

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Zöld mikroalgák sótoleranciája és sótelenítő
képessége**

Figler Aida

Témavezető: Dr. Bácsi István



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi években globális szinten az egyik legfontosabb környezeti probléma, hogy világszerte csökken az édesvízkészletek mennyisége, valamint azok minősége fokozatosan romlik. A minőség romlásához egyre inkább hozzájárul a nagy sótartalmú szennyvizek növekvő mennyisége, amelyek tisztítása bonyolult feladatot jelent a szennyvíztisztítás területén dolgozó szakemberek számára. Az ilyen szennyvizek előkezelés nélkül sem a felszíni vizekbe, sem az általános szennyvíztisztító rendszerekbe nem vezethetők be (Hárs, 2006), ugyanis a nagy sótartalom jelentősen megváltoztathatja a befogadó víztest vízminőségét és élővilágának fajösszetételét, illetve súlyos károkat okozhat a szennyvíztisztítás biológiai, de akár a fizikai-kémiai lépéseiben is.

A szennyvíz sótalanítását viszonylag olcsó módszerekkel is el lehet végezni, mint például a hígítás (esővíz hozzáadása a tároló tavakhoz) vagy kicsapás (mész vagy mésszóda hozzáadásával; Bayer, 1985). A sós szennyvizek fizikai és kémiai kezelése is megtörténhet (desztilláció, vákuum bepárlás, ioncsere, elektrodialízis, fordított ozmózis), de ezek az eljárások általában rendkívül drágák (Hárs, 2006; Takács és Nagy, 2009). Ugyanakkor egyre gyakrabban kerülnek előtérbe a különféle biológiai módszerek, amelyekben makro- (vízi növények; Arámburo-Miranda és Ruelas-Ramírez, 2017) és mikroorganizmusokat (baktériumok vagy algák; Yao és mtsai, 2013; Kokabian és mtsai, 2018; Sahle-Demessie és mtsai, 2019) használnak.

Számos tanulmány kimutatta már, hogy a mikroalgák megfelelően alkalmazhatók különböző eredetű szennyvizek kezelésére (Abdel-Raouf és mtsai, 2012). Képesek eltávolítani a szennyezőanyagok széles skáláját (Delrue és mtsai, 2016), illetve egyes mikroalgák még a víz sótartalmát is képesek tolerálni, vagy akár csökkenteni azt (Gan és mtsai, 2016). Ugyanakkor a háztartási, a mezőgazdasági és az ipari eredetű szennyvizek jelentős eltéréseket mutathatnak összetételükben. Algákkal történő szennyvíztisztítás során a tápanyagok optimálistól eltérő mennyisége és aránya gátolhatja a folyamat hatékonyságát. Ebből adódóan mindenképpen szükséges a megfelelő tápanyagtartalom, illetve azok arányának meghatározása és

beállítása az eredményes szennyvíztisztítás érdekében.

Az antropogén hatások mellett a klímaváltozás okozta fokozott párolgás és az ebből adódó kiszáradás is hozzájárul a természetes vizek betöményedéséhez. A kiszáradáshoz, mint környezeti hatáshoz az élőlények számos módon alkalmazkodhatnak. Az algák több csoportja körében gyakori a nem mozgékony ciszták kialakítása (Ellegaard és Ribeiro, 2018). Az egyes algafajok cisztásodási folyamatainak és azok indukálási lehetőségeinek vizsgálata hozzájárulhat a cisztásodás folyamatainak általános megértéséhez, segítve ezzel az előrejelzését annak, hogy a globális környezeti hatások, mint a klímaváltozás milyen változási irányokat okozhatnak a fitoplankton közösségekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A különböző eredetű szennyvizek algákkal történő biológiai tisztítása során célszerű figyelembe venni, hogy az adott területre jellemző algafajok felhasználása valószínűleg hatékonyabbnak bizonyul, mintha más élőhelyekről (pl.: trópusokról) származó fajokat alkalmaznánk erre a célra. Magyarországon a szikes tavak kivételével minden felszíni víz az „édesvizek” kategóriájába tartozik, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljunk kilenc, a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai tanszékének törzsgyűjteményében fenntartott közönséges édesvízi zöldalgát és jellemezzük azok sótoleranciáját, valamint sótalanító képességét. Munkánk során a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

- Az alkalmazott sókoncentrációk hogyan hatnak a tenyészetek növekedésére? A szárazföldi élőhelyeken is gyakran előforduló fajok (*Chlorella* spp. és *Chlorococcum* sp.) nagyobb sótoleranciával jellemezhetők-e a főleg édesvízi élőhelyekre jellemző fajoknál?
- Milyen mértékben képesek az algák csökkenteni a tápoldat vezetőképességét és sótartalmát? A csökkenés mértéke mennyiben függ össze az alkalmazott fajok sótoleranciájával?
- A vizsgált fajok milyen mértékben csökkenthetik a vizek tápanyag terhelését, különösen azok nitrát és foszfát tartalmát

különböző sókoncentrációk mellett? Képesek-e nagy sókoncentrációk (pl.: 1 000 vagy 10 000 mg/l NaCl) mellett a toleránsabb fajok nagyobb mértékben csökkenteni a közeg tápanyagtartalmát, mint a kevésbé toleráns fajok?

