

Новый гидрогелевый комплекс с иммобилизованными клетками микроводорослей для удаления аммоний и фосфат-ионов из сточных вод

© 2023. Д. В. Тарабукин, к. б. н., н. с., Е. Н. Патова, к. б. н., с. н. с.,
И. В. Новаковская, к. б. н., н. с.,
Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,
e-mail: dim1822@yandex.ru

Предложен комбинированный гидрогелевый комплекс для иммобилизации клеток микроводорослей с целью удаления соединений азота и фосфора из модельной сточной воды. Новая полимерная матрица на основе альгината натрия и карбоксиметилцеллюлозы, полиакриловой кислоты сохраняла целостность структуры в растворе с повышенным содержанием аммоний и фосфат-ионов, а также оказалась устойчивой к щелочным металлам. Условия формирования гидрогелевого комплекса позволили не только сохранить жизнеспособность включаемых клеток микроводорослей на примере *Tetrademus obliquus* и *Chlorella vulgaris*, но и обеспечили их размножение и развитие в полимерной матрице. Выявлено, что в процессе поглощения азота участвуют главным образом живые клетки микроводорослей. Наибольший вклад в удаление фосфора внесла полимерная составляющая гидрогелевого комплекса. Обнаружено влияние карбонат-ионов на процесс поглощения азота клетками микроводорослей.

Ключевые слова: $[Ca^{2+}-Fe^{3+}]$ гидрогелевые комплексы, микроводоросли, жизнеспособность клеток, удаление азота и фосфора, модельные сточные воды.

New hydrogel complex with immobilized microalgae cells for removal ammonium and phosphate ions from wastewater

© 2023. D. V. Tarabukin ORCID: 0000-0001-8572-4902
E. N. Patova ORCID: 0000-0002-9418-1601
I. V. Novakovskaya ORCID: 0000-0001-5056-9965
Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,
28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
e-mail: dim1822@yandex.ru

The aim of the work was to create a stable hydrogel complex containing microalgae cells to remove ammonium and phosphate ions from an experimental solution simulating domestic wastewater. A new polymer matrix based on sodium alginate and carboxymethyl cellulose, polyacrylic acid, retained the integrity of the structure in a solution with a high content of ammonium and phosphate ions, and also proved to be resistant to alkali metals. To increase the stability of hydrogel complexes, we proposed an increase in the number of chemical bonds in the polymer environment due to the crosslinking of alginate and carboxymethyl cellulose with Ca^{2+} and Fe^{3+} ions, as well as the introduction of an additional external stabilizer – cationic polyacrylamide. Due to the combination of several polymers, only slight swelling was observed and, as a result, the preservation of the hydrogel matrix in integrity for a long time. The two most commonly used algae in biotesting were selected for the experiment: *Tetrademus obliquus* and *Chlorella vulgaris* from the live microalgae strains collection of the Institute of Biology (Syktyvkar, Russia). The formation conditions of the hydrogel complex made it possible to preserve the viability, reproduction and development of the microalgae cells in the polymer matrix. The cell viability of both cultures was over 95%. It was found that living cells of microalgae are mainly involved in the process of nitrogen uptake. Microalgae immobilized cells, in the presence of carbonate ions, provided the best degree of removal of ammonium nitrogen, which reached 90%. The greatest contribution to the phosphorus removal (> 95%) was made by the polymer component of the hydrogel complex.

Keywords: $[Ca^{2+}-Fe^{3+}]$ hydrogel complexes, microalgae, cell viability, nitrogen and phosphorus removal, model wastewater.

В результате хозяйственной деятельности человека образуется избыточное количество различных отходов, в том числе сточных вод, которые в дальнейшем попадают в природные экосистемы и нарушают устоявшиеся экологические связи. Применение системы очистных сооружений направлено на снижение содержания в сточных водах соединений азота, фосфора, органического углерода и прочих поллютантов. Основным способом удаления целевых элементов является биологическая очистка на основе активного ила [1]. Физико-химические методы удаления азота и фосфора имеют большой потенциал [2], но, несмотря на их скорость и эффективность, они не могут заменить использование биологических агентов.

В последнее время микроводоросли активно используют для биологической очистки сточных вод. Манипулируя различными режимами культивирования, можно оказывать существенное влияние на эффективность удаления целевых поллютантов. К примеру, показана возможность снижения концентрации аммонийного азота в городских сточных водах при использовании микроводорослей *Desmodesmus communis*, *Tetradesmus obliquus* и *Chlorella protothecoides*, предварительно выращенных в условиях с пониженным содержанием питательных веществ [3]. Обнаружено влияние различных длин волн на удаление азота и фосфора в процессе культивирования пресноводной микроводоросли *Scenedesmus* sp. [4]. Оценён потенциал микроводорослей *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. и *Neochloris* sp., культивируемых в речной воде, загрязнённой фармацевтическими стоками [5]. Все исследуемые штаммы в разной степени улучшили качество речной воды несмотря на наличие неблагоприятных факторов в процессе культивирования. Микроводоросли как отдельно, так и в сочетании с дрожжами сохраняли способность расти на сточной воде в нестерильных условиях [6], при совместном культивировании было достигнуто удаление аммоний и фосфат-ионов до 90%. Применение альгобактериальных консорциумов на основе *Chlorella vulgaris* и *Rhodobacter sphaeroides* показало эффективность удаления общего азота и фосфора на уровне 95% в сточных водах пищевых и животноводческих предприятий [7].

