

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2019, 29(1): 88–103

<https://doi.org/10.15407/alg29.01.088>

СУРЕШ КУМАР ПАНДИАН, ДЖИБУ ТОМАС

Лаборатория исследования альгобиомассы, отделение биологических наук и технологий, Школа сельского хозяйства и биологических наук,

Карунский научно-технологический институт,

Коимбаторе 641114, Тамил Наду, Индия

jibuthomas.t@gmail.com

УДАЛЕНИЕ НИТРАТОВ, ФОСФАТОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ШТАММА *SCENEDESMUS RUBESCENS* КАСС 2 (*CHLOROPHYTA, CHLOROPHYCEAE*)

Проведено комплексное исследование по удалению нитратов, фосфатов и тяжелых металлов из сточных вод с использованием свободных и иммобилизованных клеток *Scenedesmus rubescens*. Результаты данной работы позволят снизить затраты на выращивание микроводорослей, использующих сточные воды в качестве питательной среды, а также очистить стоки от ряда соединений. Штамм *Scenedesmus rubescens* КАСС 2, выделенный из пресноводного водоема Сузивани (Индия), исследовали с целью удаления нитратов, фосфатов и тяжелых металлов путем выращивания микроводорослей в сточных водах в виде как суспензии, так и иммобилизованных клеток водорослей, помещенных в полимерный гель. Среди различных полимеров, используемых для этой цели, для фикоремедиации были выбраны альгинатный и альгинатно-каррагинановый гели, гранулы которых обладали хорошей стабильностью. В эксперименте регистрировали ростовые характеристики культуры и поглощение питательных веществ клетками микроводоросли, а также периодически контролировали снижение содержания нитратов, фосфатов и тяжелых металлов в культуральной среде. В варианте с альгинатными гранулами, содержащими иммобилизованные клетки *Scenedesmus rubescens* КАСС 2, было отмечено уменьшение содержания фосфатов на 98% и нитратов на 75%. Содержание тяжелых металлов (Mn, Zn и Cu) было меньше, чем в варианте со свободными клетками. Результаты исследования свидетельствуют о том, что применение иммобилизованных полимерным гелем клеток микроводоросли является более эффективным средством очистки сточных вод по сравнению с культурой свободноживущих клеток. Этот метод также может служить экономически эффективной зеленой технологией в производстве биомассы микроводорослей.

Ключевые слова: микроводоросли, стоки, фикоремедиация, экономически эффективная среда для культивирования, иммобилизация, зеленые технологии

© Суреш Кумар Пандиан, Джибу Томас, 2019

Введение

Очистка сточных вод заключается в удалении нежелательных органических или синтетических загрязнителей из жидких отходов, образующихся в результате бытовой, муниципальной, промышленной или сельскохозяйственной деятельности. Общепринятые процедуры очистки жидких стоков обычно состоят из этапа изъятия загрязняющих веществ из сточных вод и последующего процесса их устранения. Необходимо провести интегрированный процесс очистки сточных вод, при котором химические соединения, извлекаемые из стоков, в дальнейшем могут быть превращены в экономически ценные продукты. Для этого нужен определенный процесс иммобилизации. Микроводоросли используются для очистки сточных вод в течение нескольких десятилетий. В последнее годы разрабатывается направление по удалению органических и неорганических веществ из сточных вод путем их аккумуляции в водорослевой биомассе, что рассматривается как экономически эффективный способ очистки стоков (Oswald, 1988; Laliberte et al., 1994). Восстановление биомассы микроводорослей из очищенных сточных вод является одной из основных проблем при использовании микроводорослей для фикоремедиации (De la Noue et al., 1992). Технология иммобилизации, при которой клетки микроводорослей помещают в некую удерживающую их субстанцию, позволяет более эффективно извлекать химические соединения из биомассы иммобилизованных клеток по сравнению со свободно взвешенными в среде клетками тех же видов водорослей (De la Noue, Proulx, 1988; De-Bashan, Bashan, 2010).

При смешивании суспензии клеток с раствором полимера образуется пространственная структура геля, которая ограничивает перемещение клеток, но не препятствует поступлению питательных веществ. Системы иммобилизованных клеток водорослей особенно эффективны для удаления питательных веществ (т. е. фосфатов и нитратов) и различных металлов из сточных вод. Эффективность использования иммобилизованных микроводорослей для очистки сточных вод зависит от нескольких факторов, включающих вид водоросли, матрицу иммобилизации, концентрацию клеток и полимерных гранул, морфологию гранул, аэрацию, время удерживания и т.д.

Метод иммобилизации клеток также был предложен для увеличения биосорбционной способности и биологической активности биомассы (Akhtar et al., 2004; De-Bashan, Bashan, 2010). Это позволяет получать суспензии с более высокой плотностью клеток, а также легко извлекать биомассу из жидкой среды (Mallick, 2002). Методы иммобилизации имеют ряд преимуществ, таких как устойчивость к агрессивным факторам среды (соленость, токсичность металлов и pH); защита стареющих культур от вредного воздействия фотоингибирования; получение большей биомассы; восстановление клеток менее разрушительным способом. Экономическую эффективность метода можно

повысить также за счет повторного использования регенерированной биомассы (Bailliez et al., 1986; Liu et al., 2009).

