

ПОДБОР ПЕРСПЕКТИВНОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД АКВАКУЛЬТУРЫ© 2022 г. Н. Р. Акмуханова^а, Б. К. Заядан^а, А. К. Садвакасова^а, М. М. Тореханова^а,
Н. П. Тимофеев^б, М. О. Бауенова^а, Д. А. Тодоренко^б, Д. Н. Маторин^{б, *}^аКазахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, 050040 Казахстан^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

В статье исследованы 3 штамма зеленых микроводорослей (*Chlorella vulgaris* SP BB-2, *Parachlorella kessleri* Vh-2 и *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124) для биологической очистки вод (биоремедиации) аквакультуры от загрязняющих веществ. Показана повышенная скорость роста и накопление биомассы у штамма *C. vulgaris* SP BB-2. Обнаружено, что этот штамм эффективно использует азот и фосфор из сточных вод для своего роста и развития, и показывает высокую эффективность по показателю химического потребления кислорода (ХПК). Кроме того, из изученных микроводорослей биомасса штамма *C. vulgaris* SP BB-2 обладает наиболее высоким содержанием белка, что позволяет рекомендовать ее в качестве добавки в корма для аквакультуры. Регистрация индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла выявила изменения в энергозапасующих фотосинтетических процессах клеток штамма *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на сточной воде аквакультуры. Это проявлялось в высоких показателях максимального квантового выхода фотосистемы II (ФСII) (F_V/F_M), эффективности транспорта электронов (Φ_{E0}), индекса производительности ФСII (PI_{ABS}) и увеличении коэффициента максимальной утилизации световой энергии (α). Штамм *C. vulgaris* SP BB-2 может быть рекомендован для очистки загрязненных вод, а высокочувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла (PI_{ABS} , Φ_{E0}) могут быть использованы в качестве индикаторов состояния микроводорослей.

Ключевые слова: микроводоросли, биоремедиация, флуоресценция хлорофилла *a*, JIP-тест**DOI:** 10.31857/S0026365622100123

Перспективным методом очистки сточных вод аквакультуры является культивирование микроводорослей (Mohsenpour et al., 2021). Биоремедиация с использованием микроводорослей может быть экономически эффективной и экологически чистой. При этом культивирование микроводорослей в сточных водах аквакультуры может обеспечивать, помимо очистки, получение клеточной биомассы, богатой липидами, белками, углеводами и другими продуктами (Guo et al., 2013). Микроводоросли используют питательные вещества, присутствующие в сточных водах аквакультуры, преобразуя их в биомассу и, тем самым, улучшая экономические показатели производства биомассы микроводорослей в целом (Nayak et al., 2016). Также микроводоросли в процессе фотосинтеза обогащают водную среду кислородом, ускоряя окислительные процессы и минера-

лизацию органических примесей в воде. Кроме этого, многие микроводоросли способны потреблять не только минеральные вещества, но и простые органические соединения (Carorgno et al., 2015). Использование продуктивных штаммов микроводорослей в сточных водах аквакультуры предоставляет возможность получения дешевой биомассы микроводорослей, обладающей высокой питательной ценностью для рыб, личинок, ракообразных и моллюсков (Reitan et al., 1997; Gao et al., 2016). Добавки на основе микроводорослей могут обогащать корма белками, незаменимыми аминокислотами, жирными кислотами и пигментами, необходимыми для получения высококачественной продукции аквакультуры.

Хлорофилл, находящийся в тилакоидных мембранах хлоропластов водорослей, является своего рода природным индикатором фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов света (Schreiber, 2004; Kalaji et al., 2014), поэтому флуоресценция хлорофилла активно используется для ис-

Сокращения: РЦ – реакционный центр; ФСII – фотосистема II.

следования состояния фотосинтезирующих организмов (Prašil, Borowitzka, 2011; Маторин, Рубин, 2012). Флуоресцентные методы могут дать подробную информацию о фотосинтетическом электронном транспорте микроводорослей в режиме реального времени (Маторин, Рубин, 2012).

В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования 3 штаммов зеленых микроводорослей, и показана перспективность штамма *Chlorella vulgaris* SP BB-2 для использования в процессах очистки сточных вод аквакультуры и получения биомассы. Микробиологическими и флуориметрическими методами охарактеризованы параметры роста и фотосинтетических процессов этого штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* SP BB-2, выделенный из загрязненного озера Биликоль, расположенного на юге Республики Казахстан (42°59'18" с.ш., 70°41'14" в.д.), и штаммы микроводорослей *Parachlorella kessleri* Bh-2 и *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124 из коллекции Казахского Университета имени аль-Фараби. Выбранные штаммы из коллекции были охарактеризованы как нетребовательные к использованию специфических питательных веществ при культивировании (Заядан и соавт., 2017).

Культивирование микроводорослей в лабораторных условиях и определение скорости роста и биомассы. Штаммы микроводорослей культивировали в лабораторных условиях в трех средах:

а) лабораторные среды (контроль): среда Тамия для *C. vulgaris* SP BB-2 и *P. kessleri* Bh-2, среда L2-min для штамма *C. reinhardtii* CC-124 (Заядан и соавт., 2017);

б) пробы сточной воды, взятые из водоема рыбного хозяйства тепловодных рыб (тиляпия), расположенного в селе Саймасай Алматинской области (42°44'72" с.ш., 77°33'06" в.д.);

в) вода из скважины (42°44'73" с.ш., 77°33'06" в.д.), из которой она подается в водоем рыбного хозяйства.