Стоит отметить, что биомасса микроводорослей, используемая в процессах очистки сточных вод, может быть дополнительным источником различных биологически активных веществ: каротиноидов, протеинов, пигментов, полисахаридов, ценных полиненасыщенных

жирных кислот [8–10], а также перспективна в качестве сырья для производства биотоплива [11–13]. При этом возникает проблема извлечения отработанной биомассы, которая легко решается за счёт применения иммобилизованных форм микроводорослей при обработке бытовых и промышленных стоков.

Включение живых клеток или ферментов в гели для получения гетерогенных катализаторов и систем утилизации токсичных веществ применяют достаточно давно [14, 15]. В ряде работ использованы гели на основе альгината натрия, так как они относительно дешевы и не токсичны [16–18]. Но такие гели отличаются слабой устойчивостью к хелатирующим агентам, щелочным металлам и набухают в процессе использования [15, 19]. Продолжительное использование сшитых альгинатных гидрогелей с иммобилизованными клетками микроводорослей без дополнительной стабилизации возможно лишь при отсутствии щелочных металлов в сточной воде, например, на отходах пищевых производств [20]. Неизбежное набухание, приводящее к утере прочности, можно частично нивелировать за счёт высоких концентраций альгината натрия или хлорида кальция, однако при этом могут создаваться менее благоприятные условия для размножения микроводорослей за счёт повышенной концентрации хлорид-ионов и увеличения плотности гидрогелевой среды [21, 22].

Повышение устойчивости полимерных комплексов на основе альгината натрия можно достичь за счёт сшивки N,N'-метилена-бис-акриламидом или обработкой цеолитами [23, 24]. Возможно также формирование слоя силикагеля на поверхности альгинатных комплексов, который даёт достаточно прочные структуры [25], но не позволяет оценить влияние такой обработки на живые клетки. Перспективным методом является стабилизация альгинатных комплексов хитозаном с последующей пришивкой биокатализатора через химическую модификацию [26]. Однако сам фермент находится снаружи, а внутренняя часть поликомплекса на основе альгината не используется. Стабилизация альгинатных комплексов полидиаллилдиметиламмоний хлоридом хоть и привела к долговременной устойчивости [27], но при этом вызывала значительную гибель заключённых внутри живых клеток водорослей, что потребовало введения микрочастиц оксида кремния и в целом усложнило систему. Поэтому актуальны работы по усовершенствованию альгинатных носителей для иммобилизации живых клеток

и ферментов при минимальных экономических затратах.

Цель работы – создание устойчивого гидрогелевого комплекса, содержащего клетки микроводорослей для удаления аммоний и фосфат-ионов из экспериментального раствора, имитирующего хозяйственно-бытовые сточные воды.

Объекты и методы исследования

Для эксперимента были выбраны две наиболее часто используемые водоросли в биотестировании: *Tetrademus obliquus* и *Chlorella vulgaris* из Коллекции живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (СЯКОА). Накопительную культуру микроводорослей наращивали на жидкой питательной среде для зелёных водорослей 3 N BBM [28] с pH 6, при освещении 45 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ФАР (фитолампа Uniell ULI-P11-35W/SPFR IP40 WHITE, Китай) и температуре 22–25 °С. Соотношение периодов день/ночь – 12/12 часов. Для эксперимента использовали культуры с оптической плотностью (ОП) *C. vulgaris* – 0,85 и *T. obliquus* – 0,76. Показатель ОП измеряли на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония) при $\lambda = 680/720$ нм в 5 мм кювете.

Tetrademus obliquus (Turpin) M.J. Wynne (СЯКОА Ch-055-12) – водоросль из отдела Chlorophyta. Штамм СЯКОА Ch-055-12 выделен из аэротенков станции биологической очистки лесопромышленного комплекса г. Сыктывкар, Республика Коми. Для штамма СЯКОА Ch-055-12 выполнен филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей 18S рДНК и ITS1–ITS2. Фрагменты последовательностей штамма представлены в GenBank под номером KJ627791.

Chlorella vulgaris (СЯКОА Ch-011-10) – одноклеточная водоросль из отдела Chlorophyta. Штамм СЯКОА Ch-011-10 выделен из антропогенно-нарушенной почвы (стойбище оленей) на Приполярном Урале в 2010 г. Для штамма СЯКОА Ch-011-10 выполнен филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей 18S рДНК. Фрагмент последовательности штамма представлен в GenBank под номером MZ435753.

В качестве компонентов гелевых комплексов были использованы: карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), альгинат натрия и полиакриловая кислота (ПАК). Компоненты полимерной суспензии: 2% раствор КМЦ, 1%

альгинат натрия, культуральная жидкость исследуемого вида микроводоросли, 0,1% раствор ПАК смешивали в соотношении 1:1:1:0,5, соответственно. Приготовленную смесь в виде капель дозировали в подкисленный хлоридом железа(III) раствор, содержащий 2% ацетат кальция и 0,1% катионный полиакриламид (кПАА). Далее полимерные шарики с клетками вынимали и промывали дистиллированной водой. Стабильность полимерных шариков и сохранение жизнеспособности иммобилизованных клеток оценивали в течение нескольких суток при естественном освещении и температуре 25 ± 2 °С в чашках Петри, наполненных раствором 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,2). Оценку жизнеспособности микроводорослей проводили с помощью распознавания живых и мёртвых клеток [29] под флуоресцентным микроскопом Mikmed 2 (версия 11) в проходящем и отражённом свете с камерой RisingCam E3 Sony IMX226 12 MP; программное обеспечение – RisingView. В работе использовали объективы с увеличением 40 \times и 100 \times . Подсчитывали долю мёртвых клеток относительно общего их числа [30].

