

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ
УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та
біотехнології

**РОЗРОБКА СПОСОБУ ІММОБІЛІЗАЦІЇ
КЛІТИН ХЛОРЕЛИ НА ЦЕЛЮЛОЗНИХ
НОСІЯХ**

Допущена до захисту
«_____»_____2023р.

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
молекулярної біології та
біотехнології (денна форма)
Груздева С.В.

Завідувач кафедри
д.б.н., проф.
Божков Анатолій Іванович

Науковий керівник: доцент,
к.б.н. Голтвянський
Анатолій Володимирович

Оцінка «_____»
«_____»_____2023р.

Харків 2023

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	5
1. РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Пасивна іммобілізація, адсорбція	7
1.2. Активна іммобілізація	9
1.3. Сучасне використання іммобілізованих водоростей	15
2. РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	18
2.1. Підготовчі роботи.....	18
2.2. Підготовка фотобіореактору та водоростевої біоплівки.....	20
2.3. Робота з мікрководоростями та їх іммобілізація.....	22
2.4. Підготовчий етап роботи з целюлозною плівкою.....	26
2.5. Збір, іммобілізація мікрководоростей та видалення поживних речовин.....	30
2.6. Аналітичні методи.....	32
2.7. Розрахунок кривої росту.....	33
2.8. Експерименти	35
3. РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	41
3.1. Характеристика біологічних капсул сульфат целюлози натрію/полідиметил-діаліл-амонійхлориду для іммобілізованого культивування мікрководоростей <i>Chlorella</i> sp.....	41
3.2. Культивування водоростевої біоплівки з використанням різних лігноцелюлозних матеріалів як носіїв.....	44

3.3. Дослідження іммобілізованої <i>Chlorella</i> sp. за допомогою нанопорошку мідій та хітозану.....	47
3.4. Посилення утворення біоплівки та росту мікроводоростей шляхом підготовки целюлозного субстрату з шорсткою поверхнею.....	54
3.5. Видалення азоту та фосфору іммобілізованою на агарі <i>Chlorella saccharophila</i> при тривалому зберіганні при кімнатній температурі.....	55
3.6. Видалення та відновлення ртуті <i>in vitro</i> з використанням іммобілізованої живої біомаси <i>Chlorella</i> sp.....	62
3.7. Вплив кристалічної наноцелюлози на розділення культивованих у стічних водах мікроводоростей і склад біомаси.....	65
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	72
АНОТАЦІЯ.....	77
SUMMARY.....	78

РЕФЕРАТ

Роботу викладено на 78 сторінках друкованого тексту (шрифт Times New Roman, 14-й кегль, полуторний інтервал), містить 13 таблиць, 21 рисунок, 40 літературних джерел.

Метою роботи було провести аналіз літератури щодо існуючих методів іммобілізації мікроводоростей, зокрема представників роду *Chlorella* на природних целюлозних носіях.

Целюлозні плівки показали відмінні властивості адгезії мікроводоростей. В результаті досліджень встановлено, що целюлозні плівки з шорсткою поверхнею та високим коефіцієнтом адсорбції води мають величезний потенціал у якості субстрату для культивування прикріплених мікроводоростей, які сприяють росту клітин мікроводоростей та утворенню біоплівки.

Також іммобілізовані мікроводорості мають великий потенціал для видалення поживних речовин під час очищення стічних вод.

Показано, що видалення ртуті іммобілізованими клітинами *Chlorella* *sp.* було близьким до 99%, це демонструє їх потенціал як метода біоремедіації, тобто це можна розглядати як біотехнологічну альтернативу для усунення ртуті з водних екосистем.

За результатами досліджень виявлено, що іммобілізовані мікроводорості продемонстрували більший відсоток видалення забруднень, ніж вільні клітини.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, целюлозні носії, іммобілізовані клітини, біоплівка, стічні води.

ВСТУП

Використання мікроводоростей у біотехнології зросло в останні роки, ці організми залучені до харчової, косметичної, аквакультурної та фармацевтичної промисловості [1]. Але малий розмір окремих клітин означає проблему у застосуванні в біотехнологічних процесах цих організмів. Щоб вирішити ці проблеми, були вдосконалені методи іммобілізації клітин [2]. Іммобілізована клітина визначається як жива клітина, якій за допомогою природних або штучних засобів, перешкоджають самостійному переміщенню з її вихідного місця до всіх частин водної фази системи. Прихована концепція полягає в тому, що іммобілізовані мікроводорості в матрицях, можуть допомогти у вирішенні біотехнологічних задач з культурою мікроводоростей, або у вигляді отримання специфічного метаболіту, або у видаленні забруднюючих речовин. Ця концепція розвинулася з базової природи його компонентів, мікроводоростей та іммобілізуючої матриці [3].

Більшість загальних методів іммобілізації мікроорганізмів можна легко модифікувати та застосувати до мікроводоростей, додаючи фактор дизайну, що це фотосинтетичні мікроорганізми, яким потрібне світло. Було визначено шість різних типів іммобілізації: ковалентне з'єднання, афінна іммобілізація, адсорбція, утримання в емульсії рідина-рідина, включення у напівпроникні мембрани та в різні полімери [4]. Ці типи знерухомлення можна згрупувати як «пасивні» (використання природної тенденції мікроорганізмів прикріплюватися до поверхонь – природних або синтетичних – і рости на них) та «активні» (флокулянти, хімічне прикріплення та інкапсуляція в гелі) [5].

Включення до структури гелю в природних полісахаридних матрицях є найбільш широко використовуваним методом іммобілізації, зокрема, для мікроводоростей. Серед них найбільше використовують карагенан, агар і альгінат. Ці системи не створюють небезпеки для здоров'я, є екологічно

чистими, не створюють вторинного забруднення. Існує ще низка технічних аспектів цієї технології, які можна розробити та вдосконалити.

У зв'язку з цим, **метою** цієї роботи було провести аналіз літератури щодо існуючих методів іммобілізації мікроводоростей, зокрема представників роду *Chlorella* на природних целюлозних носіях.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні **завдання**:

1. Визначити вплив адсорбуючих матеріалів (носіїв) природного та синтетичного походження на іммобілізацію клітин мікроводоростей.
2. Охарактеризувати ефективність іммобілізованих систем (носій-мікроводорості) у вирішенні біотехнологічних задач.

Об'єкт дослідження: процес іммобілізації мікроводоростей.

Предмет дослідження: функціональні властивості носіїв.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Методи іммобілізації мікробіодоростей

1.1. Пасивна іммобілізація, адсорбція

Багато мікроорганізмів (включаючи деякі групи мікробіодоростей) мають природну тенденцію прикріплюватися до поверхонь і рости на них. Ця характеристика може бути використана для іммобілізації клітин на носіях різних типів. Ці процеси легко оборотні. Адсорбуючі матеріали (носії) для пасивної іммобілізації можуть бути природними або синтетичними. Що стосується природних носіїв, то були докладені зусилля із залученням біомаси люффи. Мочалкові губки є волокнистою опорою плодів різних видів з роду *Luffa* (*L. cylindrical*; *L. aegyptiaca*, *L. operculata*, *L. acutangula*). Цей носій є нетоксичним, неактивним, дешевим, механічно міцним і стабільним у довгострокових культурах [6]. Ахтар та ін. [7] використовували біомасу мочалкової губки для знерухомлення клітин *Chlorella sorokiniana*, для видалення нікелю (II) з водних розчинів.

Ця іммобілізована система продемонструвала накопичення на 25% більше нікелю, ніж вільні клітини після 20 хвилин експозиції. Огбонн та ін. [8] повідомили про можливість спільного використання хітозану для посилення процесу флокуляції вільних клітин на поверхні люфи, для клітин, які не мають природної тенденції прикріплюватися на цей тип носія. Проблема планування досліджень із залученням біомаси люффової губки полягає в повторюваності. Структура скелета плодів варіює від однієї рослини до іншої в залежності від умов культивування, кожна мочалка має різну структуру [6]. Пасивна іммобілізація клітин водоростей на мочалкових губках виглядає дуже перспективним напрямком для промислових чи комерційних цілей.

Синтетичні матеріали також широко використовуються в експериментах з пасивної іммобілізації. Urrutia та ін. [9] іммобілізували клітини *Scenedesmus obliquus* у полівінілі та поліуретані, щоб видалити нітрати з води, а також порівняли виживання адсорбованих клітин із захопленими клітинами шляхом змішування концентрованих клітин з одним із преполімерів. Було виявлено, що клітинний ріст вищий для адсорбованих клітин, ніж для захоплених клітин, можливо, через токсичність преполімерів. Ямагучі та ін. [10] досягли помітної деградації вуглеводнів за допомогою безбарвних гідрофобних мікроводоростей *Prototheca zopfii*, адсорбованих на 8-міліметрових кубиках пінополіуретану в бульбашковому реакторі. Huang та інші, [11], іммобілізували *Chlorella pyrenoidosa* в полівінілацетат (PVA) сульфаті для видалення нітратів і фосфатів, показали, що мікроводорості швидко розмножуються в гелі PVA-носія при рН від 5 до 10. Іммобілізована система мала вищу ефективність видалення у воді, коли рН був близький до нейтрального, а ефективність видалення нітратів досягала 80%; тим часом найвища ефективність для видалення фосфату становила 88%, але з часом знизилася до 56% [11]. Подібним чином *Chlorella vulgaris* і *Scenedesmus acutus* були іммобілізовані Travieso et al. [12] в поліуретанову піну для видалення хрому. Kannaiyan et al., [13], іммобілізували азотфіксуючі ціанобактерії *Anabaena azollae* також у поліуретанову піну.

Іммобілізовані в піні ціанобактерії, оброблені фунгіцидами, стимулюють активність нітрогенази та збільшують утворення аміаку значно вищими темпами. Інокуляція рисового поля цим препаратом значно збільшує відсоток аміаку, який ціанобактерії виділяють у паводкову воду рисових полів, збільшує вміст хлорофілу в рослинах і, зрештою, збільшує врожайність рисового зерна та соломи. Було продемонстровано, що ціанобактерія *Phormidium laminosum*, іммобілізована на полімерній піні, має потенційну цінність для видалення нітратів у системі безперервного потоку [1].

Spirulina maxima, іммобілізована в полімерах, посилено видаляє понад 90% амонію зі стічних вод [14]. Прикріплення перифітону до різних поверхонь також можна використовувати в екологічних дослідженнях. Адмірал та ін. [1] використовували мікробентосні водорості, що колонізують скляні диски, для вимірювання різних рівнів забруднення металами. Данилов і Екелунд [15] порівнюють моделі поселення перифітону на склі, дереві та пластику в різних озерах, помітили, що скло є найбільш бажаним матеріалом для кріплення, ніж дерево та пластик.

Прикріплення діатомових водоростей до предметних стекол і ріст популяції на цьому типі поверхонь вивчали Brandini та ін. [16] у субтропічному естуарії цілий рік, порівнюючи відмінності, спричинені глибиною, світлом, температурою та тиском. Наяр та ін. [1] також досліджували поселення видів діатомових водоростей (*Skeletonema costatum* і *Thalassiosira rotula*) разом із ціанофітами (*Synechococcus* sp.) у склянках у тропічному естуарії Сінгапуру. Robinson et al., [1], використовували іммобілізовані на склі нитки *Anabaena* sp. в експериментах з виробництва водню. Ці опорні матеріали можна використовувати з видами, які виявляють природну тенденцію до прикріплення та агрегації (діатомові водорості та ціанофіти).

1.2. Активна іммобілізація

У методах активної іммобілізації слід розрізняти використання флокулянтів, методів хімічного приєднання та включення в структуру геля.

1.2.1. Флокулянти. Щоб уникнути виснажливого центрифугування, коли водорості планується видалити з рідкого середовища, використовували флокулянти. Хітозан отримав найбільше застосування серед флокулянтів. Хітозан є лінійним амінополісахаридом β-D-глюкозаміну (2-аміно-2-дезоксид-β-D-глюкану), з'єднаних (1, 4)-зв'язками

[8]. Його отримують шляхом лужного деацетилювання хітину (отриманого з екзоскелетів ракоподібних). Цей полісахарид містить позитивно заряджені аміногрупи, забезпечуючи місця для адсорбції негативно заряджених частинок, і доведено, що він корисний для величезної кількості видів мікроводоростей. Оскільки він біологічно розкладається, його можна використовувати для збору водоростей для харчових цілей. Незручність хітозану в техніках іммобілізації полягає в його слабкій стійкості. Високов'язкі хітозанові гелі (2% р/v) продемонстрували вищу хімічну стабільність в експериментах. Хітозан може перешкоджати росту знерухомлених водоростей. Морейра та ін. [17] виявили низьку швидкість росту *Phaeodactylum tricornutum*, іммобілізованого в альгінаті, обробленому хітозаном як додатковим затверджувачем, у той час як клітини, іммобілізовані в альгінатних кульках, зміцнених CaCl_2 або SrCl_2 , продемонстрували зростання в 30 і 76 разів відповідно. Водорості *Scenedesmus* sp. при іммобілізації в хітозані показали вищу швидкість росту та видалення 70% нітратів і 94% фосфатів протягом 12 годин інкубації [18].

1.2.2. Хімічне прикріплення. Хімічна взаємодія спричиняє пошкодження клітинної поверхні та знижує життєздатність клітин, тому не рекомендується, коли планується іммобілізація живих клітин. Ефективність залучення іонів залежить від рН та іонної сили оточуючого середовища. Тим не менш, деякі експерименти не вимагають активного метаболізму клітин, і в техніках хімічної іммобілізації прикріплення використовуються неживі організми. Порівняли адсорбційну здатність двох біосорбентів флок-типу (флокул казеїну молока та глутарового альдегіду) для видалення морської мікроводорості *Heterosigma akashiwo*, яка може накопичувати Cd і Pb з водного розчину [19].

Фізичне захоплення в решітці гелю. Це широко використовувана техніка для іммобілізації водоростей. Захоплення в гелю можна здійснити за допомогою синтетичних полімерів (акриламід, фотозшиваючих смол,

поліуретанів), білків (желатину, колагену або яєчного білка) і природних полісахаридів (агарів, карагенанів або альгінатів) [1].

1.2.3. Синтетичні полімери для захоплення в гель. Мікрородорості іммобілізують на різних полімерах для різних біотехнологічних цілей, таких як дослідження морфології, виробництво тонких хімікатів, виробництво енергії та очищення стічних вод [20, 21]. У системах полімерної іммобілізації, подібно до інших систем біофільтрації, існує фізичне розділення між мікроорганізмами та очищеними стічними водами. Мікроорганізми знерухомлені (уловлені) живими всередині полімеру, оскільки його пори менші за мікроорганізми, тоді як рідина протікає крізь нього та підтримує їхній метаболізм і можливе зростання мікроорганізмів [22].

Іммобілізація в полімерах є особливо важливою у очищенні стічних вод, тому що це вирішує проблему збору біомаси, яку утворюють суспендовані у стічних водах мікрородорості [23]. Експериментально застосовано декілька синтетичних (акриламід, поліуретан, полівініл, смоли) і природних полімерів похідних полісахаридів водоростей (альгінат, карагенан, агар, агароза), а також хітозан — амінополісахарид, отриманий з хітину.

Незалежно від використовуваних полімерів, матеріал повинен бути гідрофільним, що дозволяє стічній воді дифундувати в кульку. Найбільш часто використовуваними природними полімерами є альгінат і карагенан [21]. Деякі природні полімери можуть розчинятися в сильно забруднених стічних водах, тоді як синтетичні полімери ні. Крім того, природні полімери більш вразливіші від факторів навколишнього середовища, зокрема розкладання мікроорганізмами. Однак коефіцієнт дифузії вищий у природних полімерів, і вони менш небезпечні.

Мікробна суспензія зміщується з полімером, а потім суміш твердіє з утворенням полімерного гелю шляхом з'єднання мономерів один з одним з

утворенням полімеру з найменшою взаємодією з живими мікроорганізмами, залишаючи мікроби всередині матриці недоторканими.

Полімеризація може бути досягнута кількома фізичними та хімічними обробками. Затвердіння можна здійснити шляхом зв'язування мономерів з дво- та багатовалентними катіонами. Швидкість затвердіння можна збільшити або зменшити шляхом зміни температури та різних хімічних і фотохімічних реакцій [22]. Механічна міцність кінцевого полімеру зростає зі збільшенням концентрації мономерів і використовуваних зшиваючих агентів. Сферичні намистини виготовляються шляхом повільного пропускання суміші через невеликий отвір, такий як шприц або спеціальне обладнання, призначене для цієї мети. Після виготовлення, кульки можна використовувати безпосередньо або з вторинним розмноженням у ростовому середовищі для збільшення кількості мікроорганізмів у кульці [24]. Намистини також можна висушити, як для сільськогосподарських інокулянтів або при використанні з мертвою біомасою. Імобілізовані мікрободорості продемонстрували певні переваги у метаболізмі, функції та поведінці. Імобілізація в альгінатних кульках багатих вуглеводнями мікрободоростей, таких як *Botryococcus braunii* і *Botryococcus protuberans*, призвела до значного збільшення вмісту хлорофілу, каротиноїдів, сухої маси та ліпідів під час стаціонарної фази росту та фази спокою порівняно з вільноживучими клітинами. Фотосинтез в обох видів був посилений порівняно з вільними клітинами з уповільненим старінням [25].

Імобілізація в хітозані захистила клітинні стінки *Synechococcus* sp. проти токсичної дії NaOH, показали кращий ріст, ніж вільні культури клітин [26]. Бланко та ін. [1] включили *Phormidium laminosum* у полісульфон (термопластичний матеріал) та епоксидну смолу (бісфенол та епіхлоргідрин), щоб перевірити біосорбційну здатність Cu(II), Fe(II), Ni(II) та Zn(II). Епоксидні смоли не підходять для захоплення живих клітин через токсичність компонентів. Therpenier та ін. [1] іммобілізували клітини

Porphyridium cruentum у пінополіуретан для отримання полісахаридів. Jeon та ін. [27] описав техніку іммобілізації в полівінілових спиртах і глутаровому альдегіді. Силікагелі також можна використовувати для іммобілізації клітин мікроводоростей. Рангасаяторн та ін. [28] перевірили адсорбцію кадмію іммобілізованою *Spirulina platensis* в альгінаті та силікагелі. Адсорбція кадмію клітинами, захопленими силікагелем, така ж висока, як і клітинами, захопленими альгінатом. Stark і Rayson [29] використовували іммобілізовані полісилікатні матеріали (клітини *Chlorella vulgaris*) для порівняння здатності зв'язувати іони металів.

1.2.4. Природні полісахариди для захоплення в гель. Захоплення в гель в природних полісахаридних матрицях є найбільш широко використовуваним методом іммобілізації, зокрема, для мікроводоростей. Серед них найбільше використовують карагенан, агар і альгінат. Карагенан — це термін для полісахаридів, отриманих з деяких *Rhodophyceae* (з сімейств *Gigartinaceae* і *Solieriaceae*) водно-лужною екстракцією. Карагенан складається з чергування одиниць 3-зв'язаної б-D-галактопіранози та 4-зв'язаної а-D галактопіранози. Він осідає у вигляді гелю в присутності катіонних сполук, таких як іони металів, аміни, похідні амінокислот і змішувані з водою органічні розчинники [1]. Різні ізомерні форми карагенану (i, j і k) в основному продукуються *Aghardhiella subulata* і *Chondrus crispus*. Також були розроблені процеси зміцнення з метою підвищення механічної стабільності матриць на основі карагенану. Травієсо та ін. [1] порівняли здатність видаляти поживні речовини трьох видів мікроводоростей (*C.vulgaris*, *Chlorella kessleri* та *Scenedesmus quadricauda*), іммобілізованих у різних матрицях, включаючи j карагенан. Агар — сульфатований галактан, отриманий з деяких видів червоних водоростей (з роду *Gelidium*, *Pterocladia* або *Gracilaria*).

Основний гелеутворюючий компонент агару (агарози) складається з лінійного ланцюга послідовностей (1–3) зв'язаних б-D-

галактопіранозильних одиниць і (1–4) зв'язків з 3,6-ангідро- α -D галактопіранозильними одиницями. Агар - це термооборотний гель. Цей полімер найкраще підходить для іммобілізації клітин мікроводоростей. Агар плавиться приблизно при 85 °C і застигає при 35-40 °C. Для іммобілізації агару слід відбирати види, здатні протистояти короткому термічному удару такого рівня. Температури вище 30 °C можуть пошкодити широкий спектр морських мікроводоростей (за винятком ціанофітів і деяких видів з роду *Dunaliella*, *Nannochloropsis* або *Tetraselmis*). Агароза була використана як фіксований шар іммобілізаційної матриці для *S. vulgaris* в експериментах з біосорбції Cu (II) [1]. Вони повідомили, що здатність до адсорбції металів у системі агароза-мікроводорості була нижчою, ніж у альгінату кальцію в тих же умовах. Іммобілізація *Dunaliella salina* в агарі значно покращила виробництво гліцерину порівняно з вільноживучими клітинами [1].

Найбільш широко використовуваним полісахаридним гелем для захоплення живих клітин є альгінат. Альгінати складають сімейство нерозгалужених бінарних кополімерів 1–4-зв'язаної β -D-мануронової кислоти та α -L-гулууронової кислоти (1). Комерційні альгінати добувають з бурих водоростей, переважно з роду *Laminaria* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*), види *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Lesonia negrescens* або види роду *Sargassum*, хоча всі бурі водорості містять альгінат у різних пропорціях, досягаючи до 40% сухої маси [1]. Головною перевагою захоплення альгінатним гелем є те, що іммобілізовані клітини не зазнають екстремальних фізико-хімічних змін під час процесу іммобілізації. Полімер розчинний у холодній воді та утворює термостабільні гелі. Герцберг і Дженсен [30] описали протокол іммобілізації морських мікроводоростей в альгінатних кульках.

Ране та ін. [31] іммобілізували *Tetraselmis suecica* в кульках Са-альгінату та порівняли клітинний ріст іммобілізованих і вільних клітин, та

виявили, що вміст хлорофілу на клітину в іммобілізованих клітинах був вищим. Морено-Гаррідо та ін. [5] перевірили ріст іммобілізованих клітин і стабільність кульок Са-альгінату за участю 11 видів морських мікроводоростей, виявили, що стабільність кульок також може залежати від іммобілізованих видів. Іммобілізація морської мікроводорості *Dunaliella tertiolecta* в альгінаті в гіперсолонному середовищі призводить до утворення значної кількості гліцерину [1]. Мікрокапсулювання також було розроблено шляхом спільного використання альгінату та полілізину [32]. Інша стратегія мікрокапсулювання для мікроводоростей описана Joо et al. [33], суміш 2% натрій карбоксиметилцелюлози, 2% CaCl₂ і мікроводорості перемішують у 0,8% альгінату натрію до утворення капсул. Після промивання капсули занурюють у 2% CaCl₂ на 20 хв з метою затвердіння.

