

УДК 581.192:546

А.Е. СОЛОВЧЕНКО, Л.Р. СЕМЕНОВА, И.О. СЕЛЯХ, П.Н. ШЕРБАКОВ, К.А. ЧЕКАНОВ,
О.Б. ЧИВКУНОВА, Г.А. ДОЛЬНИКОВА, Е.С. ЛОБАКОВА*

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва 119234

e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Оценка потенциальной эффективности биологической очистки сточных вод птицефабрик с применением нового штамма *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2015 (Chlorophyta)

Исследовали возможности применения нового штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2015 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) для очистки сточных вод птицефабрик. Оценивали эффективность биоизъятия неорганических анионов из искусственных сточных вод (ИСВ) на основе куриного помета, имитирующих сточные воды птицефабрик, и скорость деструкции органических компонентов ИСВ при выращивании в них нового штамма *C. vulgaris* в режиме полунепрерывного культивирования. За трое суток клетки *C. vulgaris* извлекали более 90% нитрат-аниона, более 48% ортофосфата и снижали концентрацию органических соединений (по ХПК) в среднем на 80% от исходной. В ходе культивирования наблюдали тенденцию к замещению бактерий, характерных для ИСВ, бактериями, ассоциированными с культурой *C. vulgaris*. Биомасса, полученная при культивировании нового штамма на ИСВ, обладала высоким содержанием длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот из семейства C₁₈. Обсуждаются возможности использования нового штамма *C. vulgaris* для комплексной очистки сточных вод птицефабрик, возможности утилизации биомассы микроводорослей, а также потенциальные преимущества этого процесса по сравнению с традиционными технологиями биологической очистки.

Ключевые слова: биоизъятие, микроводоросли, органические загрязнители, сточные воды.

Серьезный риск для окружающей среды при работе птицефабрик связан с генерацией значительных объемов сточных вод [1], которые отличаются высокой концентрацией органических веществ и биогенных минеральных элементов (прежде всего аммонийного и нитратного азота, а также фосфора), и высокой санитарно-эпидемио-

логической опасностью. Сброс этих стоков без надлежащей очистки и обеззараживания запрещен, поскольку приводит к эвтрофикации и заражению водоемов и почв болезнетворными микроорганизмами [2–5].

Безопасная для окружающей среды утилизация помета и сточных вод, поступающих от произ-

Соловченко Алексей Евгеньевич, Семенова Лариса Рагмировна, Селях Ирина Олеговна, Щербаков Павел Николаевич, Чеканов Константин Александрович, Чивкунова Ольга Борисовна, Дольникова Галина Александровна, Лобаква Елена Сергеевна.

Список сокращений: БПК — биологическое потребление кислорода; ГЖХ—МС — газо-жидкостная хроматография—масс-спектрометрия; ЖК — жирные кислоты; ИСВ — искусственные сточные воды; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониобразующая единица; КП — куриный помет; МВ — микроводоросли; СМ — сухая масса; ФАР — фотосинтетически активная радиация (400—700 нм) эквивалент видимого света; Хл — хлорофилл; ХПК — химическое потребление кислорода.

* Автор для переписки.

водственных зон содержания и выращивания птицы, а также из перерабатывающих цехов — один из факторов, обуславливающих развитие производства. Данная проблема обостряется вследствие массового строительства крупных птицеводческих комплексов, вызванного интенсификацией сельскохозяйственного производства и перевода его на промышленную основу [5].

Существуют эффективные способы очистки сточных вод птицефабрик с использованием современных очистных сооружений и многоступенчатых микробиологических процессов на основе гетеротрофных микроорганизмов, разработанные для очистки городских сточных вод [1, 5]. Однако в настоящее время птицеводческие хозяйства практически не используют такие подходы из-за их сложности и дороговизны, предпочитая им комбинации накопительных прудов-отстойников и полей орошения [5]. Кроме того, указанные методы малоэффективны в холодное время года, а большая часть биодоступного азота и фосфора при их использовании безвозвратно теряется в результате денитрификации и образования нерастворимых комплексов. Более подробное описание проблем утилизации сточных вод сельскохозяйственного происхождения можно найти в обзорах [6—8].

Анализ существующих технологий переработки птичьего помета в России и за рубежом показывает, что большинство из них связаны с существенными затратами, энергоемкостью и необходимостью специального оборудования, что неприемлемо для большинства хозяйств с низкой рентабельностью [5, 6]. При этом уже довольно длительное время рассматривается возможность использования одноклеточных фототрофных микроорганизмов (микроводорослей) для очистки сточных вод [9]. Однако исследования в области глубокой переработки отходов и очистки стоков животноводства с применением таких микроорганизмов стали проводиться относительно недавно. Данный подход обладает рядом преимуществ, включая эффективное изъятие биогенных элементов клетками микроводорослей, деструкцию органических загрязнителей и подавление патогенной микрофлоры кислородом, выделяющимся при фотосинтезе [10]. Очистка с применением микроводорослей наносит меньший урон окружающей среде, чем остальные процессы, поскольку не генерирует вторичные отходы, как, например, отработанный активный ил. Дополнительным преимуществом является получение биомассы, обогащенной ценными соединениями (белком, антиоксидантами и витаминами), а также возможность утилизации техногенных выбросов углекислоты в

процессе фотосинтеза [11]. Богатая липидами и (или) углеводами биомасса микроводорослей, полученная при культивировании на стоках [12], также может быть переработана в различные виды биотоплива, такие как биодизель, метан, биоводород и др. [13]. Обогащенная связанным азотом и фосфором биомасса микроводорослей может использоваться для производства биоудобрений, характеризующихся замедленным высвобождением биогенных элементов в почве [14].

Однако разработка эффективных биотехнологических подходов к очистке сточных вод птицефабрик требует участия штаммов микроводорослей с определенной и достаточно редкой комбинацией свойств. Так, штаммы — кандидаты для биологической очистки сточных вод птицефабрик должны быть толерантны к высоким концентрациям биогенных элементов [15] и прочих загрязнителей, характерных для этого типа сточных вод, способны к их эффективному поглощению и (или) деструкции [10], а также обладать высокой скоростью роста и накопления биомассы [8].