Для эксперимента по обработке модельной сточной воды свежеприготовленные гидрогелевые шарики с иммобилизованными клетками перед началом эксперимента были выдержаны в 0,01 М натрий-цитратном буфере (pH 6,0) в течение 3 суток. Затем дважды промыты дистиллированной водой. Был приготовлен исходный раствор модельной сточной воды объёмом 200 см³, содержащий 30 мг NH₄Cl, 40 мг KH₂PO₄, 10 мг MgSO₄ · 7H₂O и 10 мг ZnCl₂. Готовый раствор разливали по 30 см³ в шесть пластиковых флаконов (50 см³). В две ёмкости вносили по 2 см³ исходной культуральной жидкости исследуемого вида микроводоросли, в одну из них добавляли 10 мг NaHCO₃. В другие две ёмкости вносили полимерные комплексы (примерно по 150 гидрогелевых шариков) с иммобилизованными клетками исследуемого вида микроводоросли, в одну из них добавляли 10 мг NaHCO₃. Две оставшиеся ёмкости служили контролем, причём в одну помещали примерно 150 гидрогелевых шариков без микроводорослей. В течение восьми суток оценивали динамику поглощения аммоний и фосфат-ионов из солевой среды как свободными, так и иммобилизованными клетками микроводорослей. Объём раствора во всех ёмкостях поддерживался на одинаковом уровне при температуре 25 ± 2 °С, газообмен в колбах обеспечивала микропористая мем-

брана (0,2 мкм). Концентрацию ионов аммония определяли согласно методике, описанной в работе [31], фосфат-ионов – согласно [32]. Все варианты опытов были выполнены в трёх повторностях. Для статистической обработки полученных результатов использовалась программа Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Для повышения устойчивости гидрогелевых комплексов нами было предложено увеличение числа химических связей в полимерном окружении за счёт сшивки альгината и КМЦ ионами Ca^{2+} и Fe^{3+} , а также внесения дополнительного внешнего стабилизатора кПАА. Включение в комплекс ПАК также целесообразно в связи с повышением вязкости её растворов за счёт увеличения степени нейтрализации карбоксильных групп щелочными или переходными металлами, а также проявления полиэлектролитных свойств [33, 34]. Частичная замена альгината натрия на более дешёвую КМЦ была проведена из экономических соображений. С учётом формирования

слоистой структуры полимерных комплексов [35], предполагаемое строение полимерного комплекса можно представить в виде следующей схемы (рис. 1).

В отличие от гидрогелевых комплексов на основе одного альгината натрия, предложенные нами комплексы обладают структурой с гораздо большей устойчивостью к щелочным металлам. Более того, за счёт сочетания нескольких полимеров наблюдалось лишь незначительное набухание и сохранение их целостности в течение длительного времени (рис. 2).

При этом гидрогелевые комплексы формировались при физиологически приемлемых значениях pH (5,5–6,0), поэтому были пригодны для захвата живых клеток. После процедуры включения микроводорослей *T. obliquus* и *C. vulgaris* в гидрогелевые комплексы они сохранили высокую жизнеспособность, при этом наблюдали интенсивное деление и рост клеток водорослей в течение 8 сут (рис. 3). В гидрогелевых комплексах доля мёртвых клеток составляла около 5% для обоих штаммов. Следовательно, исследо-

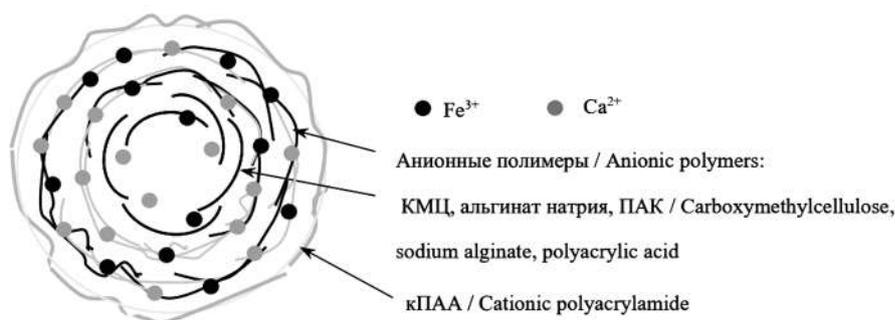


Рис. 1. Схема строения гидрогелевого комплекса
 Fig. 1. Structure scheme of the hydrogel complex