A szakirodalomban leírtak alapján a nem kedvező nitrogén:foszfor (N:P) arányok, illetve a tápanyagok nagy mennyisége korlátozott tápanyag-eltávolítást és csökkent mértékű növekedést vonhat maga után, ezzel csökkentve a szennyvíztisztítás hatékonyságát. Ez alapján célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *Coelastrum morus* közösséges édesvízi zöldalga különböző sókoncentrációkkal kezelt tenyészetait abból a szempontból, hogy milyen tápanyagtartalom és N:P arány mellett képesek a leghatékonyabb növekedésre, illetve tápanyag eltávolításra. Munkánk ezen részében a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

- A sókoncentráció növekedése milyen hatással van a tenyészetek növekedésére különböző tápanyagtartalmú és N:P arányú tápoldatok alkalmazása során?
- Hogyan változik a tápoldat vezetőképessége és klorid-tartalma a tápanyagtartalom és a N:P arány függvényében?
- Milyen különbségek figyelhetők meg az alkalmazott faj tápanyag-eltávolításában különböző tápanyagtartalom és N:P arány mellett?

Annak megértése céljából, hogy a növekvő szalinitás milyen hatással lehet a fitoplankton közösségek tagjaira, egy cisztaképző zöldalga, a *Haematococcus pluvialis* alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy milyen eltérések figyelhetők meg a tenyészetek növekedésében, a sejttípusok arányaiban és a tápoldatok összetételében különböző sókoncentrációk, illetve kiszáradást modellező körülmények mellett. Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

- A sókoncentráció változása, valamint a kiszáradás miképpen hatnak a tenyészetek sejtszám növekedésére?
- Hogyan változik a különböző sejttípusok aránya a kísérletek

során?

- Az alkalmazott faj milyen mértékben képes csökkenteni a tápoldat vezetőképességét és sótartalmát különböző sókoncentrációk mellett?
- Kiszáradás során milyen változások figyelhetők meg a tápoldat klorid-tartalmában, valamint milyen mértékben csökken a tenyészetek térfogata? Megfigyelhető-e a tápoldat betöményedése?
- Milyen változások figyelhetők meg a tenyészetek nitrát és foszfát tartalmában különböző sókoncentrációk, valamint kiszáradást modellező körülmények mellett?

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletek során alkalmazott izolátumok

A kísérletek során a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének algagyűjteményében található izolátumokat használtuk, amelyek magyarországi vízi élőhelyekről kerültek izolálásra. Az algák sótűrő és sótolerancia vizsgálatára az egysejtű *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum sp.*, *Monoraphidium komarkovae* és *Monoraphidium pusillum*, valamint a cönobiális *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus spinosus*, *Scenedesmus obliquus* és *Scenedesmus obtusus* izolátumokat alkalmaztuk. A tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) sótoleranciára gyakorolt hatásainak vizsgálata során a cönobiális *Coelastrum morus* zöldalgát használtuk. A szalinitás illetve kiszáradás okozta ozmotikus stressz életciklusra gyakorolt hatásainak vizsgálata során a *Haematococcus pluvialis* izolátumot alkalmaztuk.

3.2. A kísérletek összeállítása és kivitelezése

3.2.1. Az algák sótűrő és sótolerancia vizsgálatára

A kísérleteket a kilenc mikroalga fajjal végeztük, Bold's Basal tápoldatban (BBM; CCAP Media Recipes A), 50 ml végtérfogatban, 10 óra sötét és 14 óra fény ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mellett, 24°C -on, rázatott

tenyészetekben. A kísérlet időtartama 14 nap volt.

Az alkalmazott sókoncentrációk (500 - 20 000 mg/l) beállításához 300 g/l NaCl-ot tartalmazó törzsoldatot használtunk. A kontroll tenyészetek nem tartalmaztak hozzáadott NaCl-t. A kísérletek során úgynevezett „negatív kontroll” összeállításokat (tápoldat + só, alga nélkül) is alkalmaztunk a pontos kezdeti vezetőképesség és klorid tartalom meghatározása végett, valamint hogy korrigálni tudjuk a tenyészetekben mért eredményeket az alga nélküli összeállításokban mért eredményekkel.

3.2.2. A tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) hatása a sótoleranciára

A kísérletek során két általánosan használt tápoldatot, a Bold's Basal (BBM; CCAP Media Recipes A) és a Jaworski tápoldatot (JAW; CCAP Media Recipes B), valamint azok módosított változatait alkalmaztuk. A kísérleteket, 50 ml végtérfogatban, 10 óra sötét és 14 óra fény ($40 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mellett, 24°C -on, rázatott tenyészetekben végeztük. A kísérlet időtartama 14 nap volt.

A *C. morus* törzs sótűrő és sóalanító képességének vizsgálata a 9 algafajjal végzett kísérlettel azonos módon történt 500, 1 000, 5 000 és 10 000 mg/l sókoncentrációk alkalmazásával a négy különböző tápoldatban.