Целью настоящей работы была оценка потенциальной эффективности нового штамма *Chlorella vulgaris* IPPAS-C2015 при использовании для биологической очистки сточных вод птицефабрик.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроводоросли и условия их культивирования. В настоящей работе использовали ранее выделенный нами штамм *Chlorella* IPPAS C-2015. При периодическом культивировании клетки МВ выращивали в качалочных колбах объемом 500 мл с 300 мл среды BG-11 [16] либо искусственных сточных вод (ИСВ, см. ниже) в качалке-инкубаторе Innova 44R (New Brunswick, США) при 25°, постоянном перемешивании (80 об/мин) и освещении флуоресцентными лампами (80 мкмоль фотонов/(м² · с) ФАР).

Для предварительной оценки потенциально токсического эффекта аммиака использовали среду BG-11_М на основе минеральной среды BG-11, в которой NaNO₃ был заменен на NH₄NO₃ в 2,5-кратном избытке (по количеству вещества) в сравнении с рецептурой BG-11 [16]. В различных опытах начальная плотность культуры составляла 0,8 либо 1,6 г сухой массы/л культуры.

В экспериментах с полунепрерывным отборно-доливным культивированием на ИСВ клетки выращивали в стеклянных цилиндрах диаметром 6,6 см и емкостью 1,5 л при постоянном освещении светодиодными лампами белого света (480 мкмоль фотонов/(м² · с) ФАР). Культуру непрерывно бар-

ботировали воздухом (0,3 л/л культуры/мин) и поддерживали температуру 25°. В данных опытах начальная плотность культуры составляла 1,6 г сухой массы/л культуры.

В опытах с ИСВ исходную культуру выращивали в колбах объемом 750 мл, содержащих 250 мл среды BG-11, при 25° и 40 мкмоль фотонов/(м² · с) ФАР. Осажденные центрифугированием клетки исходных культур ресуспендировали в ИСВ (см. ниже), после чего культуру растили, как указано выше. Рост культуры контролировали по накоплению сухой массы. Сухую массу определяли гравиметрически [3].

Искусственные сточные воды. Для оценки потенциальной эффективности биологической очистки сточных вод птицефабрик с использованием нового штамма *Chlorella* обработке подвергали ИСВ на основе вытяжки из куриного помета (КП), полученного с Петелинской птицефабрики, которую готовили путем инкубации в колбах гомогенизированной навески КП в дистиллированной воде или среде BG-11 (10 г/л) в течение 3 сут при комнатной температуре и постоянном перемешивании (110 об/мин). Затем смесь центрифугировали 10 мин, при 3500 г и супернатант использовали как ИСВ в дальнейших исследованиях без предварительной стерилизации. Содержание элементного азота и углерода в лиофильно высушенных исходных образцах КП и искусственных сточных водах определяли при помощи элементного анализатора CNSH Vario EL Cube (Elementar, Германия) (табл. 1).

Оценка бактериальной контаминации культур. Для оценки численности бактерий в культурах МВ пробы культуральной жидкости (КЖ) в различных разведениях высевали на твердую стерильную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду следующего состава г/л: пептон — 2; дрожжевой экстракт — 1; гидролизат казеина — 1; глюкоза — 1; глицерин — 10; CaCO₃ (Sigma, США) — 5; агар (Difco, США) — 20; вода водопроводная — до 1 л. Выросшие колонии подсчитывали и определяли число колониеобразующих единиц (КОЕ) на 3-и и 5-е сутки инкубации в термостате при 37°. Препараты бактериальных клеток исследовали в световом микроскопе в нативном состоянии и после окраски по Граму.

Разведения КЖ получали следующим образом: 1 мл исследуемой жидкости разбавляли в 100 раз стерильной водопроводной водой и готовили серию 10-кратных разведений. Из каждого разведения вносили по 0,05 мл исследуемого образца и равномерно распределяли шпателем по питательной среде.

Анализ жирных кислот в клетках микроводорослей. Состав жирных кислот ацилсодержащих липидов клеток МВ анализировали методом ГЖХ-МС по ранее описанным методикам [2, 3]. Для каждого варианта культивирования выполнено не менее двух независимых экспериментов, каждый в трехкратной биологической повторности. Если не указано иное, на рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таблица 1

Содержание углерода и азота в исходных образцах КП и степень их экстракции при получении ИСВ

Тип субстрата	Доля элемента в сухой массе, %		Содержание элемента, г/г КП		C/N, по массе	Полнота экстракции N из КП	
	N	C	N	C		Общий азот, % от исходного	NO ₃ ⁻ , ммоль/л
Исходный образец КП	3,800±0,145	34,184±1,019	0,063±0,026	0,592±0,240	9,465±0,167	38,681	14,537
Осадок после экстракции*	2,330±0,012	38,674±0,716	0,023±0,001	0,387±0,007	16,596±0,232		

*По разнице в содержании элементов в исходном КП и в осадке после водной экстракции судили о степени перехода этих элементов в экстракт (ИСВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и оценка толерантности штамма микроводорослей *Chlorella* IPPAS C-2015

С учетом многочисленных свидетельств высокой толерантности одноклеточных зеленых МВ (Chlorophyta) к условиям культивирования на эвтрофных сточных водах [18—20] в качестве объекта исследования для настоящей работы был выбран ранее выделенный нами штамм зеленой микроводоросли, предварительно идентифицированный как *Chlorella* sp. Затем было проведено множественное выравнивание известных нуклеотидных последовательностей *Chlorella* для участка генов 18S рибосомной РНК, включающих последовательности ITS1, ITS2 с использованием программы ClustalW. На основании выравнивания были определены консервативные области данного участка и к ним подобраны олигонуклеотидные праймеры:

For 5'-TGGCTCATTAATCAGTTATAG-3',
Rev 5'-CCAAGAATTTACCTCTGACA-3'.