1.3. Сучасне використання іммобілізованих водоростей

Детальна інформація про водорості, які були успішно іммобілізовані для виробництва різних матеріалів, підсумована (табл. 1).

Таблиця 1.1

Table I. Summary of algal taxa successfully immobilized and techniques adopted for the production of electricity, hydrogen, ammonia, polysaccharides and glycerol.

Algal taxa	Immobilization matrix	Production of	References
<i>Mastigocladus laminosus</i>	Alginate	Electricity	Ochiai, et al. 1980
<i>Phormidium</i> sp.	Alginate	Electricity	Ochiai, et al. 1983
<i>Anabaena azollae</i>	Alginate and polyurethane foam	Hydrogen	Rao & Hall (1984)
<i>A. cylindrica</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Jeanfils & Loudeche, R. (1986)
<i>A. cylindrica</i> CCAP 1403/2a	Alginate	Hydrogen	Muallem et al. (1983))
<i>A. cylindrica</i> UTEX B629	Polyurethane foam	Hydrogen	Lambert et al. (1979)
<i>A. sp.</i> N-7363	Glass beads	Hydrogen	Kayano et al. (1981)
<i>A. variabilis</i>	Agar	Hydrogen	Markov et al. (1995)
<i>Chamydomonas reinhardtii</i>	Hollow fibers	Hydrogen	Laurinavichene, et al. (2006)
<i>Chlorogloea fritschii</i>	Fiber glass matrix	Hydrogen	Muallem et al. (1983)
<i>Gleocapsa olpicola</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Antal & Lindblad (2005)
<i>Mastigocladus laminosus</i>	Agar	Hydrogen	Rao & Hall (1984)
<i>M. laminosus</i>	Alginate/agar	Hydrogen	Muallem et al. (1983)
<i>Nostoc muscorum</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Rao & Hall (1984)
<i>N. muscorum</i>	Agar	Hydrogen	Rao & Hall (1984)
<i>Oscillatoria lemmitica</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Muallem et al. (1983)
<i>Phormidium laminosum</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Muallem et al. (1983)
<i>Platymonas subcordiformis</i>	Polyurethane foam	Hydrogen	Guan et al. (2003)
<i>Porphyridium purpureum</i>	Polyurethane	Hydrogen	Brouers et al. (1983)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Polyurethane	Hydrogen	Brouers et al. (1983)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Polyurethane/alginate	Hydrogen	Antal & Lindblad (2005)
<i>Anabaena azollae</i>	Alginate	Ammonia	Kannaiyan et al. (1994)
<i>A. cylindrical</i>	Polyvinyl foam	Ammonia	Jeanfils & Loudeche (1986)
<i>A. sp.</i>	Alginate	Ammonia	Kerby, et al. (1983)
<i>A.sp</i> ATCC 27893	Alginate	Ammonia	Musgrave, et al. (1982)
<i>Aphanocapsa</i> MN-11	Alginate	Polysaccharide	Matsunaga, et al. (1996)
<i>A.sp.</i>	Alginate	Polysaccharide	Gonzalez, et al. (2005)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polyurethane	Polysaccharide	Gudin&Thepenier (1986)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Glycerol&glycolate	Day and Codd, (1985)
<i>Dunaliella parva</i>	Alginate	Glycerol&glycolate	Grizeau & Navarro, (1986)
<i>D. tertiolecta</i>	Alginate	Glycerol&glycolate	Grizeau & Navarro, (1986)
<i>D. salina</i>	Agar, agarose, alginate, carrageenan	Glycerol	Thakur and Kumar (2004)

Імобілізовані водорості для очищення стічних вод. Імобілізовані водорості були досліджені на предмет їх можливого використання для накопичення відходів, зокрема для поглинання азоту та фосфору (табл. 2).

Таблиця 1.2

Table II. Summary of algal taxa successfully immobilized for the removal of nitrogen and phosphorus.

Algal taxa	Immobilization matrix	Removal of	References
<i>Anabaena CH₃</i>	Alginate	Nitrogen	Lee <i>et al.</i> (1995)
<i>Anabaena doliolum</i> & <i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Nit. & phos.	Rai & Mallick (1992)
<i>Anabaena doliolum</i> & <i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Nit. & phos.	Rai & Mallick (1993)
<i>Anabaena doliolum</i> & <i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate, agar, chitosan, carrageenan	Nit. & phos.	Rai & Mallick (1994)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alginate	Nitrogen	Vilchez & Vega (1994)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alginate	Nitrogen	Vilchez & Vega (1995)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alginate	Nit. & phos.	Garbayo <i>et al.</i> (1996)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Phosphorus	Robinson <i>et al.</i> (1988)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Phosphorus	Robinson <i>et al.</i> (1989)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate, agarose	Phosphorus	Robinson & Wilkinson (1994)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Phosphorus	Robinson (1995)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Phosphorus	Robinson (1998)
<i>Chlorella kessleri</i> & <i>Chlorella vulgaris</i>	Carrageenan, alginate, polyurethane, polystyrene	Nit. & phos.	Travieso <i>et al.</i> (1996)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Alginate	Nit. & phos.	Wang and Huang (2003)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Nit. & phos.	Tam <i>et al.</i> (1994)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Carrageenan, alginate	Nit. & phos.	Lau <i>et al.</i> (1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Carrageenan	Nit. & phos.	Lau <i>et al.</i> (1998b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Nit. & phos.	Tam & Wong (2000)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Nit. & phos.	De Bashan <i>et al.</i> (2002b)
<i>Chlorella vulgaris</i> & <i>Chlorella kessleri</i>	Alginate	Nit. & phos.	Travieso <i>et al.</i> (1992)
<i>Chlorella vulgaris</i> & <i>Scenedesmus bijugatus</i>	Alginate	Nit. & phos.	Megharaj <i>et al.</i> (1992)
<i>Chlorella vulgaris</i> & <i>Scenedesmus ophioglossus</i>	Alginate	Nit. & phos.	Kobbai <i>et al.</i> (2000)
<i>Chlorella vulgaris</i> & <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Alginate, polyurethane	Nit. & phos.	Cordoba <i>et al.</i> (1995)
<i>Dunaliella salina</i>	Alginate	Nit. & phos.	Thakur & Kumar (1999)
<i>Phormidium laminosum</i>	Polyurethane	Nit. & phos.	Garbisu <i>et al.</i> (1991)
<i>Phormidium laminosum</i>	Polyvinyl	Nit. & phos.	Garbisu <i>et al.</i> (1992)
<i>Phormidium laminosum</i>	Polyvinyl	Phosphorus	Garbisu <i>et al.</i> (1993)
<i>Phormidium laminosum</i>	Cellulose	Nit. & phos.	Sawayama <i>et al.</i> (1998)
<i>Phormidium sp.</i>	Chitosan	Nit. & phos.	de la Noue & Proulx (1988a&b)
<i>Phormidium uncinatum</i>	Polyvinyl	Nitrogen	Gil & Serra (1993)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Alginate	Nit. & phos.	Kaya <i>et al.</i> (1995)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Alginate	Nit. & phos.	Kaya & Picard (1995)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Alginate	Nit. & phos.	Kaya <i>et al.</i> (1996)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Chitosan	Nit. & phos.	Kaya & Picard (1996)
<i>Scenedesmus intermedius</i>	Alginate	Nit. & phos.	Perez <i>et al.</i> (2004)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Carrageenan	Nit. & phos.	Chevalier & de la Noue (1985a)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Alginate	Nitrogen	Jeanfils & Thomas (1986)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Polyurethane, polyvinyl	Nitrogen	Urrutia <i>et al.</i> (1995)
<i>Scenedesmus quadricauda</i> & <i>Sc. Acutus</i>	Carrageenan	Nit. & phos.	Chevalier & de la Noue (1985b)
<i>Spirulina maxima</i>	Carrageenan	Nit. & phos.	Canizares <i>et al.</i> (1993,1994)

Видалення важких металів іммобілізованими водоростями. Один із головних інтересів до мікроводоростей у біотехнології зосереджений на їх використанні для видалення важких металів зі стоків і стічних вод. Дані в (табл. 3) демонструють, що понад 14 видів водоростей вже були вивчені на предмет їхнього потенціалу з видалення важких металів.

Клітини *Chlorella vulgaris*, іммобілізовані в альгінаті, забезпечують хорошу систему видалення широкого спектру важких металів. Значне

накопичення Co, Zn і Mn було зареєстровано для клітин *Chlorella salina*, іммобілізованих в альгінаті. Кульки *Chlorella vulgaris* були більш ефективними у видаленні важких металів зі стічних вод, ніж вільні клітини. Ефективність видалення заліза, нікелю та цинку була вищою в іммобілізованих клітинах, ніж у вільних на 27, 23 та 25% відповідно.

Таблиця 1.3

Table III. Summary of algal taxa successfully immobilized for heavy metal removal.

Algal taxa	Immobilization matrix	Removal of	References
<i>Aulosira fertilissima</i>	Glass beads	Ni, Cr	Banerjee <i>et al.</i> (2004)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Alginate	Cd	Volesky & Prasetyo (1994)
<i>Chlorella</i>	Alginate	Ni, Zn, Cd	Awasthi & Rai (2004)
<i>Chlorella vulgaris</i> & <i>Anabaena doliolum</i>	Alginate	Cu, Ni, Fe	Rai & Mallick (1992); Mallick & Rai (1993, 1994)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate	Hg	Wilkinson <i>et al.</i> (1990)
<i>Chlorella emersonii</i>	Alginate, agarose	Hg	Robinson & Wilkinson (1994)
<i>Chlorella homohaera</i>	Alginate	Cd, Zn, Au	De costa & Leite (1991)
<i>Chlorella salina</i>	Alginate	Co, Zn, Mn	Granham <i>et al.</i> (1992)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Loofa sponge	Pb	Akhtar <i>et al.</i> (2004)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Polyacrylamide	Cu, Pb, Zn	Damall <i>et al.</i> (1986 a&b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Cu, Ni	Lau <i>et al.</i> (1998b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Cu	Tam <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Cd, Zn	Ilangovan <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Fe, Ni, Zn	Abdel Hameed (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginate	Pb	Abdel Hameed (2006)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Silica gel	Hg	Martinez <i>et al.</i> (2006)
<i>Chlorella ellipsoidea</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> & <i>Navicula canalis</i> .	Alginate	Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb & Zn	Moreno-Garrido, <i>et al.</i> (2002)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Alginate	Cu, Zn	Travieso <i>et al.</i> (1999)
<i>Scenedesmus acutus</i> & <i>Chlorella vulgaris</i>	Polyurethane, carrageenan	Cd, Cr, Zn	Travieso <i>et al.</i> (2002)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Alginate	Co	Rangsayatorn <i>et al.</i> (2004)
<i>Spirulina platensis</i>	Silica gel	Cd	Rangsayatorn <i>et al.</i> (2004)
<i>Tetraselmis chui</i>	Alginate	Cu, Cd	Moreno-Garrido, <i>et al.</i> (2005)

Експериментально встановлено, що іммобілізація приводить до кращої стабільності біокатализатора та підвищення продуктивності порівняно з вільними системами. У випадку досліджень очищення стічних вод результати були хорошими. Іммобілізовані системи були ефективними в тестах на видалення важких металів і оцінку токсичності. Таким чином, іммобілізовані водоростеві системи в даний час мають ряд переваг перед вільними системами.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Підготовчі роботи

У роботі [34] використовували культуру *Chlorella sp.* яку отримали з лабораторії біоінженерії кафедри хімічної інженерії університету Монаш, Австралія. Модифіковане середовище MLA використовувалося як середовище для інокулята, а також як культуральне середовище для виробництва.

2.1.1. Приготування NaCS. NaCS був отриманий за допомогою методу гетерогенного сульфатування целюлози бавовняного лінту на основі модифікованого етанолу. Холодну концентровану сірчану кислоту та абсолютний етанол повільно змішували на льоду в об'ємному співвідношенні 1,51:1. Бавовняний лінт відомої маси поміщали в реакційний розчин у співвідношенні 1:50 мас./об. реакційного розчину і підтримували температуру $0 \pm 1,0$ °C протягом 60 хв. Тверду речовину, що залишилася, видаляли, віджимали досуха і промивали холодним абсолютним етанолом два або три рази для видалення залишків сірчаної кислоти. Потім тверду речовину поміщали в дистильовану воду з 1–1,5-кратним об'ємом реакційного розчину та перемішували протягом 10 хв. Залишки бавовняного лінту виділяли центрифугуванням при 4500 об/хв протягом 10 хв (Heraeus Multifuge 3 S-R, Німеччина). Супернатант, який містив розчинений NaCS, збирали та доводили до рН 9,3 за допомогою водного NaOH. Осадження проводили додаванням абсолютно холодного етанолу в 1–1,5-кратному об'ємі супернатанту. Осад NaCS сушили при 60°C у сушильній шафі протягом 24 год. Реакція сульфатування целюлози показана на (рис. 1(a)).

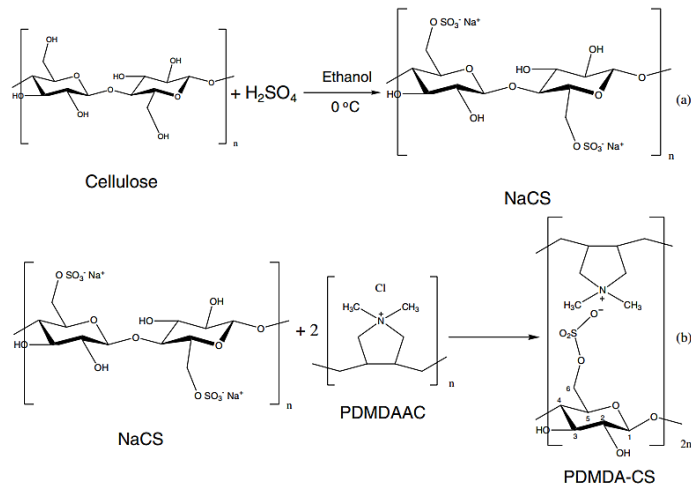


Рис. 2.1. (а) Схематичний опис синтезу NaCS; (б) Реакції зшивання NaCS-PDMDAAC

2.1.2. Приготування капсул NaCS-PDMDAAC Усі хімікати були реagentної якості та були придбані у Merck, Німеччина. Водний розчин NaCS готували в концентрації 2% (мас./об.). Для іммобілізації клітин мікроводоростей *Chlorella* sp. культуру центрифугували при 4500 об/хв протягом 10 хв і гомогенно змішували з водним розчином NaCS. Для виготовлення капсул використовували 6% водний PDMDAAC, розведений з 20% (w/v) водного розчину PDMDAAC (MW 200 000–350 000, Sigma-Aldrich, США). Водний розчин NaCS (або водну суміш NaCS-мікроводоростей) закачували насосом. у водний розчин PDMDAAC по краплях через стерильну силіконову трубку, з'єднану з одноразовим шприцом на 1 мл і реакційну систему добре перемішували шляхом перемішування.

Через 10 хвилин реакції капсули відокремлювали від ванни PDMDAAC за допомогою стерильного металевого фільтра, кілька разів промивали дистильованою водою, а потім зберігали в 0,9% сольовому розчині. Властивості капсул визначали після припинення набухання матриці, явище також спостерігали Zhang et al. Рівняння хімічної реакції показано на рис. 1(b). З молекулярної точки зору PDMDAAC є катіонним

полімером з високою щільністю заряду, придатним для флокуляції аніонних молекул. Синтетичний NaCS може легко іонізуватися в розчині та існує у вигляді сульфату целюлози (аніонного) та Na^+ . Сульфат целюлози легко зшивається з діалілдиметиламонієвою групою через активну взаємодію між зарядженими одиницями, але не через ковалентний зв'язок із сульфогрупою сульфату целюлози.

2.2. Підготовка фотобіореактору та водоростевої біоплівки

У роботі [35] використовували водорості (*Scenedesmus obliquus* FACHB-416, *Chlorella vulgaris* FACHB-32 і *Oscillatoria tenuis* FACHB-1052), які були придбані в Інституті гідробіології Китайської академії наук, КНР. Як стандартне культуральне середовище використовували середовище BG 11 з початковим рН 6,8. Усі види вирощували в 500 мл стерилізованого середовища BG 11 при інтенсивності світла $120 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ і температурі $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ у 14/10 годинному циклі світло/темрява та аерували 2% CO_2 . Коли оптична щільність (OD685) досягала приблизно 0,8–1,0 після 4–7 днів культивування, культуру використовували як посівний матеріал для наступних експериментів.

У цьому дослідженні були задіяні лігноцелюлозні матеріали, включаючи соснову тирсу (PW), рисове лушпиння (RH), дубову тирсу (OW) і цукрову тростину (SB). PW був отриманий з меблевої фабрики в місті Ухань, провінція Хубей, Китай. RH і OW були зібрані з села в місті Суйчжоу, провінція Хубей, Китай. SB був зібраний на цукровому заводі в місті Гуйпін, провінція Гуансі, Китай. Матеріали сушили на сонці 15 днів. Об'ємну щільність відібраного зразка перевіряли денситометром (NYL-103, Nylogy, Китай).

Було сконструйовано фотобіореактор з водоростевою біоплівкою жирової пластини (FPBR), який був поєднаний із системою рециркуляції

середовища та системою подачі газу (рис. 2.2). На малюнках 2а і 2с показано налаштування стендового FPBR. На малюнку 2б показано налаштування всієї системи культури. На малюнку 2д показано налаштування всієї системи культури.

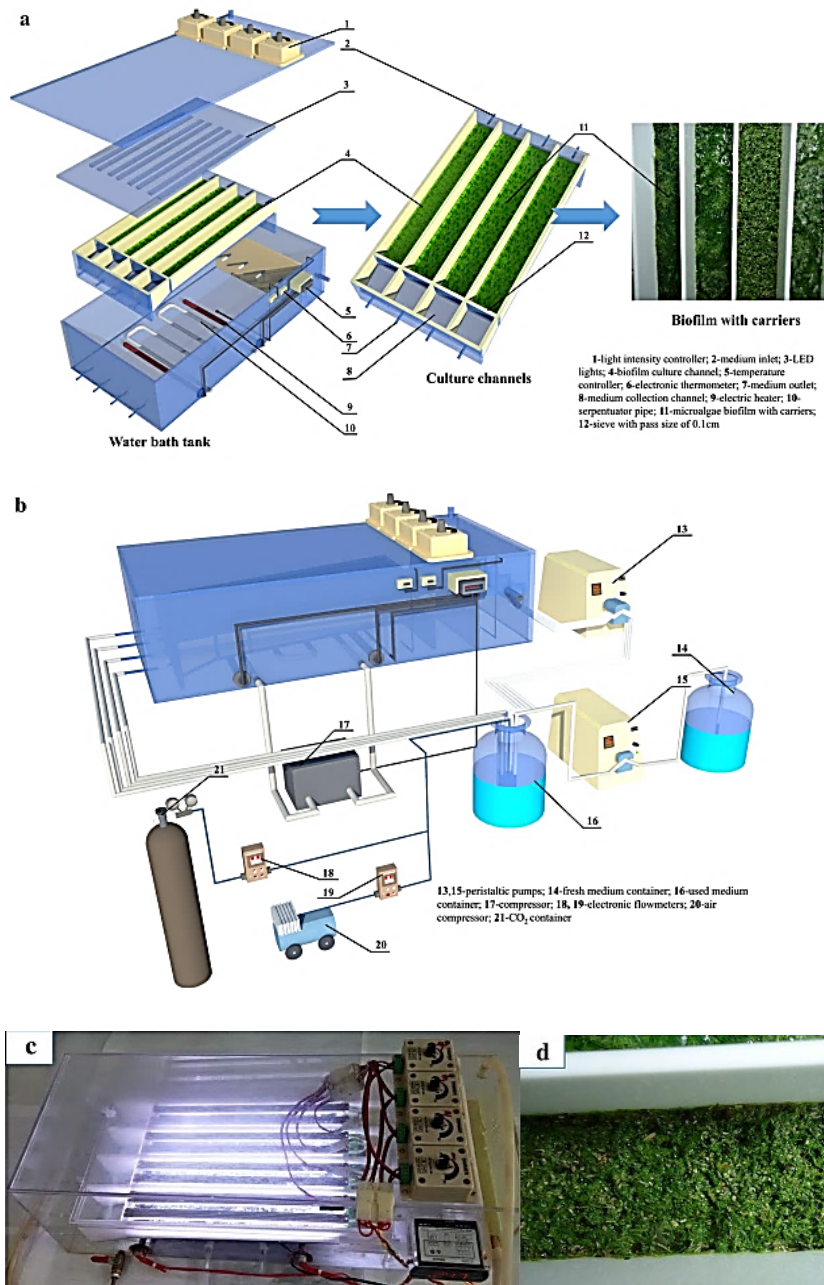


Рис. 2.2. Налаштування лабораторної системи FPBR. а Схематична діаграма фотобіореактора водоростей жирової пластини. б Схематична діаграма всієї системи культури. с Зображення фотобіореактора водоростевої жирової пластини. д Зображення біоплівки з сосною тирсою як носіями після 16-денного культивування

2.2.1. Вирощування водоростевої біоплівки. Кожен

лігноцелюлозний матеріал із заданою дозою розподіляли в культуральний канал для покриття всієї культуральної поверхні (площа 0,015 м²). Потім кожен канал інокулювали 30 мл змішаної культури водоростей протягом логарифмічної фази (10 мл кожного виду водоростей). Після цього кожні 8 годин додавали 15 мл середовища BG 11, щоб підтримувати матеріали речовини вологими. Через 24 години 10 л стерилізованого середовища BG 11 додали в контейнер для використаного середовища, і система почала безперервно перекачувати середовище з контейнера для використаного середовища в культуральні канали.

Культивування водоростей у суспендованому стані проводилося в ємностях об'ємом 2 л, щоб порівняти продуктивність росту водоростей з системою біоплівки. У ємність додавали 1 л стерилізованого середовища BG 11 і 12 мл інокулята водоростей (4 мл кожного виду водоростей). Кожен шостий день клітини водоростей, зібрані центрифугуванням з кожної ємності, додавали в ту саму ємність разом із об'ємом 1 л свіжого стерилізованого середовища BG 11. Втрату випаровування води щодня компенсували стерилізованою водою. Через 16 днів суспендовану біомасу водоростей збирали центрифугуванням і сушили заморожуванням для подальшого аналізу.

