는 방법으로 생물학적 처리방법이 대두되고 있는데, 미생물과 같은 생물체에 물리 화학적으로 중금속이 흡착되는 것을 생체 흡착(biosorption)이라 한다. 이는 미생물을 이용한다는 점에서 미생물학적 처리법으로 분류 할 수도 있으며, 미생물의 신진대사를 이용하지 않고 음이온으로 하전된 미생물 자체의 특성을 이용하면 이온교환수지나 활성탄처럼 흡착공정의 흡착제로 가능하다는 것이다[3]. Yeasts, bacteria, fungi 및 algae와 같은 미생물이 어떤 다른 물질보다 중금속을 잘 축적 할 수 있다고 오래전부터 보고되고 있다[4-7]. 그 이유는 다당류, 단백질 및 지방질로 구성된 미생물 세포벽의 carboxylate, hydroxyl, sulphate, phosphate 및 amino 기가 중금속을 흡착 할 수 있기 때문이다[8]. 미생

*연락저자:
Tel: +82-61-750-3297 Fax: +82-61-752-8011
E-mail: chojs@sunchon.ac.kr

물에 의한 중금속 이온의 제거는 물리, 화학 및 생물학적 상호작용에 기인하며, 중금속 제거의 메카니즘은 음하전을 가지는 세포벽 성분 혹은 점액질로 구성된 세포외벽으로의 흡착, 세포내 단백질과 화합물 형성, 세포 내 효소에 의한 불용화(산화, 환원, 메틸화, 탈메틸화)등으로 볼 수 있다. 이러한 생체흡착현상은 이온교환 및 활성탄 흡착과 유사하며 미생물의 종류 및 중금속의 종류에 따라 흡착성능이 다르다[3]. 생체흡착법은 가격이 저렴하고 미생물의 종류에 따른 특정 중금속을 선택적으로 흡착하는 성질을 가지고 있으며[5], 흡착이 진행되는 시간 또한 1시간 이내로 대단히 빨라 단시간 내에 많은 양의 중금속 함유 폐수를 처리할 수 있어 경제적이다[9]. 또한 중금속의 선택적인 제거가 가능하며, pH에 대한 사용범위가 넓고 상온에서 조작되므로 비용이 절감된다[10].

따라서 본 연구는 생물흡착기술을 이용하여 경제적이고 효율적인 bioremediation 기법 개발을 위한 기초자료를 확보하고자 자연계로부터 중금속에 대하여 강한 내성과 우수한 흡착능력을 동시에 가지고 있는 미생물 CPB를 분리하여 중금속 내성, 흡착 능력 평가 및 흡착특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에서 사용한 공시 중금속 내성균주는 경기도 화성시 봉담읍에 있는 폐광산(삼보광산)의 토양으로부터 분리하였다. 분리된 미생물은 현재 동정 중에 있어, 중금속 흡착 미생물을 CPB로 명명하였다.

미생물 배양을 위한 기본배지로는 LB broth(trypton 10 g ℓ^{-1}, NaCl 10 g ℓ^{-1}, yeast extract 10 g ℓ^{-1})를 사용하였고, 균주 보존을 위한 배지로는 NA medium(pepton 5 g ℓ^{-1}, beef extract 3 g ℓ^{-1}, agar 17 g ℓ^{-1})에 중금속이 100 mg ℓ^{-1}가 되게 하여 사용하였다.

균체의 수확 및 중금속 처리

중금속을 첨가하지 않은 기본배지 500 ㎖에 공시균주를 접종하여 진탕배양기에서 30℃, 160 rpm으로 48시간 배양한 다음 8,000 rpm(Hitachi G-21R)으로 5분간 원심분리 하여 균체를 회수한 후 멸균증류수로 3회 세척하여 배지 성분이 제거된 순수한 균체를 수확하였으며, 수확된 균체는 4℃에 냉장보관하면서 흡착실험에 사용하였다.

흡착 실험에 사용된 각 중금속 용액은 각 중금속 화합물($CuSO_4$, $CdSO_4$, $Pb(NO_3)_2$, $ZnSO_4$)을 중금속 농도가 10,000 mg ℓ^{-1}로 되도록 stock solution을 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

중금속에 대한 내성 조사

공시균주의 중금속에 대한 내성정도는 Ince 등[18]의 방법에 따라 단일중금속 및 복합중금속에 대한 농도별 내성정도를 조사하였다. 단일중금속(Cd, Cu, Pb, Zn)에 대한 농도별 내성정도는 중금속 이온농도가 각각 50, 100, 200 및 400 mg ℓ^{-1}이 되게 농도별로 첨가하고, 복합중금속(Cd+Cu+Pb+Zn)에 대한 중금속 농도별 내성정도는 중금속의 이온농도가 각각 10, 20 및 50 mg ℓ^{-1}이 되게 하여 공시균주 균체현탁액 1 ㎖(건조 균체량 약 100±5 mg)를 접종한 다음, 30℃, 100 rpm에서 진탕배양하면서 시간별로 분광광도계(Perkin Elmer, Lamda E2201, U. S. A)의 흡광도로서 생장도를 비교하였다.