С использованием полученной пары праймеров была проведена ПЦР-амплификация соответствующих участков геномной ДНК исследуемых изолятов. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank (ID KF006337). При помощи программы BLAST в базе данных GenBank был проведен поиск ближайших гомологов исследуемых последовательностей. Было обнаружено их наибольшее сходство с последовательностями генов 18S рРНК водорослей из р. *Chlorella* (семейство Trebouxiophyceae). Таким образом, с использованием последовательности кластера рибосомных генов была установлена принадлежность выбранного для работы штамма к виду *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Данный штамм был депонирован в коллекции IPPAS (Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН) с присвоением идентификатора IPPAS C-2015.

Эффективность изъятия биогенных элементов из ИСВ клетками МВ определяется скоростью их роста [8], толерантностью к высокому уровню азота, фосфора и органических загрязнителей. С точки зрения утилизации биомассы МВ также важ-

но содержание в ней ценных веществ. Оптимальным методом предварительного скрининга штаммов-кандидатов для использования в системах очистки животноводческих стоков с помощью интенсивных культур* МВ является тестирование на модельных средах, имитирующих сточные воды. В начале исследования была проверена способность отобранных штаммов МВ к росту на модельных средах с повышенным уровнем аммонийного и нитратного азота, а также на вытяжках из КП (см. табл. 1). Установлено (см. табл. 1), что 35—40% сухой массы помета приходится на долю углерода, в то время как на долю общего азота — 3,8—4,2%. Соотношение C/N (по массе) в исходных образцах сухого помета было порядка 9—10. После водной экстракции соотношение C/N в ИСВ повышалось почти в два раза (см. табл. 1) за счет частичного перехода азота (преимущественно нитратного) в водную фазу вытяжки. Соответственно, в вытяжке после одних суток экстракции обнаруживали до 46% общего азота (конечная концентрация по нитрату более 21 ммоль/л). Данную вытяжку использовали при приготовлении модельных сред для тестирования эффективности биоизъятия нитрата с помощью МВ.

Определяли накопление биомассы и изменение кислотности среды в ходе культивирования (табл. 2). Особое внимание уделяли динамике рН — важного аспекта толерантности МВ — кандидатов для использования в биологической очистке сточных вод. В частности, при поглощении неорганического углерода (бикарбоната, образующегося при растворении CO₂ в среде культивирования при физиологических значениях рН) [21], а также нитратного азота клетками МВ среда защелачивается [22, 23]. При этом происходит протонирование присутствующих в сточных водах ионов аммония с образованием аммиака, токсичного для клеток МВ [24].

При культивировании *C. vulgaris* IPPAS C-2015 на среде BG-11 с избытком связанного азота в течение 3 сут регистрировали незначительное снижение рН (в среднем, на 0,5 единиц, с 7,4 до 6,9), что, по-видимому, являлось следствием поглощения NH₄⁺. При этом накопление биомассы было сопоставимое с таковым при культивировании на стандартной среде BG-11, не содержащей аммонийного азота (данные не приведены). Таким образом, сравнительно высокие концентрации аммо-

* Интенсивная культура — культура микроводорослей, растущая при высокой плотности клеток, повышенной освещенности и активном перемешивании (иногда и при обогащении аэрирующей смеси CO₂).

Динамика кислотности среды и накопления биомассы культурами МВ в ходе предварительного выращивания на ИСВ с целью скрининга

Параметр	Состав среды и время культивирования, ч					
	BG-11 (контроль)		ИСВ + BG-11		ИСВ	
	0	148	0	148	0	148
рН среды	7,4	10,3	7,4	9,7	7,4	9,7
Накопление биомассы, г/л	0,8	2,1	0,8	1,5	0,8	1,9

Примечание: представлены средние значения для трех биологических повторностей, стандартное отклонение во всех случаях не превышало 5%; начальная плотность культуры — 0,8 г/л.

нийного азота при рН 6,9—7,4 не оказывали значительного негативного влияния на рост культуры.

При дальнейшем выращивании на ИСВ с добавлением или без среды BG-11 во всех случаях наблюдали сходное повышение рН среды в процессе культивирования, хотя и меньшее по сравнению с контрольными культурами, растущими только на среде BG-11. В целом, при культивировании на ИСВ наблюдали менее интенсивное накопление биомассы по сравнению с контролем. При культивировании на водном экстракте КП накопление биомассы культурами *C. vulgaris* было сопоставимо с таковым, полученным при использовании в качестве ИСВ экстракта КП средой BG-11. Эти эффекты могут быть связаны с более высоким содержанием нитратного азота в среде BG-11 по сравнению с ИСВ [16]. Тем не менее, реакция среды при культивировании микроводорослей была слабощелочной, что в присутствии большого количества аммонийного азота могло бы способствовать образованию аммиака, препятствующего росту МВ [24]. Однако в исследованных образцах КП и модельных средах на его основе не выявлено высоких количеств аммонийного азота, что сводит риск гибели культуры от потенциальной токсичности аммиака на фоне изъятия нитрата к минимуму.

Стабильность роста культуры *C. vulgaris* IPPAS C-2015 на ИСВ изучали путем полунепрерывного культивирования методом отбора—долива (рис. 1). При этом по истечении 3 сут культивирования в культуру добавляли приблизительно 0,6 объема свежеприготовленных ИСВ. Штамм *C. vulgaris* IPPAS C-2015 демонстрировал стабильное накопление биомассы после каждого разбавления в течение по крайней мере трех циклов культивирования (см. рис. 1). Таким образом, исследован-

ная культура *C. vulgaris* показывала достаточно стабильный рост в условиях полунепрерывного культивирования и поддержания высоких концентраций компонентов ИСВ, что весьма существенно для выращивания этой МВ в промышленных условиях.