2.3. Робота з мікрowodоростями та їх іммобілізація

У роботі [36] мушлі мідій були надані харчовим заводом (провінція Чжецзян, Китай). *Chlorella sorokiniana* була отримана в лабораторії морської біологічної хімічної лабораторії Чжецзянського університету океану. Середовище BG-11 (NaNO₃ - 1,5 г; K₂HPO₄ - 0,04 г; MgSO₄*7H₂O - 0,075 г; CaCl₂ *7H₂O - 0,036 г; Na₂ CO₃ - 0,02 г; H₃BO₄ - 2,86 г; MnCl₂ *4H₂O - 1,81 г; ZnSO₄ - 0,222 г ; Na₂MoO₄, - 0,39 г; CuSO₄ *5H₂O - 0,079 г; Co(NO₃)₂ *6H₂O - 49,4 г; лимонна кислота - 0,006 г; цитрат заліза (III) - 0,006 г;

ампіцилін - 50 мкг/мл; дистильована вода, 1000 мл; агар, 20 г; розчин мікроелементів А5 1 мл). Усі хімічні реактиви мали аналітичну чистоту. Усі розчини готували з використанням деіонізованої води.

2.3.1. Культивування мікрободоростей. *Chlorella sp.* культивували на середовищі BG-11. Контейнер з культуральним середовищем стерилізували в автоклаві (1,2 кг/см²). У стерильних умовах маткову культуру водоростей рівномірно інокулювали на середовищі (300 мл), переносили у конічну колбу (500 мл) і поміщали при 25 (± 1) °С закриваючи горловину колби стерильною повітропроникною плівкою; потім всі колби освітлювали під світлодіодною лампою зі співвідношенням червоного до синього 5:1 протягом 24 годин, струшуючи тричі на день в один і той же час.

2.3.2. Прожарювання шкаралупи. Очищені оболонки занурювали в 1% HCl на 24 години і прожарювали при 600 °С, 700 °С і 800 °С протягом 2 годин за допомогою вакуумної трубчастої печі (SKGL-1200-II, SIOMM, Шанхай) і муфельної печі (SX2). -5-12, TAISITE, Тяньцзінь), і просіювали до < 100 мкм (середній розмір частинок: 75 мкм) розмір частинок за допомогою мікронанопульверизатора (МКСА6-2J, Masuko, Японія; таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

План експерименту

Temperature	Muffle furnace	Vacuum tube furnace	Modified by K ₂ CO ₃
600 °С	MM600 °С	MT600 °С	MMM600 °С
700 °С	MM700 °С	MT700 °С	MTM700 °С
800 °С	MM800 °С	MT800 °С	MTM800 °С

2.3.3. Активація оболонкового порошку. 0,5 г порошку мушлі та 30 мл 1% K_2CO_3 розчиняли в пробірці об'ємом 50 мл, обробляли ультразвуком протягом 30 хвилин за допомогою ультразвукової очисної машини (G-040S, Geneng Cleaning Equipment Co., Ltd., Шеньчжень, Китай, 600 Вт). Суміш поміщали в тefлоновий реактор при 160 °C на 24 години. Після фільтрації осад промивали до нейтральності та сушили при 60 °C протягом 8 годин.

2.3.4. Модифікація хітозаном. Хітозан, лінійний полімер з високою питомою поверхнею, має подвійну функцію електрично нейтральної флокуляції та адсорбційної флокуляції, нетоксичний і нешкідливий, який не тільки може забезпечити поживними речовинами для росту мікроводоростей, але також сприяє іммобілізації мікроводоростей. 100 мг хітозану і 10 мл HCl (1%) розчиняли в 100 мл деіонізованої води. Хітозан змішували з порошком активованої оболонки в масовому співвідношенні 1:2, перемішували протягом 1 год і сушили у вакуумі при 80 °C протягом 24 год. Зразок маркували як CS-M (рис. 2.3).

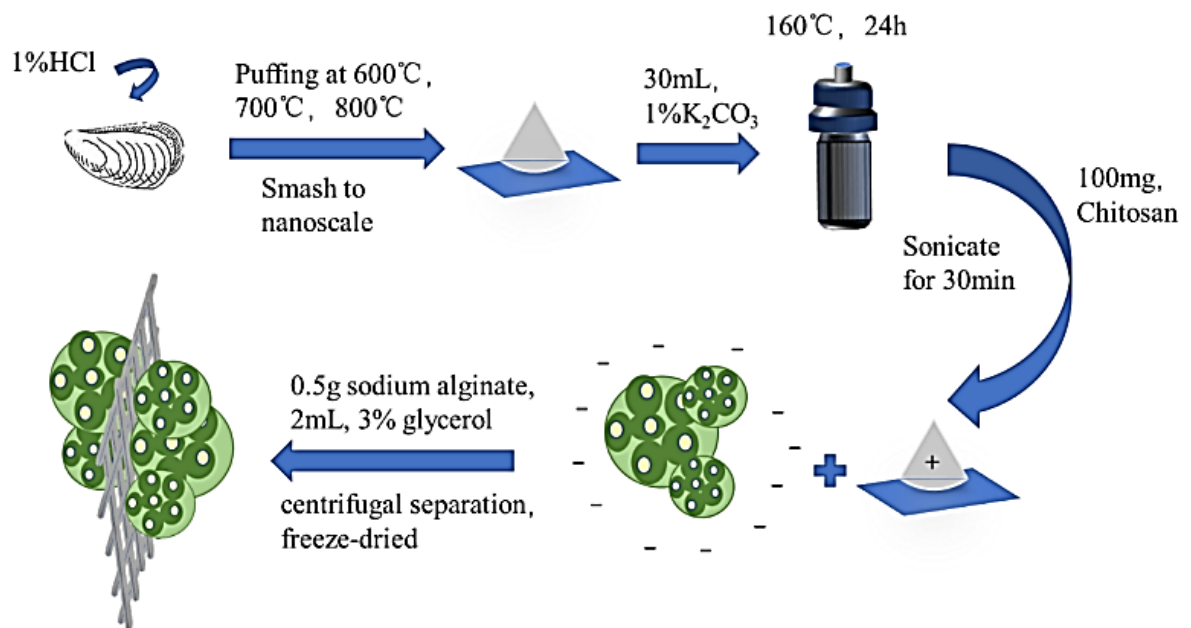


Рис. 2.3. Схематичне зображення іммобілізації *Chlorella sp.* нанопорошком мушлі мідії та хітозаном

2.3.5. Приготування іммобілізованих мікроводоростей. 100 мл *Chlorella sp.*, на логарифмічній фазі росту, 20 мл, 2% розчин екстракту чаю, 0,5 г CS-M, перемішували протягом 30 хв, відстоювали шарами для видалення якомога більшої кількості супернатанту, додавали 0,2 г альгінату натрію, 2 мл, 3% гліцерину, перемішували 30 хв, відстоювали 2 год, центрифугували, зберігали осад в стерильному, герметичному, темному приміщенні, температура зберігання 25 °С, 4 °С, -24 °С відповідно. 0,1 г CS-M і 1 мл пропареної води, розводили в 20 разів, вводили на предметне скло, накривали покривними скельцями. Оптичну мікроскопію (ОМ) використовували для спостереження комбінованої ситуації мікроводоростей і порошку мушлі у співвідношенні 10 × 10 (ECLIPSE Ti, Nikon, Японія).

2.3.6. Визначення вмісту хлорофілу-а (хл.а) в іммобілізованих мікроводоростей. 5 мл водоростей центрифугували при 5500 об/хв протягом 15 хв, збирали осад, додавали 5 мл 80% розчину ацетону, екстрагували хлорофіл-а в темряві при 4 °С протягом 24 год до повного очищення хлорофілу-а та ацетону, перемішували, центрифугували при 6000 об/хв 15 хв. Нарешті, виміряли оптичну густину (OD) супернатанту за допомогою UV-vis (UV2600, SHIMADZU, Японія) при довжині хвилі 663 нм і 645 нм відповідно, з еталонним розчином 80% ацетону. Усі тести повторювали три рази. Еталонна формула розрахунку концентрації chl.a (Gao and Sun, 2000) виглядає наступним чином:

$$\text{Concentration of chl. a (mg/L)} = 12.71 \times OD_{663} - 2.59 \times OD_{645}$$

де OD₆₄₅, OD₆₆₃: OD екстракту при довжинах хвиль 645 нм і 663 нм відповідно.

2.3.7. Методи визначення щільності клітин мікробіодоростей.

Відбирали культуральну рідину водоростей на 24 год, 48 год, 72 год, 96 год, 120 год і 162 год. Поглинання (OD680) водоростей вимірювали при довжині хвилі 680 нм. Після фіксації розчином Рошеля мікробіодорості розбавляли та підраховували їх кількість за допомогою гемоцитометра (Shanghai refinement Biochemical Instrument Co., Ltd., Шанхай, Китай). Повторювали тричі та отримували середнє значення. Будували стандартну криву залежності OD680 від кількості клітин мікробіодоростей.

Питома площа поверхні і тест на пористість використовували для аналізу питомої площі поверхні, а розподіл розміру пор порошку оболонки при 77 К з N₂ за допомогою газового аналізатора (Quadrasorb SI, Quantachrome, США). Морфологію поверхні зразка спостерігали за допомогою скануючого електронного мікроскопа надвисокої роздільної здатності JSM-7800F (JEOL, Японія).

2.4. Підготовчий етап роботи з целюлозною плівкою

У роботі [37] штам *Chlorella sp.* FACHB-1514 був отриманий з Інституту гідробіології Китайської академії наук, який вирощували та підтримували в стерилізованому середовищі BG 11 при 25 ± 2 °C при інтенсивності світла 100 мкмоль м⁻² с⁻¹ у світловому інкубаторі HZQ-QG (HDL). Apparatus). Культуру з оптичною щільністю (OD680) близько 0,3 використовували як посівний матеріал для подальших експериментів. Целюлозу (бавовняну масу) зі ступенем полімеризації (DP) 620 і вмістом целюлози понад 98% поставила компанія Hubei Chemical Company Limited (Xiangfan, Китай), яку перед використанням висушували при 80 °C у вакуумі протягом 6 год. Іонна рідина, 1-аліл-3-метилімідазолій хлорид (AmimCl), була отримана з Інституту хімії Китайської академії наук. Вміст води в отриманій іонній рідині становив менше 0,3%, як виміряли методом Карла-

Фішера. Усі неорганічні солі та органічні розчинники були аналітичними реагентами та використовувалися без додаткового очищення.

2.4.1. Приготування целюлозних плівок. Целюлозні плівки з різною шорсткістю поверхні виготовляли в AmimCl методом розчинення та регенерації шляхом зміни шорсткості поверхні підкладки. Скляна пластина і водостійкий абразивний папір з різною мікрометровою морфологією (40 сіток, 80 сіток, 120 сіток і 300 сіток) використовувався як підкладка. Використовувана типова процедура приготування така: 4,0 г целюлози диспергували в 96,0 г AmimCl у колбі, а потім суміш перемішували при 80 °C протягом 1,5 годин для забезпечення повного розчинення целюлози. Розчин дегазували у вакуумі, потім відливали на абразивний папір (40 сіток) і негайно коагулювали в деіонізованій воді при 60 °C для отримання плівок регенованої целюлози. Для видалення залишків іонної рідини AmimCl в целюлозних плівках їх додатково промивали дистильованою водою принаймні три рази, поки Cl⁻ іони були виявлені за допомогою тесту з AgNO₃. Після заміни розчинника на трет-бутанол і подальшого сублимаційного сушіння було отримано целюлозну плівку (С-А-40), яку зберігали в ексікаторі до визначення характеристик.

2.4.2. Культивування біоплівки мікробіодоростей. Адгезійні властивості мікробіодоростей на целюлозних плівках були досліджені зі прикріпленими *Chlorella sp.* Використовувана процедура така: целюлозні плівки спочатку розрізали на шматки діаметром 1,5 см, а потім занурювали в склянку з середовищем BG 11. Потім целюлозні плівки поміщали в лунки стерильного та прозорого 24-лункового планшета для культури тканин. Розчини культури водоростей об'ємом 200 мкл повільно додавали на поверхню целюлозної плівки, потім планшет зберігали в світловому інкубаторі HZQ-QG (апарат HDL) при інтенсивності світла 100 мкмоль м⁻² с⁻¹ і при температурі 25 ± 2 °C. Стерилізоване середовище BG 11 об'ємом 500 мкл додавали в кожен лунку шляхом повільного капання з боку

культуральної лунки кожні 24 години. Інтенсивність флуоресценції прикріплених клітин мікроводоростей на поверхні целюлози вимірювали кожні 3 дні. Целюлозну плівку вийняли і тричі промили водою для видалення клітин планктонних мікроводоростей, потім виміряли поглинання при 570 нм за допомогою пристрою для зчитування багатолункових планшетів (Infinite M200, TECAN, Швейцарія). Крім того, зміни поверхні целюлозних плівок під час експерименту з культивування мікроводоростей спостерігали за допомогою фотографій і світлового мікроскопа.

Наприкінці експериментів з іммобілізованим культивуванням (загальною тривалістю 18 днів) кількість прикріплених мікроводоростей на поверхні целюлозної плівки була визначена шляхом вимірювання сухої маси клітин. Целюлозну плівку промивали ультразвуком та тричі деіонізованою водою для видалення прикріплених мікроводоростей, потім весь промитий розчин збирали та центрифугували при 8000 об/хв для відділення мікроводоростей. Мікроводорості висушували сублімаційним сушінням, а потім зважували за допомогою аналітичних ваг (XS105DU, Mettler Toledo, Швейцарія). Продуктивність прикріплених мікроводоростей ($\text{г м}^{-2} \text{ д}^{-1}$) було розраховано як рівняння (1):

$$\text{Продуктивність} = (W_1 - W_0) / (A \times t)$$

де W_0 і W_1 – суха вага інокульованої та зібраної біомаси мікроводоростей відповідно. A – площа поверхні целюлозної плівки, яка дорівнює $1,77 \times 10^{-4} \text{ м}^2$. t – дні прикріпленої культивації.

2.4.3. Вимірювання. Морфологію поверхні целюлозних плівок спостерігали на інвертованому флуоресцентному мікроскопі Leica DMI4000B. Переріз целюлозних плівок спостерігали на скануючому

електронному мікроскопі (SEM) JSM-6700F JEOL при прискорювальній напрузі 10 кВ. Перед спостереженням зразки покривали платиною. Розмір пор та їх розподіл целюлозних плівок вимірювали за допомогою приладу AutoPore IV (Micromeritics, США). Поверхневий дзета-потенціал целюлозних плівок вимірювали аналізатором дзета-потенціалу SurPass (Anton Paar, Австрія) при кімнатній температурі з використанням середовища BG11 (pH = 7,5–7,8) як електроліт, потенціал вимірювали тричі, щоб отримати середній потенціал для кожного зразка. Коефіцієнт водопоглинання (WA) целюлозних плівок кількісно визначали шляхом вимірювання сухої маси (WD) і вологої маси (WW) целюлозних плівок. Целюлозну плівку сушили при 80°C при зниженому тиску до постійної ваги, а потім охолоджували до кімнатної температури. Зразок був витягнутий і негайно зважений. Зважену целюлозну плівку занурювали у воду при 25°C на 48 годин, потім воду з поверхні видаляли фільтрувальним папером і целюлозну плівку зважували. Коефіцієнт водопоглинання (WA) був розрахований за допомогою рівнянь (2) наступним чином:

$$W_A(\%) = (W_W - W_D) \times 100 / W_D$$

Середню арифметичну висоту (Sa) і максимальну висоту поверхні целюлозної плівки (Sz) вимірювали за допомогою конфокального лазерного мікроскопа з програмою (OLS4000, Olympus, Массачусетс, США), яка дозволяла вимірювати шорсткість поверхні лінійним способом. і в конкретних областях. Зображення були зроблені зі збільшенням 10 і точністю реєстрації 0,2 мкм. Центральну площу целюлозних плівок (500 мкм²) було обрано для аналізу Sa та Sz целюлозних плівок, які виражали як числове значення (мкм). Три еквідистантних вимірювання проводили для кожного зразка в трьох різних областях.

2.5. Збір, іммобілізація мікробіодоростей та видалення поживних речовин

У роботі [38] штаб мікробіодоростей *Chlorella saccharophila* FACHB-4 був отриманий з колекції FACHB (<http://algae.ihb.ac.cn/>), Інститут гідробіології Китайської академії наук. Клітини мікробіодоростей культивували в скляних колбах на 1000 мл, заповнених 600 мл водоростевого середовища BG-11. Фототрофний ріст підтримували в інкубаторі з освітленням (ZQLY-180, Zhichu Instruments Co., Ltd, Шанхай, Китай) при 30 °C, а щільність світла 100 ммоль с⁻¹ м⁻² регулювали за допомогою 12/12-годинного фотоперіоду світло/темрява.

2.5.1. Збір та іммобілізація клітин мікробіодоростей. Клітини мікробіодоростей, що ростуть пізній лаг-фазі, збирали за допомогою методу флокуляційного осадження. Коротко, 1000 мл культур мікробіодоростей завантажували в градуйований циліндр і змішували з 4 г флокулянту, що складається з PAC і монтморилоніту у співвідношенні 1:4; після 5 хв осадження збирали преципітант і наносили для іммобілізації. Клітини мікробіодоростей були іммобілізовані в агарі за допомогою модифікованого методу, раніше описаного Lukavsky(1988). Тобто зібрані мікробіодорості додавали до розплавленого агару (охолодженого до 45°C), що містить середовище водоростей BG-11, рівномірно змішували та затверділи при кімнатній температурі. Щоб отримати експериментальну групу, наприклад, з кінцевою концентрацією клітин 5 г/л і концентрацією агару 1,0%, осаджені клітини мікробіодоростей доводили до концентрації 10 г/л і змішували з 2,0% розплавленого агару в такому ж об'ємі. Після затвердіння протягом 30 хв іммобілізовані мікробіодорості інкапсулювали в прозорі пакети та зберігали в коробці, поміщеній в інкубатор з освітленням. Щоб імітувати умови температури в приміщенні та кімнаті, температуру встановлювали на рівні 30 °C, а інтенсивність світла регулювали приблизно на 20 ммоль с⁻¹ м⁻², використовуючи 12/12-годинний фотоперіод світло/темрява. Щоб оцінити

потенціал життєздатності іммобілізованих клітин після зберігання протягом певного періоду, твердий агар, іммобілізований мікроводоростями, подрібнювали пресом і засівали у свіже середовище BG-11; культивування мікроводоростей проводили в освітлювальному інкубаторі (ZQLY-180, Zhichu Instruments Co., Ltd, Шанхай, Китай) при 30 °C і щільності світла 100 ммоль с⁻¹ м⁻² та регулювали за допомогою 12/12-год. світло/темний фотоперіод.

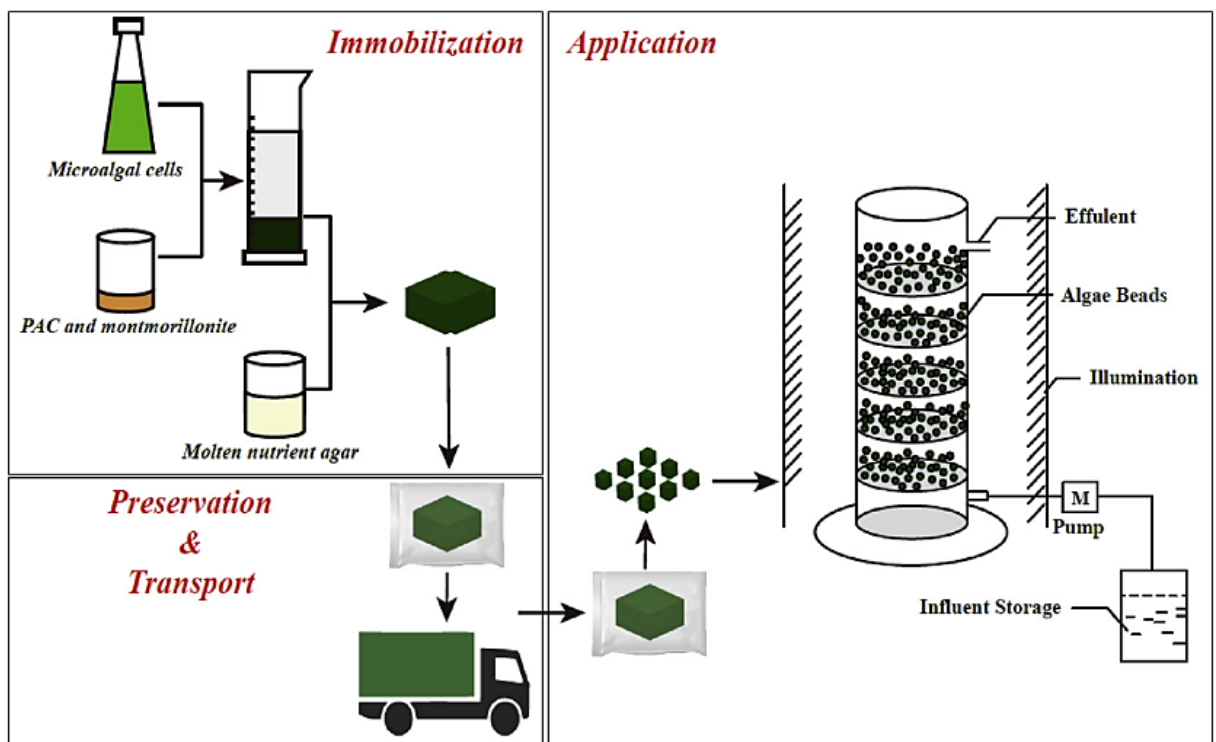


Рис. 2.4. Принципова схема іммобілізації, збереження та застосування клітин мікроводоростей.

2.5.2. Видалення поживних речовин іммобілізованими мікроводоростями в періодичних і безперервних культурах. Для оцінки здатності видалення азоту та фосфору іммобілізованими мікроводоростями клітини *C. saccharophila* із серійною концентрацією 0,5 г/л, 1г/л та 5 г/л іммобілізували в 1,0% агарі відповідно. Після зберігання при кімнатній

температурі протягом деякого часу твердий агар, іммобілізований мікроводоростями, розрізали на кубики розміром 1 см/1 см та інокулювали у синтетичні стічні води (рН 7,2), що містять NH_4Cl 190 мг/л, K_2HPO_4 67 мг/л, NaHCO_3 420 мг/л, MgSO_4 36 мг/л, CaCl_2 25 мг/л та цитрат заліза (III) 6 мг/л. Порційні посіви проводили в скляних колбах об'ємом 500 мл, які заповнювали 200 мл синтетичної стічної води та підтримували при 30°C з використанням 12/12-годинного фотоперіоду світло/темрява для визначення на формування виносу поживних речовин. Безперервні посіви проводили в колонкових фотобіореакторах (рис. 2.4) об'ємом 10000 мл із заповненням 8000 мл синтетичних або міських стічних вод. Обробку стічних вод підтримували при кімнатній температурі та при щільності світла 100 ммоль $\text{с}^{-1} \text{ м}^{-2}$ з використанням цілодобового освітлення. Під час безперервної роботи стічні води подавалися у фотобіореактор із фіксованою швидкістю потоку 417, 278, 208 та 139 мл на годину за допомогою насоса (BT100 M/DG-1, Leadfluid, Баодін, Китай), що призвело до HRT (гідралічний час утримання) 24, 36, 48 і 72 години відповідно. Одна третина кубиків агару в реакторі була замінена новими кубиками після семи днів безперервної обробки.

