



تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر تراکم ریز جلبک *Isochrysis galbana* در شرایط آزمایشگاهی

زهره برخوردار احمدی، محمدرضا طاهری‌زاده^{*}، مرتضی یوسف زادی

گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

نوع مقاله:

چکیده

کوتاه

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۱۱/۰۸

اصلاح: ۹۷/۰۲/۰۲

پذیرش: ۹۸/۰۱/۰۵

کلمات کلیدی:

ریز جلبک

مس

Isochrysis

فیتوپلانکتون‌ها به لحاظ تولید مواد آلی و قرار گرفتن در قاعده هرم غذایی جزء ذخایر مهم به شمار می‌آیند. در این مطالعه سمیت فلز سنگین مس در غلظت‌های مختلف بر رشد ریز جلبک *Isochrysis galbana* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین میزان رشد و محتوای کلروفیل *a* مربوط به غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر مس بود. در مقابل، غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر به طور قابل توجهی باعث مهار رشد و کاهش محتوای کلروفیل شدند. همچنین نتایج نشان داد که غلظت‌های پایین باعث افزایش میزان پروتئین در ریز جلبک مورد مطالعه و غلظت‌های بالا باعث کاهش آن می‌گردد.

مقدمه

آلودگی اکوسیستم آبی به فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین مباحثی است که در سال‌های اخیر به آن توجه ویژه‌ای شده است. زیرا این اکوسیستم‌ها به طور طبیعی دریافت‌کننده نهایی فلزات سنگین هستند (Peng et al., 2009). فلزات سنگین به طور طبیعی در محیط‌زیست وجود دارند؛ اما استفاده بی‌رویه انسان چرخه‌ی ژئوشیمیایی و تعادل بیوشیمیایی را تغییر داده است (Dixit et al., 2015). فلزات شامل عناصر ضروری و غیرضروری هستند و اهمیت ویژه‌ای در سمیت زیست‌شناسی دارند. آن‌ها بسیار پایدار بوده و همه آن‌ها به طور بالقوه برای موجودات زنده سمی هستند (Storelli et al., 2005) مقدار فلز مس در غلظت‌های بسیار پایین برای موجودات زنده ضروری است. اما برخی از فلزات مانند کادمیوم، سرب و جیوه حتی در سطوح پایین نیز سمی هستند و تأثیر مستقیم و نامطلوب بر فرایندهای مختلف بیولوژیکی دارند (Junior et al., 2014). به‌طور کلی، مطالعات بر روی فلزات سنگین می‌تواند از دو جنبه بسیار مهم باشد: اول، از نظر سلامت عمومی که در آن توجه به ضرورت سنجش تجمع فلزات سنگین معطوف شده است. دوم، از نظر محیط‌زیست آبی که برای جلوگیری از زوال بیولوژیکی و شناسایی منابعی که تعادل اکولوژیکی را تهدید می‌کند، انجام می‌گیرد (Khaled, 2004). اثر سمی فلزات سنگین بر روی سیستم‌های زنده یکی از مشکلات اصلی در آلودگی‌های زیست‌محیطی است. گیاهان آبرزی در مطالعات کیفیت آب برای نظارت بر فلزات سنگین و دیگر آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی استفاده می‌شوند (Samecka-cymerman and Kempers, 2004). تولیدکنندگان اصلی مانند فیتوپلانکتون‌ها معمولاً توسط مصرف‌کنندگانی که عمدتاً فیلترفیلدر هستند مصرف می‌شوند. به این ترتیب یک شبکه غذایی برای بقای سایر ارگانیسم‌ها مانند ماهی و خرچنگ ایجاد می‌شود.

^{*} نویسنده مسئول، پست الکترونیک: taheri.1965@gmail.com

پاسخ به فلزات سنگین در میان گونه‌های مختلف متفاوت است. در میان موجودات دریایی مقاوم در برابر فلزات سنگین، ریزجلبک‌ها به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی آلودگی دریایی توصیه شده اند (Kapkov and Belenikina, 2007). از آنجایی که، فلزات تجزیه زیستی نمی‌شوند و در مقادیر معین برای بسیاری از آبزیان سمی هستند و ممکن است در اجزای مختلف اکوسیستم و بافت‌های جانداران تجمع یابند، انتقال این آلاینده‌ها در طول زنجیره غذایی ممکن است در پایان به تهدید سلامت انسان منجر شود (Wang and Chen, 2009). با توجه به اهمیت جلبک‌ها و نقش آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی افزودن مس به محیط آبی با ایجاد خطراتی از جمله از بین رفتن ریزجلبک‌ها همراه است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات مختلف مس بر تراکم سلولی، محتوای کلروفیل و پروتئین ریزجلبک *I. galbana* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت ریزجلبک و اعمال تیمارها