Наиболее часто используемой техникой иммобилизации является фиксация клеток в трехмерной гелевой решетке, изготовленной из натуральных (агар, целлюлоза, альгинат, каррагинан) или синтетических (полиакриламид, полиуретан, поливинил, полипропилен) полимеров (Nameed, Ebrahim, 2007; Liu et al., 2009; De-Bashan, Bashan, 2010). В нескольких исследованиях сообщалось, что иммобилизованные клетки водорослей с использованием каррагенановых и альгинатных гранул обладают той же эффективностью в удалении азота и фосфора из сточных вод, что и свободно суспендированные клетки (Chevalier, de la Noue, 1985; de la Noue, Proulx, 1988; Garbisu et al., 1992; Garbisu, Hall, 1993; Tam, Wong, 2000). Так, Шевалье и де ла Нью (Chevalier, de la Noue, 1985) показали, что иммобилизованные клетки *Scenedesmus* способны удалять 90% аммония (в течение 4 ч) и 100% фосфата (в течение 2 ч) из бытовых стоков. Другие авторы (Tam et al., 1994) предположили, что иммобилизованные клетки *Chlorella vulgaris* можно использовать для вторичного процесса очистки бытовых сточных вод.

Задачей настоящего исследования было изучить эффективность иммобилизованных клеток штамма пресноводной микроводоросли *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 в восстановлении бытовых и синтетических сточных вод. Мы также изучали различные полимеры, необходимые для получения гранул с иммобилизованными клетками, с точки зрения стабильности и срока использования гранул. Отобранные полимерные гранулы были протестированы на эффективность удаления нитратов, фосфатов и тяжелых металлов из сточных вод с целью определения оптимального полимера для получения водорослевых гранул для фиторемедиации.

Материалы и методы

Выделение культуры микроводоросли и условия культивирования

Объектом исследования была пресноводная микроводоросль, выделенная из водоемов Сирувани (10,94395°N и 76,7215°E) в Коимбаторе (Индия). Культуру выращивали на модифицированной среде Фогга, в состав которой входили: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 200 мг/л, K_2HPO_4 – 200 мг/л, $CaCl_2 \cdot H_2O$ – 100 мг/л, KNO_3 – 2 г/л, раствор Fe-EDTA (5 мл/л), приготовленный путем добавления 0,007 г/л Na_2 EDTA, 0,005 г/л $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и 1 мл/л раствора микроэлементов, приготовленного из расчета 286 мг H_3BO_3 , 181 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 22 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 39 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 8 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, pH 7,5. Культуры выращивали в стерильных условиях с чередованием световой и темновой фаз в соотношении 16 : 8 ч, интенсивностью освещения 1500–2500 лк при температуре 28 °C.

Идентификация изолята микроводоросли секвенированием 18S рРНК

Выделенную культуру микроводоросли наблюдали под световым микроскопом при увеличении x100, морфологию культуры документи-

ровали, используя оборудованный камерой микроскоп (Accuscore, США). ДНК извлекали из клеток микроводоросли с помощью модифицированного ЦТАБ (цетилтриметиламмоний-бромид) экстракции ДНК (Doyle, Doyle, 1987). ПЦР амплифицировали с помощью универсального праймера области 18S рРНК, как описано у Piligaev et al. (2015). Реакции секвенирования проводили и анализировали на анализаторе ДНК Applied Biosystems 3730xI. Построение филогенетического дерева выполнено методом Neighbor-Joining с 1000 значений бутстрепа через MEGA v7.0 (Tamura et al., 2007). Полученная последовательность ДНК была опубликована в базе данных NCBI (GenBank) под регистрационным номером MG009232.

Приготовление иммобилизирующих гранул с использованием разных полимеров

Перед исследованием фиксореимедиации подходящие полимеры подвергали скринингу, исходя из их стабильности и срока службы гранул, полученных из природных, синтетических и комбинированных полимеров. В скрининге участвовали природные полимеры (агар, альгинат, каррагинан, альгинат-каррагинан, хитозан, альгинат-хитозан) и синтетические (поливиниловый спирт, ПВС, и поливиниловый спирт-альгинат). Полимеры были синтезированы и проанализированы с целью выявления их стабильности и продолжительности существования согласно протоколу, описанному ниже.

Гранулы из альгината

Для иммобилизации клеток в геле альгината натрия к суспензии клеток добавляли 2%-ный раствор этого полимера. После тщательного перемешивания суспензию клеток с альгинатом натрия набирали в микропипетку объемом 5 мл и вносили по каплям в 4%-ный раствор CaCl_2 , в котором происходила сшивка альгината катионами кальция в результате реакции полимеризации. Образовавшиеся гранулы для затвердения выдерживали 2 ч при 25 ± 2 °С, затем промывали стерильным солевым раствором (0,85% NaCl) и дистиллированной водой (Singh et al., 2012).

Агаровые гранулы

Готовили раствор, содержащий 6%-ный агар, который при помощи микропипетки объемом 5 мл медленно диспергировали в 40 мл растительного масла. После образования гранул определенного размера смесь охлаждали до затвердевания полимера. Полученные гранулы промывали стерильной водой (Nilsson et al., 1983).

Каррагинановые гранулы

Полимер каррагинана готовили из 2,2%-ного раствора каррагинана в дистиллированной воде, который несколько минут нагревали на водяной бане до 65 °С, а затем микропипеткой объемом 5 мл вносили по каплям в 3%-ный раствор KCl и оставляли на 2 ч для затвердения (Mohamadnia et al., 2007).

Альгинат-каррагинановые гранулы

Комбинированные полимерные гранулы, содержащие 2%-ный альгинат и 0,3%-ный каррагинан, готовили путем перемешивания с 20 мМ буферного раствора *трис*-HCl (pH 9), а затем по каплям вносили в 50 мМ раствор того же буфера, содержащий 0,3 М CaCl₂. Образовавшиеся гранулы оставляли в этом растворе на 2 ч (Hung et al., 2008).

Альгинат-хитозановые гранулы

Смесь 2%-ного альгината и 8%-ного хитозана готовили в 40 мл дистиллированной воды, содержащей 0,4 мл уксусной кислоты (pH 5), и по каплям добавляли в 2%-ный раствор CaCl₂ (Tahtat et al., 2013).