2.6. Аналітичні методи

Ріст мікроводоростей у культурах визначали шляхом підрахунку клітин за допомогою гемоцитометра або за оптичної густини при 680 нм за допомогою спектрофотометра (Tu et al., 2018).

Для визначення кількості живих клітин мікроводорості, іммобілізованої в агарі, 0,5 г твердого агару вирізали з інкапсуляту, поміщали в пластикову пробірку, що містила 1 мл рідкого середовища BG-11, і подрібнювали на дрібні шматочки за допомогою адаптер Vortex (13000-V1-24, QIAGEN, Німеччина). Кілька шматочків кварцового піску було додано в трубку, щоб сприяти дробленню. Кількість клітин

мікроводоростей вимірювали на чашках з агаром BG-11 із серійним розведенням. На основі цього методу > 85% клітин мікроводоростей, іммобілізованих в агарі, можуть бути вивільнені після 3-хвилинної обробки (оцінено на неіммобілізованих клітинах). Кожне визначення проводили в трьох повторях. Середні значення та значення стандартного відхилення аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA).

Для спостереження за морфологією іммобілізованих клітин мікроводоростей агар обережно подрібнювали на фракції за допомогою щипців і поміщали в центрифужні пробірки з подальшою фіксацією в 2,5% глутаровому альдегіді протягом 12 годин при 4 °C (McDowell and Trump, 1976; Chen, 2001). Фракції агару потім тричі промивали буфером PBS (0,1 М, рН 7,4), поступово зневоднювали в етанолі (30, 50, 70, 90 і 100%) і повністю зневоднювали шляхом сушіння до критичної точки (CPD). Нарешті, зразки були покриті Au за допомогою EMS150T (Quorum, Великобританія) які спостерігали в скануючому електронному мікроскопі (Carl Zeiss, Німеччина) (Rince та ін., 1999).

Приблизно 10 мл кожного потоку, що надходить і витікає під час безперервної обробки, збирали з фотобіореактора та центрифугували при 12000 об/хв протягом 3 хв. Супернатант фільтрували через фільтрувальну мембрану Whatman 0,45 мм і використовували для визначення амонію та фосфату методом індофенолового синього (ISO/TS14256e1:2003, 2003) та спектрофотометрією з молібдатом амонію (Worsfold et al., 1987), відповідно.

2.7. Розрахунок кривої росту

У роботі [39] клітини *Chlorella sp.* культивували у фікобіореакторах місткістю 2,5 л культурального середовища з 4 мМ агрімину, який забезпечує такі поживні речовини, як K, Mg, S, P, Fe, Cu, Zn, Mn і B,

необхідні для нормального росту водоростей і кожен контейнер буде засіяно концентрацією *Chlorella sp.* 1×10^6 UFC та оптичної густини 0,1 Abs, виміряної з λ 647 нм. Фікобіореактори інкубували при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ з постійним перемішуванням, щоб уникнути осідання біомаси та середньою освітленістю 2500 люкс протягом 12 годин світла, а решта 12 годин зберігалися в темряві, процес тривав 24 дні до виходу мікроводоростей на стаціонарну фазу.

2.7.1. Крива росту *Chlorella sp.* Щодня протягом 24 днів вимірювали ріст водоростей за допомогою спектрофотометра UV-vis Spectroquant Pharo 300 від Merck при довжині хвилі 647 нм, де вимірне поглинання було пропорційним концентрації мікроводоростей у культурі, починаючи з день 0 з концентрацією 0,1 Abs

2.7.2. Імобілізація біомаси в *Luffa Cylindrica*. Для імобілізації мікроводоростей як опору використовували сухі плоди *Luffa cylindrica*, які зрізали на кінцях для видалення насіння та домішок послідовним промиванням водою та миючим засобом протягом 30 хв. Потім нарізали шматочки губки діаметром $2,5 \pm 0,2$ см і товщиною $2,8 \pm 0,2$ см, знову промивали дистильованою водою і висушували при $70 \pm 1^\circ\text{C}$ для стерилізації та переносили у культуральне середовище з 4 мМ агрімину на 24 години, час їх інокуляції в розчині мікроводорості в стаціонарній фазі (19 днів), після чого мочалки видаляли, промивали для усунення надлишку мікроводоростей, а імобілізовану біомасу визначали за різницею ваги очищувача до і після імобілізації.

2.7.3. Біосорбція та десорбція. Здатність видаляти ртуть *Chlorella sp.* імобілізовану в очиснику визначали в концентраціях, описаних раніше, встановлюючи три періоди видалення: 8 годин, 16 годин і 24 години, після кожного разу, коли водоростеву біомасу видаляли центрифугуванням зі швидкістю 6000 об/хв протягом 5 хвилин, і супернатант розчину аналізували за допомогою атомно-абсорбційної спектрофотометрії з

холодною парою. Експеримент проводили в трьох повторах. Для десорбції ртуті видалену біомасу водоростей змішували з 10 мМ розчином HCl і перемішували при 400 об/хв протягом 30 хв при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Кінцеву концентрацію іонів металу у водній фазі визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра з холодною парою. Відсоток видалення ртуті визначали за формулою:

$$(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

де C_i — початкова концентрація ртуті, C_f це кінцева концентрація ртуті після обробки.

Коефіцієнт десорбції розраховували з кількості ртуті, десорбованої елюентом, і кількості ртуті, адсорбованої іммобілізованою мікроводорістю, за наступною формулою:

$$(\%) = \frac{Hg_d}{Hg_a} \times 100$$

де Hg_d – кількість десорбованої ртуті, а Hg_a видаляється іммобілізованою мікроводорістю *Chlorella sp.*

2.8. Експерименти

У роботі [40] одноклітинні мікроводорості *Chlorella vulgaris* UTEX 2714 (Університет Техасу, Остін, Техас, США) були обрані як модельний вид для цього дослідження через його високу швидкість росту та вміст

ліпідів, здатність видаляти та відновлювати поживні речовини зі стічних вод, а також переважання в природних водоймах і стічних вод у всьому світі.

2.8.1. Коагулянт CNC-APIm. CNC-APIm був синтезований відповідно до процедур, повідомлених Wang et al. Коротко, нативний CNC (сульфат натрієвої солі, FP Innovations, Канада) був модифікований за допомогою одноетапного 1,10-арбонілдіімідазолу (CDI, реактивної якості, Sigma-Aldrich)-опосередкованого зв'язування з APIm ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich). CNC-APIm — це новий CNC, який є наноматеріалом, що перемикається на CO₂, виготовленим шляхом модифікації поверхні за допомогою 1-(3-амінопропіл)імідазолу. Зокрема, після 1–10 хв розпилення CO₂ дзета-потенціали зросли з 18,4–21,6 мВ до приблизно 30,5–33,5 мВ, тоді як розмір зменшився з 3875–4298 нм до 158–179 нм. Подальше розбризкування повітрям призвело до зниження дзета-потенціалу (20,3–21,2 мВ) і збільшення розміру (3600–4455 нм) з макроскопічно видимими агрегатами, що тут називається процесом гелеутворення.

2.8.2. Експерименти з культивування мікрободоростей зі стічними водами. Первинні стічні води (PW) і стічні води (CW), зібрані з місцевої очисної станції в Нанкіні, Китай, використовували для культивування *C. vulgaris* в міксотрофних умовах. PW відноситься до переливу з первинних відстійників, у якому щільні тверді речовини, плаваючі речовини, пісок, жир, жири або олії в необроблених стічних водах були видалені в установці первинного відстоювання та попередньому процесі сортування. Хімічний склад PW використовуваний у цьому дослідженні був таким (мг/л): загальний азот (TN) $23 \pm 2,2$, загальний фосфор (TP) $2,3 \pm 0,1$, рН 6,97–7,44. Зразки відбирали через день до 16-го дня. Під час кожного відбору проб додавали деіонізовану воду для підтримки робочого об'єму 2,0 л для кожної колби. Після фільтрації за допомогою скловолоконного фільтра з розміром пор 0,22 мкм (Fisher Whatman puradisc-25 мм), TN і TP вимірювали за допомогою Lianhua 5B-3B

з використанням методу персульфатного розщеплення та кислотно-сульфатного розщеплення відповідно. Концентрацію біомаси мікроводоростей у перерахунку на масу сухої клітини (DCW, г/л) оцінювали згідно з процедурами, описаними раніше. Вміст азоту та вуглецю в сухих зразках біомаси кількісно визначали за допомогою аналізатора елементів PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O (Массачусетс, США). Продуктивність біомаси (BP, г/(л·д)) розраховували за формулою:

$$BP(g/(L \cdot d)) = \frac{C_t - C_0}{T_t - T_0}$$

де C_0 і C_t – концентрація біомаси в момент часу T_0 і T_t (d), г/л відповідно.

2.8.3. Експеримент із збирання мікроводоростей. Суспензію мікроводоростей, культивовану на 30-CW, використовували для експерименту зі збору врожаю. Оптимізація умов експлуатації для продуктивності збору мікроводоростей проводили через RSM з використанням експериментального плану Бох-Behnken (BBD), який є найбільш ефективним підходом з точки зору кількості експериментів. Як техніка оптимізації, модель BBD пропонує ефективний метод оцінки для підбору квадратичних моделей, заснованих на тривірневих неповних факторних планах, у тривимірному просторі спостереження. Кількість необхідних експериментів залежить від факторіальних чисел, наступних за $N = 2(1 + k)$, де k — кількість факторів.

Процедури збору мікроводоростей за допомогою CNC-APIm були докладно описані раніше. Коротко, добре диспергований CNC-APIm був змішаний із 20 мл суспензії *C. vulgaris* у різних дозах у 50 мл пробірці Falcon

при кімнатній температурі (23–25 °C). Початкова концентрація *C. vulgaris* становила приблизно 0,3 г/л для кожного експерименту. Потім у суспензію продувають CO₂ (1 атм, 5–50 с), потім продувають повітрям (1 атм, 1–10 хв, 5–50 мл/хв) і відстоюють протягом 10 хв. Нарешті, зразки рідини були взяті з глибини 1,0 см нижче поверхні суспензії мікродоростей для вимірювання оптичної абсорбції при 680 нм за допомогою спектрофотометра.

Таким чином, було розглянуто чотири найважливіші фактори, включаючи співвідношення доз, час барботування CO₂, час барботування повітрям та швидкість повітряного потоку під час процесу збору врожаю, щоб вибрати та визначити незалежні змінні та їх оптимальні значення, які мали б найбільший вплив на продуктивність збирання врожаю, зрештою покращуючи ефективність збирання врожаю. Таблиця 2.2. перераховує діапазон, що використовується для цих експериментальних змінних, і плани експерименту. Згідно з цією схемою було проведено 30 експериментальних прогонів, які містили шість реплікацій у центральній точці, щоб дозволити оцінити суто експериментальну дисперсію невизначеності.

За даними, отриманими з 30 експериментальних прогонів, зв'язок між змінними та відповідями було встановлено та оцінено згідно з наступним квадратним поліноміальним рівнянням:

$$Y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^k \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^k \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \alpha_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

де Y – залежні змінні HE (%) і RC (г-водорості/г-CNC API_m), розраховані відповідно до рівнянь.

(3) і (4) відповідно; x_i та x_j є незалежними факторами з трьома стандартизованими кодованими рівнями (-1, 0, 1), включаючи x_1 (теоретичне масове співвідношення CNC-APIm, доданого до маси мікроводоростей, $x_1 = 0,05, 0,175, 0,3$ г-CNC-APIm/г водоростей), x_2 (час барботування CO₂, $x_2 = 5, 30, 60$ с), x_3 (час барботування повітря, $x_3 = 1, 5, 10$ хв) і x_4 (швидкість потоку повітря, $x_4 = 5, 25, 50$ мл/ хв); $\beta_0, \beta_i, \beta_{ij}$ та α_{ij} – параметри моделі, які були визначені за допомогою методу найменших квадратів. Експериментальні дані аналізували за допомогою відповідної програми Design Expert 8.0 (Stat-Ease, Inc., США).

$$HE(\%) = [1 - C_a/C_b] \times 100\% \quad (3)$$

$$RC (g - algae/g - CNC - APIm) = \frac{(C_b - C_a)V}{m} \quad (4)$$

де C_b і C_a – концентрація мікроводоростей у надосадовій рідині до і після розділення (г/л), V — об'єм суспензії мікроводоростей (л), а m — маса доданого CNC-APIm (г). Концентрації CNC-APIm були кількісно визначені гравіметрично за масою сухих клітин (г/л).

Проводили кількісне визначення ліпідів, білків і вуглеводів. Застосовували Fames тест і GC аналіз, для цього жирні кислоти були перетворені на їхні метилові ефіри жирних кислот (FAME) шляхом прямої переестерифікації вологих зразків мікроводоростей у межах від 4,56 до 36,5 мас.%.

Дизайн експерименту RSM та рівні змінних, а також результати HE та RC

Run	Factors				HE (%)		RC (g-algae/g-CNC-APIm)	
	A: Mass ratio (g-CNC-APIm/g-algae)	B: CO ₂ time (s)	C: Air time (min)	D: Air flow (ml/min)	Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	0.08(+1)	30(0)	5(0)	50(+1)	99.7	100.5	12.5	11.8
2	0.08(+1)	30(0)	5(0)	5(-1)	87.6	88.1	11.0	10.7
3	0.08(+1)	30(0)	10(+1)	25(0)	99.9	101	12.5	12.2
4	0.08(+1)	30(0)	1(-1)	25(0)	80.5	78.6	10.1	9.8
5	0.08(+1)	60(+1)	5(0)	25(0)	93.5	94.9	11.7	10.3
6	0.08(+1)	5(-1)	5(0)	25(0)	99.8	97.3	12.5	11.6
7	0.01(-1)	30(0)	10(+1)	25(0)	50.6	53.2	47.3	48.9
8	0.01(-1)	5(-1)	5(0)	25(0)	44.8	43.3	40.9	43.5
9	0.01(-1)	30(0)	5(0)	50(+1)	42.5	43.9	39.4	41.5
10	0.01(-1)	60(+1)	5(0)	25(0)	42.6	45.5	39.1	40.6
11	0.01(-1)	30(0)	1(-1)	25(0)	36.5	31.7	36.8	37.2
12	0.01(-1)	30(0)	5(0)	5(-1)	34.4	32.3	32.2	35.2
13	0.04(0)	60(+1)	5(0)	50(+1)	80.6	80.5	20.2	19.8
14	0.04(0)	30(0)	10(+1)	5(-1)	72.8	70.5	18.2	18.5
15	0.04(0)	60(+1)	1(-1)	25(0)	62.5	60.5	15.6	16.2
16	0.04(0)	5(-1)	5(0)	50(+1)	84.8	82.1	21.2	20.8
17	0.04(0)	60(+1)	10(+1)	25(0)	82.6	81.5	20.7	19.8
18	0.04(0)	60(+1)	5(0)	5(-1)	77.8	76	19.5	18.9
19	0.04(0)	5(-1)	5(0)	5(-1)	73.8	72.2	18.5	19.3
20	0.04(0)	30(0)	10(+1)	50(+1)	84.9	82.7	21.3	20.6
21	0.04(0)	5(-1)	1(-1)	25(0)	59.5	58.3	14.9	15.5
22	0.04(0)	5(-1)	10(+1)	25(0)	79.2	77.7	19.8	20.7
23	0.04(0)	30(0)	1(-1)	5(-1)	56.6	55.7	14.2	15.5
24	0.04(0)	30(0)	1(-1)	50(+1)	63.8	62.6	16	15.8
25	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	82.5	84.9	20.6	21.3
26	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	81.5	79.9	20.4	19.4
27	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	84.3	84.9	21.1	20.5
28	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	76.9	74.9	19.2	21.2
29	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	80.4	79.9	20.1	19.7
30	0.04(0)	30(0)	5(0)	25(0)	79.9	81.9	20.0	21.4

2.8.4. Статистичний аналіз. Представлені результати є середніми значеннями \pm стандартне відхилення від незалежних повторних експериментів. Відмінності в значеннях усіх показників між досліджуваними групами аналізували на значущість за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу з ретроспективним тестом Тьюкі на значимому рівні 0,05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика біологічних капсул сульфат целюлози натрію/полі-диметил-діаліл-амонійхлориду для іммобілізованого культивування мікроводоростей *Chlorella* sp. [34]

У цій роботі було синтезовано новий носій для іммобілізації мікроводоростей, капсулу з сульфату целюлози натрію/полі-диметил-діаліламоній-хлориду (NaCS-PDMDAAC), а отримані полімерні капсули охарактеризовано за допомогою фізико-хімічних методів, таких як інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FT-IR), скануюча електронна мікроскопія, оснащена енергодисперсійною рентгенівською спектроскопією (SEM-EDX) і спектроскопією ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Експериментальні результати показали, що можна точно контролювати унікальні властивості капсул NaCS-PDMDAAC, такі як розмір пор, розмір капсули, механічна міцність, структурна та композиційна однорідність, що мають відношення до культивування мікроводоростей із періодичним або безперервним видаленням поживних речовин.

3.1.1. Морфологічний аналіз капсул NaCS-PDMDAAC. Як показано на рис. 2, мембрана капсули має складчасту поверхню з наявністю кількох остиол розміром 500–1000 нм (рис. 3.1 (E)–(F)). Існує також щільний зовнішній первинний шар, присутній у поперечному перерізі між протилежно зарядженими іонними полімерами (рис. 3.1 (A) і (C)), відповідно до спостереження, повідомленого Zhang et al. Внутрішня поверхня капсули набагато шорсткіша (рис. 3.1 (B) і (D)). Існують деякі пористі матричні кріплення, які, можливо, можуть бути полімерною підтримкою для іммобілізованих клітин мікроводоростей. SEM мікрофотографії іммобілізованої мікрокосмічної структури мікроводоростей NaCS-PDMDAAC показані на рис. 3.1 (A) і (B). Після того, як крапля NaCS (або розчин NaCS-мікроводоростей) молекулярно взаємодіє

з розчином PDMDAAC, зовнішня поверхня краплі спочатку зв'язується з PDMDAAC, і зовнішній шар утворюється одночасно. Крім того, PDMDAAC у розчині та NaCS у капсулі повільно дифундують до мембрани капсули та реагують поблизу мембрани капсули, утворюючи пористий шар на внутрішній поверхні.

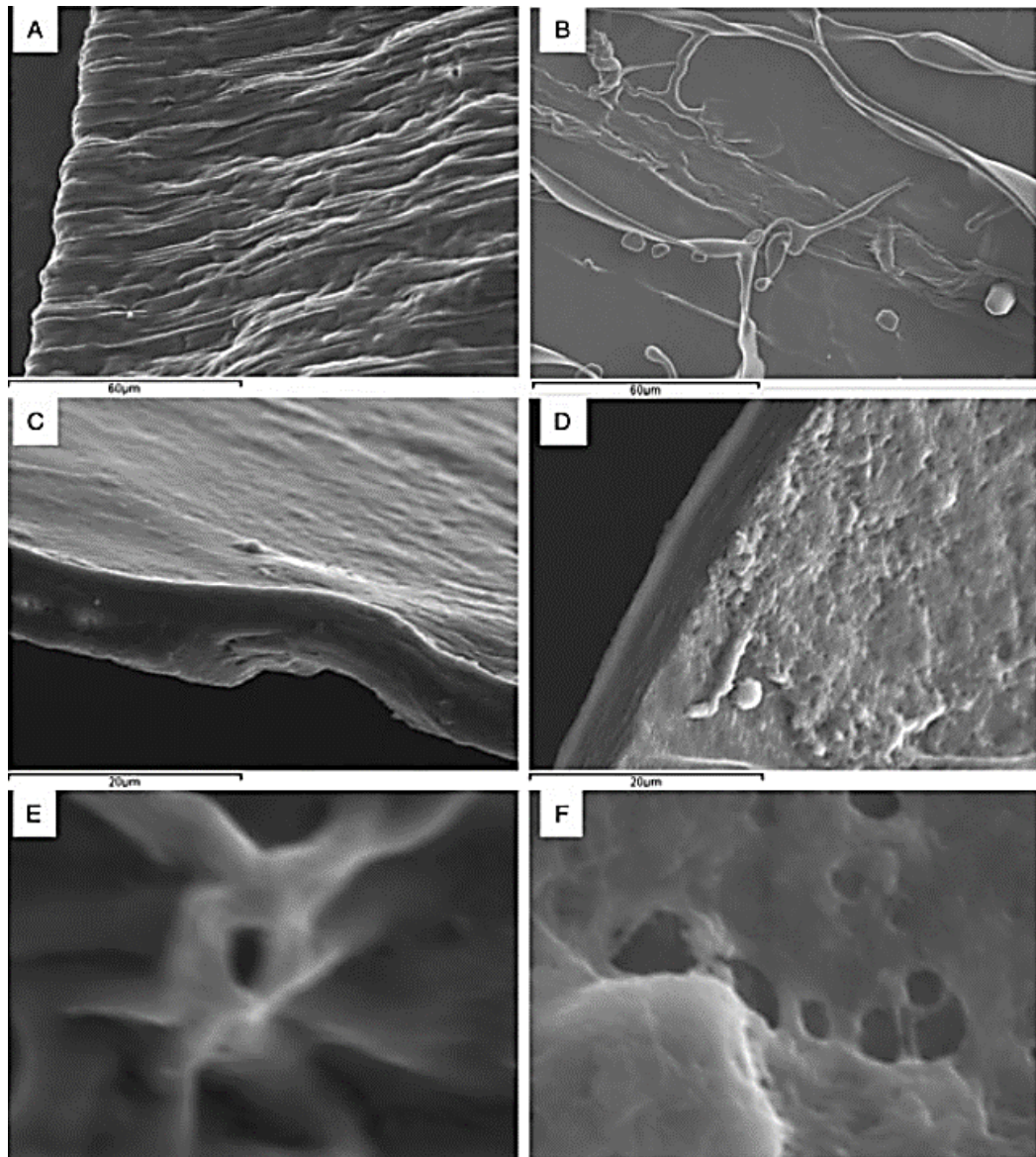


Рис. 3.1. Порожні капсули: (А) зовнішня поверхня; (В) внутрішня поверхня; (С) поперечний переріз зовнішньої поверхні; (D) поперечний переріз внутрішньої поверхні; (Е) зовнішня поверхнева остиола розміром 500–1000 нм; (F) внутрішня поверхня остиоли розміром 500–1000 нм (масштабна шкала: (А–В) 60 мкм; (С–D) 20 мкм; (Е–F) 4 мкм).