در این آزمایش استوک مورد نیاز جهت شروع کشت فیتوپلانکتون‌ها از مرکز تحقیقات شیلات بندرلنگه تهیه گردید. برای کشت جلبک از محیط کشت f_2 (حدود ۸-۷/۸ و شوری ۲۵) استفاده شد. پس از انجام این مراحل با اضافه کردن استوک اولیه در حجم ۲۵۰ و ۵۰۰ سی‌سی استوک خالص *I. galbana* کشت داده شد (Yap et al., 2004). جلبک *I. galbana* پس از رسیدن به حجم مطلوب، به مقدار یکسان و مشخص (به نسبت ۱۰ در ۹۰) درون ارلن‌ها ریخته شد. شش غلظت (۰، ۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر) از فلز مس تهیه و با استفاده از سمپلر به محیط کشت جلبکی اضافه شد و به خوبی مخلوط و به مدت ۱۵ روز هوادهی شد. اثر غلظت‌های مختلف مس طی یک دوره ۱۵ روزه بر میزان رشد، کلروفیل و پروتئین جلبک در ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. تمامی تیمارها و تکرارها تحت شرایط یکسان دمایی (۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد) و میزان نور ۵۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس توسط لامپ فلوروسنت سفید با فاصله (۱۰-۱۵ سانتی‌متری) و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و تحت هوادهی مداوم برای جلوگیری از رسوب‌دهی قرار گرفت (Koenig and Demacedo, 2004). برای محاسبه تراکم سلول‌های ریزجلبک در هر میلی‌لیتر از تیمارها، بعد از همگن نمودن محیط کشت، یک میلی‌لیتر از هر نمونه با استفاده از فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. سپس توسط لام هموسیتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم، نهم، یازدهم، سیزدهم و پانزدهم شمارش صورت گرفت و جذب نوری آن در طول موج ۶۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر ثبت شد و میزان رشد آن‌ها به دست آمد.

اندازه‌گیری - میزان کلروفیل

به منظور بررسی تغییرات میزان کلروفیل، در فواصل زمانی سه روزه به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی به طور کامل خارج شد و به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد اضافه و توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها توسط فویل پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت مجدداً عمل سانتریفیوژ تکرار شد. محلول رویی استخراج و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب آن در طول موج‌های ۶۳۰ و ۶۶۴ نانومتر قرائت شد. در نهایت، مقدار کلروفیل کل برحسب میکروگرم در لیتر و در سه تکرار به وسیله فرمول زیر محاسبه شد (Jeffrey and Humphrey, 1975).

$$Ca = 11.64 E_{664} - 0.40 E_{630}$$

اندازه‌گیری میزان پروتئین

برای سنجش میزان تغییرات پروتئین از روش برادفورد استفاده گردید. برای استخراج عصاره پروتئین ۰/۵ گرم از نمونه در ۱/۵ میلی‌گرم محلول بافر فسفات حل و در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس فاز بالایی جدا گردیده که حاوی پروتئین کل است. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد به ۰/۱ سی‌سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی‌سی محلول برادفورد اضافه شد

و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت گردید (Bradford, 1976).

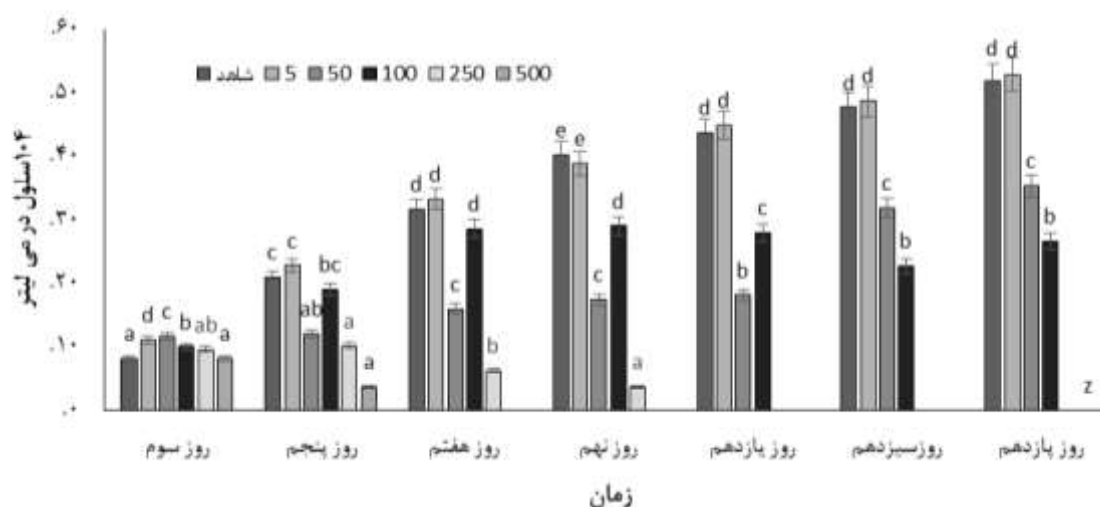
داده‌های به دست آمده، در نرم‌افزار Excel ثبت و در مراحل بعدی مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا، نسبت به نرمال بودن داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS و آنالیز Kolmogorov-Smirnov Z اطمینان حاصل شد و سپس، تفاوت میانگین بین گروه‌های تیماری از طریق آزمون ANOVA و در سطح اطمینان ($p < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