ПВС-альгинатные гранулы

Полимерный раствор, содержащий 10% ПВС и 0,5% альгината, несколько минут нагревали на водяной бане до 65 °С. Затем раствор по каплям добавляли в 4% раствор борной кислоты, содержащий 0,3 М CaCl₂, для образования гранул (Zhan et al., 2013).

Приготовление гранул с иммобилизованными клетками микроводоросли

После акклиматизации микроводорослей, их клетки центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин. Затем полученную биомассу ресуспендировали в 50 мл дистиллированной воды до образования концентрированной водорослевой суспензии с плотностью клеток 5000 кл/мл. Далее суспензию водорослей в соотношении 1 : 1 с полимерами использовали для получения гранул водорослей по вышеупомянутым методикам.

Изучение свойств полученных полимерных гранул

Эксперимент 1. Гранулы, синтезированные из разных полимеров, исследовали на стабильность с учетом изменения их веса и формы. В качестве контроля использовали гранулы без микроводорослей. Стабильность гранул при различных значениях pH (4, 7, 10) и температуры (27 и 30 °С) изучали в течение 10 дней. Гранулы, которые оставались стабильными в течение всего периода обработки, были взяты для иммобилизации водорослей.

Эксперимент 2. Гранулы с иммобилизованными водорослями были исследованы на стабильность путем инкубации их при различных значениях pH: кислых (pH 4), щелочных (pH 10) и нейтральных (pH 7) и температуре 27 и 30 °С в течение 10 дней. Для оценки стабильности и жизнеспособности культур ежедневно в течение 10 дней проверяли pH среды, количество клеток в культуре водорослей и вес гранул с водорослями. Клетки иммобилизованных водорослей подсчитывали с помощью гемоцитометра путем растворения одной гранулы в 1 мл 0,5 М NaH₂PO₄. Гранулы с лучшей стабильностью и жизнеспособностью в дальнейшем использовали для фикоремедиации.

Эксперимент по фикоремедиации

Отбор проб сточных вод и подготовка синтетических сточных вод. Водорослевые гранулы были проверены на эффективность удаления нитратов и фосфатов из бытовых сточных вод, а тяжелых металлов — из

синтетических сточных вод. Для исследования бытовые сточные воды отбирали на станции очистки сточных вод Каруни, синтетические сточные воды готовили путем растворения в воде тяжелых металлов цинка, меди, хрома, двухвалентного железа и марганца в концентрации 25 частей млн⁻¹ каждого металла. После отбора сточных вод была проведена их фильтрация путем седиментации с последующим фильтрованием через фильтровальную бумагу Whatmann No.1 для удаления любых нерастворимых твердых частиц.

Исследование эффективности гранул с микроводорослями для фикоремедиации бытовых и синтетических сточных вод. Для определения уровня содержания нитратов и фосфатов в бытовых сточных водах неочищенные сточные воды были проанализированы Американской ассоциацией общественного здравоохранения (АРНА) (2005). Содержание тяжелых металлов в синтетических сточных водах устанавливали с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии (Agilent 200AA Series, США). Как бытовые, так и синтетические сточные воды обрабатывали альгинатными и альгинатно-каррагинановыми гранулами с микроводорослями. Содержание нитратов и фосфатов, а также тяжелых металлов анализировали в течение всего периода обработки (12 сут). Уровень нитратов и фосфатов изучали согласно протоколу АРНА (2005) каждые третьи сутки до 12-го дня. Уменьшение содержания тяжелых металлов (Zn, Cu, Cr, Fe и Mn) анализировали с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии в конце 12-х суток. Гранулы без микроводоросли служили контролем; все тесты проводили в трех повторностях.

Результаты

Идентификация изолята микроводорослей

Микроскопическое наблюдение показало, что клетки в основном были одиночные, эллиптические или слитые в ряды, с небольшими шиповидными отростками на внешних клетках колонии. Абсорбцию геномной ДНК A260/A280 в соотношении 1,8 : 1,9 сочли хорошей и использовали для амплификации ПЦР. Размер геномной ДНК был в диапазоне > 10 т.п.н. ПЦР амплифицирована с использованием 18S рДНК, продукт ПЦР был около 1100 п.н. Полученная необработанная последовательность была урезана, отредактирована и проанализирована для идентификации. Филогенетический анализ проводили на конкатенированном наборе данных, полученных в результате поиска NCBI BLAST с использованием нуклеотидной последовательности индийского штамма микроводоросли. Последовательности 18S рДНК штамма KACC 2 (893 п.н.) имели 99% сходства с *Asterarcys quadricellulare* (KT991532), *Scenedesmus* sp. (KT279490), *Pectinodesmus* sp. (AB917099), *Scenedesmus regular* (FR865732). Филогенетический анализ с использованием последовательностей 18S рДНК показал, что штамм KACC 2 наиболее близок к *Scenedesmus* sp. (рис. 1). На основе полученных

результатов и с учетом морфологических характеристик штамма КАСС 2, его идентифицировали как *Scenedesmus rubescens* КАСС 2. Выделенные последовательности были депонированы в GenBank под регистрационным номером MG009232.