В сточных водах водоема обнаружены (мг/л): аммиак – 25.12, нитриты – 3.8, нитраты – 16.07 и фосфаты – 5.13. Биохимическое потребление кислорода (БПК₅) составило 8.5 мг/О₂/л и химическое потребление кислорода (ХПК) – 96 мг/О₂/л. Также показано наличие других микроэлементов, таких как железо, магний, цинк, молибден, которые необходимы для различной физиологической активности микроводорослей. Таким образом, сточная вода аквакультуры характеризовалась высоким содержанием органоминеральных веществ. Химический состав воды из скважины имел следующий состав (мг/л): железо – 0.2, мар-

ганец – 0.1, сульфаты – 100, хлорид – 5, аммоний – 0.6, нитраты – 1.2, фториды – 1.5. Общая жесткость воды составляла 10 моль/л.

Микроводоросли предварительно 8–10 сут выращивали на соответствующих питательных средах в конических колбах объемом 250–1000 мл при круглосуточном искусственном освещении лампами Flora Led 35 D120 (80 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) и при температуре 25°C. Контроль за темпом роста микроводорослей в культуре осуществляли на основании учета изменений их численности с помощью камеры Горяева (Заядан и соавт., 2017).

В опытах по очистке сточных вод аквакультуры использовали лабораторную установку прямоугольного типа объемом 10 л (35 × 12 × 25 см). Культивирование микроводорослей проводили в течение 14 сут при барботировании воздухом с 1.5% CO₂ (скорость барботажа 0.3 л/мин), при температуре 25°C и освещенности 80 мкмоль м⁻² с⁻¹. Начальное количество клеток микроводорослей составляло 0.5 × 10⁶ кл./мл во всех экспериментальных вариантах.

Продуктивность исследуемых штаммов микроводорослей определяли по накоплению веса сухой биомассы в соответствии со стандартным методом для общего количества взвешенных твердых веществ (Lee et al., 2013).

Анализ изменения концентрации ионов в среде при культивировании микроводорослей. Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли путем измерения окисляемости бихроматом калия, регистрируя оптическую плотность образцов при λ = 600 нм на спектрофотометре PD-303UV (Япония) (Clesceri et al., 1998).

Содержание аммонийного азота (NH₄⁺) определяли с помощью реактива Несслера, измеряя оптическую плотность образцов при λ = 414 нм в соответствии с методами, описанными в работе (Clesceri et al., 1998). Определение концентрации фосфора в виде ортофосфата (PO₄³⁻) проводили при 610 нм с использованием молибдата аммония и малахитового зеленого на спектрофотометре PD-303UV (Япония) (Cogan et al., 1999).

Анализ биохимического состава полученной биомассы. Определение общего содержания белка проводили по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Углеводы определяли согласно (Dubois et al., 1951), а липиды – согласно (Marsh, Weinstein, 1966). Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре PD-303UV (Япония). Процентное содержание белков, углеводов и липидов определяли относительно веса сухой биомассы микроводорослей.

Биофизические методы исследования. Регистрацию световых кривых параметров флуоресценции хлорофилла проводили на флуориметре

Water-PAM (“Walz, Effelrich”, Германия). Световые зависимости измеряли при последовательном увеличении интенсивности света от 0 до 1400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Регистрировали параметры флуоресценции F_0 и F_M в темноте и на свету. Рассчитывали квантовый выход фотосистемы II (ФСII) и скорость нециклического транспорта электронов. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой (Schreiber, 2004).

Параметры индукционных кривых флуоресценции хлорофилла регистрировали на портативном флуориметре Aquapen-C 100 (“Photon System Instruments”, Чехия). Перед измерением образцы выдерживали в темноте в течение 10 мин. Регистрировали индукцию флуоресценции с высоким временным разрешением (начиная с 0.05 мс) при освещении светом ($\lambda = 455 \text{ нм}$) интенсивностью 3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров индукционной кривой был использован JIP-тест (Strasser et al., 2004; Lazár, Schansker, 2009; Kalaji et al., 2014). По соответствующим формулам (Strasser et al., 2004; Kalaji et al., 2014) рассчитывали следующие параметры: F_V/F_M – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФСII; V_j – относительная амплитуда фазы O–J (после 2 мс освещения), отражает количество закрытых реакционных центров (РЦ) по отношению к общему числу РЦ ФСII; ϕ_{E_0} – квантовый выход электронного транспорта (при $t = 0$); ABS/RC – поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром (РЦ), PI_{ABS} – индекс производительности, показатель функциональной активности ФСII, отнесенный к поглощенной энергии.

Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены данные средних значений и стандартные отклонения. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с уровнем достоверности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор штамма микроводорослей с высокими значениями роста и фотосинтетической активностью. Культивирование микроводорослей на сточных водах аквакультуры является весьма перспективным подходом для биоремедиации, однако не все виды микроводорослей способны расти на среде сточных вод. На первом этапе был проведен скрининг и изучены биофизические параметры микроводорослей с целью выбора штамма с вы-

сокими значениями скорости роста на сточной воде.