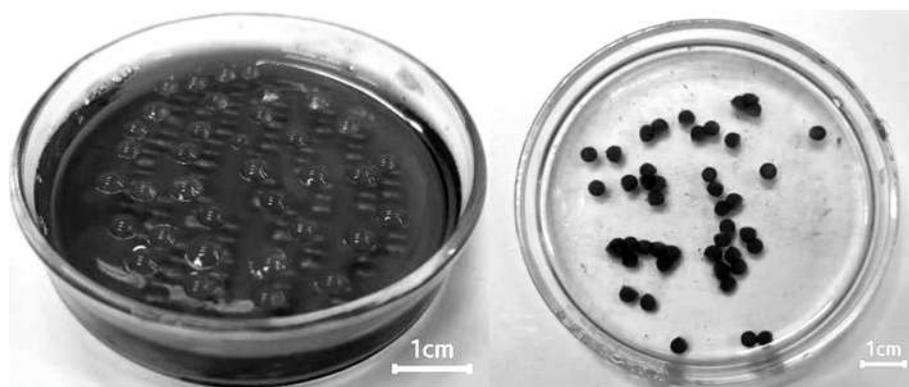


Рис. 2. Полимерные шарики с включёнными клетками микроводорослей (на примере *Chlorella vulgaris*, слева – свежеприготовленные, справа – после 8 суток выдержки в калий-фосфатном буфере)
 Fig. 2. Polymer beads with included microalgae cells (by the example of *Chlorella vulgaris*, on the left freshly prepared, on the right after 8 days of exposure in potassium phosphate buffer)

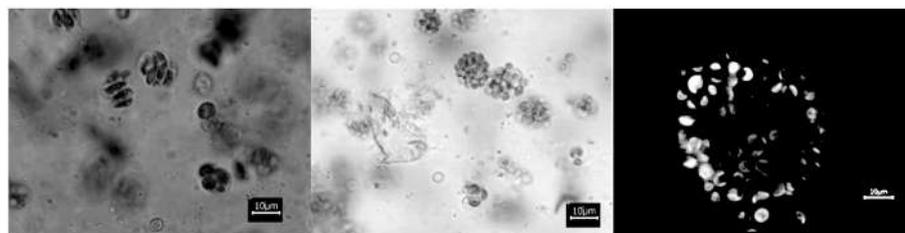


Рис. 3. Колонии микроводорослей *Tetradesmus obliquus* (слева) и *Chlorella vulgaris* (посередине) в матрице гидрогелевых комплексов на 3 сутки, (микроскопия в проходящем свете); свечение хлорофилла живых клеток *Chlorella vulgaris* (люминесцентная микроскопия)
Fig. 3. Colonies of microalgae *Tetradesmus obliquus* (left) and *Chlorella vulgaris* (in the middle) in the matrix of hydrogel complexes on the 3rd day, (microscopy in transmitted light); luminescence of chlorophyll in living cells of *Chlorella vulgaris* (fluorescence microscopy)