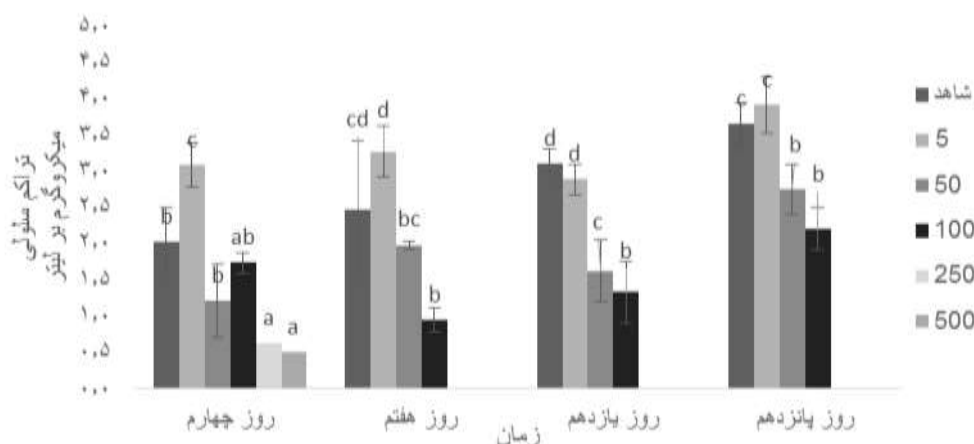
شکل ۱ تراکم ریز جلبک *I. galbana* را در مواجهه با غلظت‌های مختلف مس و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. در رابطه با تراکم ریز جلبک *I. galbana* در غلظت‌های مختلف مس، کمترین میزان تراکم ریز جلبک در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ پس از پنج روز مواجهه با فلز به دست آمد. به گونه‌ای که نسبت به تراکم‌های به دست آمده از غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر تراکم کمتری را نشان دادند. غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر، به ترتیب در روزهای پنجم و نهم رشد ریز جلبک را مهار کردند. اما بیشترین تراکم ریز جلبک در غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر در مقایسه با شاهد مشاهده شد. در بین غلظت‌های مختلف و روزهای فرد از نظر میزان رشد ریز جلبک *I. galbana* اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($p < 0.05$).

شکل ۲ تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس را بر کلروفیل *a* ریز جلبک *I. galbana* نشان می‌دهد. بین غلظت‌های مختلف مس غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر بیشترین مقدار کلروفیل و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر در روز اول و غلظت ۲۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر در روزهای بعدی کمترین مقدار کلروفیل را نسبت به شاهد داشتند. همچنین با توجه به بررسی‌های انجام شده تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف مس در مقدار کلروفیل *a* ریز جلبک وجود داشت ($p < 0.05$).

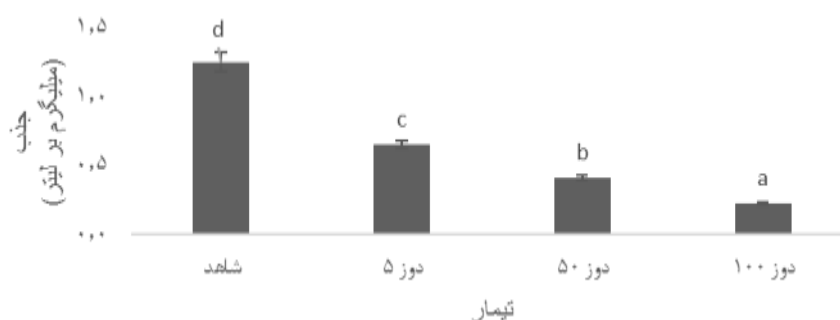
شکل ۳ تغییرات میزان پروتئین ریز جلبک *Isochrysis galbana* را در غلظت‌های مختلف سولفات مس در روز پانزدهم نشان می‌دهد. بین غلظت‌های مختلف سولفات مس، غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر دارای بیشترین میزان پروتئین نسبت به شاهد بود و غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر کمترین مقدار پروتئین را نشان دادند. با توجه به بررسی غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین در غلظت‌های مختلف مس در ریز جلبک *I. galbana* مشاهده شد. نتایج آزمون توکی نشان داد که بین شاهد و غلظت ۵ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). در حالی که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p < 0.05$).