3.2.3. A szalinitás élelciklusra gyakorolt hatásai

3.2.3.1. A különböző sókoncentrációk hatása a *Haematococcus pluvialis* élelciklusára

A tenyészetek nevelése Optimalizált *Haematococcus* tápoldatot (OHM; Fábregas és mtsai, 2000), 200 ml végtérfogatban, 10 óra sötét és 14 óra fény ($80 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mellett, 24°C -on, buborékolatott tenyészetekben történt. A kísérlet időtartama 11 nap volt.

A tenyészetek nevelése során a következő sókoncentrációkat alkalmaztuk: 100, 250, 500, 1 000, 2 000, 3 000 és 4 000 mg/l, melyeket NaCl törzsoldat (300 g/l) hozzáadásával állítottunk be. A kontroll tenyészetek nem tartalmaztak hozzáadott NaCl-t. Ebben a kísérletben is alkalmaztunk negatív kontrollt (tápoldat + só, alga nélkül)

a pontos kezdeti vezetőképesség és klorid tartalom meghatározására végeztünk, valamint hogy korrigálni tudjuk a tenyészetekben mért eredményeket az alga nélküli összeállításokban mért eredményekkel.

3.2.3.2. A kiszáradás hatásai a *Haematococcus pluvialis* életciklusára

A tenyészetek nevelése OHM tápoldatban, 50 ml kezdőtérfogatban, 10 óra sötét és 14 óra fény ($80 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mellett, 24°C -on, buborékoltatott tenyészetekben történt. A kísérlet időtartama 16 nap volt.

Ebben a kísérletben három, különböző módon kezelt beállítást alkalmaztunk: abszolút kontroll, kontroll és kiszáradó tenyészetek. Az abszolút kontroll tenyészetek esetében a tenyésztés során a párolgás eredményeként elvesztett folyadék mennyiségét kétnaponta OHM tápoldattal újratöltöttük (50 ml-re). Ezzel szemben a kontroll tenyészetek térfogatpótlása desztillált vízzel való újratöltéssel történt meg. A kiszáradó tenyészetek esetében az elvesztett folyadékot nem töltöttük vissza, mivel kísérletünk célja a kiszáradás hatásainak vizsgálata volt.

3.3. A tenyészetek növekedésének mérése

A tenyészetek növekedését a sejtek, illetve a cönóbiumok számának meghatározásával követtük nyomon (European Standard EN 15204). A számláláshoz kétnaponta 200 μl mintákat vettünk le a tenyészetekből és formaldehiddel tartósítottuk (5%-os végkoncentráció) azokat. Az egyes sejt/ cönóbium számokat 10 μl -es mintákból számoltuk meg Bürker kamrában, Olympus BX50F-3 mikroszkóppal (Olympus Optical Co., Ltd., Tokió, Japán) 400-szoros nagyításon.

Az algák sótűrő és sótoleranciára gyakorolt hatásainak, valamint a különböző sókoncentrációk *Haematococcus pluvialis* életciklusára gyakorolt hatásainak vizsgálata során az 50%-os növekedésgátlást előidéző NaCl-koncentrációk (EC_{50} -értékek) meghatározásához a növekedésgátlás mértékét (százalékban, a kontrollhoz viszonyítva)

ábrázoltuk a NaCl-koncentrációk függvényében. A kapott görbékre trendvonalakat illesztettünk (másodrendű összefüggés), majd a trendvonalak egyenleteivel (másodfokú egyenletek) kiszámítottuk az 50%-os gátlást okozó koncentrációkat.

3.4. A vezetőképesség, a klorid- és a tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) változásának meghatározása

A kísérletek végén (a 11. illetve 14. napon) a tenyészeteket lecentrifugáltuk (Beckman Avanti J-25, Beckman Industries Inc., Fullerton, California, USA), majd a vezetőképesség, a klorid, a nitrát és a foszfát tartalom mérése a sejtmentes felülúszókból történt meg. Ez alól kivételt csak a kiszáradás *Haematococcus pluvialis* életciklusára gyakorolt hatásait vizsgáló kísérlet jelentett, ahol kétnaponta centrifugáltunk le (Multifuge X4R Pro, Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz, Németország) egy - egy abszolút kontroll, kontroll, illetve kiszáradó tenyészetet, majd a sejtmentes felülúszókból történt a klorid, a nitrát és a foszfát tartalom mérése.

3.4.1. A vezetőképesség mérése

A vezetőképességet Hach Lange HQ30d hordozható multiméterrel (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Németország) mértük meg IntellicalTM CDC401 vezetőképesség-mérő elektróda (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Németország) alkalmazásával. A vezetőképesség utolsó napra bekövetkező csökkenésének mértékét százalékos arányban adtuk meg, a kezdeti értékeket 100%-nak tekintettük.

3.4.2. A klorid tartalom mérése

A sejtek által felvett NaCl mennyiségének meghatározása a tápközegek klorid tartalmának mérésével történt, amelyet csapadékos titrálással végeztünk (Németh, 1998), ezüst-nitrát mérőoldat felhasználásával. A klorid mennyiségét a módszerben megadott képlettel számítottuk ki. A mérések 12,5 ml (kontroll, 100 - 1 000 mg/l NaCl), illetve 1 ml (2 000 - 20 000 mg/l NaCl) felülúszó

felhasználásával történtek. A klorid tartalom utolsó napra bekövetkező csökkenésének mértékét százalékos arányban adtuk meg, a kezdeti értékeket 100%-nak tekintettük.