Як показано на рис. 3.2 (C) і (D), завдяки впливу сили тяжіння та м'якості капсули, розташовані в чашці з культурою, мають еліптичну морфологію, а іммобілізовані клітини мікробіодоростей можуть вільно рухатися всередині матриці капсули. Однак клітини переважно прикріплюються до внутрішньої поверхні капсул, що підтримує високу інтенсивність світла, високу концентрацію вуглекислого газу та кращу швидкість передачі поживних речовин. Можливо, це може бути причиною того, чому капсули (рис. 3.2 (B)) мають асиметричний зелений колір. Це явище свідчить про те, що мембрана капсули, виготовлена цим методом, неоднорідна, і зразки мембрани з різних частин однієї капсули можуть мати різні коефіцієнти дифузії, що суперечить припущенням Yao et al. і Чен та ін. Незважаючи на те, що неоднорідна характеристика мембрани капсули дещо неминуха через спонтанність процесу реакції, це не перешкоджає біотехнологічному застосуванню NaCS-PDMDAAC капсули.

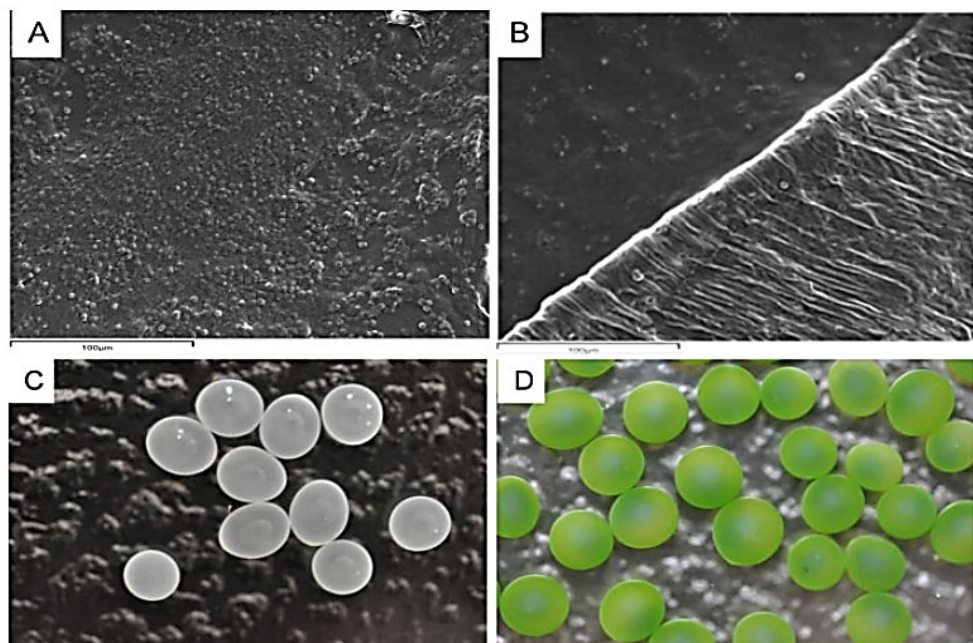


Рис. 3.2. Капсули, інкапсульовані мікробіодоростями: (A) внутрішня поверхня; (B) зовнішня поверхня та поперечний переріз (шкала 100 мкм); (C) порожні капсули; (D) капсули, інкапсульовані мікробіодоростями (фото, зроблене після 7 днів культивування).

Через 7 днів культивування розмір в капсула мікроводоростей не змінилася, як виміряно штангенциркулем, і зберегла початкову морфологію. Як повідомлялося раніше, вищий тиск навколишнього середовища, ефект самозатінення та нижча швидкість передачі поживних речовин/метаболічних відходів іммобілізованої системи культивування сприяють варіаціям морфології клітин, вмісту ліпідів/жирних кислот, хлорофілу та експресії білка. Ці варіації, можливо, є наслідком відмінностей у біосинтезі ліпідів/білків, амінокислотах і метаболічних шляхах.

3.2. Культивування водоростевої біоплівки з використанням різних лігноцелюлозних матеріалів як носіїв [35]

У цій роботі було досліджено чотири типи лігноцелюлозних матеріалів, щоб оцінити їх дію як носіїв для прикріплення клітин водоростей і відповідний вплив на виробництво біомаси водоростей. Культивували водорості у пластинчатому фотобіореакторі власної розробки. Визначено виробництво біоплівки та хімічний склад зібраної біомаси. Фізичні властивості поверхні матеріалів досліджували за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Продукція біомаси водоростей суттєво змінювалася залежно від варіації носіїв ($P < 0,05$). Усі лігноцелюлозні матеріали продемонстрували кращі показники у виробництві біоплівки, ніж поліетилен метилметакрилату, а застосування соснової тирси як носія може отримати максимальну біопродуктивність $10,92 \text{ г м}^{-2} \text{ день}^{-1}$ після 16-денного культивування. Крім того, із зібраної біомаси було досягнуто 20,10–23,20 % загального вмісту ліпідів, 30,35–36,73 % сирих білків і 20,29–25,93 % вуглеводів. Продуктивність біомаси зростала лінійно зі збільшенням шорсткості поверхні, коефіцієнта шорсткості Венцеля досліджуваних матеріалів і шорсткості поверхні може суттєво вплинути на виробництво біомаси через розмір морфології поверхні та площу поверхні ($P < 0,05$).

Зображення ESEM (рис. 3.3) і рисунки CLSM (рис. 3.4) демонструють, що всі протестовані лігноцелюлозні матеріали мали шорстку поверхню та велику кількість регулярних і добре розподілених канавок і виступів. Однак поверхня ПММА була набагато гладкішою, ніж випробувані лігноцелюлозні матеріали. Спостережувані борозенки та виступи могли утворитися під час процесу утворення частинок за допомогою механічної енергії від дробарок, пресів і пилок. Серед випробуваних матеріалів PW (шорсткість поверхні 18,98 мкм) мав найскладнішу рельєфну поверхню з різноманітними канавками, подібними до створених руками V-подібних канавок. По-перше, OW і SB мали шорсткість поверхні 11,29 і 11,25 мкм відповідно. RH мала середню шорсткість поверхні 10,01 мкм, найменше значення серед чотирьох матеріалів, але все ще була більшою, ніж у ПММА (шорсткість поверхні 0,07 мкм).

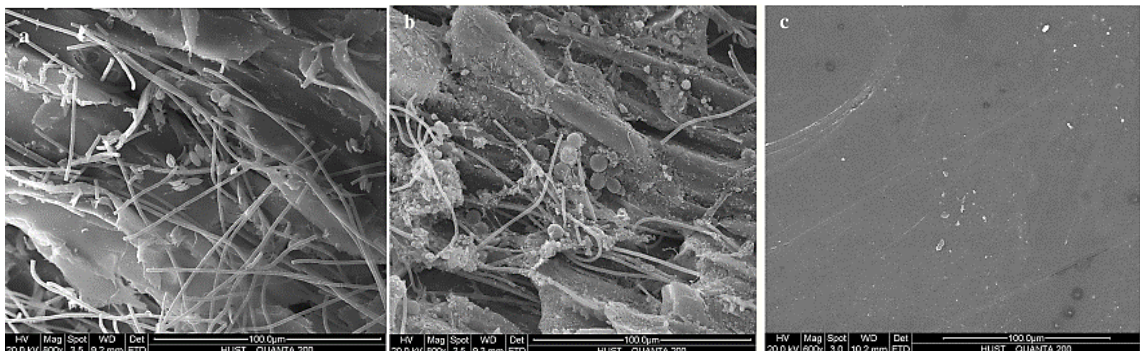


Рис. 3.3. ESEM-зображення 1-денних біоплівки з різними матеріалами як носіями. a Біоплівка з PW як носіями. b Біоплівка з SB як носіями. c Біоплівка з ПММА як носії.

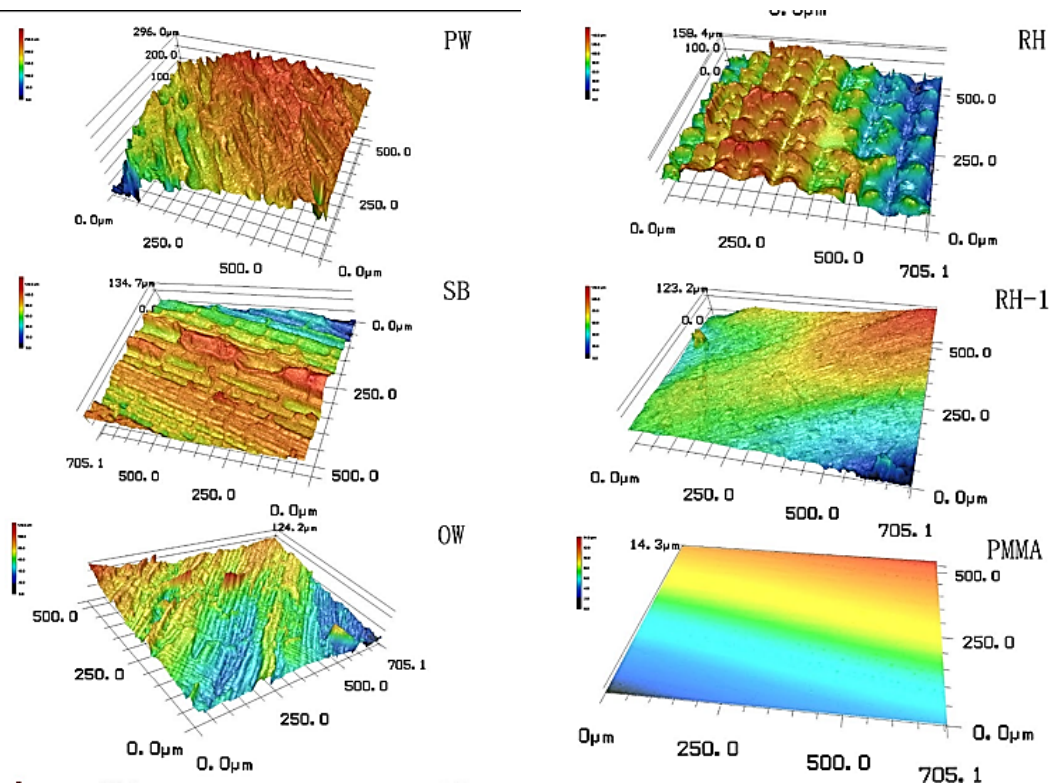


Рис. 3.4. Тривимірні зображення рельєфу поверхні тестованих п'яти різних матеріалів, отриманих за допомогою технології CLSM, RH має два типи поверхонь із абсолютно різною шорсткістю, (RH) шорстка зовнішня поверхня, (RH-1) гладка внутрішня поверхня.

Таблиця 3.1

Вимірювання канавок на поверхні досліджуваних лігноцелюлозних матеріалів (середнє значення \pm SD)

Material	Groove width (μm)			Groove depth (μm)	
	Mean	Max	Min	Mean	Max
PW	20.44 \pm 5.22	31.36 \pm 8.25	12.12 \pm 9.43	49.33 \pm 12.55	82.95 \pm 11.38
OW	15.48 \pm 2.99	20.65 \pm 1.28	12.78 \pm 1.33	39.31 \pm 7.76	45.47 \pm 7.85
SB	26.00 \pm 12.83	65.22 \pm 24.23	10.88 \pm 4.26	16.68 \pm 2.35	33.63 \pm 6.42
RH	47.85 \pm 14.35	79.71 \pm 12.35	28.11 \pm 8.88	29.29 \pm 7.05	46.46 \pm 10.79

Крім того, прикріплення клітин мало сильний зв'язок із розміром канавок. У таблиці 3.1. перераховані вимірювання канавок на поверхні субстрату. RH мав найширший середній розмір канавок, досягаючи 47,85

мкм (шорстка поверхня), за ним йшли SB (26,00 мкм), PW (20,44 мкм) і OW (15,48 мкм). Однак PW (49,33 мкм) і OW (39,31 мкм) мали глибші борозенки, ніж RH (29,29 мкм) і SB (16,68 мкм). Ці особливості також можна спостерігати на тривимірних зображеннях, показаних на рис. 3.4. Певною мірою зміна глибини канавок випробуваних лігноцелюлозних матеріалів мала тенденцію, подібну до біоплівки. продуктивність, шорсткість поверхні та коефіцієнт шорсткості Венцеля. Матеріал із грубішою поверхнею, як правило, має відносно більшу площу поверхні, глибші канавки та більшу продуктивність біоплівки.

Згідно із зображеннями ESEM рис. 3.3., після 1-денного періоду інокуляції та 1-денного культивування клітини водоростей *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. або *Oscillatoria tenuis* переважно знаходились в борозенках. Однак для ПММА як носія існувало лише кілька клітин. Сатанантан та ін. нанесли візерунок на поверхню субстрату за допомогою 20 мкм V-подібних канавок і завдяки 10-денній змішаній культурі продуктивність водоростей була вдвічі більша ніж гладка поверхня. Мікротопографії поверхні, які трохи більші за розмір клітин водоростей, сприятимуть прикріпленню, а більш глибокі канавки завжди забезпечують прикріплення більшої кількості клітин. У цьому дослідженні розмір усіх досліджуваних видів водоростей був трохи меншим за середню глибину та середню ширину спостережуваних канавок.

Результати показали, що лігноцелюлозні матеріали можуть бути ефективними носіями для недорогого культивування водоростевої біоплівки та підвищення продуктивності біомаси.

3.3. Дослідження іммобілізованої *Chlorella* sp. за допомогою нанопорошку мідій та хітозану [36]

Оболонки використовували для виробництва матеріалів біомаси шляхом кальцинування завдяки їхнім чудовим механічним властивостям. У

цій статті мушлі мідій прожарювали у вакуумній трубчастій печі та муфельній печі при 600°C, 700°C і 800°C відповідно, а ті, що були підготовлені в оптимальних умовах, активували K₂CO₃ гідротермальним методом. Структуру пор і морфологію зразка охарактеризували за допомогою аналізатора питомої поверхні (ВЕТ) і скануючої електронної мікроскопії (SEM). Криві ізотерм адсорбції та розподілу пор за діаметром ММ (порошок мідій, прожарений у муфельній печі) та МТ (мідії, прожарені в трубчастій печі) при 600 °С (а), 700 °С (б) та 800 °С (в) (рис. 3.5.).

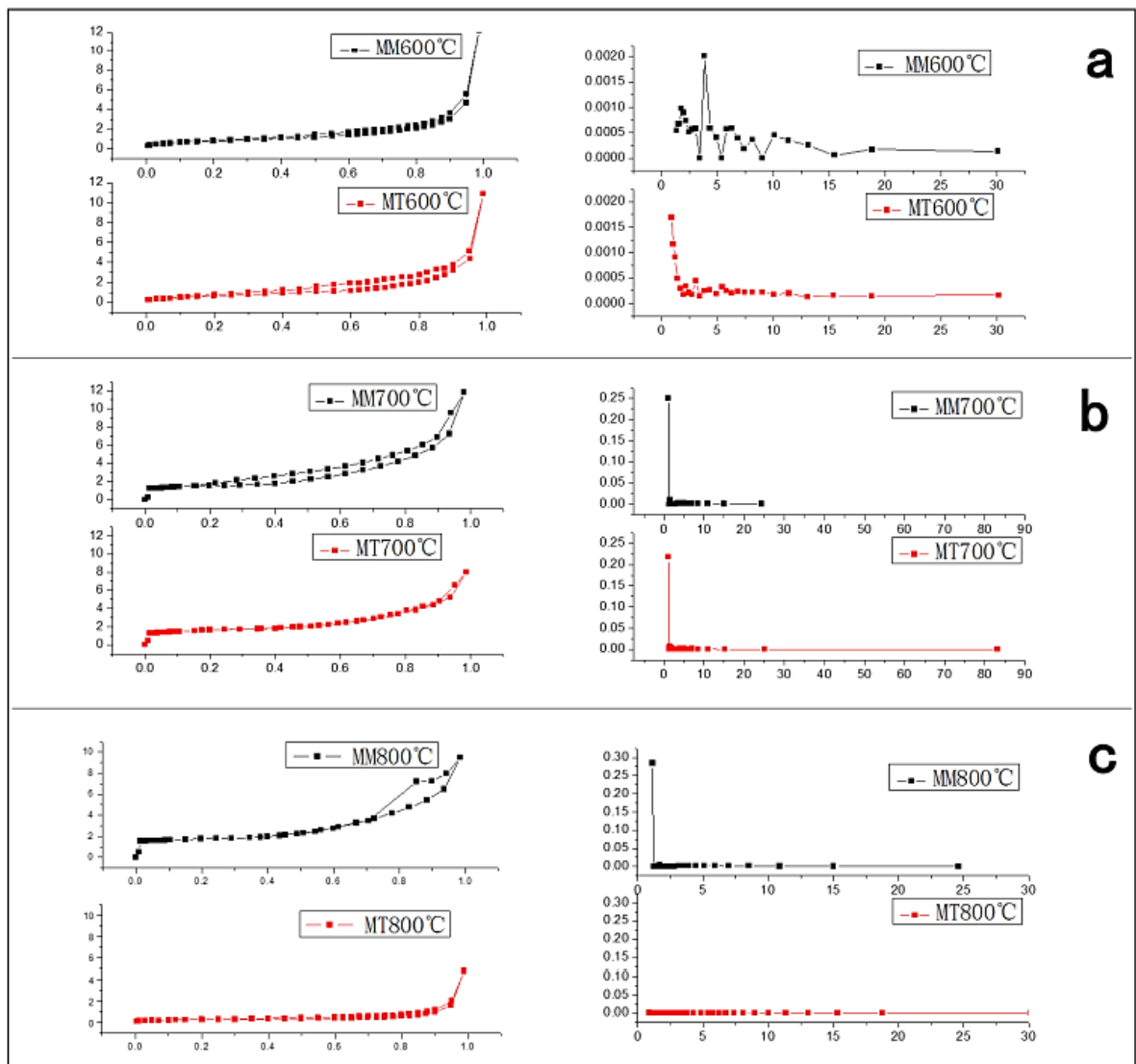


Рис. 3.5. Ізотерми адсорбції та криві розподілу пор за діаметром ММ та МТ за різних температур розширення (600 °С, а; 700 °С, б; 800 °С, в).

Ізотермічні криві адсорбції ММ і МТ при 600 °С і 700 °С подібні, і всі типи ІІІ. Латеральна взаємодія між адсорбованими молекулами більша, ніж взаємодія між поверхнею адсорбенту та адсорбатом. Адсорбція відбувається кількома шарами, і кількість адсорбції збільшується зі збільшенням тиску. Хоча питома площа поверхні ММ загалом перевищує МТ при температурі нижче 600 °С, 1,308 м²/г проти 0,435 м²/г середній діаметр пор МТ становить близько 5 нм, а ММ — приблизно 2 нм. Середні діаметри пор ММ і МТ при 800 °С істотно не відрізняються. Причина може полягати в тому, що органічні речовини в порошок шкаралупи повністю розклалися після 700 °С. Ізотерми адсорбції ММ при 800 °С мають петлю гістерезису, яка належить до типу Н1, що вказує на те, що розподіл пор матеріалу є відносно вузьким, частинка є сферичною, а її розмір однорідним. Загалом, органічна речовина порошку шкаралупи повністю розкладається при 700 °С. Відповідно до середнього розміру пор кожного матеріалу, можна довести, що порошок оболонки утворить добре розподілений, менш пористий мезопористий матеріал після високотемпературного прожарювання. Ефект роздування трубчастої печі трохи кращий, ніж муфельної печі (табл. 3.2 і 3.3).

Таблиця 3.2

Питома поверхня та середній розмір пор ММ

Temperature (°C)	600	700	800
Specific surface area (m ² /g)	1.308	5.538	12.45
Average pore size (nm)	7.627	11.1078	4.9343

Таблиця 3.3

Питома поверхня та середній розмір пор МТ

Temperature (°C)	600	700	800
Specific surface area (m ² /g)	0.435	1.2	0.965
Average pore size (nm)	3.406	4.107	3.177

Криві ізотерм адсорбції та розподілу пор за діаметром MMM (ММ, модифікований K_2CO_3) та МТМ (МТ, модифікований K_2CO_3), (рис. 3.6) прожарений стан якого становить 600 °С, 700 °С, 800 °С.

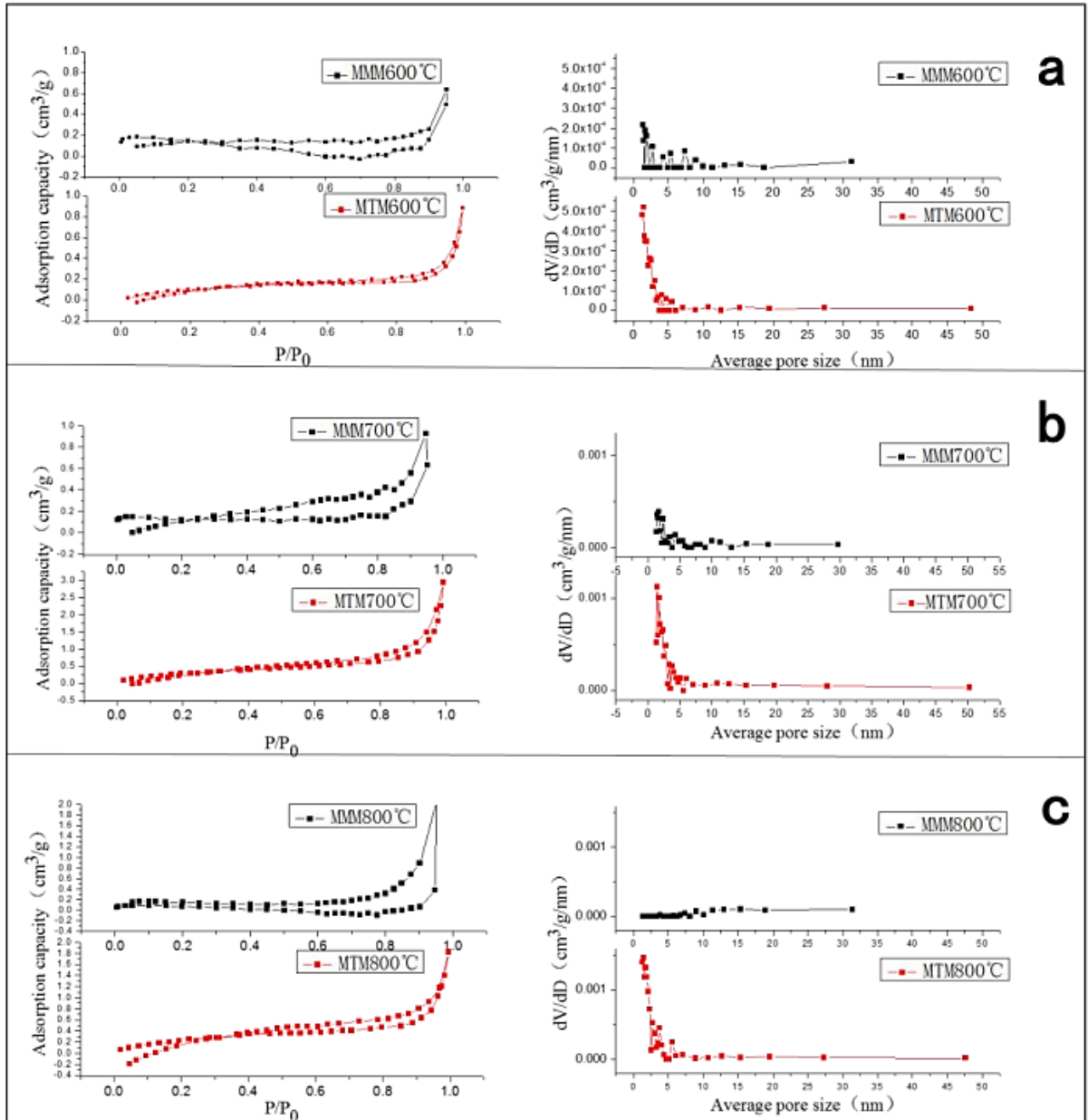


Рис. 3.6. Ізотерми адсорбції та криві розподілу діаметрів пор для MMM (ММ, модифікований K_2CO_3) і МТМ (МТ, модифікований K_2CO_3) за різних температур розширення (600 °С, а; 700 °С, б; 800 °С, с).