شکل ۱. تأثیر غلظت‌ها مختلف مس بر میزان رشد *I. galbana*



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر میزان کلروفیل *I. galbana*



شکل ۳. تأثیر غلظت‌ها مختلف سولفات مس بر میزان پروتئین *I. galbana*

بحث

نتایج حاصل از تأثیر فلز مس در میزان رشد ریز جلبک *I. galbana* تأثیرات متفاوتی را در غلظت‌های مختلف مس نشان داد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان رشد ریز جلبک مربوط به غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر بود و با افزایش میزان غلظت فلز، از رشد ریز جلبک کاسته شد؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های بالاتر از ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر مهار رشد ریز جلبک را شاهد بودیم (EL-Naggar and Sheikh, 2014). مس، یک ماده ضروری برای رشد گیاهان است و به عنوان یک عامل کاهنده آنزیمی و حامل الکترون در فتوسنتز و تنفس نقش حیاتی ایفا می‌کند (Andrade et al., 2004). مس سرعت رشد جلبک‌ها را مهار می‌کند. یون Cu^{2+} می‌تواند لیپیدهای غشایی را اکسید کند و باعث افزایش مقدار اکسیژن فعال شود که ساختار لایه تیلاکوئید را از بین می‌برد و بنابراین میزان فتوسنتز گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Vaadia and Waisel, 1967; Pätsikkä et al., 2001). به منظور بررسی کلروفیل *a* در ریز جلبک *I. galbana* در این تحقیق سطح رنگ‌دانه‌ها در پاسخ به فلز مس در غلظت‌های مختلف در فواصل ۳ روزه در یک دوره ۱۵ روزه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که با افزایش غلظت فلز مس در جلبک *I. Galbana* غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر بیشترین میزان محتوای کلروفیل را نسبت به شاهد و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر در روز اول و غلظت ۵۰ میکروگرم بر لیتر در روزهای بعد کمترین میزان کلروفیل نسبت به شاهد را داشتند (Burzyński and Żurek, 2007; Anantharaj et al., 2011). موجودات فتوسنتزکننده به ترکیبات فلزی بسیار حساس هستند. اثر یون‌های فلزی بر روی گیاهان شامل اختلال در بسیاری از عوامل فیزیولوژیکی مانند جذب آب، تنفس، جذب مواد معدنی و فتوسنتز می‌باشد (Burzynski and Zurek, 2007). مس بر اندام‌های سلولی مانند کلروپلاست و میتوکندری تأثیر می‌گذارد و تغییرات

ساختاری را در غشاهای تیلاکوئید منجر می‌شود و همچنین فتوسنتز را از راه‌های مختلفی از جمله مهار انتقال الکترون‌های فتوسنتزی در PSII (فتوسیستم II) تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wilde et al., 2006; Baron et al., 1995). غلظت بالای مس باعث کاهش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و تخریب زیرساخت‌های سلولی جلبک می‌شود (Zhou et al., 2012). با توجه به نتایج این مطالعه، میزان پروتئین در غلظت‌های مختلف مس در ریزجلبک *I. galbana* تفاوت معنی‌داری داشت و با افزایش غلظت فلز مس از میزان پروتئین ریزجلبک کاسته شد (Anantharaj et al., 2011; Bajguz, 2011). بازدارندگی در محتوای پروتئین ناشی از غلظت‌های بالاتر فلزات سنگین است که می‌تواند به اثر سمی فلزات سنگین بر روی فعالیت‌های آنزیمی مرتبط به بیوسنتز متابولیتها مربوط باشد (El-Naggar, 1993). مکانیسم‌های سمیت با تأثیر بر مولکول‌های مهم از قبیل آنزیم‌ها، پلی نوکلئوتیدها، سیستم‌های انتقال مواد مغذی ضروری و یون‌ها و در نتیجه اختلال فیزیولوژیکی در سلول و غشاهای سلولی توأم است. علاوه بر این، تأثیر فلزات از طریق تولید رادیکال‌های آزاد امکان‌پذیر است. رادیکال‌ها باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین و چربی می‌شوند و در نتیجه در ثبات سلولی و نفوذپذیری غشاء اختلال ایجاد می‌کنند (Cobbett, 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002).