중금속 흡착 특성

공시균주의 중금속 흡착 능력 조사는 Yan 등[11]의 방법에 따라 단일중금속과 복합중금속에서의 중금속 종류별 흡착 능력을 조사 하였다. 중금속을 첨가하지 않은 기본배지에서 48시간 배양 후 원심분리하여 회수한 균체현탁액 1 ㎖(건조 균체량 약 100±5 mg)을 단일중금속 Cd, Cu, Pb 및 Zn과 복합중금속(Pb+Cu+Cd+Zn)용액의 이온 농도가 각각 100 mg ℓ^{-1}씩 되게 조정한 중금속 용액 100 ㎖에 접종 한 후 30℃, 100 rpm으로 조정한 진탕 배양기에 24시간 흡착시킨 후 원심분리하여 상등액에 남은 중금속 잔존량을 비교하였다. pH에 따른 중금속 흡착 변화는 Sag 등[12]과 Bedell 등[13]의 방법에 따라 0.01M-Tris 완충용액에 중금속이 100 mg ℓ^{-1}의 농도로 첨가된 용액에 1N 혹은 0.1N NaOH와 H_2SO_4를 이용하여 초기 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 각각 조정한 후 균체현탁액 1 ㎖(건조균체량 약 100±5 mg)를 접종하여 진탕 배양기에서 24시간 흡착시킨 후 중금속 흡착 정도를 비교하였다. 온도 따른 중금속 흡착 변화는 Norberg 등[14]의 방법에 따라 중금속이 100 mg ℓ^{-1}의 농도로 첨가된 용액 100 ㎖에 균체현탁액 1 ㎖(건조균체량 약 100±5 mg)를 접종하여 10℃, 20℃, 30℃ 및 40℃로 조정된 진탕 배양기에서 24시간 흡착시킨 후 중금속 흡착정도를 비교하였다.

분석

중금속 농도 분석

균체내 흡착된 중금속함량과 용액내 남아있는 잔존량을 Kadukova 등[10]의 방법에 따라 전처리한 후 inductively coupled plasma atomic emission spectrometer(ICP-AES, Optima 3300DV, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 정량하였다.

전자현미경 관찰 및 EDS 분석

균체내 흡착된 중금속의 외형적인 흡착형태는 Tsezos 등[15], Say 등[16], KaduKová 등[17]의 방법에 따라 균체를 전처리하여 전자현미경으로 관찰하였다. 중금속이 첨가되지 않은 기본배지에서 배양한 균체와 중금속이 첨가된 기본배지에서 배양한 균체를 원심분리(8,000 rpm, 5 min)하여 회수한 다음 멸균 증류수를 이용하여 3회 세척 후 배지성분이 제거된 균체를 2.5% glutaraldehyde로 실온에서 2시간 전 고정시킨

후 1% osmium tetroxide로 24시간 후 고정시켰다. 이때 사용한 모든 시약의 희석은 0.1M 인산완충용액(pH 7.0)으로 하였으며 동일한 완충용액으로 세척하였다. 균체를 연속적으로 60, 70, 80, 90 및 100%의 ethanol로 탈수하고 propylene tetraoxide로 조직을 치환시킨 다음 Epon 812로 포매(embedding)하고 60℃ 건조기에서 24시간 중합시킨 후, ultramicrotome(ULTRACUT, Reicher-Jung)을 이용하여 0.35 μm 크기로 잘라 탄소 피복된 200 mesh 니켈 또는 구리 grid에 고정시켜 전자현미경(TEM, Hitachi H-600)으로 75KV에서 관찰하였으며, 무기원소의 분석은 TEM에 부착된 energy dispersive X-ray spectroscopy(EDS, Serial II, Noran, U. S. A.)로 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물 생장특성