Середній розмір пор порошку оболонки збільшився з 3,406 нм до 15,176 нм при 600 °С, з 4,107 нм до 16,557 нм при 700 °С і з 3,177 нм до 7,804 нм при 800 °С. Але зі зменшенням кількості пор зменшується питома поверхня. Кальцинований порошок оболонки в муфельній печі не має великої різниці до і після модифікації. Автори обрали МТМ (700 °С) як найкращий зразок (табл. 3.4 і 3.5).

Таблиця 3.4

Питома поверхня та середній розмір пор МММ

Temperature (°C)	600	700	800
Specific surface area (m ² /g)	2.894	5.4272	0.888
Average pore size (nm)	7.086	12.600	9.019

Таблиця 3.5

Питома поверхня та середній розмір пор МТМ

Temperature (°C)	600	700	800
Specific surface area (m ² /g)	0.336	0.364	0.123
Average pore size (nm)	15.176	16.557	7.804

Є кілька повідомлень про використання матеріалів біомаси як носіїв для іммобілізації мікрободоростей. Порошок оболонки, чудовий пористий матеріал, знерухомлює мікрободорості за допомогою притягування заряду та фізичної адсорбції, має сильну іммобілізуючу здатність і може забезпечити мікрободорості певними поживними речовинами та подовжити їх життя. *Chlorella sp.* іммобілізували порошком мушлі мідії та хітозаном, який спільно культивували протягом 60 днів. Результати показали, що прожарені оболонки при 700 °С у вакуумній трубчастій печі мають оптимальну питому поверхню до 4,107 м²/г. Метод гідротермальної модифікації K₂CO₃ може ефективно розширити пори порошку оболонки від

4,107 нм до 16,557 нм. Порошок шкаралупи, модифікований хітозаном, мав позитивні заряди, які могли притягувати мікрободорості з негативними зарядами, і вони могли жити до 60 днів. (рис. 3.7)

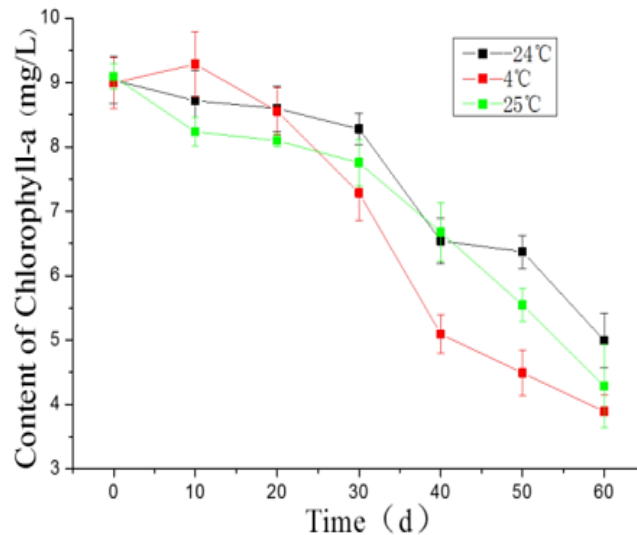


Рис. 3.7. Крива росту мікрободоростей протягом 60 днів за різних умов зберігання (- 24 °C, 4 °C, 25 °C)

3.3.1. SEM характеристика. Дві SEM-фотографії М (Мідія, прожарена при 700 °C у вакуумі), МТМ, (рис. 3.8) текстура М пухка, на поверхні є кілька пор, діаметр яких становить близько 0,5 мкм, що визначає відмінні адсорбційні характеристики оболонкового порошку. Розмір пор в МТМ збільшений, порівняно з М, який становить 1 мкм, тому що 1% карбонат калію та водяна пара мають гарну пороутворюючу здатність, підвищуючи адсорбцію та здатність тривалого вивільнення порошку оболонки.

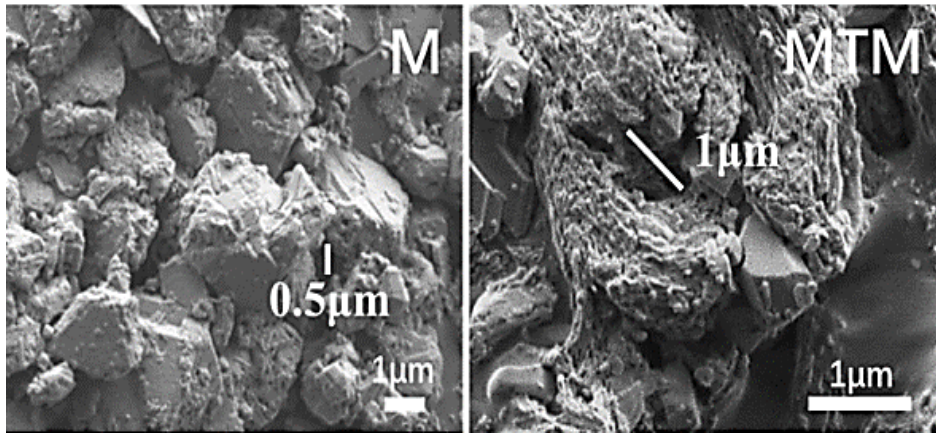


Рис. 3.8. SEM зображення M і MTM.

Мікрофотографії іммобілізованих мікроводоростей під біооптичним мікроскопом (рис. 3.9). Видно, що діаметр порошку оболонки становить близько 200 мкм, а клітини хлорели мають розмір приблизно 10 мкм з частковим укладанням порошку оболонки. Велика кількість *Chlorella sp.* клітини накопичуються навколо порошку шкаралупи, що вказує на те, що модифікація шкаралупи CS збільшила «фіксований» ефект шкаралупи на мікроводорості. Це корисно для розсіювання мікроводоростей під час використання іммобілізованих мікроводоростей. Альгінат натрію також має певну зміцнюючу і зволожуючу дію.

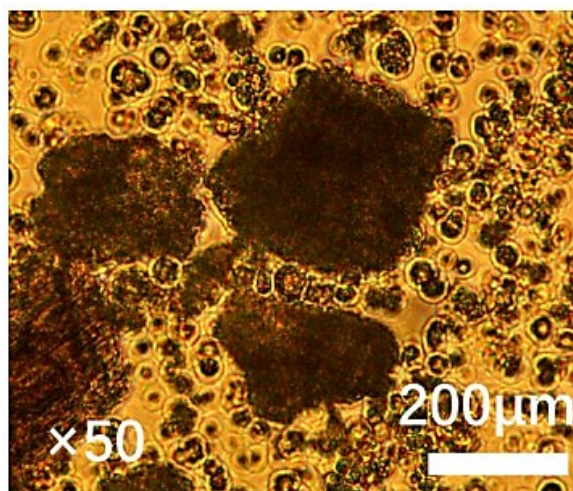


Рисунок 3.9. OM зображення іммобілізованих мікроводоростей.

Ця стаття спрямована на використання відходів оболонки для іммобілізації мікроводоростей, що не тільки має велике значення для захисту навколишнього середовища, але також забезпечує новий спосіб іммобілізації мікроводоростей.

3.4. Посилення утворення біоплівки та росту мікроводоростей шляхом підготовки целюлозного субстрату з шорсткою поверхнею [37]

Серія целюлозних плівок із шорсткою поверхнею була виготовлена за допомогою простого методу лиття розчину та використання водонепроникного абразивного паперу з різною зернистістю як підкладку. Целюлозні плівки мали шорстку поверхню з максимальною різницею висоти (Sz) 128-217 мкм, макропористу структуру з високою пористістю 84,7%-90,5% і негативним потенціалом між -40,00 і -54,15 мВ (табл. 3.6). Крім того, целюлозні плівки показали відмінні властивості адгезії мікроводоростей. Через 18 днів прикріплена *Chlorella* sp. У досліді культивування середня продуктивність плівок С-А-120 (С-А-Х, Х означає число сіток субстрату) досягла 20,80 г м⁻² д⁻¹), що в 2,69 рази більше, ніж у целюлозної плівки з гладкою поверхнею. Результат показує, що целюлозні плівки з шорсткою поверхнею та високим коефіцієнтом адсорбції води мають величезний потенціал у якості субстрату для культивування прикріплених мікроводоростей для сприяння росту клітин мікроводоростей та утворенню біоплівки.

Отримання та характеристика целюлозних плівок

Samples	Total intrusion volume* (mL/g)	Average pore diameter (nm)	Porosity (%)	Water absorption ratio (%)	Zeta potential (mV)	RSa (µm)	RSz (µm)
C-A-40	8.57	285.19	90.51	253	-46.47 ± 3.60	21.43	166
C-A-80	5.56	200.68	86.24	306	-49.22 ± 3.19	26.14	211
C-A-120	7.74	258.92	89.13	419	-40.00 ± 3.31	26.17	217
C-A-300	4.93	185.52	84.68	222	-54.15 ± 3.84	18.44	128
C-G	8.68	303.51	89.20	174	-41.12 ± 2.49	15.68	108

* Total intrusion volume was measured at 3*10⁴ psi.

3.5. Видалення азоту та фосфору іммобілізованою на агарі *Chlorella saccharophila* при тривалому зберіганні при кімнатній температурі [38]

Іммобілізовані мікроводорості мають великий потенціал для видалення поживних речовин під час очищення стічних вод. Однак їх застосування має проблему, як економічно ефективно підтримувати та зберігати велику кількість життєздатних та активних клітин мікроводоростей. У цьому дослідженні клітини *Chlorella saccharophila* були іммобілізовані в агарі, що містить водоростеві поживні речовини, інкапсульовані в прозору упаковку та зберігалися при кімнатній температурі.

3.5.1. Іммобілізація та збереження клітин мікроводоростей. Перед іммобілізацією клітини мікроводоростей збирали методом флокуляції та преципітації з використанням PAC у поєднанні з монтморилонітом (рис. 3.10). PAC є різновидом економічно ефективного хімічного флокулянта, який уже застосовувався для видалення забруднюючих речовин під час

очищення стічних вод, а також для збирання мікроводоростей (Jiang та ін., 2015; Wan та ін., 2015). Однак лише за використання флокулянта PAC, осаді були недостатньо щільними для отримання високої концентрації ($> \text{г/л}$) клітин мікроводоростей. Одночасне використання PAC і монтморилоніту допомогло вирішити цю проблему. Насправді монтморилоніт зазвичай поєднували з полімерними матеріалами (такими як хітозан) для флокуляції забруднюючих речовин (Yang et al., 2016).

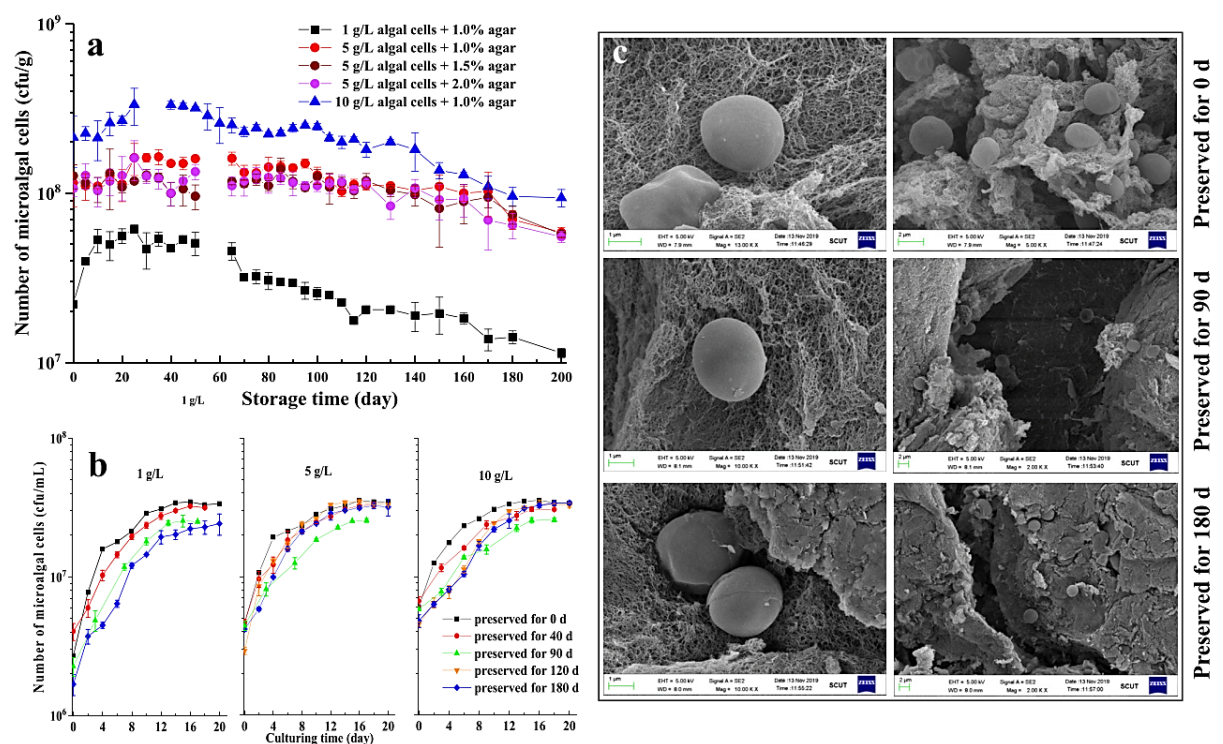


Рис. 3.10. Зміни в часі живих клітин мікроводоростей, іммобілізованих в агарі (а), відновлення після тривалого зберігання (б) і SEM спостереження (с).

Сконцентровані клітини мікроводоростей з кінцевими концентраціями 1, 5 і 10 г/л були іммобілізовані в живильному агарі та зберігалися при кімнатній температурі. Згідно з результатами, показаними на рис. 3.9а, початкова кількість клітин у твердому агарі становила $2,2 \cdot 10^7$, $1,2 \cdot 10^8$ і $2,1 \cdot 10^8$ КУО/г для 1, 5 і 10 г/л іммобілізованих мікроводоростей

відповідно. Під час зберігання спостерігали життєздатні клітини з постійним збільшенням до 25-ї доби; на той час життєздатні клітини мікроводоростей становили приблизно $6,1 \cdot 10^7$, $1,6 \cdot 10^8$ і $3,3 \cdot 10^8$ КУО/г відповідно. При використанні іммобілізованих на агарі клітин як посівного матеріалу для культивування мікроводоростей зростання мікроводоростей було таким же хорошим, як зростання до консервації, навіть зберігаючись протягом 180 днів (рис. 3.10b). Профілі SEM показали, що клітини мікроводоростей, іммобілізовані в агарі та збережені протягом 90 і 180 днів, зберігали сферичну форму і не мали різниці з морфологією клітин до консервації (рис. 3.10c). Також припускають, що іммобілізовані в агарі мікроводорості не тільки довго зберігаються при кімнатній температурі, але й здатні відновити свою активність лише після короткочасного культивування.

3.5.2. Видалення азоту та фосфору в періодичній культурі.

Амонійний азот ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) і фосфатно-фосфорний ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) є двома найпоширенішими поживними речовинами азоту та фосфору, присутніми у стічних водах відповідно (Mujtaba et al., 2017). У цьому дослідженні для видалення цих двох поживних речовин із синтетичних стічних вод використовували іммобілізовані в агарі мікроводорості. Як результати (рис. 3.11 a і b) більше 90% $\text{NH}_4^+\text{-N}$ і $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ було видалено після 60 годин і 36 годин обробки при використанні агаромобілізованих мікроводоростей з концентрацією 1 г клітин водоростей на літр відповідно; але на відміну від цієї концентрації, більш висока або нижча концентрація клітин водоростей призводила до нижчої ефективності видалення.

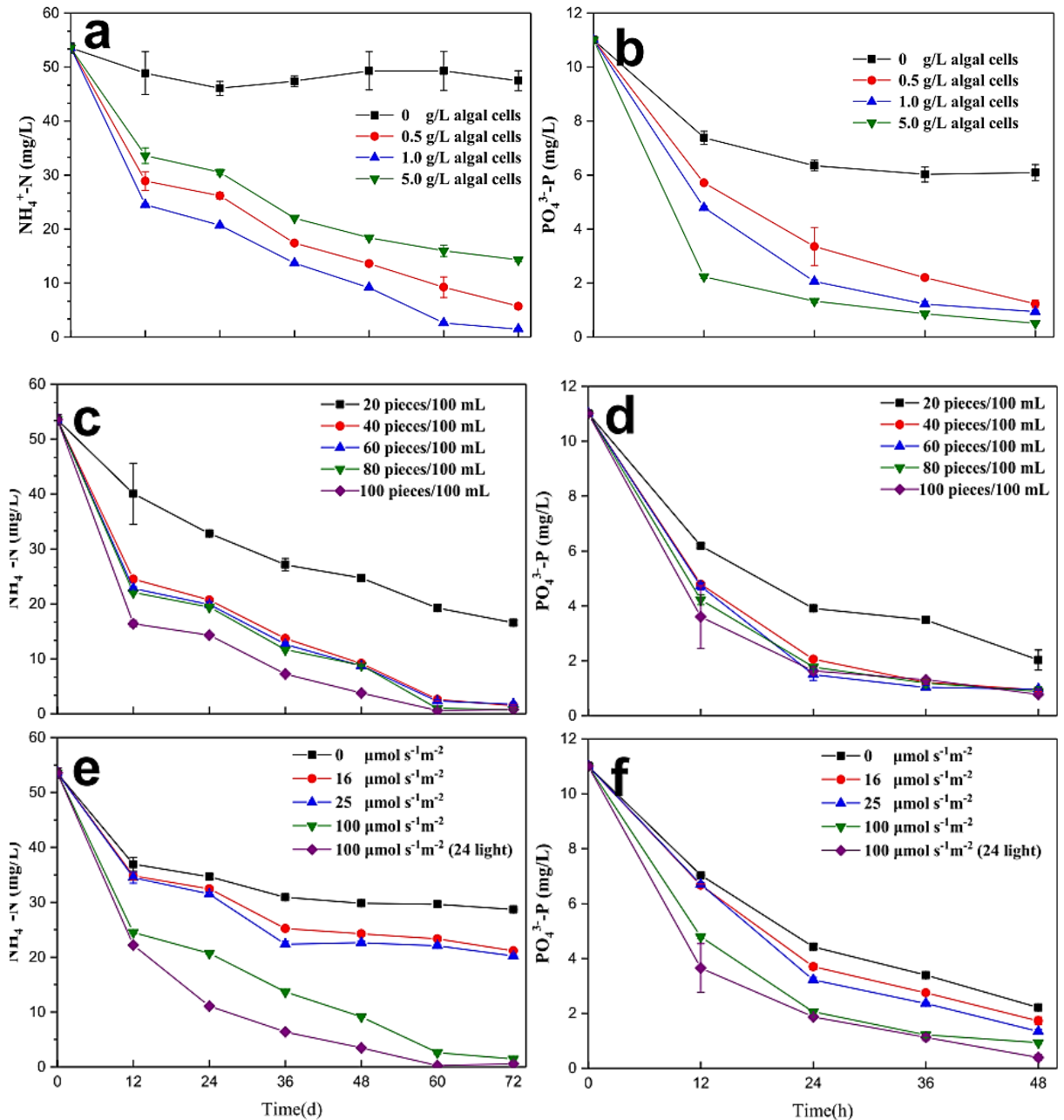
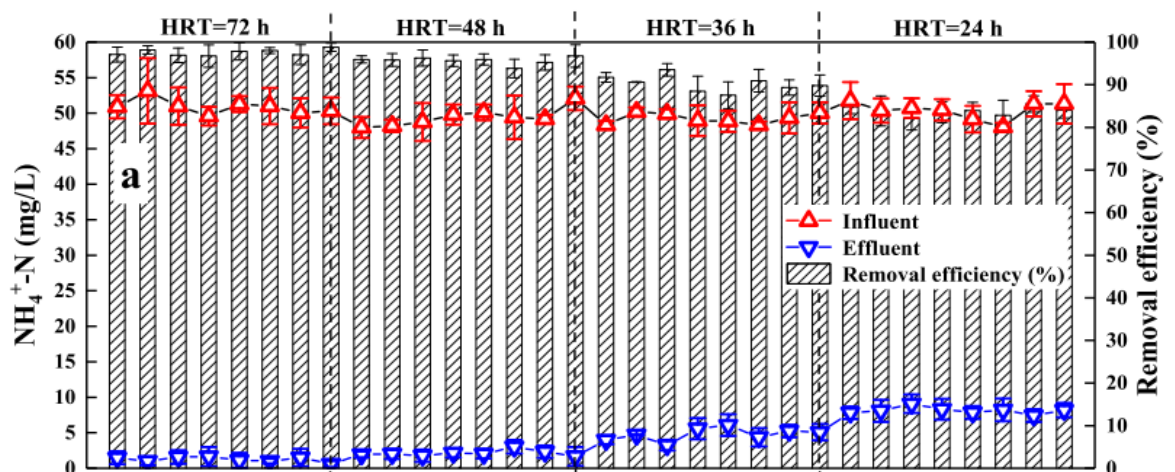


Рис. 3.11. Видалення $\text{NH}_4^+\text{-N}$ та $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ у серійних культурах з різною щільністю водоростей (a, b), дозуванням (c, d) та щільністю світла (e, f).