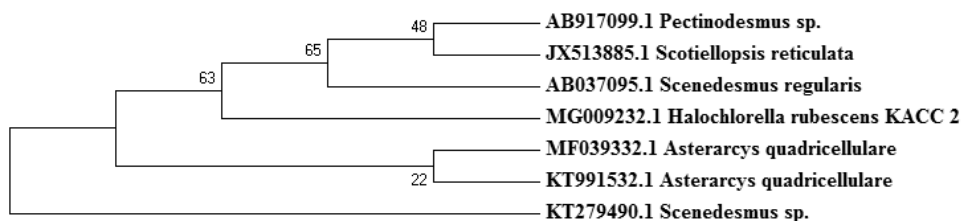


Рис. 1. Построение филогенетического дерева для штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 с использованием последовательности 18S рДНК

Скрининг и характеристика гранул из разных полимеров

Гранулы из альгината, каррагинана, агара, альгинат-каррагинана, ПВС-альгината и альгинат-хитозана образовывали прочные сферические структуры (рис. 2). По результатам изучения воздействия на них различных значений рН (4, 7, 10) мы оценивали устойчивость гранул с точки зрения их формы и веса. Изменения рН среды и массы гранул контролировали ежедневно в течение 10 дней (рис. 3).

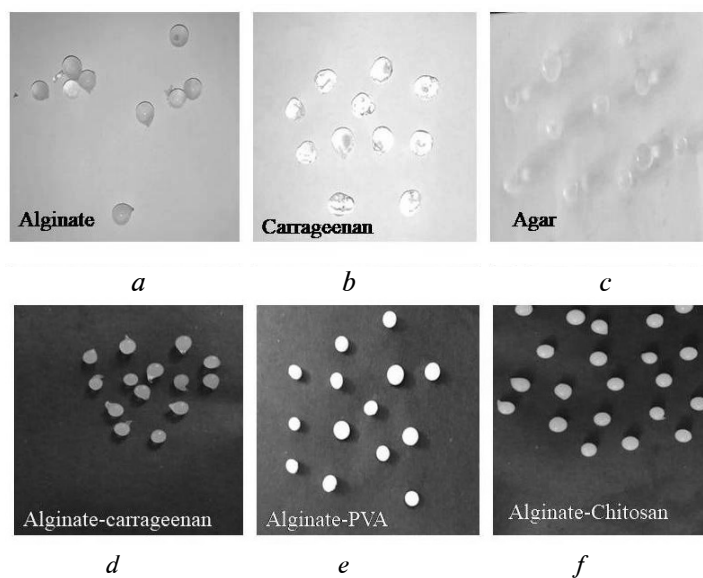


Рис. 2. Гранулы, синтезированные с использованием различных полимеров: *a* – альгинат, *b* – каррагинан, *c* – агар, *d* – альгинат-каррагинан, *e* – альгинат-ПВС, *f* – альгинат-хитозан

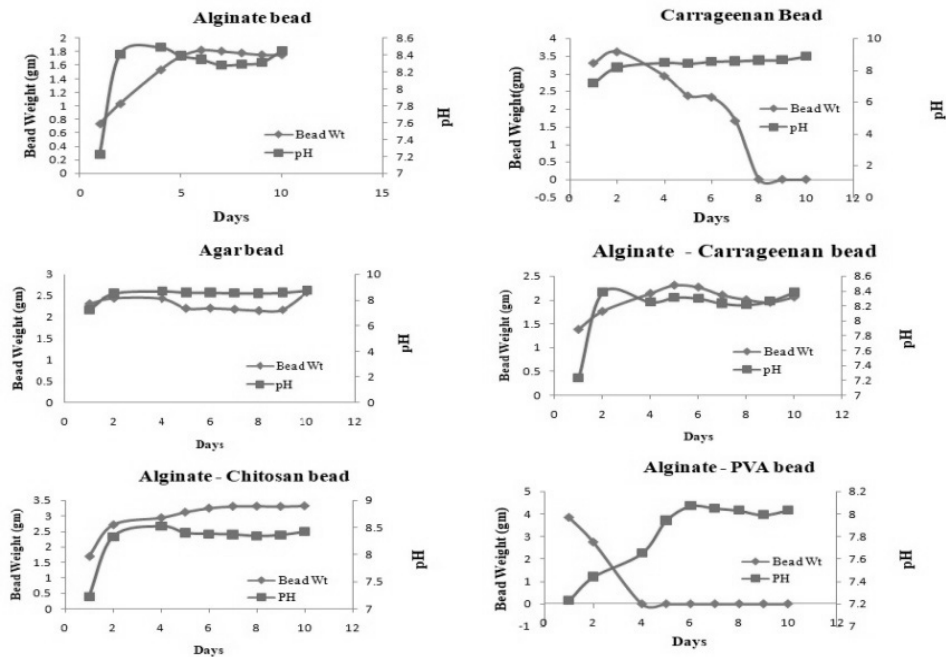


Рис. 3. Определение стабильности гранул по изменению их веса при различных значениях рН

Характеристика водорослевых гранул

Водорослевые гранулы были получены в результате соединения клеток штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 с альгинатным, агаровым и альгинатно-каррагинановым полимерами (рис. 4). Образовавшиеся гранулы имели сферическую форму, плотность их составляла почти 5000 кл/мл. Альгинатно-водорослевые гранулы имели стабильную концентрацию 3800 кл/мл в конце 10-го дня при рН 7, тогда как у агарово-водорослевых гранулах при всех значениях рН наблюдалось резкое снижение концентрации клеток (до 1700 кл/мл) на 10-й день. Водорослевые гранулы, синтезированные с использованием альгинат-каррагенана, имели стабильную концентрацию клеток (5000 кл/мл при рН 4; 4400 кл/мл при рН 7 и 4045 кл/мл при рН 10). Стабильность водорослевых гранул также оценивали по их весу при различных значениях рН и температуры. Обнаружено, что альгинатные гранулы и альгинатно-каррагенановые гранулы стабильны при нейтральном рН и температуре 27 °С (рис. 5). Поэтому именно эти гранулы были отобраны для изучения фикоремедиации.