На рис. 1а представлены кривые роста клеток исследуемых штаммов микроводорослей на сточной воде рыбного хозяйства. Исходное количество клеток в начале эксперимента составляло 0.5×10^6 кл./мл во всех опытных вариантах. Исследования показали, что микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде быстрее росли по сравнению с остальными культурами микроводорослей. Количество клеток этого штамма на 6 сут культивирования на сточной воде составляло 6.1×10^6 кл./мл, тогда как для штаммов *C. reinhardtii* CC-124 и *P. kessleri* Bh-2 количество клеток было 3.8×10^6 и 4.0×10^6 кл./мл соответственно. На среде Тамия количество клеток *C. vulgaris* SP BB-2 на 6 сут составило 3.8×10^6 кл./мл, а на воде из скважины 2.7×10^6 кл./мл (рис. 1б). Таким образом, по результатам изучения роста микроводорослей можно утверждать, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 наиболее активно развивается в сточной воде аквакультуры.

Для оценки изменений фотосинтетической активности в клетках водорослей измерены параметры индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла. Параметр флуоресценции F_V/F_M позволяет определить максимальную эффективность процессов ФСII, связанную с разложением воды и выделением кислорода (Schreiber, 2004). Проведенные нами исследования показали, что максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций F_V/F_M (ϕ_{P_0}) у всех штаммов микроводорослей, выросших на лабораторных средах, находится на достаточно высоком уровне (0.58–0.62) (табл. 1). Отмечается небольшое увеличение этого параметра у штамма *C. vulgaris* SP BB-2 по сравнению с другими культурами. На сточных водах этот параметр был достоверно увеличен у *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на 3 сут культивирования по сравнению со средой Тамия. При этом спектры поглощения суспензий разных штаммов водорослей практически не различались (данные не представлены) при регистрации на 3 и 7 сут культивирования, что свидетельствует об отсутствии влияния сточной воды на пигментный аппарат. При очень длительном культивировании (10–20 сут) отмечалось уменьшение значения F_V/F_M , что, по-видимому, обусловлено исчерпанием биогенных элементов в сточной воде за счет потребления их водорослями. При выращивании на воде из скважины, параметр F_V/F_M был существенно снижен у всех штаммов микроводорослей (табл. 1).

На рис. 2 представлены кинетики индукции флуоресценции микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде и среде Тамия, а также на воде из скважины. В кинетике индукции флуоресценции в ответ на свет высокой интенсивности

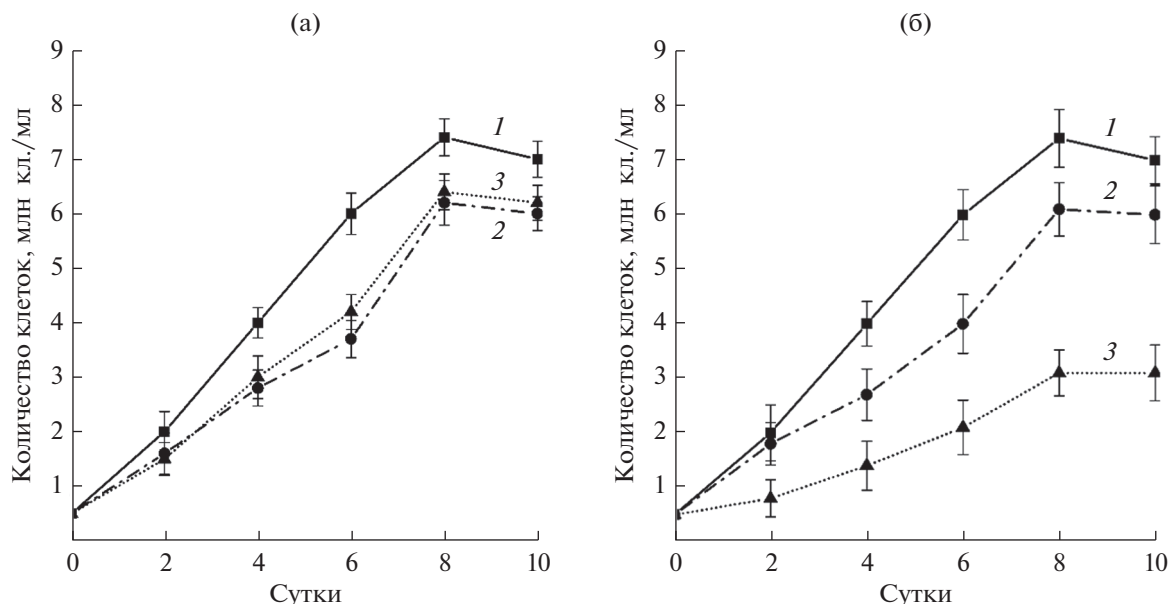


Рис. 1. Динамика роста штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры (а) и штамма *C. vulgaris* SP BB-2 при культивировании на сточной воде (1), среде Тамия (2) и воде из скважины (3) (б).