Полученные данные свидетельствовали о том, что *C. vulgaris* IPPAS C-2015 обладает, судя по скорости роста и динамике кислотности среды, достаточно выраженной способностью к росту на ИСВ. Однако толерантность к компонентам сточных вод, в частности, к высокому уровню биоген-

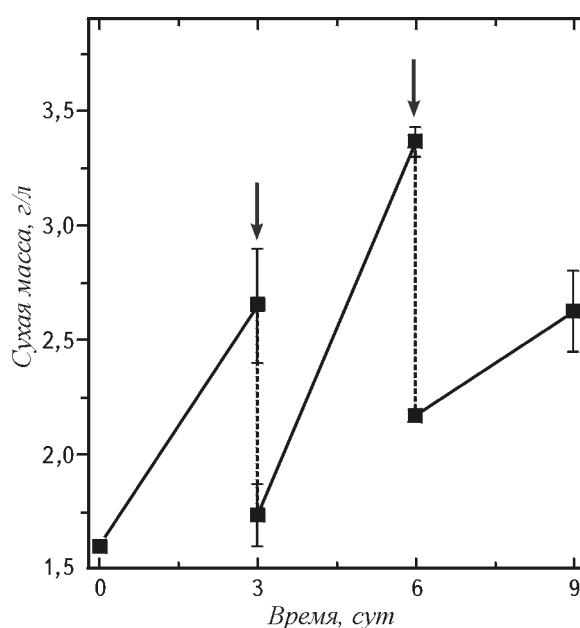


Рис. 1. Кинетика накопления сухой массы культурой *C. vulgaris* IPPAS C-2015 при полунепрерывном культивировании на ИСВ. Моменты долива ИСВ показаны стрелками

ных элементов, является необходимым, но недостаточным атрибутом штаммов, предназначенных для биоремедиации сточных вод. На следующем этапе работы тестировали эффективность удаления биогенных элементов из среды отобранными штаммами МВ.

Эффективность удаления биогенных элементов клетками микроводорослей

Для оценки эффективности изъятия сравнивали состав анионов в ИСВ, имитирующих сточные воды птицефабрик, до и после культивирования в них клеток МВ (табл. 3). Изученный штамм снижал концентрацию нитрат-аниона в ИСВ, в среднем, на 90% за 3 сут, что соответствует скорости удаления приблизительно 177,2 мг/л культуры/сут. Следует отметить высокую степень изъятия нитрит-аниона (по абсолютному содержанию), степень удаления остальных анионов была ниже. Тем не менее, за один 72-часовой цикл при данной плотности культуры и концентрации анионов (т.е. при данной нагрузке на биомассу) не удалось достигнуть снижения концентрации всех биогенных элементов до уровня ПДК. По-видимому, для повышения эффективности биологической деконтаминации необходимо снижать нагрузку на биомассу путем повышения плотности культуры или разбавления сточных вод, либо увеличивать время пребывания сточных вод в культивационной системе. Действительно, дополнительные исследования эффективности изъятия нитрат-аниона показали, что двукратное повышение плотности культуры (с 0,8 до 1,6 г/л) приводило к повышению скорос-

ти и полноты изъятия этого иона из модельной среды ВГ-11 с избыточным уровнем нитратного азота (данные не приведены).

Следует также отметить значительное снижение содержания хлорид-аниона (до уровня ниже ПДК), вероятно, из-за адсорбции на поверхности клеток и (или) поглощения ими (см. табл. 3).

Один из наиболее перспективных способов утилизации биомассы МВ, полученной при очистке животноводческих стоков — производство биоудобрений. Известно, что сразу после внесения сухой биомассы МВ примерно 3% общего азота из ее состава доступны для растений, спустя 3 нед этот показатель увеличивается до 33%; аналогичная динамика характерна и для фосфора [25]. В итоге рост растений огурца и кукурузы на почвах, удобренных выращенной на стоках молочных ферм биомассой МВ, был не хуже, чем при использовании равного количества (в пересчете на N и P) химических удобрений [3, 25]. Несмотря на предполагаемую высокую концентрирующую активность МВ в отношении тяжелых металлов, внесение в почву этих загрязнителей с биомассой МВ, полученной на животноводческих стоках, другими исследователями не зафиксировано [26].

Деструкция органических загрязнителей при культивировании микроводорослей

Наряду с высоким содержанием неорганических ионов сточные воды птицефабрик отличаются значительной концентрацией органических загрязнителей (2,5 г/л ХПК и более). В современных очистных сооружениях интенсивная аэрация

Таблица 3

Эффективность удаления основных анионов из ИСВ клетками микроводорослей за 72 ч культивирования

Показатель	Концентрация, мг/л (полнота удаления, %)				
	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
ПДК*	350	0,1	45	3,5	500
Концентрация в ИСВ**	455	615	589	128	106
Концентрация после культивирования	67,4±2,0 (85,9)	7,3±3,0 (98,8)	57,3±0,9 (90,3)	66,1±0,6 (48,4)	79,5±6,6 (25,0)

* Для воды поверхностных источников хозяйственно-питьевого назначения.

** Погрешность определения меньше 5%.

сточных вод (за счет механического перемешивания и (или) продувки воздухом) обеспечивает поступление кислорода, необходимого для окисления органических загрязнителей, регистрируемое как снижение параметров БПК и ХПК, традиционно применяемых при оценке содержания органических загрязнителей в воде [27]. При очистке стоков с использованием фототрофных микроорганизмов кислород выделяется клетками при фотосинтезе, исключая потребность в дополнительной аэрации; этот процесс получил название фотосинтетической аэрации [10]. С целью оценки способности исследованного штамма к очистке сточных вод от органических загрязнителей исследовали динамику общего содержания органических веществ (по величине ХПК) в ходе культивирования водорослей (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что при культивировании МВ в течение 3 сут содержание органических компонентов сточных вод резко уменьшается (приблизительно на 80% по сравнению с исходным). В качестве контроля использовали сосуд с ИСВ, не содержащий водорослей и аэрируемый с той же скоростью, что и культура МВ. В этом случае скорость снижения содержания органических загрязнителей была пренебрежимо низкой (данные не приведены). Полученные результаты позволяют заключить, что исследованный штамм наряду с изъятием биогенных элементов обеспечивает эффектив-

ную деструкцию органических загрязнителей в составе ИСВ.