Потенциальные возможности использования гранул с микроводорослями для фикоремедиации

При проверке эффективности альгинатных и альгинатно-каррагинановых микроводорослевых гранул для извлечения азота и фосфатов из сточных вод было обнаружено, что они остаются стабильными в течение 10 дней при различных значениях рН и температуры.

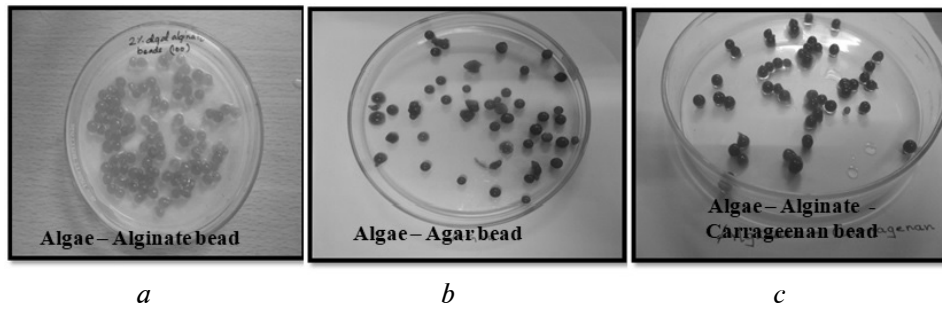


Рис. 4. Водорослево-полимерные гранулы, состоящие из клеток штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 и полимеров (a) альгината (b), агара и (c) альгинат-каррагинана

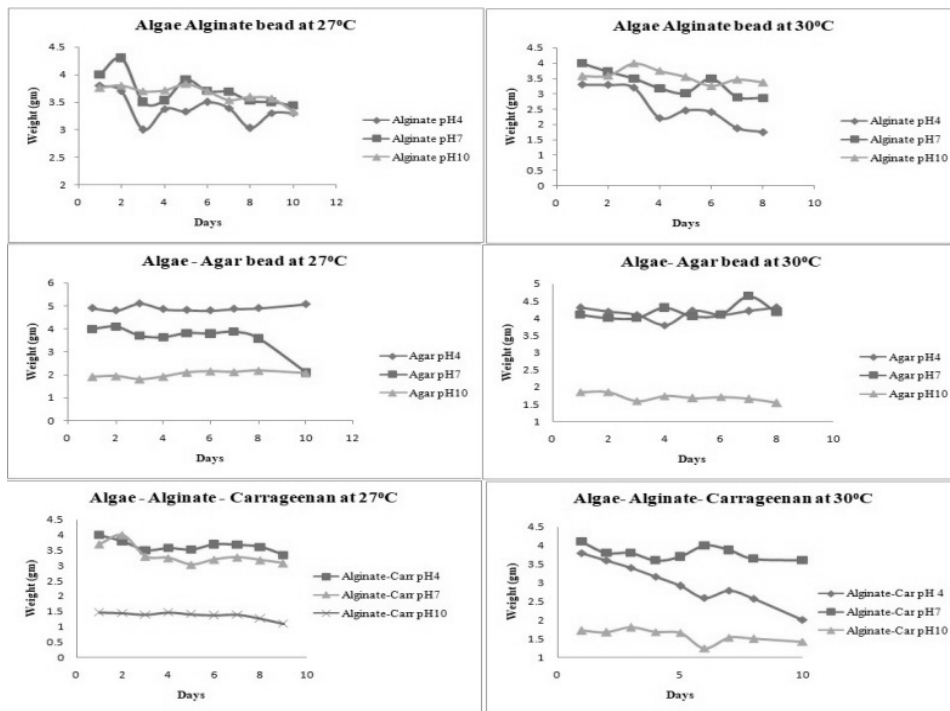


Рис. 5. Определение стабильности гранул по изменению их веса при 27 и 30 °С

Было рассчитано количество клеток водорослей в одной грануле, чтобы проследить за изменением их количества в период эксперимента. Сравнение эффективности уменьшения содержания нитратов и фосфатов проводили для микроводорослевых гранул, полученных в результате синтеза с различными полимерами, а также гранул без водорослей (таблица). Установлено, что в конце 12-го дня эксперимента содержание фосфатов при использовании альгинатных микроводорослевых гранул снижалось на 97,7%. В присутствии альгинатно-каррагеноновых гранул с водорослями этот показатель достигал 98,82%; содержание нитратов снижалось на 75,6 и 70,45% соответственно.

Сокращение содержания тяжелых металлов анализировали в конце 12-го дня в синтетических сточных водах, содержащих по 25% железа, марганца, цинка, хрома и меди. Сравнивали способность поглощать тяжелые металлы иммобилизованными и свободными клетками водорослей. В среде и иммобилизованными клетками водорослей отмечалось значительное снижение содержания Cr, Cu, Fe и Mn по сравнению со взвесью свободных клеток (рис. 6). Установлено, что иммобилизованные водоросли способствовали наиболее значительному снижению количества меди (на 64,17%) и Zn (на 42%).

Таблица

Процент снижения содержания нитратов и фосфатов иммобилизованными клетками штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 в бытовых сточных водах

Сутки	Снижение содержания фосфатов, %				Снижение содержания нитратов, %			
	Гранулы							
	без водорослей		с <i>Scenedesmus rubescens</i> КАСС 2		без водорослей		с <i>Scenedesmus rubescens</i> КАСС 2	
	Alg	Alg-Ca	AAlg	AAlg-Ca	Alg	Alg-Ca	AAlg	AAlg-Ca
3	1,34	1,26	62,42	61,87	2,27	0,909	29,54	18,18
6	1,73	1,41	96,85	95,87	3,18	2,045	55,22	31,81
9	1,73	1,73	97,05	98,82	3,63	2,72	70,45	45,45
12	2,51	2,2	97,71	98,85	4,31	3,4	75,68	70,45

Обозначения гранул: Alg – альгинатные, Alg-Ca – альгинат-каррагинановые, AAlg – альгинатные с клетками водоросли, AAlg-Ca – альгинат-каррагинановые с клетками водоросли.