Ez alól kivételt egyedül a kiszáradás *Haematococcus pluvialis* életciklusára gyakorolt hatásainak vizsgálata képezett, amelyben a klorid tartalom mérése a felülúszók teljes mennyiségéből történt a tenyészetek betöményedésének igazolására, és az eredményeket minden mintavételi napon mg/l-ben adtuk meg.

3.4.3. A tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) mérése

A nitrát és a foszfát tartalom mérését spektrofotometriás módszerekkel végeztük el. A nitrát esetében a szalicilsavas - klorimetriás módszert (MSZ 1484-13: 2009), a foszfát tartalom mérésére a savas foszfor-molibdenátos módszert (MSZ EN ISO 6878: 2004) alkalmaztuk. A nitrát és foszfát tartalom utolsó napra való csökkenésének mértékét százalékos arányban adtuk meg, a kezdeti értékeket 100%-nak tekintettük. Ez alól kivételt csak a szalinitás életciklusra gyakorolt hatásaival foglalkozó kísérlet jelentett, ahol az eredményeket minden mintavételi napon mg/l-ben adtuk meg.

3.5. Statisztikai analízis

Minden kísérletet háromszoros ismétlésben végeztünk el és kiszámoltuk az átlagértékeket, illetve a szórásokat. Az algák sótűrő és sótalanító képességének, illetve a tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) sótoleranciára gyakorolt hatásainak vizsgálata során a növekedési görbék tendenciái közötti különbségeket a kontroll és a kezelt tenyészetekben egyutas kovariancia-analízissel (ANCOVA; Zar, 1996; Hammer és mtsai, 2001) határoztuk meg. A szalinitás életciklusra gyakorolt hatásaival foglalkozó kísérletekben a tenyészetek időbeni növekedésében, illetve az egyes mintavételi napokon a különböző kezelések közötti növekedésben és a sejttípus arányban megjelenő különbségeket egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg. A vezetőképesség-csökkenés mértékét (%), a klorid- és tápanyag-eltávolítás mértékét (%), valamint a kiszáradás hatásait vizsgáló

kísérletekben a klorid- és tápanyagtartalmat (mg/l) egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. Annak megállapítására, hogy a vezetőképesség, a klorid tartalom, illetve a tápanyagtartalom szignifikánsan változott-e az algák sótűrő és sótalanító képességének, a tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) sótoleranciára gyakorolt hatásainak, valamint a különböző sókoncentrációk *Hameatococcus pluvialis* életciklusára gyakorolt hatásainak foglalkozó kísérletek időtartama alatt, a nulladik és az utolsó nap eredményeit páros t-tesztel hasonlítottuk össze.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

4.1. Az algák sótűrő és sótalanító képességének vizsgálata

A kilenc zöld mikroalga izolátum mindegyike sótűrőnek tekinthető, hiszen még nagy sókoncentrációk (pl.: 1 000 - 10 000 mg/l) mellett is képesek voltak a növekedésre. A szárazföldi környezetben is gyakran megjelenő *Chlorella* és *Chlorococcum* fajok nagyobb sótoleranciával jellemezhetők, mint a főleg édesvízi élőhelyen előfordulók.

A tenyészetek vezetőképesség-csökkentő képességét tekintve a növekedésükben gátolt, kezelt tenyészetek ionfelvétele szignifikáns volt a legtöbb vizsgált izolátum esetében, így mindegyik hozzájárulhat a klorid tartalom csökkentéséhez is. A toleránsabb, „terresztris” izolátumok kis mértékű vezetőképesség csökkentése és klorid eltávolítása mögött az állhat, hogy esetükben a folyamatos ioncsere-mechanizmusok jellemzőbbek lehetnek, mint az ion-felhalmozás (Fraghl és mtsai, 2015).

A nitrát eltávolítás mértéke csak 5 000 mg/l és afeletti NaCl koncentrációknál csökkent szignifikánsan, de még ezekben az esetekben is jelentős mértékű nitrát eltávolítás történt. Töményebb oldatokban a nitrát eltávolítás gátlása egyértelműen összefügg a tenyészetek növekedésének gátlása miatti kisebb sejtszámmal. A Bold's Basal tápoldatban (BBM; N:P = 1,7) nevelt zöld mikroalga tenyészetek nem mutattak jelentős foszfát eltávolítást. Feltételezhető foszforraktárak megléte (Moudriková és mtsai, 2017), de nagy valószínűséggel

a táptalaj kisebb N:P aránya miatt (Arora és mtsai, 2019) következett be a kismértékű foszfátfelvétel. Mindegyik vizsgált faj sokféle víztestben gyakori (John és mtsai, 2002), így joggal feltételezhető, hogy a mikroalgák közössége fennmaradna mesterséges inokuláció vagy természetes betelepülés után és hatékonyan tudna hozzájárulni a sós szennyvizek remediációjához (Figler és mtsai, 2019).