중금속 내성미생물의 다양한 중금속 및 농도에 대한 내성은 다양한 환경에서도 중금속을 제거하는데 있어 중요한 요인 중 하나이다[18]. 따라서 공시균주의 중금속 종류별(Cd, Cu, Pb 및 Zn) 및 농도별(무(無)처리, 10, 20, 50, 100, 200 및 400 mg ℓ^{-1})로 수용액내 중금속이 단일로 존재할 때와 복합적(Cd+Cu+Pb+Zn)으로 존재하였을 경우의 중금속 내성을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 공시균주의 단일중금속에 대한 내성은 전반적으로 중금속 농도가 높을수록 유도기가 연장되고 생장에 약간의 저해를 받았으나, 무(無)처리와 비슷한 패턴의 생장도를 보였다. 또한 중금속 종류에 따라서도 내성정도에 차이가 있었으나 Cd 200 및 400 mg ℓ^{-1}에서 생장도가 약간 낮아진 것을 제외하고는 다른 중금속 Cu, Pb, Zn에 대해서는 400 mg ℓ^{-1}까지 중금속 농도에 대한 큰 영향 없이 높은 생장도를 보였다. 복합중금속에 대한 내성(Fig. 1(e))은 단일중금속에 비하여 유도기가 연장되고 생장도 저해되었으며, 50 mg ℓ^{-1}에서는 초기생장도가 크게 저해되었다. 미생물에 의한 중금속 내성 및 흡착 관한 연구 결과로는 Hassen A. 등[19]이 오염된 토양에서 중금속에 대한 내성을 가진 미생물을 분리하여 중금속에 내한 내성을 관찰 한 결과 Co = Cr > Zn > Cu > Hg 순으로, 그 중 중금속 Cu와 Cr에 대해 가장 높은 내성을 보였다고 하였으며, Verma T. 등[20]도 중금속으로 오염된 토양에서 분리한 미생물의 내성을 관찰한 결과 중금속 Cr에 대해 200 mg ℓ^{-1}까지의 내성을 보였다고 하여, 중금속의 종류, 농도 및 종에 따라 중금속에 대한 내성을 달리함을 알 수 있었다.

중금속 흡착 특성

중금속 흡착 능력

단일중금속(Cd, Cu, Pb, Zn이 각각 100 mg ℓ^{-1})과 복합중금속(Cd 100 mg ℓ^{-1}+Cu 100 mg ℓ^{-1}+Pb 100 mg ℓ^{-1}+Zn 100 mg ℓ^{-1})에서 중금속 종류별 흡착 능력을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 각 중금속이 단독으로 처리된 용액에서의 중금속 흡착량은 Pb가 97 mg g^{-1}로 다른 중금속에 비해 흡착량이 높았으며, 전체적인 중금속흡착은 Pb>Cd>Cu>Zn의

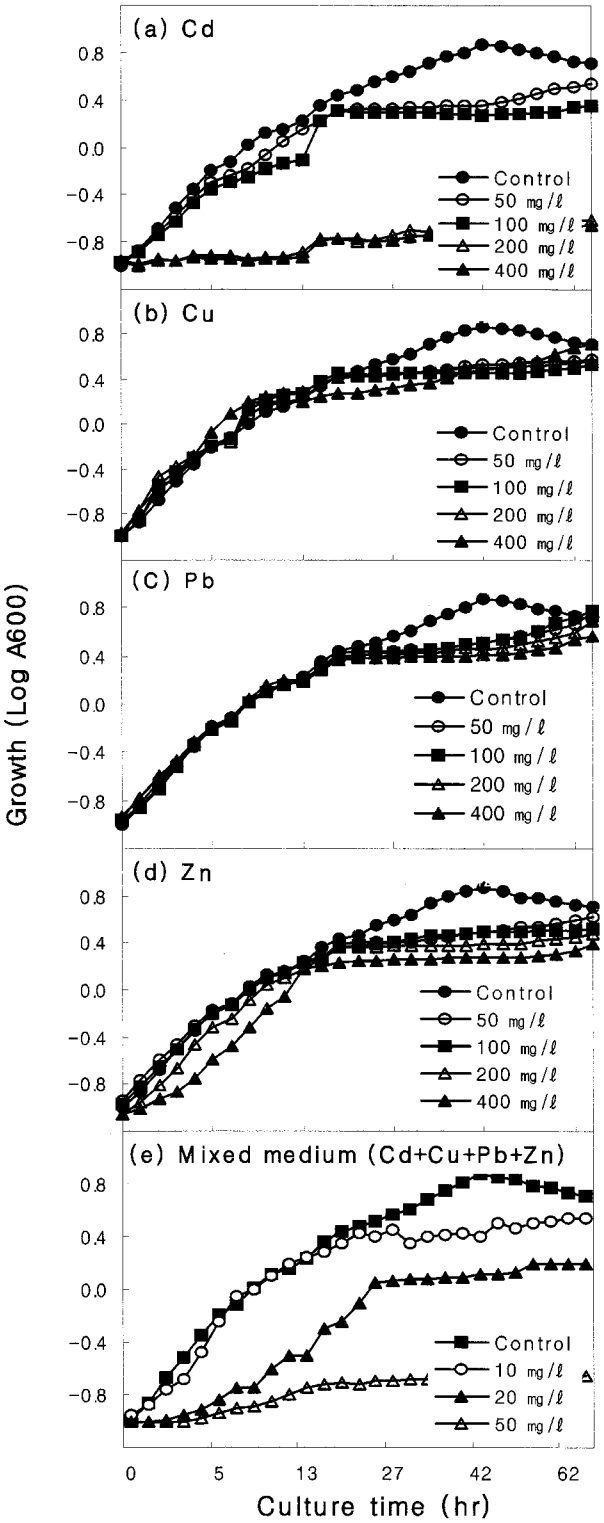

Fig. 1. Change of CPB activities in heavy metal treated media with the different rates.