наблюдалось несколько стадий, известных как O-J-I-P переходы (Strasser et al., 2004). Начальный уровень O соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при “открытых” РЦ ФСII (F_0), когда все первичные акцепторы в ФСII (Q_A) окислены. Фаза O-J обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления акцепторов Q_B и пула хинонов (Lazár, Schansker, 2009; Kalaji et al., 2014). Согласно полученным нами результатам, у штамма микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2, выращенного на сточной воде аквакультуры, увеличивалась фаза фотохимического тушения (J-I-P), связанная с утилизацией световой энергии при фотосинтезе. При выращивании этих водорослей на воде из скважины эта фаза сильно уменьшена, но увеличена фаза O-J, что указывает на уменьшение оттока электронов от акцептора Q_A . Параметры кинетической кривой O-J-I-P, рассчитанные с использованием JIP-теста, представлены в табл. 1. Определено, что все параметры были близки у штаммов микроводорослей, растущих на сточных водах и на лабораторных средах. Отмечалось увеличение параметров квантового выхода электронного транспорта в ФСII (ϕ_{E_0}) и индекса производительности (PI_{ABS}) у *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на сточной воде аквакультуры. Параметр PI_{ABS} является показателем функциональной активности ФСII, отнесенным к поглощенной

энергии (ABS), и характеризуется высокой чувствительностью к разным экологическим факторам (Kalaji et al., 2014). Увеличение этих параметров у штамма *C. vulgaris* SP BB-2 в сточных водах сопровождалось уменьшением значения параметров V_j (относительная амплитуда фазы O-J) что, вероятно, связано с увеличением доли активных реакционных центров ФСII относительно поглощаемого света (Lazár, Schansker, 2009). При выращивании всех штаммов микроводорослей на воде из скважины параметры ϕ_{E_0} и индекс производительности PI_{ABS} были снижены, особенно PI_{ABS} , а параметры ABS/RC и V_j , соответственно, увеличены. Это подтверждает ухудшение реакций фотосинтеза водорослей, растущих на воде из скважины.

Для исследования реакции микроводорослей на световую нагрузку регистрировали световые кривые параметров флуоресценции. На рис. 2 представлены кинетики относительной скорости нециклического электронного транспорта ($rETR$) штамма микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2, выращенных на сточной воде, среде Тамия и воде из скважины. Как видно из рисунка, при выращивании этого штамма на сточной воде аквакультуры скорость нециклического электронного транспорта увеличена, а при выращивании на воде из скважины уменьшена.

По световым кривым $rETR$ рассчитывались относительная максимальная скорость электронного транспорта (ETR_{max}) и коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α) (табл. 1). У штамма

Таблица 1. Параметры индукционных и световых кривых флуоресценции штаммов микроводорослей при выращивании на сточной воде аквакультуры, лабораторных средах и на воде из скважины на 3 сут

Параметры флуоресценции	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
	Сточная вода		
F_V/F_M	0.64 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.59 ± 0.02
V_J	0.55 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.6 ± 0.01
Φ_{E_0}	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01
ABS/RC	4.51 ± 0.09	4.76 ± 0.12	5.19 ± 0.11
PI_{ABS}	0.29 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.03
ETR_{max} , отн. ед.	142 ± 2.1	138 ± 1.6	134 ± 2.1
α	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.2 ± 0.01
	Среда Тамия	Среда Тамия	Среда L2-min
F_V/F_M	0.62 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.01
V_J	0.56 ± 0.02	0.62 ± 0.01	0.65 ± 0.03
Φ_{E_0}	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.2 ± 0.03
ABS/RC	5.1 ± 0.11	5.14 ± 0.09	5.95 ± 0.2
PI_{ABS}	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.04
ETR_{max} , отн. ед.	124 ± 1.9	120 ± 1.6	119 ± 1.6
α	0.22 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.17 ± 0.02
	Вода из скважины		
F_V/F_M	0.49 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02
V_J	0.71 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.68 ± 0.01
Φ_{E_0}	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
ABS/RC	7.21 ± 0.51	8.28 ± 0.32	7.81 ± 0.44
PI_{ABS}	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ETR_{max} , отн. ед.	94 ± 1.7	84 ± 1.6	83 ± 1.5
α	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02

C. vulgaris SP BB-2 при выращивании на сточной воде по сравнению со средой Тамия отмечалось увеличение этих показателей, что согласуется с изменениями в электрон-транспортной цепи, зарегистрированными по индукционным кривым флуоресценции. У всех штаммов микроводорослей при выращивании на воде из скважины все эти параметры были снижены.

Факт высокой скорости роста штамма *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде подтвердился при анализе прироста биомассы (табл. 2). При выращивании штаммов *C. vulgaris* SP BB-2, *P. kessleri* Bh-2 и *C. reinhardtii* CC-124 на воде из скважины наблюдали низкий прирост биомассы со значениями 1.51, 1.49 и 1.25 г/л соответственно. В то время как прирост биомассы на лабораторных средах составил 2.47 г/л для штамма *C. vulgaris* SP BB-2, 2.45 г/л для *P. kessleri* Bh-2 и 2.42 г/л для *C. reinhardtii* CC-124. При выращивании на сточной воде аквакультуры из исследованных штаммов мик-

роводорослей наиболее высокую продуктивность по биомассе показал штамм *C. vulgaris* SP BB-2. Полученные результаты показывают, что сточные воды аквакультуры могут быть эффективно использованы в качестве питательных сред для накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2.