4.2. A tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) hatása a sótoleranciára

Eredményeink rámutattak arra, hogy a táptalajok nitrát és foszfát tartalmának csekély eltérései (a „tápanyagban gazdag” kategóriában) a N:P arány eltéréseit eredményezik, ami jelentősen eltérő növekedési jellemzőket eredményezhet. Az eredmények azt sugallják, hogy a nagy nitrát tartalom (100 mg/l felett) hasonlóan nagy foszfát-koncentráció mellett (kicsi N:P arányt eredményezve) nem a legkedvezőbb feltétel a *C. morus* zöldalgának. A vizsgált izolátum halotoleráns fajnak tekinthető, hisz figyelemre méltó növekedést mutat 1 000 mg/l NaCl koncentrációig. Úgy tűnik, hogy a nagyobb tápanyagtartalom hozzájárul a nagyobb halotoleranciához.

A *C. morus* tápanyagtartalomtól és N:P aránytól függetlenül képes eltávolítani a klorid-ionokat, a nagyobb tápanyagtartalom azonban kedvezőbbnek tűnt a folyamat számára.

A nitrát- és foszfátfelvétel esetében megállapítható, hogy ezeket a fiziológias folyamatokat a vizsgált tartományban a NaCl tartalom közvetlenül nem befolyásolja, ami tovább igazolja a faj halotoleranciáját. Az izolátum jelentős mértékű nitrátot távolított el a különböző tápanyagtartalmú és N:P arányú táptalajokból különböző sókoncentrációk mellett. A nagy N:P arány kedvez a foszfát eltávolításnak, amit a növekvő NaCl koncentráció jobban gátolt, mint a nitrátfelvételt.

Összességében elmondható, hogy viszonylag nagyobb tápanyagtartalom és kedvező (5 vagy annál nagyobb) N:P arány mellett egy olyan gyakori zöldalga faj, mint a *C. morus*, jelentősen javítani tudná a szennyvíz minőségét. Az eljárás során előállított biomassza összetételének vizsgálata rávilágíthat a faj további felhasználásának előnyeire is (pl.: gyógyszeripar, biodízel előállítás).

4.3. A szalinitás életciklusra gyakorolt hatásai

4.3.1. A különböző sókoncentrációk hatása a *Haematococcus pluvialis* életciklusára

Eredményeink alapján elmondható, hogy a tenyészetek növekedésének mértéke a sókoncentráció növekedéssel párhuzamosan folyamatosan csökkent, azaz a növekvő sókoncentráció egyre erősebben gátolta a tenyészetek növekedését. A vegetatív sejtek számát vizsgálva az eredmények azt mutatták, hogy 4. napról a 11. napra nagymértékben csökkent az 50%-os növekedésgátlást okozó NaCl-koncentráció, amely arra utal, hogy a vegetatív sejtek kevésbé toleránsak nagy sókoncentrációk jelenlétében.

A só okozta stressznek köszönhetően megkezdődött a vegetatív sejtek cisztává alakulása, azok száma folyamatosan emelkedett 1 000 mg/l NaCl-koncentrációig. A növekvő sókoncentráció a karotinoidok felhalmozását indukálta a cisztákban, azaz a NaCl hozzáadásával növelt szalinitás a fajra jellemző védelmi mechanizmusokat indukálja, azok természetes lejátszódását nem akadályozza meg. Az 1 000 mg/l-től nagyobb NaCl-koncentrációk további ciszták képződését nem indukálták, melynek oka valószínűleg az, hogy a nagyobb NaCl-koncentrációk a vegetatív sejtek pusztulását eredményezték.

Habár a vezetőképesség csökkenésének mértéke csökkent a NaCl-koncentráció emelésével, a vizsgált *H. pluvialis* izolátum még így is képes volt nagy mennyiségű ion eltávolítására azokból a tenyészetekből is, amelyekben nagy volt a kezdeti sókoncentráció.

Még a nagy sókoncentrációk ellenére is jelentős mértékű volt a tenyészetek nitrát, illetve foszfát eltávolítása, amely eredmények azt sugallják, hogy a vizsgált izolátumot megfelelően lehetne alkalmazni különféle alternatív szennyvíztisztítási folyamatok során.

5.3.2. A kiszáradás hatásai a *Haematococcus pluvialis* életciklusára

A kiszáradó tenyészetek térfogatának csökkenése mellett az egyre nagyobb klorid-koncentrációk bizonyították a betöményedés folyamatát; ugyanakkor a betöményedés mértéke a klorid tartalom

alapján nem kifejezetten kiemelkedő (maximális mértéke a 250 mg/l NaCl kezelésnek felel meg).

A betöményedés szignifikáns emelkedésével, illetve a térfogat csökkenésével egyidőben következik be a fő tápanyagok, a nitrát és a foszfát kimerülése. Habár az abszolút kontroll tenyészetek térfogatpótlása tápoldattal történt, a sejtek a pótolta tápanyagokat azonnal felvehették. Ez magyarázza, hogy a kontroll és a kiszáradó tenyészetek mellett az abszolút kontroll tenyészetekben is elfogyott az összes foszfát a 4. napra, illetve az összes nitrát a 7. napra. Ezt követően a tápanyaghiány (foszfát és nitrát) indukálta a vegetatív sejtek cisztákká alakulását. A teljesen érett, vörös ciszták korábban jelentek meg a kiszáradó tenyészetekben a kontroll tenyészetekhez képest, illetve nagyobb arányban voltak jelen, mint a kontroll és az abszolút kontroll tenyészetekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a kiszáradás a tápanyaghiány mellett egy további környezeti stressz volt a jelen kísérleti beállításban, amely a ciszták érését, a karotinoidok felhalmozódását indukálta.