Влияние культивирования микроводорослей на микрофлору модельных сред

Как отмечено выше, важной задачей при очистке сточных вод является их обеззараживание [6]. При фотосинтетической аэрации оно достигается, как и деструкция органических загрязнителей, за счет повышения pH и выделения кислорода клетками при фотосинтезе [9, 10]. В настоящей работе исследовали влияние культивирования МВ на бактериофлору ИСВ, приготовленных без стерилизации. Этот подход позволяет полнее имитировать условия реальной промышленной технологии биоремедиации.

Количество КОЕ в свежеприготовленных ИСВ составляло в среднем $4,2 \cdot 10^8$ /мл. Выделено четыре основных типа колоний, среди которых доминировали два типа: тип 1 (колонии болотного цвета с ровным краем; клетки — небольшие палочки с закругленными концами, неподвижные, граммотрицательные) и тип 2 (колонии серого цвета с ровным краем; клетки дрожжеподобные). Посев ИСВ на стандартные твердые среды (среда Чапека и сусло-агар) не выявил грибную контаминацию [28]. Судя по морфотипу колоний, исследованные образцы ИСВ характеризовались значительным содержанием микроорганизмов при невысоком их разнообразии. Разнообразие бактериальных клеток, присутствующих в альгологической монокультуре *S. vulgaris*, использованной в настоящей работе, было выше: выявлено семь визуально различимых морфотипов бактериальных колоний (среднее общее число бактериальных клеток — $1,1 \cdot 10^8$ /мл).

Культивирование *S. vulgaris* на ИСВ привело к снижению в популяции биоразнообразия сопутствующих микроорганизмов (в 2—3 раза) и числа КОЕ (в 300 раз). Существенно, что после 9 сут культивирования МВ в ИСВ доминировали морфотипы, характерные для бактерий, ассоциированных с *S. vulgaris*: тип 1 (серые колонии с неровным краем; клетки — одиночные или парные палочки, средней длины, неподвижные, граммотрицательные) и тип 5 (серые матовые колонии из подвижных палочек средней длины и толщины, одиночные, редко в парах, граммотрицательные). Последнее обстоятельство указывает на вероятное участие в процессах изъятия биогенных элементов, деструкции органических загрязнителей и подавления микрофлоры ИСВ консорциума микроорганизмов с доминированием МВ *S. vulgaris*.

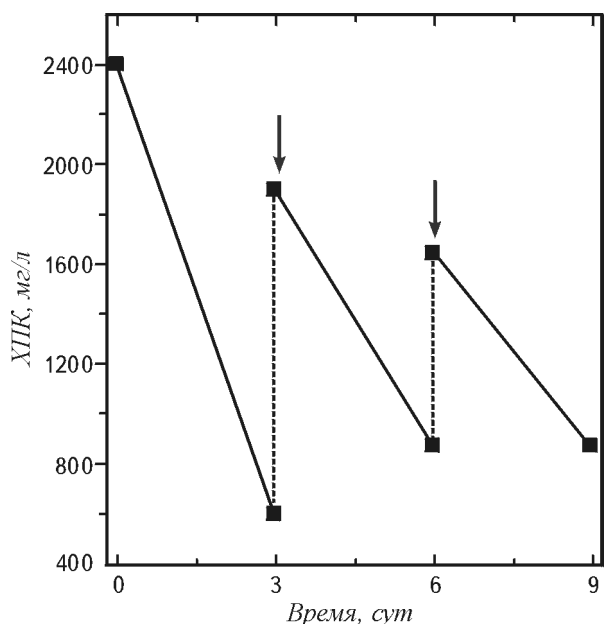


Рис. 2. Кинетика снижения содержания органических веществ в среде при полунепрерывном культивировании *S. vulgaris* IPPAS C-2015 на ИСВ в течение трех циклов длительностью по 3 сут каждый; моменты долива ИСВ показаны стрелками

Жирнокислотный состав биомассы микроводорослей, выращенной на ИСВ

Важной характеристикой штаммов МВ, пригодных для биологической очистки сточных вод, является способность генерировать биомассу, обогащенную ценными соединениями, такими как, например, липиды, пригодные для конверсии в биодизель [15]. Кроме того, структурные липиды фотосинтетического аппарата клеток МВ содержат ценные длинноцепочечные (поли)ненасыщенные жирные кислоты [29]. В этой связи определяли содержание и состав жирных кислот биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-2015, полученной при культивировании на ИСВ.

Анализ содержания суммы жирных кислот в клетках исследованного штамма показал, что за 72 ч культивирования в ИСВ этот параметр практически не изменяется, оставаясь на уровне 8—10% от сухой массы клеток. Такая тенденция характерна для роста МВ, не лимитированного элементами минерального питания, и соответствует ожиданиям для культур, растущих на ИСВ со сравнительно высоким содержанием биогенных элементов (см. табл. 1 и 3). В составе липидов клеток МВ в этих условиях преобладают моно- и полиненасыщенные жирные кислоты семейств C_{16} и C_{18} [30].

В отличие от общего содержания соотношение жирных кислот в липидах клеток *C. vulgaris* IPPAS C-2015 при культивировании на ИСВ претерпело значительные изменения (табл. 4). В частности, повышалось содержание α -линоленовой кислоты, наблюдалось также повышение доли остальных ненасыщенных жирных кислот. Известно, что α -линоленовая и линолевая кислоты входят в состав преимущественно структурных липидов тилакоидных мембран хлоропластов МВ [29]. Можно думать, что наблюдаемые изменения жирнокислотного состава связаны с развитием мембранного аппарата хлоропластов при адаптации к снижению эффективной освещенности клеток по мере накопления сухой массы. Таким образом, хотя накопление биомассы на минеральной среде BG-11, и происходит более активно (см. табл. 2), биомасса, полученная путем культивирования на сточных водах в наших экспериментальных условиях, отличается более высоким содержанием триненасыщенной α -линоленовой кислоты.