Эффективность очистки сточных вод аквакультуры с помощью микроводорослей. Эффективность удаления загрязняющих веществ является важным критерием для выбора штамма микроводорослей в очистке сточных вод. В основном этот процесс связан с потреблением органического углерода, азота и фосфора из среды (Bohutskyi et al., 2015). Для оценки эффективности штаммов микроводорослей в очистке сточных вод аквакультуры были измерены такие показатели как ХПК (химическое потребление кислорода), концентрация аммонийного азота и фосфора. По результатам исследования все культуры микроводорос-

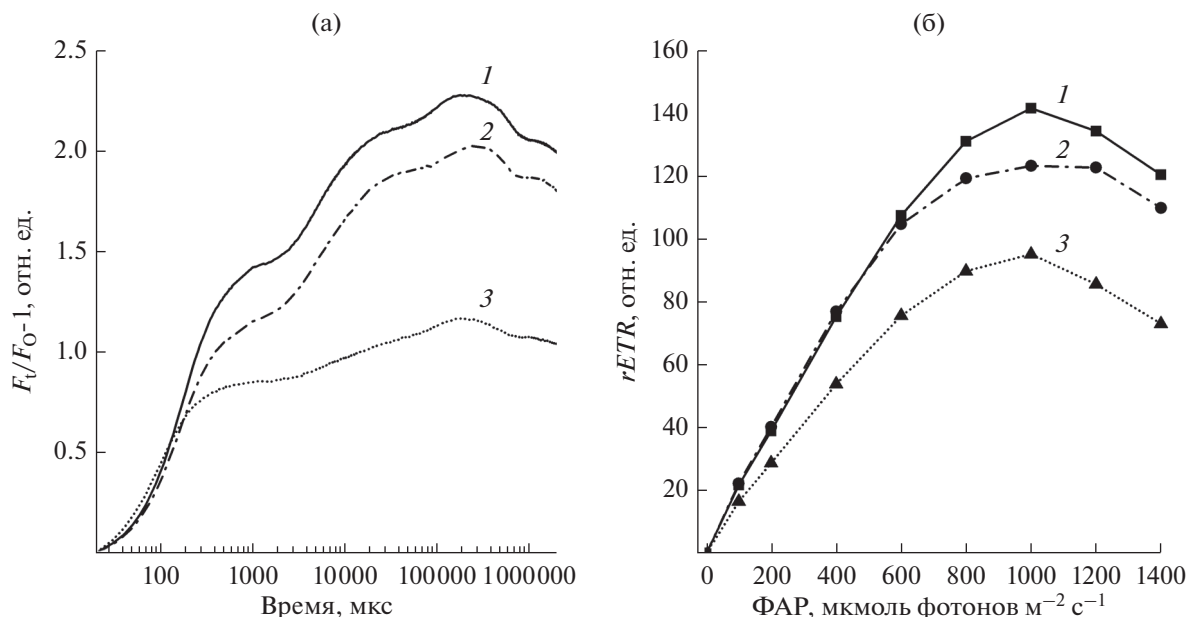


Рис. 2. Кинетики индукции флуоресценции (а) и относительной скорости нециклического электронного транспорта ($rETR$) (б) штамма водорослей *C. vulgaris* SP BB-2, выращенного на сточной воде аквакультуры (1), среде Тамия (2) и воде из скважины (3). ФАР – фотосинтетически активная радиация.

лей показали потенциал в очистке сточных вод аквакультуры от органических и биогенных веществ при выращивании.

ХПК является косвенным показателем наличия органического вещества в сточных водах. Из данных рис. 3 следует, что в присутствии всех штаммов микроводорослей происходило снижение ХПК. Но наибольшую эффективность показал штамм *C. vulgaris* SP BB-2.

Микроводоросли способны усваивать азот в форме аммиака, нитрата, нитрита и мочевины, но аммонийный азот является более предпочтительным (Mata et al., 2012; Delgadillo-Mirquez et al., 2016). Нами было изучено потребление штаммами микроводорослей аммонийного азота из сточной воды аквакультуры (рис. 4). У всех штаммов микроводорослей наблюдалась высокая активность потребления аммонийной формы азота. Его практически полное удаление из среды достигалось на 8 сут роста у всех исследуемых штаммов.

Фосфор также является еще одним из важных макроэлементов, который влияет на рост микроводорослей (Subramaniyam et al., 2016). Изменение концентраций фосфора в виде ортофосфата показано на рис. 4б. Потребление фосфора в виде ортофосфата в первые 6 сут культивирования у всех штаммов было сравнимым и составило >75% от исходного значения. К концу культивирования на 14 сут этот показатель для *C. vulgaris* SP BB-2 составил 100%. Полученные результаты показывают, что все штаммы микроводорослей имеют высокую скорость удаления фосфатов из сточных вод аквакультуры, однако *C. vulgaris* SP BB-2 показывает наибольшую эффективность.