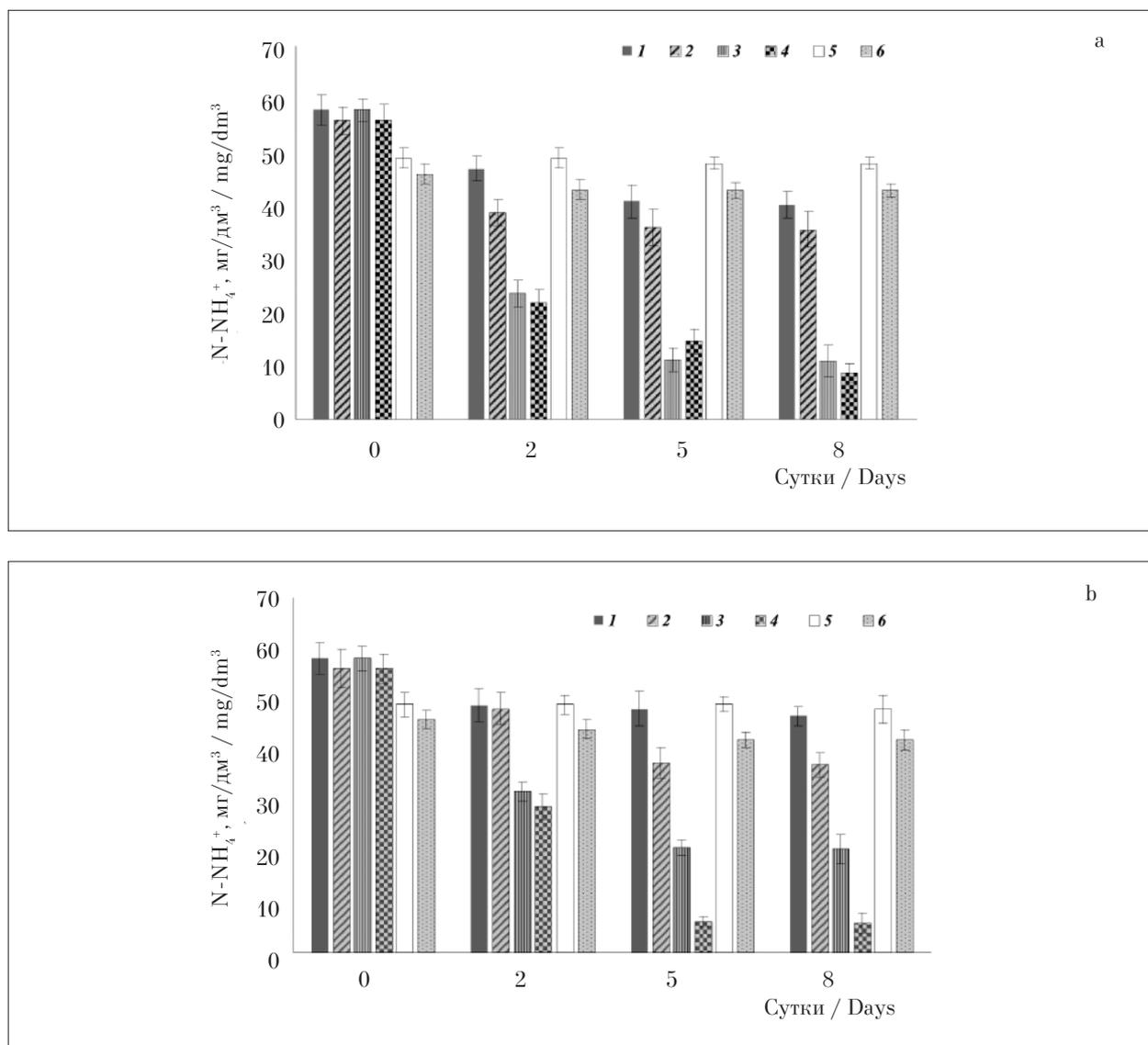


Рис. 4. Динамика изменения концентрации N–NH₄⁺ при различных режимах культивирования *Tetradesmus obliquus* (a) и *Chlorella vulgaris* (b): 1 – свободные клетки микроводорослей, 2 – иммобилизованные клетки микроводорослей, 3 – свободные клетки микроводорослей + NaHCO₃, 4 – иммобилизованные клетки микроводорослей NaHCO₃, 5 – контроль, 6 – полимерные комплексы без клеток микроводорослей
Fig. 4. Dynamics of changes in the concentration of N–NH₄⁺ under different modes of cultivation of *Tetradesmus obliquus* (a) and *Chlorella vulgaris* (b): 1 – free cells of microalgae, 2 – immobilized cells of microalgae, 3 – free cells of microalgae + NaHCO₃, 4 – immobilized cells of microalgae + NaHCO₃, 5 – control, 6 – polymer complexes without cells microalgae

ванные культуры можно считать здоровыми, так как жизнеспособность клеток была более 95% [29].

В результате проведённого исследования было выявлено, что свободные и иммобилизованные клетки обеих культур микроводорослей были способны поглощать $N-NH_4^+$. Снижение концентрации аммоний-ионов в модельной сточной воде на 8 сут для свободных клеток *T. obliquus* составило около 30%, для иммобилизованных – 35% (рис. 4). В варианте со свободными клетками *C. vulgaris* снижение концентрации аммония было

в пределах 20%, иммобилизованными – 35% (рис. 4). Внесение дополнительных гидрокарбонат-ионов существенно увеличило степень удаления $N-NH_4^+$ как свободными клетками, так и включёнными в гидрогелевые комплексы ($p < 0,05$). Для *T. obliquus* остаточная концентрация $N-NH_4^+$ составила 15%, для свободных клеток – 20%. Для *C. vulgaris* разница между значениями для свободных и иммобилизованных клеток была более выражена и составила 35 и 10%, соответственно. Необходимо отметить частичное поглощение $N-NH_4^+$ самой матрицей гидрогеля без клеток

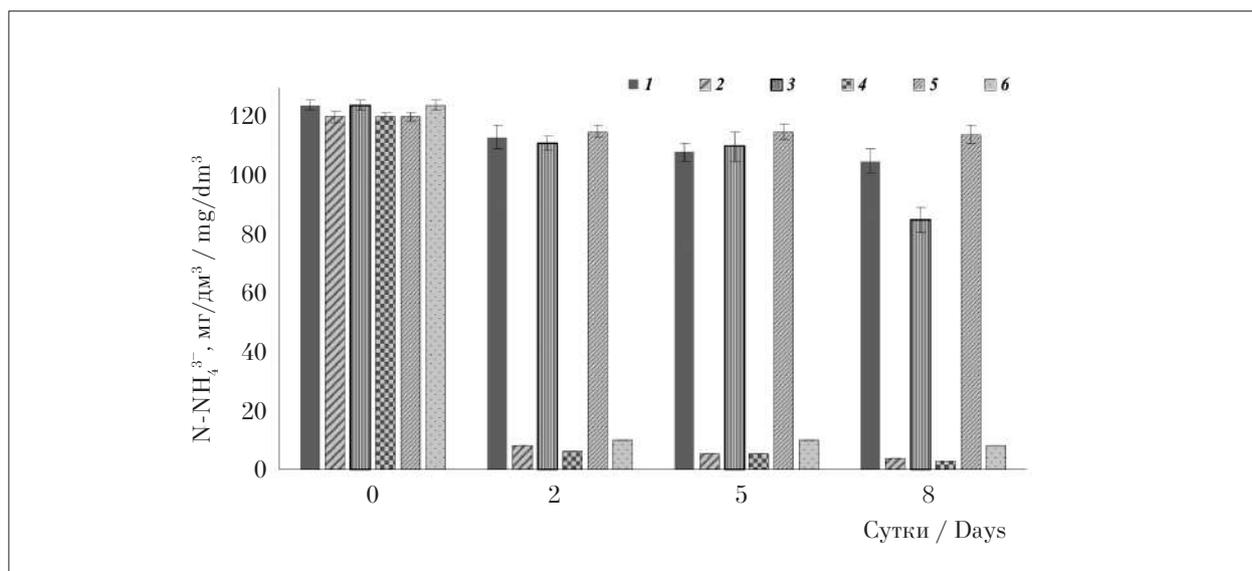
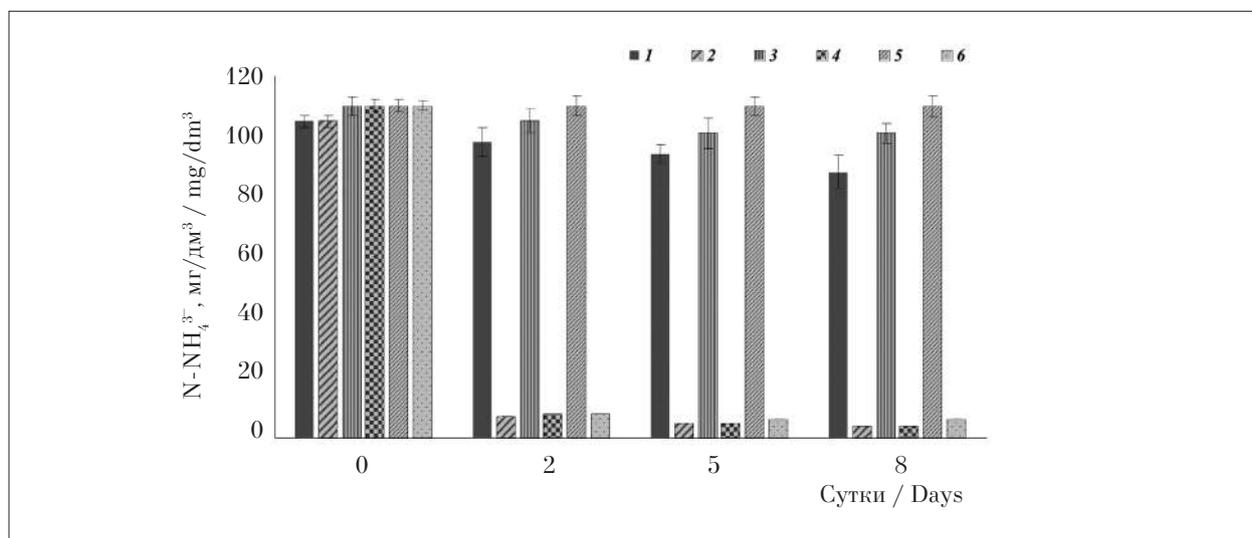