Фикоремедиация сточных вод свободноживущими клетками штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2

Было установлено, что иммобилизованные микроводоросли *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 в полимерах способны удалять нитраты и фосфаты в сточных водах. В нашем исследовании наблюдалось снижение содержания фосфатов приблизительно на 98% и нитратов на 75%. Даже содержание тяжелых металлов в синтетических сточных водах постепенно снижалось в присутствии иммобилизованных микроводорослей по сравнению со свободными клетками. Данное исследование показывает, что иммобилизация микроводорослей является эффективным методом биоремедиации благодаря своей простоте, экономической эффективности и возможности повторного использования. По нашим данным, на 10-й день наблюдения клетки штамма КАСС 2 использовали 83,88% нитратного азота и 100% фосфатов из бытовых сточных вод, что подтвердило их эффективность для быстрого удаления как нитратов, так и фосфатов в течение 10 дней. Также были проанализированы концентрации тяжелых металлов в синтетических сточных водах до и после обработки микроводорослями

(рис. 6). Как видно, содержание тяжелых металлов снижалось как в присутствии иммобилизованных, так и свободноживущих клеток, тогда как пустые альгинатные гранулы не оказывали почти никакого действия. Снижение содержания различных тяжелых металлов было следующим: Mn (13%), Cd (26%), Fe (28%) и Zn (38%), Cr (55%).

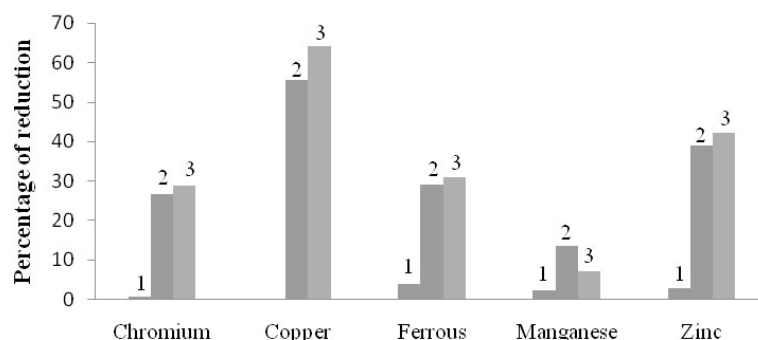


Рис. 6. Снижение количества тяжелых металлов в синтетических стоках с использованием пустых альгинатных гранул (1), свободноживущих клеток микроводоросли (2) и гранул с иммобилизованными клетками (3)

Обсуждение

Использование микроводорослей для очистки сточных вод изучается уже не одно десятилетие (De la Noue, De Pauw, 1988; Tang et al., 1997), как и многие другие эффективные способы их очистки (Gonzalez et al., 1997). В нашем исследовании изучали стабильность и эффективность микроводорослевых гранул в зависимости от типа полимера, использованного для их синтеза. Сравнение гранул, синтезированных из различных природных и синтетических полимеров, показало, что альгинатные, альгинат-каррагинановые и агаровые гранулы оказались наиболее стабильными с точки зрения сохранения веса и формы гранулы. Эти результаты согласуются с выводами Mogeira et al. (2006), которые сообщали о стабильности и пригодности различных концентраций альгинатных гранул для роста микроводорослей. В гранулах, изготовленных с использованием каррагенана и альгината-ПВС, признаки нарушения стали проявляться уже со 2-го дня, тогда как альгинатные, агаровые и альгинат-каррагенановые гранулы сохраняли стабильную массу и pH в течение 10 дней. Было обнаружено, что альгинатные и агаровые гранулы имеют стабильный вес с 5-го по 10-й день, тогда как каррагинановые гранулы разрушаются (см. рис. 3). В случае смешанных полимеров альгинат-каррагинановые и альгинат-хитозановые гранулы оказались стабильными по массе и pH, тогда как альгинат-ПВС гранулы разрушались уже на вторые сутки. Martinsen et al. (1989) изучили взаимосвязь между композиционными характеристиками нескольких альгинатов и прочностью геля. Авторы обнаружили,

что механическая прочность гранул увеличивается с ростом концентрации альгината и содержания гулурановых мономеров в полимерной цепи. Основываясь на этих результатах, гранулы, синтезированные из альгината, агара и альгината-каррагенана, были отобраны для иммобилизации водорослевых гранул.

Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что культура клеток *S. rubescens* КАСС 2, иммобилизованных в гранулах, синтезированных с использованием альгината и альгинат-каррагенана, росла значительно лучше, чем при иммобилизации в любом из оставшихся типов гранул. Также было обнаружено, что эти гранулы являются наиболее стабильными и подходящими для обеспечения хорошего роста клеток *S. rubescens* КАСС 2 при воздействии различных рН и температуры. В конце периода воздействия, на основе визуального осмотра, альгинатные и альгинат-каррагинановые гранулы с иммобилизованными клетками *S. rubescens* были взяты для фикоремедиации бытовых и синтетических сточных вод. Ruiz-Marin et al. (2010) сообщали, что плотность клеток *S. obliquus* была меньше, чем у *Ch. vulgaris*. После иммобилизации клетки обоих видов стали мельче (2,7 мкм у *Ch. vulgaris* и 4,2 мкм у *S. obliquus*). Высказывалось предположение (Tam et al., 1994; Lau et al., 1997), что клетки меньшего размера имеют больше шансов занять однородное пространство в матрице геля, что приводит к формированию большей плотности клеток на гранулу.