Биохимический состав биомассы микроводорослей. Микроводоросли привлекают внимание как потенциальный сырьевой источник для пищевых и кормовых целей (Dickinson et al., 2013). Нами был проанализирован состав основных биоорганических компонентов полученной биомассы после культивирования в сточных водах. По ре-

Таблица 2. Накопление биомассы штаммов микроводорослей при выращивании на сточной воде аквакультуры, лабораторных средах и на воде из скважины на 14 сут

Среды для культивирования микроводорослей	Выход биомассы, г/л		
	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
Сточная вода	2.89 ± 0.01	2.38 ± 0.01	2.25 ± 0.01
Лабораторные среды	2.47 ± 0.01	2.45 ± 0.01	2.42 ± 0.01
Скважина	1.51 ± 0.03	1.49 ± 0.01	1.25 ± 0.01

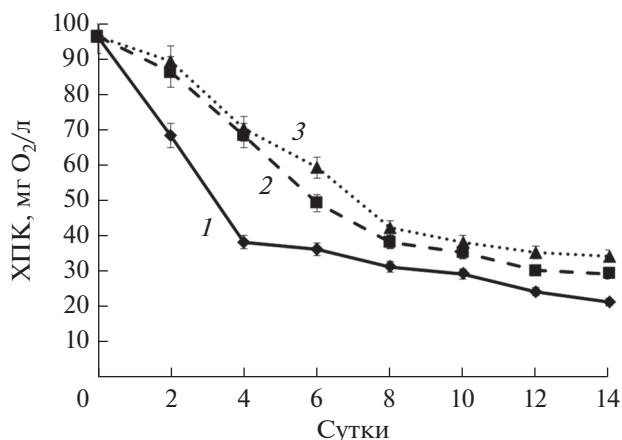


Рис. 3. Динамика показателя ХПК при культивировании штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры.

результатам исследования содержание белка в полученной биомассе *C. vulgaris* SP BB-2 составило $57.0 \pm 1.2\%$, для *C. reinhardtii* CC-124 – $35.55 \pm 1.1\%$ и для *P. kessleri* Bh-2 – $32.3 \pm 1.1\%$ (табл. 3). Содержание липидов для *C. vulgaris* SP BB-2 составило $16 \pm 1.2\%$ и для *C. reinhardtii* CC-124 и *P. kessleri* Bh-2 – $15 \pm 1.2\%$ при выращивании на сточных водах. Показатели общего содержания углеводов для всех штаммов были схожими (табл. 3). Таким образом, штамм *C. vulgaris* SP BB-2 при культивировании на сточных водах показал высокое содержание белка, что позволяет рекомендо-

вать использование этих микроводорослей в кормовых целях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активное использование микроводорослей в качестве биоремедиации сточных вод помогает очищать воды от избыточного количества минеральных и органических соединений. На сточных водах обычно культивируют микроводоросли, способные к миксотрофному росту, поскольку в этом случае возможна параллельная утилизация органических источников углерода (Cabanelas et al., 2013).

Выделяя кислород в процессе фотосинтеза, микроводоросли обеспечивают окисление органических загрязняющих веществ в среде. Кроме того, микроводоросли способны ассимилировать из сточных вод азот и фосфор, что выгодно отличается от обычных методов ремедиации. Одним из подходов для решения проблемы очистки сточных вод является выбор высокоактивных штаммов микроводорослей (Malla et al., 2015).

В нашей работе был отобран штамм микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 для использования в очистке рыбохозяйственных сточных вод с возможностью получения кормовой биомассы. По результатам исследований этот штамм продемонстрировал повышенную скорость роста на сточной воде аквакультуры. Этот штамм показал также эффективность снижения показателя ХПК, который используется в качестве косвенного показателя количества органических соединений, присутству-

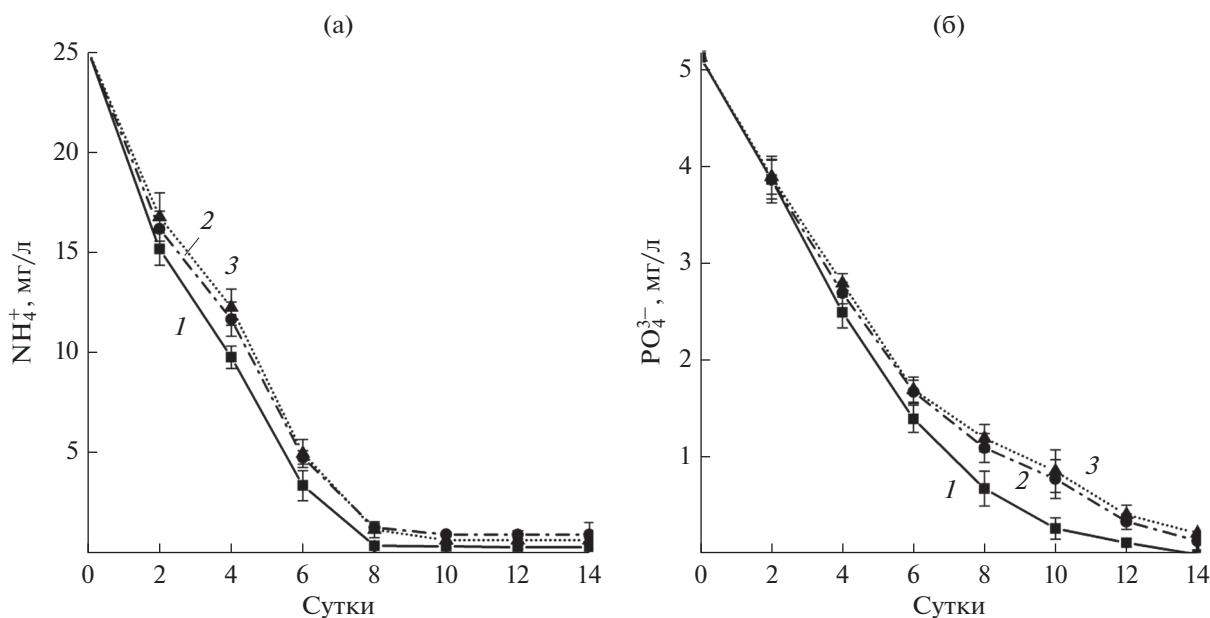


Рис. 4. Уменьшение концентрации NH_4^+ (а) и PO_4^{3-} (б) при культивировании штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры.