Для технологий, ориентированных на производство кормовых добавок, предпочтительны штаммы, синтезирующие длинноцепочечные ЖК в составе клеточных липидов. Примером могут служить представители р. *Nannochloropsis*, накапливающие эйкозапентаеновую кислоту [31, 32]. В

целом, отсутствие лимитирования связанным азотом при культивировании на сточных водах должно способствовать повышению накопления культурами липидов, обогащенных ценными длинноцепочечными полиненасыщенными жирными кислотами. Хотя содержание жирных кислот с длиной углеродной цепи более 18 в клетках исследованного штамма *C. vulgaris* IPPAS C-2015 было незначительным, высокое содержание линолевой и α -линоленовой кислот позволяют считать выращенную на сточных водах биомассу *C. vulgaris* IPPAS C-2015 потенциальным сырьем для производства кормовых добавок с ценными свойствами. Существовало, что в стоках птицефабрик не ожидается присутствие высоких количеств тяжелых металлов и токсических органических соединений и, как видно из результатов предварительного анализа (см. предыдущий раздел), наблюдается тенденция к подавлению бактериальной флоры, характерной для КП, и замещению их бактериями, ассоциированными с клетками МВ *C. vulgaris*. Однако использовать полученную биомассу для производства кормовых добавок можно будет только после проверки на присутствие патогенных микроорганизмов и токсических компонентов.

Проблема очистки сточных вод сельскохозяйственных предприятий, в том числе птицефабрик, является весьма актуальной по ряду причин, включая опасность для окружающей среды и в особенности для водных экосистем [33], а также заметный рост объемов сточных вод при отсутствии эффективных и недорогих технологий их очистки. Кроме того, биогенные элементы сточных вод птицефабрик в настоящее время безвозвратно теряются [34], например, за счет действия бактерий-денитрификаторов, выделяющих N_2 в атмосферу. Лишь небольшую часть биогенных элементов из этих сточных вод удастся вернуть в почву [35, 36].

Напротив, клетки МВ усваивают азот и фосфор, включая их в состав своих клеток, и поэтому обладают высоким потенциалом для решения проблемы биоизъятия азота и фосфора из сточных вод [11, 12, 15] и возврата их в агроэкосистемы в виде биоудобрений [3]. Дополнительным преимуществом удобрений из биомассы МВ, обогащенной N и P, является медленное высвобождение этих элементов, что обеспечивает их высокую доступность для растений [25]. Следует также отметить, что очистка сточных вод с помощью МВ с дальнейшей конверсией биомассы в удобрения позволила бы сэкономить значительное количество азот- и фосфор-содержащих химических. Хими-

Жирнокислотный состав клеток исходной культуры *C. vulgaris* IPPAS C-2015 до и после трех суток культивирования на ИСВ

Жирные кислоты, % от суммарного содержания*	Содержание жирных кислот, % от суммы ЖК			
	Исходная культура, выращена на BG-11 среде	Культура после выращивания на ИСВ в течение 1, 2 или 3 циклов по 72 ч каждый		
		1	2	3
14:0 (лауриновая)	< 1	< 1	< 1	< 1
16:0 (пальмитиновая)	24	20	22	17
16:1 (пальмитолеиновая)	< 1	< 1	< 1	< 1
16:2 (гексадекадиеновая)	6	9	10	13
16:3 (гексадекатриеновая)	1	3	4	6
18:0 (стеариновая)	4	1	< 1	< 1
18:1 (олеиновая)	42	2	< 1	< 1
18:2 (линолевая)	22	31	27	29
18:3 (α -линоленовая)	< 1	34	36	35
Сумма насыщенных ЖК	29	21	22	17
Сумма мононенасыщенных ЖК	42	2	< 1	< 1
Сумма диеновых ЖК	28	40	37	42
Сумма триеновых ЖК	1	37	41	40
Сумма полиненасыщенных ЖК	29	77	78	82
Индекс ненасыщенности	102	193	196	206

* Погрешность определения < 5%.

ческий синтез азотных удобрений энергоемок и вреден для окружающей среды [37], а сырье для производства минеральных фосфатов является конечным невозобновляемым ресурсом, дефицит которого ожидается уже в этом столетии [30].

Несмотря на очевидные преимущества биологическая очистка сточных вод птицефабрик с применением МВ пока еще не получила достаточного распространения главным образом из-за отсутствия практического опыта проектирования сооружений для очистки животноводческих стоков с использованием этих микроорганизмов, а также разработанных методов культивирования в сточных водах и подходящих для этого штаммов МВ. Настоящая работа направлена на решение этих

проблем. В частности, показано, что исследованный штамм МВ *C. vulgaris* IPPAS C-2015 обладает высокой потенциальной эффективностью при очистке сточных вод птицефабрик (значительное уменьшение содержания N и P и деструкция органических загрязнителей), что подтверждено патентом РФ [38]. Этот штамм способен также генерировать биомассу с ценными свойствами, потенциально пригодную для различных вариантов переработки, включая производство биоудобрений и (после бактериологической экспертизы) кормовых добавок. Однако в полной мере раскрыть биотехнологический потенциал данного штамма помогут только дополнительные исследования. В частности, необходима оптимизация параметров

культивирования, сбора и переработки биомассы. Кроме того, представляется перспективным повышение эффективности процесса за счет использования бросового тепла и углекислого газа котельных, обогревающих птицефабрики в зимнее время. Однако интеграция очистных сооружений и теплогенерирующих объектов является отдельной, довольно сложной задачей [6, 11].

Работы по альгологической характеристике штамма *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2015 выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00029) и Министерства науки и образования Российской Федерации (контракт № 14.515.11.0026).