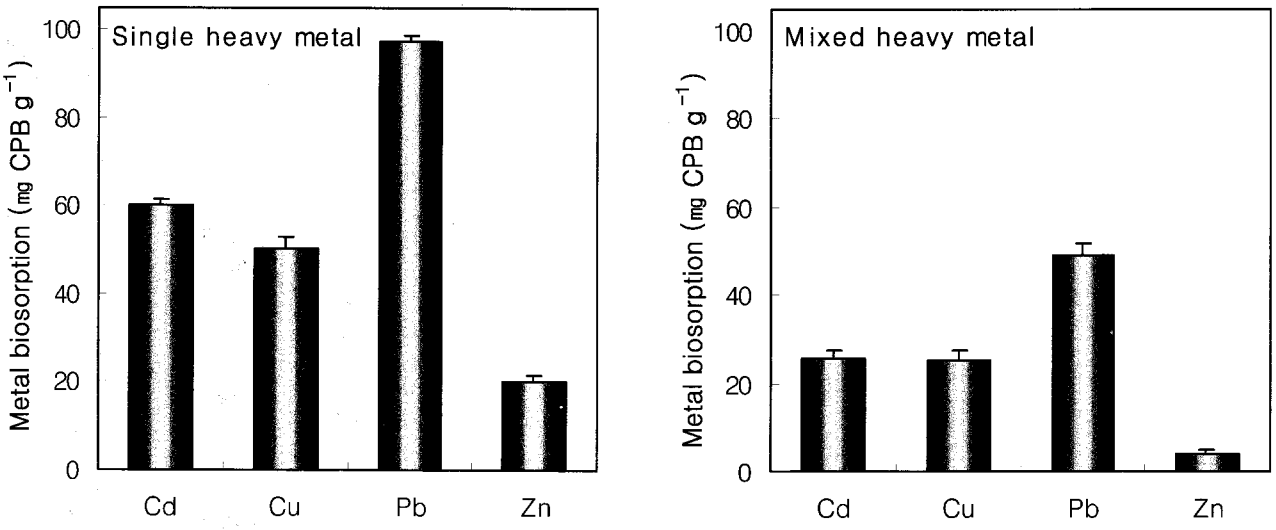

Fig. 2. Characteristics of heavy metal biosorption of strain CPB in single to mixed metal treated solution with 100 mg ℓ^{-1}.

순이였다. 복합중금속용액에서의 중금속 흡착양은 단일중금속용액에 비해 흡착량이 감소하였지만 중금속 흡착양상은 매우 비슷하였다.

용액내 여러가지 중금속 이온들이 공존해 있을 때 미생물에 의한 중금속 흡착은 각 중금속 이온들의 상호작용에 의해하여 흡착에 영향을 받게되는 것으로 알려져 있으며[11] 이러한 원인은 3가지로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째로는 생물 흡착제가 단일중금속 용액내에서보다 복합중금속 용액내에서의 중금속 흡착 능력이 더 증가 할 수 있으며(Synergism), 두 번째로는 단일중금속 용액내에서보다 복합중금속 용액내에서의 중금속 흡착 능력이 더 감소될 수 있으며(Antagonism), 마지막으로 단일중금속용액이든 복합중금속용액이든 간에 그 흡착능력에는 영향을 미치지 않을 수 있다(No interaction). 본 연구에서는 각각의 중금속흡착능력은 단일중금속용액내에서 보다 복합중금속용액내에서 흡착 능력이 감소되는 결과를 나타냈었다. 이러한 원인은 여러 가지 중금속이 복합처리된 용액내의 이온세기가 단일 중금속이 용해된 용액내의 이온세기보다 크고 동일용액내에 공존하는 여러 가지 중금속이온들이 미생물 세포내 중금속 결합부위에 대한 경쟁관계를 가지기 때문인 것으로 생각되었다[21].