Összességében elmondható, hogy egyes zöldalgák a jelentősebb sókoncentrációk túlélésére képesek vegetatív állapotban. Meglepő, hogy a tanulmányozott édesvízi fajok a *Haematococcus pluvialis* kivételével sótoleránsnak tekinthetők. A szárazföldi környezetben is gyakran előforduló izolatumok (*Chlorococcum* sp.; *Chlorella sorokiniana* és *C. vulgaris*; John és mtsai, 2002) nagyobb sótoleranciája ellenben várható volt. Az édesvízi, sótoleráns taxonok a klorid (és minden valószínűség szerint a nátrium) felhalmozásával próbálják biztosítani az ozmotikus egyensúlyt. A toleránsabb, „terresztris” taxonokra nem jellemző a kloridfelhalmozás, vélhetően intenzív transzportfolyamatok felelősek az ozmotikus egyensúly biztosításáért (Fraghl és mtsai, 2015). Ezen tulajdonságok ismerete kulcsfontosságú lehet alternatív szennyvíztisztító eljárások kidolgozása során.

A *Haematococcus pluvialis* merőben más stratégiát képvisel: vegetatív állapotban érzékeny a szalinitás emelkedésére, a folyamat kitartó képletek, ciszták képződését indukálja (Spencer, 1989; Borowitzka és mtsai, 1991; Boussiba és Vonshak, 1991). Meg kell jegyezni, hogy a vegetatív sejtek nagyon intenzív tápanyag (nitrát és foszfát) felvétellel jellemezhetők, így nehéz eldönteni, hogy a

cisztásodás folyamatának mely környezeti változás az elindítója. A karotinoid-felhalmozást mutató zöld-vörös, illetve vörös ciszták nagyobb arányú, illetve korábbi megjelenése azonban egyértelműen igazolja, hogy a hasonló stratégiát képviselő algák cisztaképzéssel, és a túlélést biztosító anyagcseretermékek felhalmozásával élik túl a kedvezőtlen időszakot. Ez a tulajdonság a hatékony tápanyag-eltávolítás mellett jelentősen növelheti az alternatív szennyvíztisztítási eljárás során termelődő biomassa értékét.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az algák sótűrő és sótolanító képességének vizsgálatával kapcsolatban az új tudományos eredmények a következők:

- Bizonyítást nyert, hogy a változatos élőhelyeken előforduló, közönséges zöldalgák általánosságban széles só-toleranciával jellemezhetők, sótűrőnek tekinthetők.

- Kimutattuk, hogy a szárazföldi környezetben is gyakran megjelenő *Chlorella* és *Chlorococcum* fajok nagyobb sótoleranciával jellemezhetők, mint a főleg édesvízi élőhelyeken előforduló fajok.

- A sótolerancia és a vezetőképesség csökkentése, valamint a kloridfelhalmozás között nincs egyértelmű összefüggés. A szárazföldi környezetben is jellemzően előforduló fajok sótűrésének hátterében nem az ionfelhalmozás áll.

- a nitrát és foszfát felvételét a sókoncentráció közvetlenül nem befolyásolja, csak közvetetten, a növekedés gátlásán keresztül.

A tápanyagtartalom (nitrát és foszfát) hatása a sótoleranciára témához kapcsolódó új tudományos eredmények a következők:

- A kis N:P arány nagy tápanyagtartalom mellett sem kedvező a zöldalgák növekedésének, ugyanakkor a nagy tápanyagtartalom javítja a sótoleranciát.

- A nagy tápanyagtartalom kedvezően befolyásolja a kloridfelhalmozást.

- A N:P arány egyértelműen hatással van a foszfát eltávolítás mértékére: a nagy N:P arány kedvez a hatékony foszfát-eltávolításnak.

A szalinitás életciklusra gyakorolt hatásaival kapcsolatban az alábbi új tudományos eredmények fogalmazhatók meg:

- A NaCl hozzáadásával növelt szalinitás az általános védelmi mechanizmusokat indukálja a *Haematococcus pluvialis* zöldalgában: megindul a cisztaképzés és az astaxanthin-felhalmozás.

- A kis mértékben felvételre kerülő ion (jelen esetben klorid) mennyiségének mérése alkalmas a térfogatcsökkenés során bekövetkező betöményedés (szalinitás-növekedés) igazolására.

- A növekvő szalinitás mellett a nitrát és a foszfát gyors kimerülése, valamint a térfogatcsökkenés és ezzel együtt az „élőhely” fényviszonyainak megváltozása azok a fő környezeti tényezők, amelyek a cisztaképzést és az anyagcseretermék-felhalmozást indukálják.