Получено 27.04.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh, M. Microalgal System for Treatment of Effluent from Poultry Litter Anaerobic Digestion / M. Singh, D.L. Reynolds, K.C. Das // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102. — P. 10841—10848.
2. Mulbry, W. Treatment of Dairy Manure Effluent Using Freshwater Algae: Algal Productivity and Recovery of Manure Nutrients Using Pilot-Scale Algal Turf Scrubbers / W. Mulbry, S. Kondrad, C. Pizarro, E. Kebede-Westhead // *Biores. Technol.* — 2008. — V. 99. — P. 8137—8142.
3. Kim, M.K. Enhanced Production of *Scenedesmus* Spp. (Green Microalgae) Using a New Medium Containing Fermented Swine Wastewater / M.K. Kim, J.W. Park, C.S. Park, S.J. Kim, K.H. Jeune, M.U. Chang, J. Acreman // *Biores. Technol.* — 2007. — V. 98. — P. 2220—2228.
4. НТП 17-99: Нормы технологического проектирования систем удаления и подготовки к использованию навоза и помета. — М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2001. — 84 с.
5. Афанасьев А.В. Анализ технологий переработки навоза и помета // *Вестник ВНИИМЖ.* — 2012. — Т. 4. — С. 28—35.
6. Соловченко А.Е. Экологические фотобиотехнологии для очистки сточных вод / А.Е. Соловченко, Е.С. Лобакова, Е.Л. Барский, Я.В. Саванина, А.А. Лукьянов, М.П. Кирпичников // *Биотехнология.* — 2011. — № 6. — С. 70—88.
7. Соловченко А.Е. Возможности биотехнологической переработки сельскохозяйственных отходов с использованием микроводорослей / А.Е. Соловченко, А.А. Лукьянов, С.Г. Васильева, Я.В. Саванина, О.В. Соловченко, Е.С. Лобакова // *Вестник МГУ, сер. Биология.* — 2014. — № 1. — С. 38—49.
8. Olguin, E.J. Phycoremediation: Key Issues for Cost-Effective Nutrient Removal Processes // *Biotechnol. Adv.* — 2003. — V. 22. — P. 81—91.
9. Oswald, W.J. Photosynthesis in Sewage Treatment / W.J. Oswald, H.B. Gotaas // *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* — 1957. — V. 122. — P. 73—105.
10. Muñoz, R. Algal-Bacterial Processes for the Treatment of Hazardous Contaminants: A Review / R. Muñoz, B. Guieysse // *Water Res.* — 2006. — V. 40. — P. 2799—2815.
11. Pittman, J.K. The Potential of Sustainable Algal Biofuel Production Using Wastewater Resources / J.K. Pittman, A.P. Dean, O. Osundeko // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102. — P. 17—25.
12. Park, J.B.K. Wastewater Treatment High Rate Algal Ponds for Biofuel Production / J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102. — P. 35—42.
13. Georgianna, D.R. Exploiting Diversity and Synthetic Biology for the Production of Algal Biofuels / D.R. Georgianna, S.P. Mayfield // *Nature.* — 2012. — V. 488. — P. 329—335.
14. Ray, K. A Way to Curb Phosphorus Toxicity in the Environment: Use of Polyphosphate Reservoir of Cyanobacteria and Microalga as a Safe Alternative Phosphorus Biofertilizer for Indian Agriculture / K. Ray, C. Mukherjee, A.N. Ghosh // *Environ. Sci. Technol.* — 2013. — V. 47. — P. 11378—11379.
15. Sivakumar, G. Integrated Green Algal Technology for Bioremediation and Biofuel / G. Sivakumar, J. Xu, R.W. Thompson, Y. Yang, P. Randol-Smith, P.J. Weathers // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 107. — P. 1—9.
16. Stanier, R. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales) / R. Stanier, R. Kunisawa, M. Mandel, G. Cohen-Bazire // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1971. — V. 35. — P. 171—205.
17. Gorelova, O. Similarity and Diversity of the *Desmodesmus* Spp. Microalgae Isolated from Associations with White Sea Invertebrates / O. Gorelova, O. Baulina, A. Solovchenko, K. Chekanov, O. Chivkunova, T. Fedorenko, E. Lobakova // *Protoplasma.* — 2015. — V. 252. — P. 489—503.
18. Aslan, S. Batch Kinetics of Nitrogen and Phosphorus Removal from Synthetic Wastewater by Algae / S. Aslan, I.K. Kapdan // *Ecol. Eng.* — 2006. — V. 28. — P. 64—70.
19. Ruiz-Marin, A. Growth and Nutrient Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-Continuous Cultures Treating Real Wastewater / A. Ruiz-Marin, L.G. Mendoza-Espinosa, T. Stephenson // *Biores. Technol.* — 2010. — V. 101. — P. 58—64.
20. Solovchenko, A. Phycoremediation of Alcohol Distillery Wastewater with a Novel *Chlorella Sorokiniana* Strain Cultivated in a Photobioreactor Monitored on-Line Via Chlorophyll Fluorescence / A. Solovchenko, S. Pogosyan, O. Chivkunova, I. Selyakh, L. Semenova, E. Voronova, P. Scherbakov, I. Konyukhov, K. Chekanov, M. Kirpichnikov, E. Lobakova // *Algal. Res.* — 2014. — V. 6. — P. 234—241.
21. Solovchenko, A. A Novel CO₂-Tolerant Symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Desmodesmaceae): Acclimation to and Performance at a High Carbon Dioxide Level / A. Solovchenko, O. Gorelova, I. Selyakh, S. Pogosyan, O. Baulina, L. Semenova, O. Chivkunova, E. Voronova, I. Konyukhov, P. Scherbakov, E. Lobakova // *Algal Res.* — 2015. doi:10.1016/j.algal.2015.04.011 (в печати).