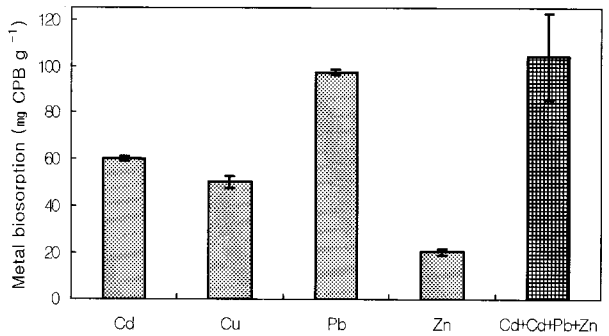

Fig. 3. Total biosorption content of heavy metals of strain CPB in single and mixed heavy metal treated solution with 100 mg ℓ^{-1}.

그러나 복합중금속용액에서의 각각의 중금속 흡착능력은 단일중금속 용액에서보다 감소되었지만, 균체내 흡착된 중금속의 총량은 더 증가된 것으로 타나났으며(Fig. 3), 이는 Yan 등[11]이 M. rouxii 바이오메스를 이용하여 단일중금속용액과 복합중금속용액내에서 중금속 흡착 총량을 비교 하였을 때, 복합중금속용액에서의 중금속 제거율이 훨씬 높았다는 연구결과와 유사하였다.

pH 효과

pH에 따른 중금속 흡착 변화 및 최적 pH를 조사하기 위하여 0.01M-Tris 완충용액에 중금속을 100 mg ℓ^{-1}의 농도로 하여 1N 혹은 0.1N NaOH와 H_2SO_4를 이용하여 초기 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0으로 각각 조정한 후 중금속 흡착변화를 비교한 결과 Fig. 4에서 보는바와 같이 용액내 초기 pH에 따른 중금속 흡착량은 pH가 증가 할수록 증가하였으며, 전반적으로 pH 5~7에서 가장높은 흡착량을 보였다.

일반적으로 미생물에 의한 중금속 흡착은 pH에 민감하게 변화하며 pH가 중성으로 갈수록 흡착량은 증가하며[14] 미생물의 종류에 따라 최적 pH가 존재하는 경우도 있는 것으로 알려져 있다[22,23]. pH는 중금속 흡착 사이트(binding site)와 중금속을 화학적으로 해리시키는데 가장 중요한 환경 인자이며 중요한 매개 변수로서 흡착제 표면의 음전하수가 중금속이온흡착과 매우 중요한 관계가 있다. 일반적으로 중금속 용액내의 이온들 형성과 흡착제의 전화형성은 pH에 의존되는데, organic 혹은 inorganic ligand, redox reaction, precipitation은

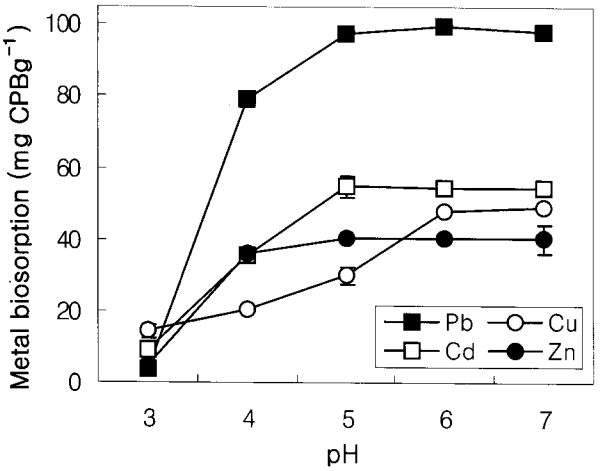

Fig. 4. Changes of biosorption capacity of strain CPB with heavy metal solution (100 mg ℓ^{-1}) at different pH conditions.

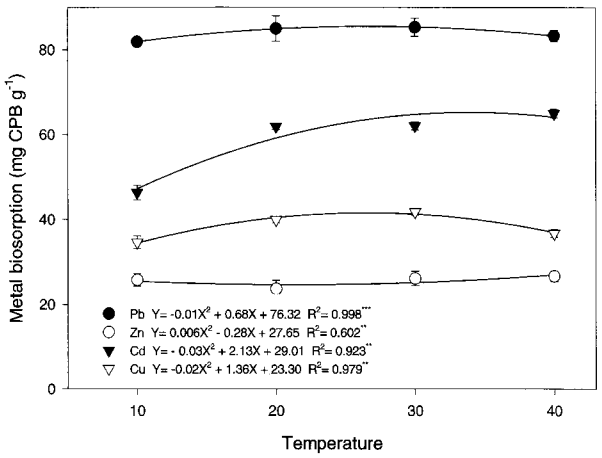

Fig. 5. Changes of biosorption capacity of strain CPB with heavy metal solution (100 mg ℓ^{-1}) at different temperature conditions.

pH에 의해 강하게 영향을 받으며 이들은 중금속 흡착 능력에도 영향을 미친다. 많은 과학자들에 의해 밝혀진 바에 의하면[23-30] pH가 매우 낮은 영역(pH 3>)에서는 H^+이온들이 세포벽 주변과 아주 밀접한 관계를 가지고 있어, 생물 흡착제의 흡착 사이트에 결합하는 중금속의 양이온과 H^+이온과의 경쟁이 일어나[31,32] 중금속 이온의 탈착현상이 일어나며, 반대로 pH가 너무 높으면 많은 functional group들, 예를 들어 carboxylic과 phosphate 그룹들이 세포벽에 음전하가 달라붙는 것을 방해하며, metal hydroxide 형태의 침전이 형성되므로 결국 중금속 양이온의 흡착이 저해되는 것으로 알려져 있다[33,34].