Nyilvántartási szám: DEENK/378/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Figler Aida
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10073137

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Figler, A.**, Márton, K., B-Béres, V., Bácsi, I.: Effects of Nutrient Content and Nitrogen to Phosphorous Ratio on the Growth, Nutrient Removal and Desalination Properties of the Green Alga *Coelastrum morus* on a Laboratory Scale.
Energies. 14 (8), 1-16, 2021. ISSN: 1996-1073.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/en14082112>
IF: 3.252
2. **Figler, A.**, B-Béres, V., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates.
Water. 11, 1-17, 2019. EISSN: 2073-4441.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w11122527>
IF: 2.544





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

3. Tumurtooo, U., **Figler, A.**, Korponai, J., Sajtos, Z., Grigorszky, I., Berta, C., Gyulai, I.: Density and Diversity Differences of Contemporary and Subfossil Cladocera Assemblages: A Case Study in an Oxbow Lake.
Water. 14 (14), 1-14, 2022. EISSN: 2073-4441.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w14142149>
IF: 3.53 (2021)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,326

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,796

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.07.29.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Salt tolerance and desalination abilities of green
microalgae**

by Aida Figler

Supervisor: Dr. István Bácsi



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2022

1. INTRODUCTION

In recent years, one of the most important environmental problems at the global level is the decrease in the amount of freshwater resources and the gradual deterioration of their quality. Increasing amounts of wastewater with high salt concentration contribute to the decreasing quality. The purification of these wastewaters is a complicated task for professionals working in the field. Such wastewaters cannot be entered into surface waters or general wastewater treatment systems without pretreatment (Hárs, 2006). The reason is that the high salinity can significantly change the water quality of the recipient water body and the species composition of its living community, and it can cause serious damage to the biological, as well as the physical and chemical steps of the wastewater treatment.

Desalination of wastewater can also be accomplished by relatively cheap methods such as dilution (adding rainwater to storage ponds) or precipitation (adding lime or soda lime; Bayer, 1985). Physical and chemical treatment of salty wastewater can also take place (distillation, vacuum evaporation, ion exchange, electrodialysis, reverse osmosis), but these procedures are usually extremely expensive (Hárs, 2006; Takács and Nagy, 2009). At the same time, various biological methods are increasingly coming to the fore, in which macro- (aquatic plants; Arámburo-Miranda and Ruelas-Ramírez, 2017) and microorganisms (bacteria or algae; Yao et al., 2013; Kokabian et al., 2018; Sahle-Demessie et al. et al., 2019) are used.

Several studies have already shown that microalgae can be properly used to treat wastewater from different origins (Abdel-Raouf et al., 2012). They can remove a wide range of pollutants (Delrue et al., 2016), and some microalgae can tolerate or even reduce water salinity (Gan et al., 2016). At the same time, domestic, agricultural, and industrial wastewater can show significant differences in their composition. During wastewater treatment with algae, the non-optimal quantity and ratio of nutrients can inhibit the efficiency of the process. As a result, it is necessary to determine and adjust the appropriate nutrient content and their ratio for effective wastewater treatment.

In addition to anthropogenic effects, the increased evaporation caused by climate change and the resulting drying out also contribute to the concentration of natural waters. Organisms can adapt to dehydration as an environmental effect in many ways. The formation of non-motile cysts is common among several groups of algae (Ellegaard and Ribeiro, 2018). Investigating the cyst formation processes of individual algal species and their induction possibilities can contribute to the general understanding of cyst formation processes, thus helping to predict the direction of changes in phytoplankton communities caused by global environmental effects such as climate change.

2. OBJECTIVES

During the biological treatment of wastewater with algae, it is useful to take into account that the use of algae species native to the given area will probably be more effective than the use of species from other habitats (e.g. tropical ones) for this purpose. In Hungary all surface water belongs to the category of "freshwater" except soda lakes, so one of the goals was to study nine common freshwater green algae maintained in the algae collection of the Department of Hydrobiology of the University of Debrecen and investigate their salt tolerance and desalination abilities. During our work, we were looking for answers to the following questions:

- How do the applied salt concentrations affect the growth of cultures? Can species that also occur frequently in terrestrial habitats (*Chlorella* spp. and *Chlorococcum* sp.) have a higher salt tolerance than species that are mainly native to freshwater habitats?
- To what extent are algae able to reduce the conductivity and salinity of the culturing medium? To what extent is the reduction related to the salt tolerance of the species used?
- To what extent can the tested species reduce the nutrient load of waters, especially their nitrate and phosphate content at different salt concentrations? Are the more tolerant species able to reduce the nutrient content of the medium to a greater extent than the less

tolerant species at high salt concentrations (e.g. 1 000 or 10 000 mg/l NaCl)?

Based on the literature, it is known that unfavorable nitrogen:phosphorus (N:P) ratios and large amounts of nutrients can result in limited nutrient removal and reduced growth, thus reducing the efficiency of wastewater treatment. Based on this, the next goal was to study the cultures of the common freshwater green alga, *Coelastrum morus* treated with different salt concentrations from the viewpoint of which nutrient content and N:P ratios support the most efficient growth and nutrient removal. In this part of our work, we were looking for answers to the following questions:

- What effect does the increase in salt concentration have on the growth of cultures when using media with different nutrient content and N:P ratios?
- How does the conductivity and chloride content of the medium change depending on the nutrient content and the N:P ratio?
- What differences can be observed in the nutrient removal of the used species with different nutrient content and N:P ratios?