Рис. 5. Динамика изменения концентрации $P-PO_4^{3-}$ при различных режимах культивирования *Tetradesmus obliquus* (a) и *Chlorella vulgaris* (b): 1 – свободные клетки микроводорослей, 2 – иммобилизованные клетки микроводорослей, 3 – свободные клетки микроводорослей + $NaHCO_3$, 4 – иммобилизованные клетки микроводорослей $NaHCO_3$, 5 – контроль, 6 – полимерные комплексы без клеток микроводорослей

Fig. 5. Dynamics of changes in the concentration of $P-PO_4^{3-}$ under different modes of cultivation of *Tetradesmus obliquus* (a) and *Chlorella vulgaris* (b): 1 – free cells of microalgae, 2 – immobilized cells of microalgae, 3 – free cells of microalgae + $NaHCO_3$, 4 – immobilized cells of microalgae + $NaHCO_3$, 5 – control, 6 – polymer complexes without cells microalgae

микроводорослей. Однако, как отмечено ранее другими исследователями [36], сугубо химическое связывание азота достаточно сильно зависит от внешних факторов, в том числе посторонних веществ, поэтому биологическое поглощение рассматривалось нами как более приоритетное.

Таким образом, добавка гидрокарбоната в виде натриевой соли не повлияла на целостность гидрогелевых комплексов, но при этом значительно усилила эффекты удаления свободного азота. Наиболее вероятный механизм усиления эффекта удаления $N-NH_4^+$ связан с преобразованием гидрокарбонатов в свободный CO_2 с последующей интенсификацией процессов фотосинтеза [37]. Как следствие, ускоренный фотосинтез параллельно обеспечивает энергию для усиленной ассимиляции $N-NH_4^+$ и биосинтеза аминокислот [38].

Анализ динамики поглощения $P-PO_4^{3-}$ свободными клетками микроводорослей выявил снижение концентрации ионов в пределах 15–20%, причём наличие дополнительных карбонат-ионов особой роли не играло (рис. 5). Наибольшее снижение концентрации фосфатов произошло на 8 сут (до 25%) для *C. vulgaris* в присутствии карбонат-ионов. Напротив, удаление (> 95%) $P-PO_4^{3-}$ из раствора было отмечено для всех вариантов с иммобилизованными микроводорослями ($p < 0,01$). Однако сходные значения по степени удаления $P-PO_4^{3-}$ для контрольных вариантов подводят к выводу о химической природе связывания фосфора. Таким образом, гидрогелевый комплекс служил адсорбентом для фосфора [39], обеспечивая его локальную концентрацию в сфере размножающихся клеток микроводорослей. В дальнейшем фосфаты могут быть переведены во внутриклеточные полифосфаты [40].