بر اساس تحقیق انجام شده، اثر فلز مس بر روی ریزجلبک *I. galbana* باعث کاهش رشد ریزجلبک شد که شدت تأثیرات به غلظت فلز و همچنین زمان یا دوره تماس بستگی دارد. به طوری‌که بر اساس نتایج، فلز مورد آزمایش در غلظت‌های پایین بر رشد ریزجلبک اثر افزایشی نشان داد. اما در غلظت‌های بالا و با گذشت زمان، مهار رشد ریزجلبک مشاهده شد. بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز، تنفس، سنتز پروتئین و سنتز کلروفیل، در غلظت‌های بالای فلز تحت تأثیر قرار می‌گیرند. به طوری‌که در تحقیق انجام شده میزان پروتئین با افزایش فلز به طور قابل توجهی کاهش یافت. ارزیابی تأثیرات سمیت ناشی از فلزات با استفاده از ریزجلبک‌ها سریع و کم هزینه است و می‌تواند به‌طور مؤثر در ارزیابی عناصر و ترکیبات سمی حتی در غلظت‌های بسیار کم سموم مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Anantharaj, K., Govindasamy, C., Natanamurugaraj, G., Jeyachandran, S. 2011. Effect of heavy metals on marine diatom *Amphora coffeaeformis* (Agardh. Kutz). *Global Journal of Environmental Research*. 5(3): 112-117.
- Andrade, L.R., Farina, M., Amado Filho, G.M. 2004. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58(1): 117-125.
- Bajguz, A. 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60(3): 406-416.
- Baron, M., Arellano, J.B., Gorge, J.L. 1995. Copper and photosystem 2: A controversial relationship: review [nutrient deficiency]. *Physiologia Plantarum* (Denmark). 94(1): 174-180.
- Baumann, H.A., Morrison, L., Stengel, D.B. 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(4): 1063-1075.
- Bradford, Marion, M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry*, 72: 248-54.
- Burzyński, M., Żurek, A. 2007. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica*. 45(2): 239-244.
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*. 123(3): 825-832.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 53(1): 159-182.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., Sahu, A., Shukla, R., Paul, D. 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*. 7(2): 2189-2212.

- El-Naggar, A.H. 1993. Growth some metabolic activities of *Chlorella* and *Scenedesmus* in relation to heavy metal water pollution in Gharbia Governorate (Doctoral dissertation, Ph.D. Thesis, Botany Department, Faculty of Science, Tanta University, Egypt).
- El-Naggar, A.H., Sheikh, H.M. 2014. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals. *Life Science Journal*. 11(10): 1249-1257.
- Jeffrey, S.T., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c 1 c 2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167(2): 191-194.
- Junior, M.M., Silva, L.O., Leão, D.J., Ferreira, S.L. 2014. Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ET AAS. *Food Chemistry*. 160: 209-213.
- Khaled, A. 2004. Seasonal concentrations of some heavy metals in muscle tissues of *Siganus rivulatus* and *Sargus sargus* fish from El-mex Bay and eastern harbour, Alexandria, Egypt.
- Kapkov, V.I., Belenikina, O.A. 2007. A Study of the resistance of mass marine algae to heavy metals. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 62(1): 30-33.
- Koenig, L.M., Demacedo, J.S. 2004. Urban secondary sewage: an alternative medium for The culture of *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae), Brazilian archives of Biology and Technology, an International Journal. 47(.3): 451-459.
- Patsikka, E., Aro, E.M., Tyystjärvi, E. 2001. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*. 113(1): 142-150.
- Peng, J.F., Song, Y.H., Yuan, P., Cui, X.Y., Qiu, G.L. 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials*. 161(2): 633-640.
- Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J. 2004. Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59(1): 64-69.
- Storelli, M.M., Storelli, A., D'Addabbo, R., Marano, C., Bruno, R., Marcotrigiano, G.O. 2005. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the eastern Mediterranean Sea: overview and evaluation. *Environmental Pollution*. 135(1): 163-170.
- Vaadia, Y., Waisel, Y. 1967. Physiological processes as affected by water balance. In: *Irrigation of Agricultura Lands*. Wisconsin, USA: American Society of Agronomy.
- Wang, J., Chen, C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27(2): 195-226.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown, P.L. 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 51(2): 174-185.
- Yap, C.K., Ismail, A., Omar, H., Tan, S.G. 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International*. 29(8): 1097-1104.
- Zhou, G.J., Peng, F.Q., Zhang, L.J., Ying, G.G. 2012. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research*. 19(7): 2918-2929.