온도 효과

온도에 따른 중금속 흡착 변화를 및 최적 온도를 조사하기위하여 중금속 농도가 100 mg ℓ^{-1}인 용액 100 ㎖에 공시균주를 접종하여 10, 20, 30 및 40℃로 조정한 진탕배양기에서 24시간동안 흡착시킨 후 흡착변화를 비교한 결과(Fig. 5) Cd 및 Cu의 흡착량은 온도가 30℃까지 증가 할수록 흡착량이 증가 하였으며, 25~35℃ 사이에서 최대 흡착량을 나타내었다. Pb 및 Zn은 온도에 따른 중금속의 흡착량에는 큰 차이가 없었다.

Sag 등[12]과 Bedell 등[13]은 초기 온도 변화 역시 중금속을 흡착시키는데 있어 다음 몇 가지 중요한 요소에 영향을 미치는데, 첫번째는 용액내 초기 중금속 이온을 안정화 시키며, 두번째는 미생물의 생체흡착 부위와 결합된 중금속을 안정화시키며, 세번째로는 중금속이 흡착된 미생물의 세포벽 구성배열과 그 세포벽의 화학적 이온화 작용에 영향을 미친다고 하였다. 따라서 미생물에 의한 중금속 흡착에 있어서 같은 미생물을 사용하더라도 중금속종류에 따라서 최적 흡착온도가 달라지는 것을 알 수 있었으며, 이러한 차이는 온도에 따른 세포의 활성도 및 활성자리의 변화, 중금속과 리간드 사이의 온도에 따른 친화성의 차이 등으로 설명되고있지만 아직까지 명확하게 밝혀진 것은 없는 실정이다.

중금속 흡착형태

공시균주의 외형적인 중금속 흡착형태를 확인하기 위하여 중금속을 흡착하지 않은 균체와 흡착한 균체를 전자현미경(TEM)으로 관찰 한 결과는 Fig. 6과 같다. 전반적으로 중금속을 흡착하지 않은 균체는 정상적인 세포형태를 이루고 있었으나 Pb를 흡착한 균체는 세포표면에 많은 electron dense particles들이 형성되어 있었다. Cu, Cd 및 Zn을 흡착한 흡착 균체는 세포벽과 세포막 부근이 상당히 팽창었으며 세포표면보다는 세포내부에 많은 electron dense particles들이 형성되었음을 알 수 있었다. 일반적으로 미생물이 중금속을 흡착하는데는 크게 2가지 단계가 있는 것으로 알려져 있는데 첫번째는 물질대사나 온도에 무관한 단계로서 중금속의 흡착이 매우 빠르게 일어나는 물리적인 흡착단계이고 두번째 단계로서 물질대사에 의존하는 매우 느린 흡착과정이 일어나며 이 두번째 단계가 중금속 이온을 세포 내부로 이동시키는 것으로 알려져 있다.

또한 전자현미경으로는 electron dense particles의 구성성분들을 눈으로 정확히 확인할 수 없기 때문에 전자현미경에 부착된 EDS(X-ray energy dispersion spectra) 분석을 통하여 electron dense particles를 확인[2,35] 한 결과 중금속 결합능력이 있는 세포물질과 해당 중금속인 Pb, Cu, Cd 및 Zn등이 complex를 이루고 있는 것으로 나타났다.