Заключение

Новый гидрогелевый комплекс для обработки сточных вод с целью удаления азота и фосфора за счёт эффективного сочетания альгината натрия, КМЦ, ПАК и кПАА оказался устойчив к щелочным металлам, сохранял стабильность в течение длительного времени и был не токсичен для водорослей. Клетки двух штаммов микроводорослей были успешно включены в полимерную матрицу, где сохраняли способность к размножению и росту. Иммобилизованные клетки микроводорослей оказались наиболее эффективны в процессе поглощения $N-NH_4^+$, которое было

усилено за счёт добавки дополнительных карбонат-ионов. $P-PO_4^{3-}$ связывался с компонентами полимерной матрицы более, чем на 90% за счёт химических взаимодействий. Длительная сохранность структуры гидрогелевых комплексов позволяет в дальнейшем извлекать накопленную биомассу микроводорослей из жидкой фазы для последующей переработки. Компоненты таких комплексов дешевы, состоят из биоразлагаемых, нетоксичных полимеров, а факт ассимиляции азота и аккумуляции фосфора позволяет рассматривать гидрогелевые комплексы с иммобилизованными клетками микроводорослей в качестве органоминеральных удобрений. С другой стороны, биомасса микроводорослей из выработавших свой ресурс гидрогелевых комплексов может быть рассмотрена как потенциальный источник недорогого сырья для получения биотоплива.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания 122040600019-1 и 122040600026-9.

References

1. Zhmur N.S. Technological and biochemical processes of wastewater treatment at facilities with aerotanks. Moskva: AKVAROS, 2003. 507 p. (in Russian).
2. Shao Q., Zhang Y., Liu Z., Long L., Liu Z., Chen Y., Hu X.-M., Lu M., Huang L.-Z. Phosphorus and nitrogen recovery from wastewater by ceramsite: Adsorption mechanism, plant cultivation and sustainability analysis // Science of The Total Environment. 2022. V. 805. Article No. 150288. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150288
3. Lavrinovičs A., Mežule L., Juhna T. Microalgae starvation for enhanced phosphorus uptake from municipal wastewater // Algal Research. 2020. V. 52. Article No. 102090. doi: 10.1016/j.algal.2020.102090
4. Kim T.-H., Lee Y., Han S.-H., Hwang S.-J. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment // Biore-source Technology. 2013. V. 130. P. 75–80. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.134
5. Singh A., Ummalya S.B., Sahoo D. Bioremediation and biomass production of microalgae cultivation in river water contaminated with pharmaceutical effluent // Biore-source Technology. 2020. V. 307. Article No. 123233. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123233
6. Walls L.E., Velasquez-Orta S.B., Romero-Frasca E., Leary P., Noguez I.Y., Ledesma M.T.O. Non-sterile heterotrophic cultivation of native wastewater yeast and microalgae for integrated municipal wastewater treatment and bioethanol production // Biochemical Engineering

Journal. 2019. V. 151. Article No. 107319. doi: 10.1016/j.bej.2019.107319

7. You K., Ge F., Wu X., Song K., Yang Z., Zhang Q., Liu Y., Ruan R., Zheng H. Nutrients recovery from pig-gery wastewater and starch wastewater via microalgae-bacteria consortia // *Algal Research*. 2021. V. 60. Article No. 102551. doi: 10.1016/j.algal.2021.102551

8. Levasseur W., Perré P., Pozzobon V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification // *Biotechnology Advances*. 2020. V. 41. Article No. 107545. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107545

9. Nishshanka G.K.S.H., Liyanaarachchi V.C., Premaratne M., Nimarshana P.H.V., Ariyadasa T.U., Kornaros M. Wastewater-based microalgal biorefineries for the production of astaxanthin and co-products: Current status, challenges and future perspectives // *Bioresource Technology*. 2021. V. 342. Article No. 126018. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126018

10. Gorbunova S.Yu., Gudvilovich I.N. Cultivation of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler on waste water of poultry farms // *Theoretical and Applied Ecology*. 2020. No. 4. P. 68–74 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-4-068-074

11. Wang X., Zhang M., Liu S., Xu R.-L., Mou J., Qin Z.-H., Zhou Z.-G., Li H., Lin C.S.K., Sun Z. Synergistic bioconversion of lipids and carotenoids from food waste by *Dunaliella salina* with fulvic acid via a two-stage cultivation strategy // *Energy Conversion and Management*. 2021. V. 234. Article No. 113908. doi: 10.1016/j.enconman.2021.113908

12. Godbole V., Pal M.K., Gautam P. A critical perspective on the scope of interdisciplinary approaches used in fourth-generation biofuel production // *Algal Research*. 2021. V. 58. Article No. 102436. doi: 10.1016/j.enconman.2021.113908

13. Alva M.S., Pabello V.M.L., Ledesma M.T.O., Gómez M.J.C. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes // *Algal Research*. 2018. V. 34. P. 97–103. doi: 10.1016/j.algal.2018.07.006

14. Immobilised cells and enzymes – A practical approach / Ed. J. Woodward. Oxford: IRL Press, 1985. 177 p.

15. Smidsrod O., Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Trends Biotechnology*. 1990. V. 8. P.71–78. doi: 10.1016/0167-7799(90)90139-O

16. Shen Y., Gao J., Li L., Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: microorganism growth and nutrients removal // *Bioresource Technology*. 2017. V. 243. P. 905–913. doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.041

17. Petrovič A., Simonič M. Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana* // *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2016. V. 13. P. 1761–1780. doi: 10.1007/s13762-016-1015-2

18. Kondo K., Hirayama K., Matsumoto M. Adsorption of metal ions from aqueous solution onto microalga entrapped into Ca-alginate gel bead // *Desalination and Water Treatment*. 2013. V. 51. P. 4675–4683. doi: 10.1080/19443994.2013.770236

19. Kostov G., Angelov M., Mihaylov I., Poncelet D. Mechanical properties of Ca-alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast // *Revue de genie industriel*. 2010. V. 5. P. 25–35.