Эффективность удаления нитратов и фосфатов из бытовых сточных вод оценивали, сравнивая иммобилизованные клетки *S. rubescens* КАСС 2 с контрольными гранулами без микроводорослей. Для исследования мы использовали стерильные сточные воды, чтобы избежать возможного вмешательства присутствующих в них бактерий (Gonzalez-Bashan et al., 2000). В целом, сточные воды содержат большое количество соединений азота и фосфора (Oswald, 1988; Lau et al., 1997), которые можно использовать для выращивания микроводорослей (Gonzalez, Bashan, 2000). Наше исследование показало, что в результате иммобилизации клеток *S. rubescens* альгинатными и альгинатно-каррагинановыми полимерами происходит стабилизация клеток микроводорослей и быстрое удаление нитратов и фосфатов из сточных вод. При использовании альгината в качестве полимерной матрицы клетки штамма *S. rubescens* КАСС 2 могли утилизировать 97% фосфатов и 75% нитратов, содержащихся в сточных водах. С альгинатом-каррагинаном в качестве матрицы они могут удалять 98% фосфатов и 70% нитратов. Nameed (2007) обнаружил, что клетки *S. vulgaris*, иммобилизованные в альгинатных гранулах, были более эффективными в удалении азота и фосфора из сточных вод, чем чистые альгинатные гранулы. Автор установил, что оптимальный запас клеток составляет $1,5 \times 10^6$ клеток на гранулу⁻¹, а размер гранулы 4 мм был идеальным для очистки сточных вод. В данном исследовании наши результаты сопоставимы с таковыми по удалению нитратов и фосфатов свободноживущими клетками

штамма *S. rubescens* КАСС 2 из бытовых сточных вод (они способны удалять 83% нитратов и 100% фосфатов). Отмечено значительное удаление азота и фосфора по сравнению с суспензией клеток. Таким образом, иммобилизацию клеток *S. rubescens* можно использовать в качестве потенциального инструмента для разработки новых способов очистки сточных вод. Acevedo et al., (2017) сообщили, что штамм *Scenedesmus* sp., выделенный из водоема Порк II, эффективно удалял нитраты и фосфаты из неочищенных и синтетических бытовых сточных вод. В синтетических сточных водах с низкой и средней концентрацией этих соединений наблюдался более высокий процент их удаления – 50–60% азота и 40–70% фосфора, при этом наблюдался максимальный рост 1×10^7 клеток на 1 мл. Для реальных бытовых сточных вод удаление составляло 65% для фосфора и 80% для азота (Acevedo et al., 2017).

Удаление тяжелых металлов из синтетических сточных вод было изучено при различных концентрациях тяжелых металлов. Эффективность иммобилизованных водорослей в удалении тяжелых металлов сравнивали с контрольными гранулами и суспензией культуры водорослей. Обнаружено, что иммобилизованные клетки *S. rubescens* КАСС 2 эффективнее удаляют тяжелые металлы, чем свободноживущие клетки того же штамма. Значительное поглощение Co, Zn и Mn было также зарегистрировано для клеток *Chlorella salina*, иммобилизованных в альгинате (Garnham et al., 1992).

Заключение

Альгинатные и альгинатно-каррагинановые гранулы наиболее стабильны по сравнению с гранулами, изготовленными из других природных и синтетических полимеров. Установлено, что иммобилизованные в полимерных гранулах клетки штамма *Scenedesmus rubescens* КАСС 2 могут снижать уровень нитратов и фосфатов в сточных водах. В нашем исследовании содержание фосфатов уменьшалось на 98%, нитратов на 75%, а содержание тяжелых металлов эффективнее снижалось в присутствии иммобилизованных микроводорослей по сравнению с их свободноживущими клетками. Показано, что иммобилизация микроводорослей является эффективным методом биоремедиации благодаря его простоте, экономичности, возможности повторного использования.

Авторы выражают благодарность Научно-исследовательскому совету Департамента науки и техники при правительстве Индии за финансовую поддержку (грант SO: No / SB / FT / LS-389/2012) и Карунскому научно-технологическому институту за предоставление условий для исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acevedo S., Pino N.J., Pecuela G.A. 2017. Biomass production of *Scenedesmus* sp. and removal of nitrogen and phosphorus in domestic wastewater. *Environ. Eng.* 193(1): 185–193.

- Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. 2004. Enhancement of lead (II) biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Eng. Life Sci.* 4(2): 171–178.
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 2005. 19th ed. Amer. Publ. Health Assoc., Amer. Water Works Assoc. and Water Pollut. Control Federat. Washington, DC.
- Bailliez C., Largeau C., Berkaloff C., Casadevall E. 1986. Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. *Appl. Microbiol. Biot.* 23(5): 361–366.
- Chevalier P., de la Noue J. 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb. Technol.* 7(12): 621–624.
- De la Noue J., de Pauw N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* 6(4): 725–770.
- De la Noue J., Proulx D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29(2–3): 292–297.
- De-Bashan L.E., Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101(6): 1611–1627.
- De la Noue J., Laliberte G., Proulx D. 1992. Algae and wastewater. *J. Appl. Phycol.* 4(3): 247–254.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19(1): 11–15.
- Garbisu C., Hall D.O. 1993. Removal of phosphate by foam immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous flow bioreactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 181–189.
- Garbisu C., Hall D.O., Serra J.L. 1992. Nitrate and nitrite uptake by free-living and immobilized N-starved cells of *Phormidium laminosum*. *J. Appl. Phycol.* 4(2): 139–148.
- Garnham W.G., Codd G.A., Gadd M.G. 1992. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green *Chlorella salina* immobilized in alginate microbeads. *Environ. Sci. Technol.* 26(9): 1764–1770.
- Gonzalez L.E., Bashan Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1527–1531.
- Gonzalez L.E., Canizares R.O., Baena S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* 60(3): 259–262.
- Gonzalez-Bashan L.E., Lebsky V.K., Hernandez J.P., Bustillos J.J., Bashan Y. 2000. Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can. J. Microbiol.* 46(7): 653–659.
- Hameed M.S.A. 2007. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Afr. J. Biotechnol.* 6(10): 1185–1191.
- Hameed M., Ebrahim O. 2007. Review: biotechnological potential uses of immobilized algae. *Int. J. Agr. Biol.* 9(1): 183–192.
- Hung C.P., Lo H.F., Hsu W.H., Chen S.C., Lin L.L. 2008. Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150(2): 157–170.
- Laliberte G., Proulx D., De Pauw N., de la Noue J. 1994. Algal technology in wastewater treatment. In: *Algae and Water Pollution*. Arch. Hydrobiol. Berlin. Pp. 283–302.