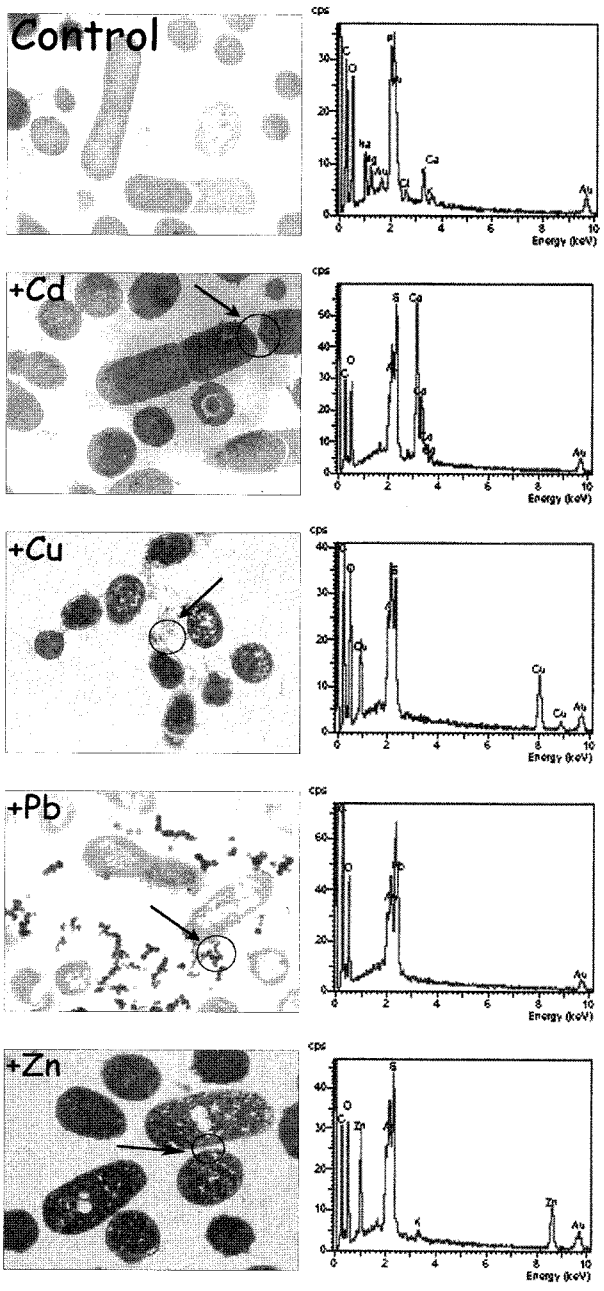

Fig. 6. TEM observation of biosorption heavy metals on the cell surfaces of strain CPB, with magnification (12,000X). Arrows indicate the area of the EDS analysis.

요 약

중금속으로 오염된 폐수를 처리하기 위하여 다양한 처리 방법들이 제시 되고 있으나, 최근에는 미생물을 이용한 중금속 처리 방법에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 중금속으로 오염된 토양에서 중금속에 대하여 강한 내성과 우수한 생물흡착능력을 동시에 가지고 있는 미생물 CPB를 분리하여 중금속에 대한 내성, 흡착 능력 및 흡착의 최적조건을 조사하였다. 중금속에 대한 내성은 전체적으로 400 mg ℓ^{-1} 이상의 농도에서도 높은 내성을 보였으며, 생장 저해도는 단일 중금속 보다 중금속이 복합으로 존재 할 경우 더 크게 나타났다. 중금속 흡착 능력은 Pb>Cd>Cu>Zn의 순으로 흡착 능력이 나타났다. 외형적 흡착형태는 중금속의 종류에 따라 세포 표면 및 세포 막 부근에 electron dense particles들이 형성되었으며, 이는 EDS 분석을 통하여 중금속 화합물인 것으로 확인되었다. 중금속을 흡착하는데 있어 전반적인 최적 pH는 5~7범위였고, 최적 온도는 25~35℃이다.

참고문헌

1. Aksu, Z., Egretli, G., and Kutsal, T. (1999) A comparative study for the biosorption characteristics of chromium(VI) on Ca-alginate, agarose and immobilized C. *vulgaris* in a continuous packed bed column. *J. Environ.Sci. Health A.* 34(2), 295-316.
2. Say, R., Denizli, A., and Arica, M.Y. (2001) Biosorption of cadmium, lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus, Phanerochaete chrysoporium, *Bioresour. Technol.* 76, 67-70.
3. Ahn, K. H. and Suh, K. H. (1995) Biosorption of Heavy Metlas by *Saccharomyces uvarm. J. of Kerean Environmental Sciences Society.* 5, 527-534.
4. Rudd, T., Sterritt, R. M., and Lester J. N. (1984) Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sluge process, WPCF. 56(12), 1260-1268.
5. Volesky, B. May. H, and Holan Z. R. (1993) Cadmium biosorption by *saccaromyces cerevisiae, Biotech. and Bioeng.* 41, 826-829.
6. Goksungur, Y., S. Uren, and U. Guvenc. (2005) Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 103-109.
7. Choi, S.D., H.B. Hong., and Y.S. Chang. (2003) Adsorption of halogenated aromatic pollutants by a protein released from *Bacillus pumilus. Water Research.* 37, 4004-4010.
8. Eric, F., Catherine, C., and Roux, J. C. (1994) Evaluation of a countercurrent biosorption system for the removal of lead and copper aqueous solutions, *FEMS Microbiol.* 14, 333-338.
9. Volesky, B. (1990) Biosorption of Heavy Metals, CRC Press, 21., Boca Raton Ann Arbor, Boston. p.20-21.
10. Kadukova, J. and Vircikova, E. (2005) Comparison