Під час періодичного культивування, коли дозування кубиків агару збільшили до 40 штук, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ з початковою концентрацією 53,5 мг/л зменшився до 16,4-24,5 мг/л, а $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ зменшився з 11,0 мг/л до 3,6-4,8 мг/л протягом перших 12 год; понад 95% зменшення N і 90% P спостерігалось після 60 годин і 36 годин обробки відповідно (рис. 3.11 c і d). Як важливий

фактор навколишнього середовища для росту мікрободоростей, зазвичай повідомляється, це щільність світла яка має значний вплив на видалення поживних речовин як для вільноживучих мікрободоростей, так і для іммобілізованих клітин (Liu et al., 2019; de-Bashan and Bashan, 2010; Yang et al. ін., 2018). Як показано (рис. 3.11 е і f), чим більша щільність світла була використана і чим більше було освітлення, тим більше зменшувалися N і P. Коли щільність світла сягала 100 ммоль/с на 1 м² (приблизно щільність в приміщенні), >50% N і P зменшувалися лише після 12 годин обробки, а >90% N і P зниження спостерігали через 60 годин і 36 годин обробки відповідно.

3.5.3. Видалення азоту та фосфору в безперервній культурі. Щоб оцінити доступність іммобілізованих на агарі мікрободоростей для видалення поживних речовин при безперервній обробці, дослідження видалення $\text{NH}_4^+\text{-N}$ і $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ проводили у фотобіореакторах. По результатам (рис. 3.12а) вхідний $\text{NH}_4^+\text{-N}$ з концентрацією 48,0–53,1 мг/л було зменшено до 1,0–9,0 мг/л у стічній рідині, а ефективність видалення підтримувалася на високому рівні (> 82%).



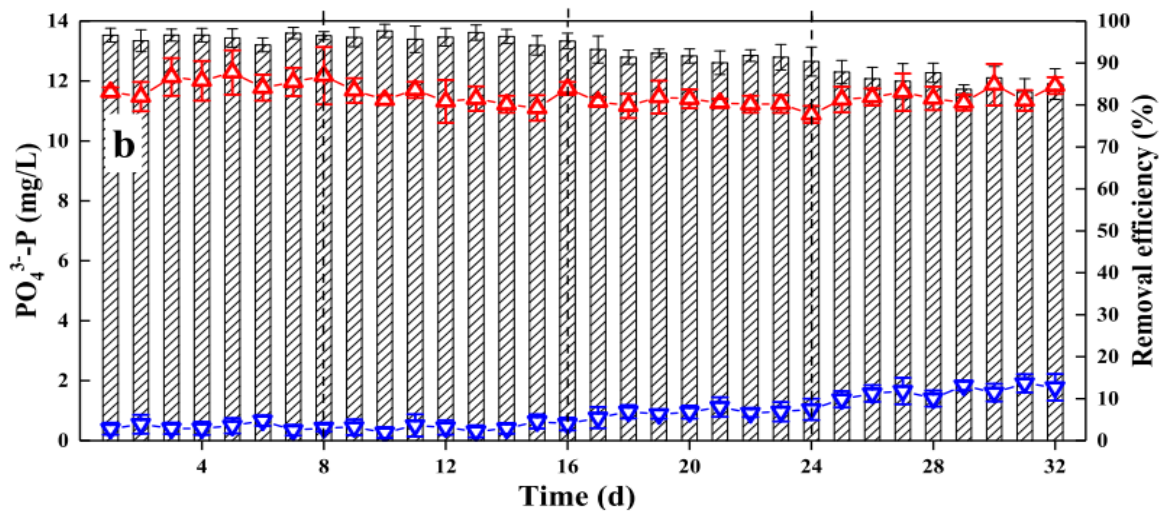


Рис. 3.12. Видалення $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (а) та $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (б) у безперервному фотобіореакторі з різним гідравлічним часом утримання (HRT).

Під час видалення $\text{NH}_4^+\text{-N}$ спостерігалось, що середня ефективність видалення становила 97,6%, 95,7%, 90,3% і 83,8%, коли HRT (час роботи гідравлічного насосу) було встановлено на 72, 48, 36 і 24 години відповідно. Подібним чином, ефективність видалення $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ також підтримувалася на високих рівнях із середніми значеннями 96,1%, 96,1%, 91,5% і 85,7% відповідно (рис. 3.12b). Ці спостереження узгоджувалися з результатами очистки очисних станцій і муніципальних стічних вод іммобілізованими мікрободоростями, згідно з якими висока ефективність видалення поживних речовин зберігалася лише при HRT понад 24 години (Shen та ін., 2017; He та Хуе, 2010). На відміну від видалення поживних речовин у водоростевому фотобіореакторі з біоплівки (Тао et al., 2017), система фотобіореактора, в яку вставлено іммобілізовані на агарі мікрободорості, здається, має вищу ефективність видалення за низької HRT.

Однак, через витік клітин мікрободоростей з альгінатних кульок, щільність клітин іммобілізованих альгінатом мікрободоростей знизиться в кінці обробки, що призведе до зниження ефективності видалення поживних речовин, що вимагає модифікації іммобілізованого матеріалу (Шен та ін.,

2017). Хоча під час видалення поживних речовин потрібна була регулярна заміна кубиків агару, іммобілізовані в агарі мікроводорості мали високу стійкість і мали великий потенціал для очищення стічних вод. Мембранний біореактор (MBR), вбудований у клітини мікроводоростей, зазвичай використовується для видалення поживних речовин зі стічних вод (Hoh et al., 2016). Відповідна HRT є важливою для видалення поживних речовин, оскільки висока HRT призводить до низької продуктивності, а низька HRT призводить до вимивання біомаси (Singh and Thomas, 2010; Arcila and Buitron, 2016). Якщо MBR поєднується з мікроводоростями, іммобілізованими на агарі, можна встановити низьку HRT для досягнення високої пропускної здатності обробки і при цьому підтримувати високу ефективність видалення. Також було досліджено ефективність іммобілізованих на агарі мікроводоростей щодо видалення поживних речовин при використанні муніципальних стічних вод, які збираються з очисних споруд (Станція очищення стічних вод Ліцзяо, Гуанчжоу, Китай). Ефективність видалення N і P зросла до 98% і 96% після трьох днів обробки і підтримувалася в межах 95-98% і 90-96% у наступні дні відповідно.

Висновки. При зберіганні іммобілізованих на агарі мікроводоростей при кімнатній температурі можна підтримувати високу життєздатність і культивованість клітин мікроводоростей навіть після тривалого періоду. Агаріммобілізовані мікроводорості мали високу ефективність видалення $\text{NH}_4^+\text{-N}$ та $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ при періодичному та безперервному вирощуванні культур, і їх можна було використовувати для переробки. Навіть зберігання протягом тривалого часу агаріммобілізованих мікроводоростей мало високу ефективність видалення. Це перший випадок демонстрації того, що застосування агару для іммобілізації мікроводоростей довго зберігає їх при кімнатній температурі для видалення поживних речовин зі стічних вод. На відміну від мікроводоростей, іммобілізованих в іншій матриці або/або збережених при низькій температурі, цей метод є простим, економічно ефективним і практичним. Незважаючи на те, що це дослідження проведено

в лабораторних масштабах, його результати щодо видалення поживних речовин показали, що стратегія іммобілізації клітин водоростей в агарі та збереження їх при кімнатній температурі є великим потенціалом для комерційного застосування мікроводоростей для біоремедіації.

3.6. Видалення та відновлення ртуті *in vitro* з використанням іммобілізованої живої біомаси *Chlorella sp.* [39]

Крива росту мікроводоростей *Chlorella sp.* Мікроводорісті *Chlorella sp.* інкубували в умовах міксотрофного росту, продемонстрували логарифмічний ріст, в перші два дні експерименту відбувалася адаптація мікроводорості до навколишнього середовища, надалі спостерігали посилення росту, яке тривало до 19 дня, а з 24 дня культура мікроводоростей увійшла в стаціонарну фазу (рис. 3.13).

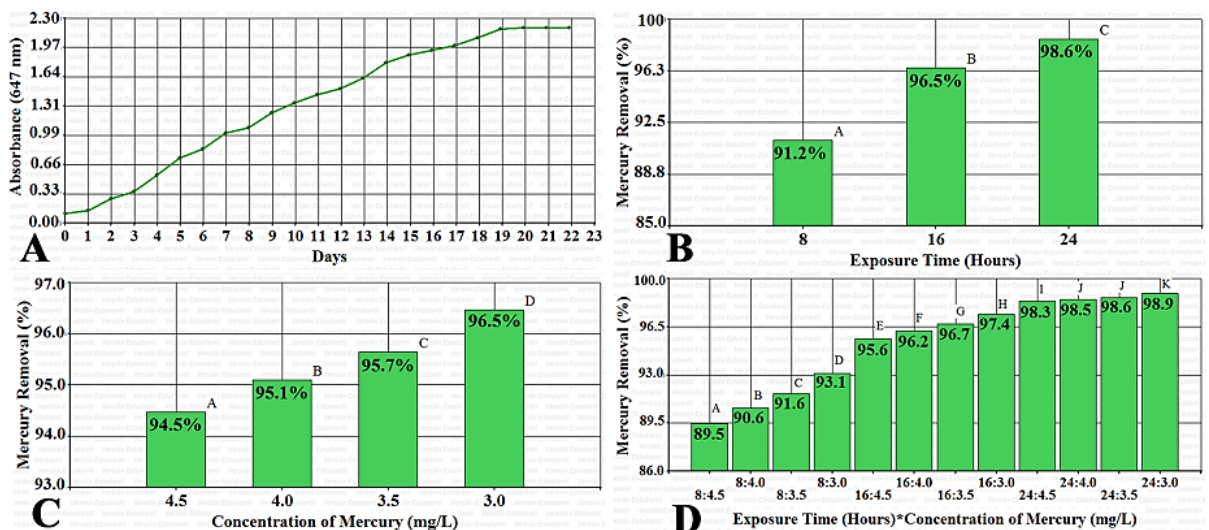


Рис. 3.13. А. Крива росту *Chlorella sp.*, В. Тест на видалення ртуті за часом впливу (годин), С. за концентрацією ртуті (мг/л) і D. Взаємодія між часом впливу (годин) і концентрацією ртуті (мг/л).

3.6.1. Імобілізація *Chlorella sp.* у фрагментах мочалки (*Luffa cylindrica*). *Chlorella sp.* була імобілізована у сухому скотчі фрукту в середньому 1,69 г на 18 добу фрагментами мочалки розміром 2,5x2,8 см (рис. 3.14). Імобілізовані мікроводорості мають багато переваг порівняно з мікроводоростями в суспензії, тому застосування цієї біотехнології демонструє зростаючу тенденцію, оскільки вона забезпечує підтримку вищої щільності клітин, більшу толерантність мікроводоростей, наприклад, до стресів, до солоності, при екстремальному рН, до важких металів. Однак тип субстрату для імобілізації водоростей є обмежуючим фактором у цій біотехнології, оскільки синтетичні матеріали можуть пригнічувати поділ клітин, швидкість фотосинтезу та інші ключові фактори цілісності клітин. Природні опорні матеріали, такі як сухі фрукти роду *Luffa*, змінюють повторюваність процесів, оскільки структура волокна не завжди є однорідною, і це залежить від умов отримання врожаю. У будь-якому випадку імобілізовані мікроводорості продемонстрували більший відсоток видалення забруднень, ніж вільні клітини.

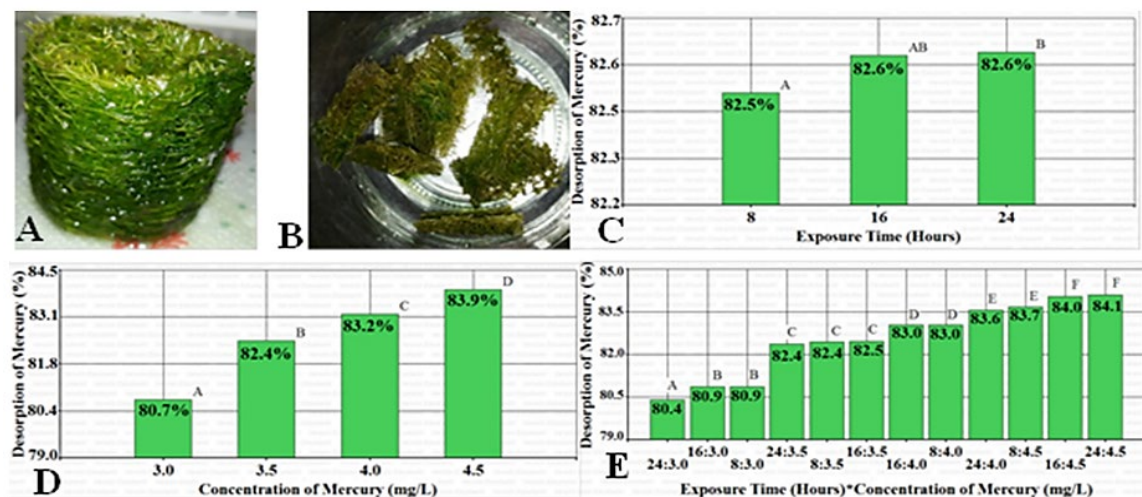


Рис. 3.14. А. Імобілізовані мікроводорості, В. Процес десорбції ртуті, С. Випробування десорбції ртуті за часом впливу (години) і D. за концентраціями ртуті (мг/л). Е. Взаємодія між часом впливу (годин) і концентрацією ртуті (мг/л).

Тест на видалення/десорбцію ртуті *Chlorella sp.* іммобілізованими у мочалці. За результатами випробувань на сорбцію/десорбцію та/або видалення ртуті критерій нормальності був виконаний за допомогою тесту Шапіро-Вілкса, виявивши р-значення 0,0635 для змінної видалення ртуті та р-значення 0,0782 для змінної десорбції ртуті. Встановлюючи критерії нормальності, дисперсійний аналіз проводився за допомогою плану з факторним розташуванням, визначаючи в якості факторів впливу на змінну відповіді час експозиції іммобілізованої мікроводорості, рівні якої становили 8 годин, 16 годин і 24 години, а в якості другого фактора - концентрації ртуті, як-от хлориду ртуті, рівні якого становили 3,0 мг/л, 3,5 мг/л, 4,0 мг/л і 4,5 мг/л, а також взаємодія між цими двома факторами, виявивши значні статистичні відмінності (р-значення $< 0,05$) між усіма факторами, а також між взаємодіями. Тому було застосовано множинний тест Тьюкі, який виявив значні статистичні відмінності (р-значення $< 0,05$) між усіма часовими інтервалами експозиції, показуючи найвищі середні показники видалення з 98,58% через 24 години після впливу на іммобілізовану біомасу водоростей різних концентрацій ртуті (рис. 3.14В). Однак з 8-ї години видалення ртуті було вище 91%.

Аналогічно, для різних концентрацій ртуті тест Тьюкі показує значні статистичні відмінності (р-значення $< 0,05$) з найвищими середніми значеннями видалення зазначеного важкого металу при найнижчих концентраціях, це становило 3,0 мг/л з 96,47%, і як концентрація ртуті зростає, здатність біосорбенту до видалення зменшується, досягаючи видалення 94,48% до 4,5 мг/л ртуті (рис. 3.14С).

Коли відбувається взаємодія між фактором часу впливу та концентраціями ртуті, тест Тьюкі показує значні статистичні відмінності (р-значення $< 0,05$), показуючи найвищі середні значення видалення за найдовшого часу впливу та найнижчі концентрації ртуті, що вказує на те, що біомаса *Chlorella sp* знерухоплена. Він ефективний для видалення ртуті

в розбавлених розчинах, це при концентраціях 3,0 мг/л ртуті протягом 24 годин впливу (рис. 3.14D).

Видалення ртуті іммобілізованими клітинами *Chlorella sp.* було близьким до 99%, що демонструє їх потенціал як метода біоремедіації, позиціонуючи себе як біотехнологічну альтернативу для усунення ртуті з водних систем. Використання мікроводоростей *Chlorella sp.*, іммобілізованих у чистячих подушечках (з люффи), забезпечує вищі показники видалення ртуті, порівняно з вільними клітинами цієї мікроводорості, а також впливає на екологічне розташування забруднюючої речовини (ртуті).

3.7. Вплив кристалічної наноцелюлози на розділення культивованих у стічних водах мікроводоростей і склад біомаси [40]

Мікроводорості є поновлюваною та багатообіцяючою сировиною, багатою на біохімічні речовини для виробництва біопалива та біоенергії. Життєздатність цієї технології залежить від енергетично та економічно ефективних процесів культивування (використовується культуральне середовище) та збору врожаю (застосовується коагулянт). Природний коагулянт кристалічної наноцелюлози, модифікованої 1-(3-амінопропіл)імідазол (CNC-APIm) було продемонстровано як екологічно чистий і придатний для переробки коагулянт для збирання мікроводоростей. Однак оптимізація все ще потрібна, щоб забезпечити його застосовність до мікроводоростей, культивованих у стічних водах, відсутність впливу на склад біомаси, а також економічно ефективний збір.

У цьому дослідженні ріст мікроводоростей і здатність *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) до видалення поживних речовин вперше були досліджені на двох типах міських стічних вод. *C. vulgaris* добре росла (рис.3.15) як на первинних стічних водах, так і на 30% (об./об.) розбавлених

стічних водах з продуктивністю біомаси $0,071 \pm 0,005$ і $0,062 \pm 0,006$ г/(л·д), відповідно.

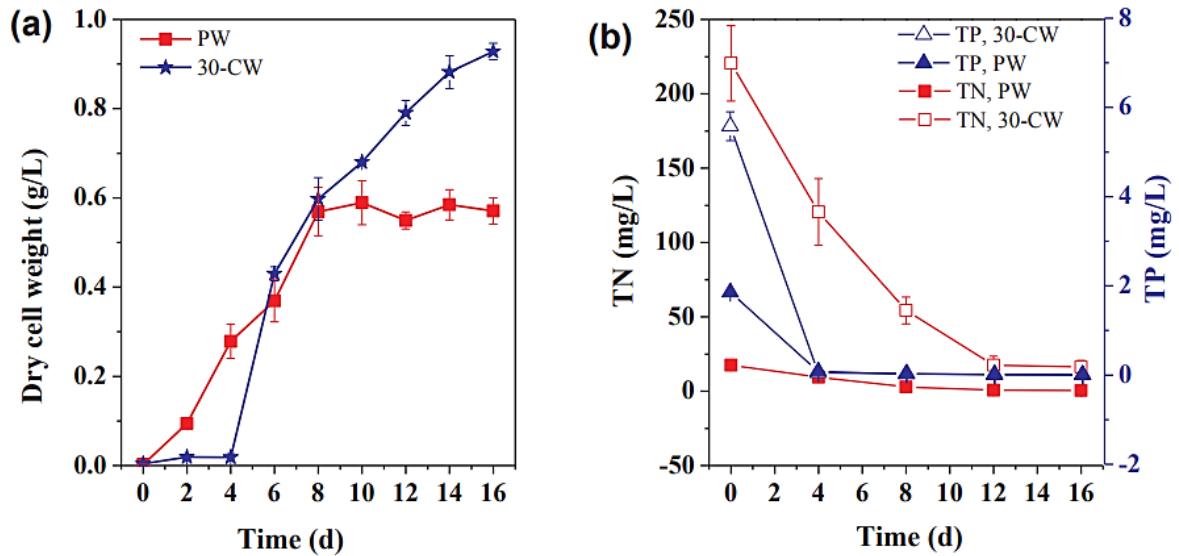


Рис. 3.15. Профілі (а) маси сухих клітин *C. vulgaris*, культивованих на PW і 30-CW відповідно, і (б) концентрації TN і TP в PBR протягом експериментальних періодів.

Отримано високу ефективність видалення азоту та фосфору (91,1–100%) (табл.3.7).

Таблиця 3.7

Зростання біомаси та видалення поживних речовин у культурах PW та 30-CW

Culture	BP (g/(L·d))	Growth rate (/d)	TN, RE (%)	TP, RE (%)	N assimilation (%) ^a	P assimilation (%) ^b
PW	0.071 ± 0.005	0.69 ± 0.04	97.2 ± 5.2	99.4 ± 1.1	91.5 ± 4.9	93.1 ± 4.5
30-CW	0.062 ± 0.006	0.39 ± 0.01	92.6 ± 3.6	99.9 ± 1.4	37.7 ± 1.9	91.5 ± 0.6

^a Calculated based on N content in biomass (2.72% for PW and 8.30% for 30-CW).

^b Calculated based on P content in biomass (0.30% for PW and 0.55% for 30-CW).

Згодом культивувану на стічних водах *C. vulgaris* було зібрано за допомогою нового природного коагулянту кристалічної наноцелюлози, модифікованої 1-(3-амінопропіл)імідазолом (CNC-APIm) (рис. 3.16, 3.17).

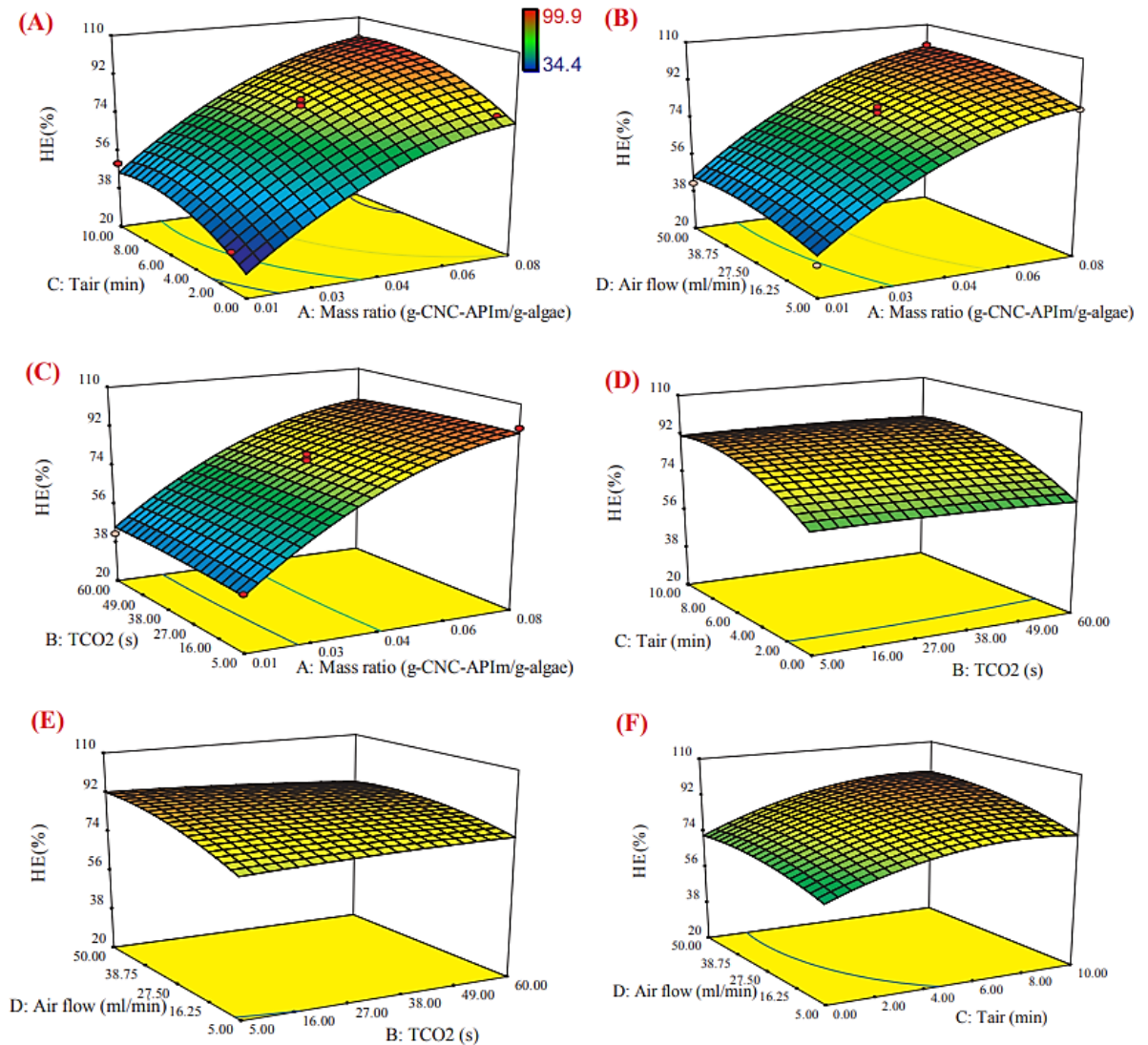


Рис. 3.16. Аналіз DOE-SRM ефективності збору врожаю (HE) як функції масового відношення та часу барботування CO₂ (A), масового співвідношення та часу барботування повітрям (B), масового співвідношення та швидкості повітряного потоку (C), барботування CO₂ час і час барботування повітря (D), час барботування CO₂ і швидкість потоку повітря (E), а також час барботування повітря та швидкість потоку повітря (F).