20. Jesus G.C., Bastos R.G., Silva M.A. Production and characterization of alginate beads for growth of immobilized *Desmodesmus subspicatus* and its potential to remove potassium, carbon and nitrogen from sugarcane vinasse // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019. V. 22. Article No. 101438. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101438

21. Petraitytė S., Šipailienė A. Enhancing encapsulation efficiency of alginate capsules containing lactic acid bacteria by using different divalent cross-linkers sources // *LWT – Food Science and Technology*. 2019. V. 110. P. 307–315. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.065

22. Banerjee S., Tiwade P.B., Sambhav K., Banerjee C., Bhaumik S.K. Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: Uptake kinetics and adsorption studies // *Biochemical Engineering Journal*. 2019. V. 149. Article No. 107241. doi: 10.1016/j.bej.2019.107241

23. Pourjavadi A., Barzegar Sh., Mahdavinia G.R. MBA-crosslinked Na-Alg/CMC as a smart full-poly-saccharide superabsorbent hydrogels // *Carbohydrate Polymers*. 2006. V. 66. No. 3. P. 386–395. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.03.013

24. Moghaddam S.A.E., Harun R., Mokhtar M.N., Zakaria R. Stability improvement of algal-alginate beads by zeolite molecular sieves 13X // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. V. 132. P. 592–599. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.191

25. Rehbein P., Raguz N., Schwalbe H. Evaluating mechanical properties of silica-coated alginate beads for immobilized biocatalysis // *Biochemical Engineering Journal*. 2019. V. 141. P. 225–231. doi: 10.1016/j.bej.2018.10.028

26. Bedade D.K., Sutar Y.B., Singhal R.S. Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee // *Food Chemistry*. 2019. V. 275. P. 95–104. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.090

27. Zhang B.B., Wang L., Charles V., Rooke J.C., Su B.L. Robust and biocompatible hybrid matrix with controllable permeability for microalgae encapsulation // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016. V. 8. No. 14. P. 8939–8946. doi: 10.1021/acsami.6b00191

28. Andersen R.A. *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic, Burlington/San & Diego/London, 2005. 578 p.

29. Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I., Akimenko Yu.V., Dadenko E.V. Methods for biodiagnostics of terrestrial ecosystems. Rostov na Donu: Iz-vo Yuzhnogo federalnogo universiteta, 2016. 356 p. (in Russian).

30. Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Vedunova M.V. Determination of viability of cell cultures. Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskiy gosuniversitet im. N.I. Lobachevskogo, 2015. 21 p. (in Russian).
31. Tarabukin D.V. Assessment of the lowland bog biomass for ex situ remediation of petroleum-contaminated soils // *Environments*. 2020. V. 7. No. 86. P. 1–11. doi: 10.3390/environments7100086
32. Nagul E.A., Kolev S.D., McKelvie I.D., Worsfold P.J. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box // *Analytica Chimica Acta*. 2015. V. 890. P. 60–82. doi: 10.1016/j.aca.2015.07.030
33. Yokoi H., Nomoto E., Ikoma S. Reversible formation of iron(III) ion clusters in the poly(acrylic acid)-Fe³⁺ complex gel with changes in the water content // *Journal of Materials Chemistry*. 1993. V. 3. No. 4. P. 389–392. doi: 10.1039/JM9930300389
34. Smitha B., Sridhar S., Khan A.A. Polyelectrolyte complexes of chitosan and poly(acrylic acid) as proton exchange membranes for fuel cells // *Macromolecules*. 2004. V. 37. No. 6. P. 2233–2239. doi: 10.1021/ma0355913
35. Voo W.P., Ooi C.W., Islamc A., Tey B.T., Chan E.S. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour // *European Polymer Journal*. 2016. V. 75. P. 343–353. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.12.029
36. Isik Z., Saleh M., Dizge N. Adsorption studies of ammonia and phosphate ions onto calcium alginate beads // *Surfaces and Interfaces*. 2021. V. 26. Article No. 101330. doi: 10.1016/j.surfin.2021.101330
37. Geng Y., Cui D., Yang L., Xiong Z., Pavlostathis S.G., Shaob P., Zhang Y., Luo X., Luo S. Resourceful treatment of harsh high-nitrogen rare earth element tailings (REEs) wastewater by carbonate activated *Chlorococcum* sp. microalgae // *Journal of Hazardous Materials*. 2022. V. 423. Article No. 127000. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127000
38. Liu X., Wang K., Zhang J., Wang J., Wu J., Peng F. Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater // *Bioresource Technology*. 2019. V. 283. P. 184–190. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.038
39. Schambeck C.M., Costa R.H.R., Derlon N. Phosphate removal from municipal wastewater by alginate-like exopolymers hydrogels recovered from aerobic granular sludge // *Bioresource Technology*. 2021. V. 333. Article No. 125167. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125167
40. Fu L., Li Q., Yan G., Zhou D., Crittenden J.C. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation // *Biotechnology for Biofuels*. 2019. V. 12. Article No. 121. doi: 10.1186/s13068-019-1458-z