of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environmental International*. 31, 227-232.
11. Yan, G. and Viraraghavan, T. (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*. 37, 4486-4496.
12. Sag, Y. and Kutsal, T. (2000) Determination of the biosorption heats of heavy metal ions on *Zoogloea ramigera and Rhizopus arrhizus*. *Biochem. Eng*. J. 6, 145-151.
13. Bedwell, G. W. and D. W. Darnal. (1990) Biosorption of heavy meatls, CRC press, Boca Raton, pp. 314-316.
14. Norberg, A. B. and H. Persson. (1984) Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloearamigera, Biotech. and Bioeng*. 26, 239-246.
15. Tsezos, M. and B. Volesky (1982) The mechanism of uranium biosorption by Rhizoups arrhizus. *Biotech. Bioeng*. 24, 385-401.
16. Say, R., Denizli, A., and Arica, M.Y. (2001) Biosorption of cadmium, lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus, Phanerochaete chrysoporium, *Bioresour. Technol*. 76, 67-70.
17. Kadukova. J. and E. Vircikova (2005) Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environmental International*. 31, 227-232.
18. Ince Yilmaz, E. (2003) Metal tolerance and biosorption capacity of Bacillus circulans strain EB1. *Research in Microbiology*. 154, 409-415.
19. Hassen, A., N. Saidi., M., and Cherif, A. (1998) Baudabous, Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour. Technol*. 64. 7-15.
20. Verma Tuhina, T. Srinath, R. U. Gadparle, P. W. Ramteke, P. K. Hans., and S. K. Garg. (2001) Chromate tolerance bacteria isolated from tannery effluent. *J Gen Appl Microbiol*. 47(6), 307-312.
21. Willard L. Lindsay. (1979) Chemical Equilibria in Soils, John Wiley & Sons.
22. Strandberg, G.W., S.E. II Shumate., and J.R. Parrot. (1981) Micronial cells as biosorbents for heavy metals : accumulation of uranium by *Sacchromyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa*. Appl. 41(1), 237-245.
23. Fourest E. and J.C. Roux. (1992) metal biosorption by fungal mycelial by poiducts : mechanisms and onfluence of pH. Appl. *Microbiol. Biotechno*. 37: 399-403.
24. Guibal, E., Roulph, C., and Cloirec, P. L. (1992) Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucor Miehei* : pH effect on mechanisms and performances of uptake, *Water Research*. 26, 1139-1145.
25. Sautel, G., Roulph, C., and Leclerc, P. (1991) Cadmium biofixation by *Pseudomonas putida* bacteria. Recents Progres en Genie des procedes. 5, 203-208.
26. Fourest, E. and Volesky, B. (1996) Contribution of sulphonate group and alginate to heavy metal biosorption by dry biomass of Sargassum fluitants. *Environmental Science and Technology*. 30. 227-302.
27. Fourest, E. and Volesky, B. (1997) Alginate properties and heavy metal ciosorption by marine algae. *Biochemistry and Biotechnology*. 67, 215-216.
28. Fourest, E. and Roux, J. C. (1992) Heavy metal biosorption by fungal mycelial by products : mecahnisms influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37,399-403.
29. Fourest, E. and Volesky, B. (1997) Alginate properties and heavy metal ciosorption by marine algae. *Biochemistry and Biotechnology*. 67, 215-216.
30. Huang, C. and Huang, C.P. (1996) Applocation of Aspergillus oryzae and Rhizopus oryzae for Cu(II) removal. *Water Research*. 30, 1985-1990.
31. Doyle, R. J., Matthews, T. H., and Streips, U. N. (1980) Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall, *J. Bacteriol*. 143(1), 471-480.
32. Guibal, E., Roulph, C., and Cloirec, P. L. (1992) Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucor Miehei* : pH effect on mechanisms and performances of uptake, *Water Research*. 26, 1139-1145.
33. H. Salehizadeh, S.A. Shojaosadati. (2003) Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produce from *Bacillus Firmus*. *Water Research*. 37, 4231-4235.
34. Flemming, C. A., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., and Bailey, G. W. (1990) Remobilization of toxic heavy metals adsorbed to bacterial wall-clay composites, *Appl. Environ. Microbiol*. 56(10), 3191-3203.
35. KaduKova, J. and Komorova, T. (2002) Bopakumulacia a biocoppcia striebra riasou Chlorella kessleriz modelovych roztokov [Silcer bioaccumulation and biosorption by alga chlorella kessleri from model solutions]. Acta Metall Slovaca. 8(2), 117-123.