22. Shiraiwa, Y. Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae During Uptake Dissolved Inorganic Carbon / Y. Shiraiwa, A. Goyal, N.E. Tolbert // *Plant Cell Physiol.* — 1993. — V. 34. — P. 649—657.
23. Vanlerberghe, G.C. Relationship between NH_4^+ Assimilation Rate and in Vivo Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity Regulation of Anaplerotic Carbon Flow in the Green Alga *Selenastrum Minutum* / G.C. Vanlerberghe, K.A. Schuller, R.G. Smith, R. Feil, W.C. Plaxton, D.H. Turpin // *Plant Physiol.* — 1990. — V. 94. — P. 284—290.
24. Abeliovich, A. Toxicity of Ammonia to Algae in Sewage Oxidation Ponds / A. Abeliovich, Y. Azov // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1976. — V. 31. — P. 801.
25. Mulbry, W. Recycling of Manure Nutrients: Use of Algal Biomass from Dairy Manure Treatment as a Slow Release Fertilizer / W. Mulbry, E.K. Westhead, C. Pizarro, L. Sikora // *Biores. Technol.* — 2005. — V. 96. — P. 451—458.
26. Wilkie, A.C. Recovery of Dairy Manure Nutrients by Benthic Freshwater Algae / A.C. Wilkie, W.W. Mulbry // *Biores. Technol.* — 2002. — V. 84. — P. 81—91.
27. Fu, W. Enhancement of Carotenoid Biosynthesis in the Green Microalga *Dunaliella Salina* with Light-Emitting Diodes and Adaptive Laboratory Evolution / W. Fu, O. Gugmundsson, G. Paglia, G. Herjolfsson, O. Andre'sson, B. Palsson, S. Brynjolfsson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — V. 97. — P. 2395—2403.
28. Trentacoste, E. The Place of Algae in Agriculture: Policies for Algal Biomass Production / E. Trentacoste, A. Martinez, T. Zenk // *Photosynth. Res.* — 2015. — V. 123. — P. 305—315.
29. Guschina, I.A., Harwood, J.L. Algal Lipids and Their Metabolism: Algae for Biofuels and Energy [Eds. M.A. Borowitzka and N.R. Moheimani]. — Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer, 2013. — P. 17—36.
30. Mulbry, W. Treatment of Dairy and Swine Manure Effluents Using Freshwater Algae: Fatty Acid Content and Composition of Algal Biomass at Different Manure Loading Rates / W. Mulbry, S. Kondrad, J. Buyer // *J. Appl. Phycol.* — 2008. — V. 20. — P. 1079—1085.
31. Vooren, G.V. Investigation of Fatty Acids Accumulation in *Nannochloropsis Oculata* for Biodiesel Application / G.V. Vooren, F. Le Grand, J. Legrand, S. Cuine', G. Peltier, J. Pruvost // *Bioresour. Technol.* — 2012. — V. 124. — P. 421—432.
32. Solovchenko, A. Stress-Induced Changes in Optical Properties, Pigment and Fatty Acid Content of *Nannochloropsis* sp.: Implications for Non-Destructive Assay of Total Fatty Acids / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, L. Recht, S. Boussiba // *Mar. Biotechnol.* — 2011. — V. 13. — P. 527—535.
33. Vance, C.P. Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource / C.P. Vance, C. Uhde-Stone, D. L. Allan // *New Phytol.* — 2003. — V. 157. — P. 423—447.
34. Carpenter, S.R. Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen / S.R. Carpenter, N.F. Caraco, D.L. Correll, R.W. Howarth, A.N. Sharpley, V.H. Smith // *Ecol. Appl.* — 1998. — V. 8. — P. 559—568.
35. Brown, N. Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilisation Ponds: Current Understanding and Future Direction / N. Brown, A. Shilton // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* — 2014. — V. 13. — P. 321—328.
36. Elser J.J. Phosphorus: A Limiting Nutrient for Humanity? // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2012. — V. 23. — P. 833—838.
37. Лебедев Е.М. Возможные экологические последствия избыточного применения азотных удобрений: Минеральный и биологический азот в СССР. — М.: Наука, 1985. — С. 41—60.
38. Лобакова Е.С., Соловченко А.Е., Селях И.О., Семенова Л.П., Лукьянов А.А., Курпичников М.П., Щербаков П.Н. Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* 711-54 для очистки сточных вод сельскохозяйственных и спиртовых производств с попутным получением сырья для производства кормовых добавок // Заявка № 2012122230 от 30.05.2012. Положительное решение ФИПС от 10.09.2013. RU2507251-C2, C12 N1/12.

A.E. SOLOVCHENKO, L.R. SEMENOVA,
I.O. SELYAKH, P.N. SHCHERBAKOV,
K.A. CHEKANOV, O.B. CHIVKUNOVA,
G.A. DOLNIKOVA, and E.S. LOBAKOVA *

The Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234, Moscow Russia

e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Assessment of Potential Effectiveness of Biological Decontamination of Poultry Farm Waste Water using a New *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2015 (Chlorophyta) Strain

The potential use of a new microalgal strain *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2015 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) for poultry wastewater treatment has been studied. The efficiency of inorganic anion bioremoval from and organic contaminant destruction in the artificial wastewater (AWW) prepared from chicken litter mimicking real poultry wastewater were estimated during the new strain of *C. vulgaris* semi-continuous cultivation. After three days of cultivation, the nitrate and orthophosphate ions levels were decreased by more than 90% and more than 48%, respectively, and 80% of the organic compounds on average (judging from chemical oxygen minimum index) were degraded in the AWW. During the cultivation of the microalgae, the bacteria associated with the *C. vulgaris* pre-culture gradually replaced the bacteria characteristic of the AWW. The microalgal biomass grown in AWW possessed a high content of polyunsaturated long-chain fatty acids from the C_{18} family. The possibilities of the new *C. vulgaris* strain application to the combined poultry wastewater treatment and utilization of the resulting microalga biomass are discussed together with the potential advantages of the microalgae-based over the conventional biological wastewater treatment technologies.

Key words: bioremoval, microalgae, organic contaminants, wastewater.

* Author for correspondence.