Таблица 3. Содержание белков, углеводов и липидов в биомассе разных штаммов микроводорослей после культивирования в сточных водах аквакультуры на 14 сут (% от веса сухого вещества)

Параметры, %	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
Белок	57.0 ± 1.2	32.3 ± 1.1	35.55 ± 1.1
Углеводы	11.4 ± 1.4	11.4 ± 1.2	11.56 ± 1.1
Липиды	16 ± 1.2	15 ± 1.2	15 ± 1.2

ющих в сточных водах, и его снижение указывает на то, что микроводоросли могут обладать потенциалом для использования органических соединений (Hu et al., 2012). Высокая скорость снижения ХПК является показателем жизнеспособности микроводорослей при изначально высоких уровнях ХПК (Wang et al., 2012). Этот штамм продемонстрировал также эффективность в отношении удаления фосфатов из сточной воды аквакультуры.

С использованием флуоресцентных методов было обнаружено, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 также обладает высокой фотосинтетической активностью, что важно для процесса очистки стоков, так как выделяемый при фотосинтезе кислород позволяет проводить аэрацию сточных вод (Guldhe et al., 2017). Проведенный нами комплексный анализ параметров световых и индукционных кривых флуоресценции хлорофилла показал, что у микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2 в сточных водах происходит увеличение таких параметров фотосинтеза как максимальный квантовый выход ФСII (F_V/F_M), максимальная относительная скорость транспорта электронов (ETR_{max}), коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α), эффективность транспорта электронов (Φ_{E0}) и индекса производительности (PI_{ABS}). Одновременно это сопровождается уменьшением доли Q_B -невосстанавливающих центров (V_j). Из этого набора параметров для мониторинга состояния фотосинтеза водорослей в водоемах можно предложить наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла – PI_{ABS} и Φ_{E0} .

Регистрация изменений фотосинтетической активности по этим параметрам флуоресценции позволит неинвазивно контролировать жизнеспособность и активность водорослей во время очищения вод. В частности, во многих работах отмечалось, что квантовый выход ФСII зависит от концентрации биогенных элементов в среде (Маторин, Рубин, 2012). При исчерпании биогенных элементов и наступлении азотного или фосфорного дефицита может происходить выключе-

ние работы ФСII, что отражается на параметрах флуоресценции (Prašil, Borowitzka, 2011). В настоящее время существуют малогабаритные приборы, которые позволяют вести непрерывный контроль содержания и состояния водорослей в течение длительного времени, и получаемая информация может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме (Маторин, Рубин, 2012).