- Lau P., Tam N.F.Y., Wong Y.S. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ. Technol.* 18(9): 945–951.
- Liu Y., Rafailovich M.H., Malal R., Cohn D., Chidambaram D. 2009. Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(34): 14201–14206.
- Mallick N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals.* 15(4): 377–390.
- Martinsen A., Skjak-Bræk G., Smidsrod O. 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 33(1): 79–89.
- Mohamadnia Z., Zohuriaan-Mehr M.J., Kabiri K., Jamshidi A., Mobedi H. 2007. pH-sensitive IPN hydrogel beads of carrageenan-alginate for controlled drug delivery. *J. Bioact. Compat. Polym.* 22(3): 342–356.
- Moreira S.M., Moreira-Santos M., Ribeiro R. 2006. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enz. Microbial Technol.* 38(1–2): 135–141.
- Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schroder U., Jeppsson U., Larsson P., Mosbach K., Brodelius P. 1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17(6): 319–326.
- Oswald W.J. 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge Univ. Press. Pp. 305–328.
- Piligaev A.V., Sorokina K.N., Bryanskaya A.V., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Parmon V.N. 2015. Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production. *Algal Res.* 12: 368–376.
- Proulx D., de la Noue J. 1988. Removal of macronutrients from wastewaters by immobilized microalgae. In: *Bioreactor immobilized enzymes and cells: fundamentals and applications*. New York: Elsevier Appl. Sci. Pp. 301–310.
- Ruiz-Marin A., Mendoza-Espinosa L.G., Stephenson T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Biores. Technol.* 101(1): 58–64.
- Singh S.K., Bansal A., Jha M.K., Dey A. 2012. An integrated approach to remove Cr (VI) using immobilized *Chlorella minutissima* grown in nutrient rich sewage wastewater. *Biores. Technol.* 104: 257–265.
- Tahtat D., Mahlous M., Benamer S., Khodja A.N., Oussedik-Oumehdi H., Laraba-Djebari F. 2013. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. *Int. J. Biol. Macromol.* 58: 160–168.
- Tam N.F.Y., Wong Y.S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ. Poll.* 107(1): 145–151.
- Tam N.F.Y., Lau P.S., Wong Y.S. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Wat. Sci. Technol.* 30(6): 369–374.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596–1599.

- Tang E.P.Y., Vincent W.F., Proulx D., Lessard P., de la Noue J. 1997. Polar cyanobacteria versus green algae for tertiary waste-water treatment in cool climates. *J. Appl. Phycol.* 9(4): 371–381.
- Zhan J.F., Jiang T., Pan J. 2013. Immobilization of phospholipase a1 using a polyvinyl alcohol-alginate matrix and evaluation of the effects of immobilization. *Braz. J. Chem. Eng.* 30(4): 721–728.

Поступила 02.07.2018

Подписал в печать С.П. Вассер

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2019, 29(1): 88–103

<https://doi.org/10.15407/alg29.01.088>

Pandian S.K., Thomas J.

Algae Biomass Research Lab., Department of Biotechnology, School of Agriculture and Biosciences, Karunya Institute of Technology & Sciences, Coimbatore 641114, Tamil Nadu, India

INTEGRATED STUDY ON NUTRIENTS AND HEAVY METALS REMOVAL FROM DOMESTIC WASTEWATER USING FREE AND IMMOBILIZED STRAIN *SCENEDESMUS RUBESCENS* KACC 2 (*CHLOROPHYTA, CHLOROPHYCEAE*)

Microalgae have immense potential in remediating toxic content in wastewater and serve as prospective organisms in the treatment of wastewater. Our present study reduces the input cost for microalgae cultivation using wastewater as a growth medium. *Scenedesmus rubescens* KACC 2, isolated from Siruvani freshwater body (India), was investigated for removal of nitrates, phosphates and heavy metals by growing microalgae in wastewater both as free cells and immobilized algal cells. Among the various polymers used for immobilization, beads with good stability were selected (alginate and alginate-carrageenan) for phycoremediation. Growth and uptake of nutrients in the culture were compared and reduction in the levels of nitrates, phosphates, and heavy metal contents were monitored periodically. Reductions of phosphates (98%) and nitrates (75%) were observed with alginate algal beads. Mn, Zn, and Cu were more reduced by algae beads than with free cells. The study concludes that the immobilized microalgae were effective in wastewater treatment, as with free cells, by utilizing nutrients and serve as a cost-effective green technology in biomass generation.

Key words: microalgae, effluents, phycoremediation, cost-effective medium, immobilization, green technology