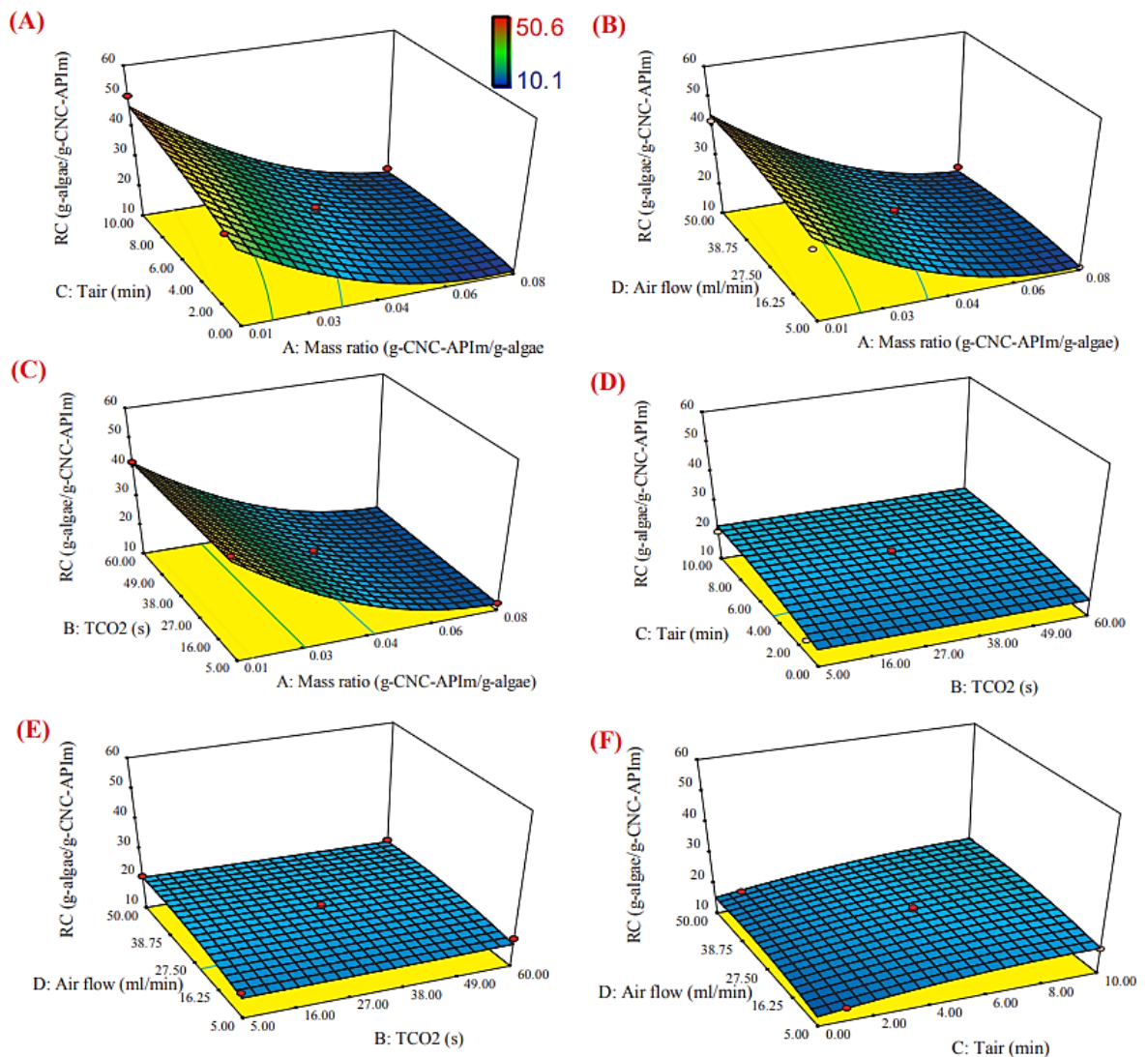


Рис. 3.17. Аналіз DOE-RSM регенераційної здатності (RC) як функції масового відношення та часу барботування CO_2 (A), масового співвідношення та часу барботування повітрям (B), масового співвідношення та швидкості потоку повітря (C), барботування CO_2 час і час барботування повітря (D), час барботування CO_2 і швидкість потоку повітря (E), а також час барботування повітря та швидкість потоку повітря (F).

Ґрунтуючись на результатах оптимізації підходу методології поверхні відповіді, керованої дизайном експериментів, оптимальні умови для максимальних відповідей HE (86,5%) і RC (38,5 g-*lgae*/g-CNC) були визначені для *C. vulgaris* за таких умов: 0,02 г-CNC-APIm/г водоростей

масового співвідношення, 5 с часу барботування CO₂, 8 хв часу барботування повітря та швидкості потоку повітря 50 мл/хв.

Крім того, не спостерігалось статистично значущих відмінностей у вмісті вуглеводів, білків, ліпідів і жирних кислот у біомасі, зібраній центрифугуванням і CNC-APIm відповідно, що свідчить про те, що CNC-APIm не впливатиме на подальше застосування мікрводоростей.

Згідно з приблизними техніко-економічними оцінками, CNC-APIm буде альтернативою звичайним коагулянтам для комерційного застосування мікрводоростей (табл.3.8).

Таблиця 3.8

Порівняння ефективності збирання мікрводоростей різними коагулянтами

Coagulant	Microalgae	Dose of coagulant (g/L)	Maximum HE (%)	Maximum RC (g-algae/g-coagulant)	Harvesting time (T, min)	Reference
<i>B.licheniformis</i> CGMCC 2876	<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	2.5 ml/L	> 98	0.2 g-algae/mL-coagulant	< 10	[45]
PEI-coated <i>Escherichia coli</i> K12 ^b	<i>Chlorella zofingiensis</i>	0.0252	65	36	20	[41]
<i>Paenibacillus</i> sp. AM49 and CaCl ₂	<i>C. vulgaris</i>	–	93	–	11	[40]
Native MNPs ^c	<i>C. vulgaris</i>	0.9	95	0.32	1–2	[42]
CPAM-coated MNPs ^d	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	0.12	95	21.4	< 10	[46]
Silica-coated MNPs	<i>C. vulgaris</i>	3.003	95	4.6	5–10	[43]
PDDA-coated MNPs ^e	<i>Chlorella</i> sp.	0.2	99	1.485	< 10	[47]
ImBnOO-g-CNCs ^a	<i>C. vulgaris</i>	0.2	90	1.575	< 60	[16]
Grafted chitosan	Wastewater-born microalgae	0.04–0.067	70	0.7	90	[48]
Cationic starch	<i>Scenedesmus obliquus</i> (CCAP 276j3A)	0.0045	80	26.7	65	[49]
Cationic guar gum	<i>Chlorella</i> sp. CB4	0.04	94.5	18.4	30	[44]
CNC-APIm	<i>Centrate-grown C. vulgaris</i>	0.044–0.088	99.9	43.4	< 10	This study

^a CNCs were modified by reaction with 4-(1-bromo-methyl)benzoic acid activated by p-toluenesulfonyl chloride, producing ImBnOO-g-CNCs.

^b PEI: poly(ethyleneimine).

^c MNPs: magnetic nanoparticles.

^d CPAM: cationic polyacrylamide.

^e PDDA: poly(diallyldimethylammonium chloride).

ВИСНОВКИ

Культивування іммобілізованих клітин отримує все більше визнання в біотехнологічних виробництвах. У першій роботі, яку я розглянула, було синтезовано новий носій для іммобілізації мікродоростей, капсула NaCS-PDMDAAC, і фізико-хімічно охарактеризований за допомогою SEM, FT-IR, SEM-EDX і ЯМР-аналізу. Процес синтезу капсул був простим і масштабованим, що давало можливість застосовувати технологічні прийоми для оптимізації і контролю фізико-хімічних властивостей капсул.

Друга розглянута робота показала, що з використанням лігноцелюлозних матеріалів в якості носіїв для вирощування біоплівки водоростей була досягнута продуктивність в діапазоні від 7,32 до 10,92 г – м² в день – 1, при цьому PW є максимальним значенням. Загальний вміст ліпідів в біоплівці з різними матеріалами в якості носіїв коливався в меншій мірі від 20,10% - до 23,20%, в той час як вміст сирих білків і вуглеводів значно варіював в залежності від матеріалу.

Результати цього дослідження показали, що лігноцелюлозні матеріали можуть бути ефективними носіями для недорогого культивування біоплівки водоростей та підвищення продуктивності біомаси.

У подальшій роботі було виявлено, що порошок оболонки, прожарений при 700°C у вакуумній трубчастій печі та гідротермально модифікований K₂CO₃, має оптимальну структуру пор із середнім розміром пор 16,557 нм. Загальна картина CSM чітко показує, що *Chlorella* sp. фіксується модифікованим хітозаном, порошком шкаралупи, поверхня якого є позитивною. Така структура дозволяє продовжити термін зберігання *Chlorella* sp. до 60 днів, а найкращий зразок з коефіцієнтом відновлення становить 26%, кількість клітин становить $3,41769 \times 10^6$ клітин/мл, відновлюється при 4°C. Це нова технологія іммобілізації мікродоростей, яка може бути використана в очищенні води та інших областях.

Далі була розглянута робота, в якій серія целюлозних плівок була отримана з розчину целюлози AmimCl методом лиття з розчину з використанням водонепроникного наждачного паперу в якості основи. Целюлозні плівки мають шорстку поверхню і макропористу структуру, а також хороші водопоглинаючі властивості. Крім того, целюлозні плівки володіють хорошими адгезійними властивостями до мікроводоростей. Ці целюлозні плівки з шорсткою поверхнею і високим коефіцієнтом водопоглинання можна розглядати в якості субстратних матеріалів для культивування прикріплених мікроводоростей.

У наступній роботі видалення ртуті іммобілізованої *Chlorella* sp. склало близько 99%, що демонструє її потенціал в якості методу біоремедіації, позиціонуючи себе як біотехнологічну альтернативу для видалення ртуті з водних систем.

Використання мікроводоростей, іммобілізованих в чистячих подушечках, забезпечує більш високу швидкість видалення ртуті, ніж мікроводорості в вільних осередках, а також екологічну утилізацію забруднюючих речовин.

У даній роботі було виявлено, що PW та 30-CW є чудовими джерелами поживних речовин для росту *C. vulgaris*. Видалення азоту та фосфору в основному досягалося шляхом асиміляції біомаси в культурах PWs; однак, ймовірно, що інші процеси сприяли додатковому видаленню азоту в культурах з 30-градусною тривалістю життя через відносно високі значення рН та концентрації азоту.

Результати цього дослідження формують сукупність знань, які будуть мати вирішальне значення при розробці нового і техніко-економічно життєздатного коагулянта CNC-APIm для збору мікроводоростей, що прокладає шлях до стійкої біоенергетики на основі мікроводоростей зі стічних вод і виробництва біопалива.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jyothi Kaparapu J. Algal Biomass Utln.: Micro algal Immobilization Techniques. 2017. № 8(1). P. 64-70.
2. Jyothi Kaparapu and Mohan Narasimha Rao Geddada Applications of immobilized algae. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2016. № 7 (2). P. 122- 128.
3. Luz E. de-Bashan, Yoav Bashan Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 2010. № 101. P. 1611–1627.
4. Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, 2002. № 15. P. 377–390.
5. Moreno-Garrido I., Campana O., Lubián L.M., Blasco J. Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Mar. Pollut. Bull.* 2005. № 51. P. 823–929.
6. Liu Y.K., Seki M., Tanaka H., Furusaki S., Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *J. Ferment. Bioeng.* 1998. № 85. P. 416–421.
7. Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. Enhancement of lead (II) biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*Luffa cylindrica*) sponge: *Eng. Life Sci.* 2004. № 4. P. 171–178.
8. Oungbho K., Muller B.W. Chitosan sponges as sustain release drug carriers: *Int. J. Pharm.* 1997. № 156. P. 229–237.
9. Urrutia I., Serra J.L., Llama M.J. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme Microb. Technol.* 1995. № 17. P. 200– 205.
10. Yamaguchi T., Ishida M., Suzuki T. An immobilized cell system in polyurethane foam for the lipophilic microalga *Prototheca zopfii*. *Process Biochem.* 1999. № 34. P. 167–171.

11. Huang G.L., Huang G.L., Wang Y., Wang Y. Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH values. *Water Qual: Res. J. Can.* 2003. № 38. P. 541–551.
12. Travieso L., Canizares R.O., Borja R., Benitez F., Dominguez A.R., Dupeyron R., Valiente V. Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1999. № 62. P. 144–151.
13. Kannaiyan S., Aruna S.J., Kumari S.M.P., Hall D.O. Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops: *J. Appl.* 1997. Vol. 9. P. 167–174.
14. Canizares R.O., Dominguez A.R., Rivas L., Montes M.C., Travieso L., Benitez F. Free and immobilized cultures of *Spirulina maxima* for swine waste treatment. *Biotechnol. Lett.* 1993. № 15. P. 321–326.
15. Danilov R.A., Ekelund N.G.A. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status. *J. Microbiol. Methods.* 2001. № 45. P. 167–170.
16. Brandini F.P., da Silva E.T., Pellizari F.M., Fonseca A.L.O., Fernandes L.F. Production and biomass accumulation of periphytic diatoms growing on glass slides during a 1-year cycle in a subtropical estuarine environment (Bay of Paranagua, southern Brazil). *Mar. Biol.* 2001. № 138. P. 163–171.
17. Moreira S.M., Moreira-Santos M., Guilhermino L., Ribeiro R. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in alginate for in situ experiments: bead stability and suitability. *Enzyme Microb. Technol.* 2006. № 38. P. 135–141.
18. Fierro S., Sanchez-Saavedra M.D.P., Copalcua C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresour. Technol.* 2008. № 99. P. 1274–1279.
19. Seki H., Suzuki A. Adsorption of heavy metal ions to floc-type biosorbents: *J. Colloid Interface Sci.* 2002. № 249. P. 295–300.

20. Lebeau T., Robert J.M. Biotechnology of immobilized micro-algae: a culture technique for the future? In: Rao, S. (Ed.), *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*: Science Publishers, Enfield, NH, 2006. P. 801–837.
21. Ignacio Moreno-Garrido Review: Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 2008. № 99. P. 3949–3964.
22. Cohen Y. Biofiltration, the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresour. Technol.* 2001. № 77. P. 257–274.
23. Valderrama L.T., Del Campo C.M., Rodriguez C.M., de-Bashan L.E., Bashan Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*: *Water Res.* 2002. № 36. P. 4185–4192.
24. Bashan Y., Hernandez J.P., Leyva L.A., Bacilio M. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growthpromoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 2002. № 35. P. 359– 368.
25. Singh Y. Photosynthetic activity, lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of *Botryococcus* in relation to growth phase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2003. № 13. P. 687–691.
26. Aguilar-May B., Sanchez-Saavedra M.P., Lizardi J., Voltolina D. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH: *J. Appl.* 2007. Vol. 19. P. 181–183.
27. Jeon C., Park J.Y., Yoo Y.J. Novel immobilization of alginic acid for heavy metal removal: *Biochem. Eng. J.* 2002. № 11. P. 159–166.
28. Rangasayatorn N., Pokethitiyook P., Upatahm E.S., Lanza G.R. Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel: *Int. Environ.* 2004. № 30. P. 57–63.
29. Stark P.C., Rayson G.D. Comparisons of metal-ion binding to immobilized biogenic materials in a flowing system. *Adv. Environ. Res.* 2000. № 4. P. 113–122.

30. Hertzberg S., Jensen A. Studies of alginate-immobilized marine microalgae. *Bot. Mar.* 1989. № 32. P. 267–273.
31. Pane L., Feletti M., Bertino C., Carli A. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads: *Int. Aquacult.* 1998. № 6. P. 411–420.
32. Jen A.C., Wake M.C., Mikos A.G. Review: hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 1996. № 50. P. 357–364.
33. Joo D.-S., Cho M.G., Lee J.-S., Park J.-H., Kwak J.-K., Han Y.-H., Bucholz R. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. *J. Microencapsul.* 2001. № 18. P. 567–576.
34. Zeng X. and Danquah M. and Potumarthi R. and Cao J. and Chen X. and Lu Y. Characterization of sodium cellulose sulphate/poly-dimethyl-diallyl-ammonium chloride biological capsules for immobilized cultivation of microalgae. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2013. № 88 (4): P. 599-605.
35. Qi Zhang, Cuixia Liu, Yubiao Li, Zhigang Yu, Zhihua Chen, Ting Ye, Xun Wang, Zhiquan Hu, Shiming Liu, Bo Xiao, Shiping Jin. Cultivation of algal biofilm using different lignocellulosic materials as carriers *Biotechnol Biofuels.* 2017. 10:115 DOI: 10.1186/s13068-017-0799-8.
36. WEI D.Y., CA L., JIANG D.J., GUO J., WANG Y.N., JI L.L., SONG W.D. Study on immobilized *Chlorella* sp. by nano mussel-shell powder and chitosan: *APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH.* 2018. 16(5): P. 5653-5664.
37. Caixiang Chen, Shumei Wen, Zhihui Wang, Jinming Zhang, Chenghu Yan. Enhancing Biofilm Formation and Microalgae Growth by Preparing Cellulose Substrate With Rough Surface: *Research Square.* 2021. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-447698/v1>.
38. Jun Hu a, Hao Liu b, Pratyosh Shukla c, Weitie Lin a, Jianfei Luo. Nitrogen and phosphorus removals by the agar-immobilized *Chlorella*

saccharophila with long-term preservation at room temperature. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126406> 0045-6535/.

39. Sandra Benítez Alvis, Alexander Pérez Cordero and Deimer Vitola Romero. Removal and Recovery of Mercury in Vitro Using Immobilized Live Biomass of *Chlorella* sp. *Indian Journal of Science and Technology*. December 2018. Vol. 11(45). DOI: 10.17485/ijst/2018/v11i45/137575.
40. Shuang Qiu, Lingfeng Wang, Pascale Champagne, Guihua Cao, Zhipeng Chen, Shuying Wang, Shijian Ge. Effects of crystalline nanocellulose on wastewater-cultivated microalgal separation and biomass composition *Applied Energy*. 1 April 2019. Vol. 239. P. 207-217.

АНОТАЦІЯ

У роботі були розглянуті приклади іммобілізації мікроводоростей, а саме клітин *Chlorella vulgaris* та *Chlorella sorokiniana*, на целюлозних носіях. В деяких роботах ці іммобілізовані клітини були використані для очищення стічних вод.

Завдяки природній тенденції мікроводоростей, прикріплюватися до поверхонь і рости на них, їх можна використовувати для іммобілізації клітин на носіях різних типів. Також ці процеси легко оборотні. Адсорбуючи носії для пасивної іммобілізації можуть бути природними або синтетичними. Власне для знерухомлення клітин *Chlorella sorokiniana* використовували біомасу мочалкової губки, щоб видалити нікелю (II) з водних розчинів.

Адгезійні властивості мікроводоростей на целюлозних плівках були досліджені з прикріпленими *Chlorella sp.* Наприкінці експериментів з іммобілізованим культивуванням, шляхом вимірювання сухої маси клітин, була визначена кількість прикріплених мікроводоростей на поверхні целюлозної плівки.

Результати однієї з робіт показали, що лігноцелюлозні матеріали можуть бути ефективними носіями для недорогого культивування водоростевої біоплівки та підвищення продуктивності біомаси.

Також було доведено, що іммобілізовані в агарі мікроводорості довго зберігаються при кімнатній температурі та здатні відновити свою активність лише після короткочасного культивування, на відміну від мікроводоростей, іммобілізованих в іншій матриці або збережених при низькій температурі.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, целюлозні носії, іммобілізовані клітини, біоплівка, стічні води.

SUMMARY

The paper considered examples of immobilization of microalgae, namely *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana cells*, on cellulose carriers. In some studies, these immobilized cells have been used for wastewater treatment.

Due to the natural tendency of microalgae to attach to and grow on surfaces, they can be used to immobilize cells on various types of media. These processes are also easily reversible. Adsorbing carriers for passive immobilization can be natural or synthetic. In fact, to immobilize *Chlorella sorokiniana cells*, a sponge biomass was used to remove nickel (II) from aqueous solutions.

The adhesive properties of microalgae on cellulose films were studied with attached *Chlorella sp.* At the end of the immobilized culture experiments, the number of attached microalgae on the surface of the cellulose film was determined by measuring the dry mass of cells.

The results of one study showed that lignocellulose materials can be effective carriers for low-cost cultivation of algae biofilms and increase biomass productivity.

It was also proved that microalgae immobilized in Agar remain at room temperature for a long time and are able to restore their activity only after short-term cultivation, in contrast to microalgae immobilized in another Matrix or stored at low temperature.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, cellulose carriers, immobilized cells, biofilm, wastewater.