Использование сточных вод в качестве питательных сред для культивирования микроводорослей является весьма перспективным, поскольку позволяет объединить технологии очистки водных ресурсов и накопления биомассы микроводорослей. В практике аквакультуры микроводоросли являются важными источниками питания рыб при прямом потреблении, либо в качестве косвенно приготовленного корма. Биомасса микроводорослей богата белками, липидами и углеводами, которые являются необходимыми питательными веществами для водных животных. В настоящее время много литературных данных об исследованиях процессов культивирования микроводорослей с использованием сточных вод (Sabanelas et al., 2013). Однако отмечают тот факт, что не каждый штамм микроводорослей способен адаптироваться к росту на сточных водах (Zhang et al., 2014). Результаты наших исследований показали, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 обладает лучшей адаптационной способностью расти на сточных водах водоемов рыбохозяйственного назначения из всех исследованных штаммов микроводорослей. Штамм *C. vulgaris* SP BB-2 может быть эффективно использован при биоремедиации сточных вод с целью их очистки от органоминеральных загрязнений. Кроме того, этот штамм показал высокое накопление биомассы с повышенным содержанием белка, и поэтому может быть рекомендован в качестве побочного продукта для получения дешевой кормовой добавки в аквакультуре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды” и при поддержке грантов РФФИ № 20-04-00465 и РНФ № 20-64-46018.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Каталог коллекций культур микроводорослей и цианобактерий. Алматы.: Абзал-Ай, 2017. 135 с.
- Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. М.: Ижевск, 2012. 256 с.
- Bohutskiy P., Liu K., Nasr L.K., Byers N., Rosenberg J.N., Oyler G.A., Betenbaugh M.J., Bouwer E.J. Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 6139–6154.
- Cabanelas I.T.D., Ruiz J., Arbib Z., Chinalia F.A., Garrido-Pérez C., Rogalla F., Nascimento I.A., Perales J.A. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 131. P. 429–436.
- Caporgno M.P., Taleb A., Olkiewicz M., Font J., Pruvost J., Legrand J., Bengoa C. Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane // *Algal Res.* 2015. V. 10. P. 232–239.
- Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF, 1998. 2671 с.
- Cogan E.B., Birrell G.B., Griffith O.H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates // *Anal. Biochem.* 1999. V. 271. P. 29–35.
- Dickinson K.E., Whitney C.G., McGinn P.J. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD // *Algal Res.* 2013. V. 2. P. 127–134.
- Delgadillo-Mirquez L., Lopes F., Taidi B., Pareau D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture // *Biotechnol. Rep.* 2016. V. 11. P. 18–26.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J.A. Colorimetric method for the determination of sugars // *Nature.* 1951. V. 168. P. 167.
- Gao F., Li C., Yang Z.H., Zeng G.M., Feng L.J., Liu J.Z., Liu M., Cai H.W. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal // *Ecol. Eng.* 2016. V. 92. P. 55–61.
- Guldhe A., Ansari F.A., Singh P., Bux F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation // *Ecol. Eng.* 2017. V. 99. P. 47–53.
- Guo Z., Liu Y., Guo H., Yan S., Mu J. Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production // *J. Environ. Sci.* 2013. V. 25. P. S85–S88.
- Hu B., Min M., Zhou W., Li Y., Mohr M., Cheng Y. Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 166. P. 1661–1673.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Kalaji V., Bosa K., Al-lakhverdiev S., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D.B., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Seródio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues // *Photosynth. Res.* 2014. V. 122. P. 121–158.
- Lazár D., Schansker G. Models of chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynthesis in Silico.* Springer Netherlands. 2009. V. 29. P. 85–123.
- Lee Y., Chen W., Shen H., Han D., Li Y., Jones H.D.T., Timlin J.A., Hu Q. Basic culturing and analytical measurement techniques // *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* / Eds. Richmond A., Hu Q. New York: Blackwell Publishing Ltd., 2013. P. 37–68.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagents // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
- Malla F.A., Khan S.A., Sharma G.K., Gupta N., Abraham G. Phycoremediation potential of *Chlorella minutissima* on primary and tertiary treated wastewater for nutrient removal and biodiesel production // *Ecol. Eng.* 2015. V. 75. P. 343–349.
- Marsh J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* 1966. V. 7. P. 574–576.
- Mata T.M., Melo A.C., Simões M., Caetano N.S. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 107. P. 151–158.
- Mohsenpour S.F., Hennige S., Willoughby N., Adeyoye A., Gutierrez T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: a review // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 752. 142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>
- Nayak M., Karemore A., Sen R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application // *Algal Res.* 2016. V. 16. P. 216–223.
- Prašil O., Borowitzka M.A. Chlorophyll *a* Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Dordrecht: Springer, 2011. 326 p.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Øie G., Olsen Y. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae // *Aquaculture.* 1997. V. 155. P. 207–221.
- Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview // *Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* / Ed. G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 279–319.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis / Ed. G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362.

Subramaniam V., Ramraj S., Ganeshkumar V. Bioresource technology cultivation of *Chlorella* on brewery wastewater and nano-particle biosynthesis by its biomass // Bioresour. Technol. 2016. V. 211. P. 698–703.

Wang H., Xiong H., Hui Z., Zeng X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids // Bioresour. Technol. 2012. V. 104. P. 215–220.

Zhang T.Y., Wu Y.H., Hu H.Y. Domestic wastewater treatment and biofuel production by using microalga *Scenedesmus* sp. ZTY1 // Water Sci. Technol. 2014. V. 69. P. 2492–2496.

Determination of the Promising Microalgal Strain for Bioremediation of the Aquaculture Wastewater

N. R. Akmukhanova¹, B. K. Zayadan¹, A. K. Sadvakasova¹, M. M. Torekhanova¹,
N. P. Timofeev², M. O. Bauenova¹, D. A. Todorenko², and D. N. Matorin^{2, *}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Received February 24, 2022; revised April 4, 2022; accepted April 6, 2022

Abstract—Applicability of three strains of green microalgae (*Chlorella vulgaris* SP BB-2, *Parachlorella kessleri*, and *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124) for bioremediation (contaminants removal) of aquaculture wastewater was investigated. *C. vulgaris* strain SP BB-2 exhibited the highest growth rate and biomass accumulation. This strain was found to utilize nitrogen and phosphorus from wastewater for growth and development and showed high efficiency according to chemical oxygen demand (COD). Moreover, among the studied strains, *C. vulgaris* SP BB-2 produced biomass with the highest protein content, which may be recommended as a feed additive for the aquaculture. Analysis of the induction and rapid light curves of chlorophyll fluorescence revealed alterations in the energy storage photosynthetic processes of *C. vulgaris* SP BB-2 cells when grown on the aquaculture wastewater. Thus, high values of the maximum quantum yield of primary photochemistry in photosystem II (PSII) (F_v/F_M), quantum yield of electron transport (Φ_{E_0}), PSII performance index on absorption basis (PI_{ABS}), and the light utilization coefficient (α) were observed. *C. vulgaris* strain SP BB-2 may be recommended for wastewater treatment, while its highly sensitive parameters of chlorophyll fluorescence induction (PI_{ABS} , Φ_{E_0}) may be used as indicators of the state of the microalgae.

Keywords: microalgae, bioremediation, chlorophyll *a* fluorescence, JIP test