In order to understand how increasing salinity can affect the members of phytoplankton communities, we used a cyst-forming green alga, *Haematococcus pluvialis*, to study the differences in the growth of cultures, the proportions of cell types, and the composition of culturing medium under different salt concentrations and conditions simulating drying out. During this part of the work, we were looking for answers to the following questions:

- How do changes in salt concentration and drying out affect the cell numbers in the cultures?
- How does the proportion of different cell types change during the experiments?
- To what extent can the used species reduce the conductivity and salinity of the culturing medium at different salt concentrations?

- What changes can be observed in the chloride content of the culturing medium and to what extent does the volume of the cultures decrease during drying out? Will an increase in the concentration of the culturing medium be observed?
- What changes can be observed in the nitrate and phosphate content of the cultures under different salt concentrations and conditions simulating drying out?

3. MATERIAL AND METHOD

3.1. Strains used in the experiments

During the experiments, we used isolates maintained in the algae collection of the Department of Hydrobiology of the University of Debrecen, which were isolated from aquatic habitats in Hungary. During the investigating the salt tolerance and desalination abilities of algae, we used isolates of the unicellular *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp., *Monoraphidium komarkovae*, and *Monoraphidium pusillum*, and the coenobial *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus spinosus*, *Scenedesmus obliquus*, and *Scenedesmus obtusus*. During the study of the effects of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance, we used the coenobial green alga *Coelastrum morus*. The *Haematococcus pluvialis* isolate was used as a model to investigate the effects of osmotic stress induced by salinity and drying out on the life cycle of algae.

3.2. Experimental setup and implementation of the experiments

3.2.1. Studying the salt tolerance and desalination abilities of algae

The experiments were performed with nine microalgae species in Bold's Basal medium (BBM; CCAP Media Recipes A), in a final volume of 50 ml, under 10 hours dark and 14 hours light (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) cycles, at 24°C, in shaken cultures. The duration of the experiment was 14 days.

A stock solution containing 300 g/l NaCl was used to adjust the applied salt concentrations (500 – 20 000 mg/l). Control cultures did not

contain added NaCl. During the experiments, we also used so-called "negative control" compositions (culturing medium + salt, without algae) to determine the exact initial conductivity and chloride content and to be able to correct the results measured in the cultures with the results measured in the compositions without algae.

3.2.2. Effect of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance

During the experiments, we used two common media, Bold's Basal medium (BBM; CCAP Media Recipes A) and Jaworski medium (JAW; CCAP Media Recipes B), as well as their modified versions. The experiments were carried out in a final volume of 50 ml, under 10 hours dark and 14 hours light ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) cycles, at 24°C , in shaken cultures. The duration of the experiment was 14 days.

The salt tolerance and desalination ability of the *C. morus* strain was tested in the same way as the experiment with 9 algal species, using salt concentrations of 500, 1 000, 5 000, and 10 000 mg/l in the four different media.

3.2.3. The effects of salinity on the life cycle

3.2.3.1. The effect of different salt concentrations on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*

The experiments were carried out in steril air bubbled cultures with Optimized Haematococcus medium (OHM; Fábregas et al., 2000) in a final volume of 200 ml, under 10 hours dark and 14 hours light ($80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) cycles, at 24°C . The duration of the experiment was 11 days.

The following salt concentrations were used during the experiments: 100, 250, 500, 1 000, 2 000, 3 000, and 4 000 mg/l, which were adjusted by adding NaCl stock solution (300 g/l). Control cultures did not contain added NaCl. In this experiment, we also used a negative control (nutrient solution + salt, without algae) to determine the exact initial conductivity and chloride content and to be able to correct the

results measured in the cultures with the results measured in the compositions without algae.

3.2.3.2. Effects of drying out on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*

The experiments were carried out in steril air bubbled cultures in OHM medium, with 50 ml initial volume, in 10 hours dark and 14 hours light ($80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) cycles, at 24°C. The duration of the experiment was 16 days.

In this experiment, we used three differently treated setups: absolute control, control, and drying out cultures. In the case of the absolute control cultures, the amount of liquid lost as a result of evaporation during the culture was refilled with OHM medium every two days (to 50 ml). In turn, the volume refilled of the control cultures was done by refilling with distilled water. In the case of drying cultures, the lost liquid was not refilled, as the purpose of our experiment was to investigate the effects of dehydration.

3.3. Measuring the growth of cultures

The growth of the cultures was followed by counting the cells and coenobia (European Standard EN 15204). For this purpose, 200 μl samples were taken from the cultures every two days and preserved with formaldehyde (5% final concentration). Cell/coenobium numbers were counted from 10 μl samples in a Bürker chamber using an Olympus BX50F-3 microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 400 \times magnification.

During the investigation of salt tolerance and desalination abilities of algae, the effects of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance, and the effects of different salt concentrations on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*, effective NaCl concentrations causing 50% growth inhibition (EC_{50} values) were calculated. The extent of growth inhibitions (in percentage, compared to the control) were plotted as functions of NaCl concentrations. Trend lines were fitted to the resulting curves (quadratic correlation), then the

concentrations causing 50% inhibition were calculated using the equations of the trend lines (quadratic equations).

3.4. Measurement of changes in conductivity, chloride, and nutrient content (nitrate and phosphate).

At the end of the experiments (on the 11th and 14th days), the cultures were centrifuged (Beckman Avanti J-25, Beckman Industries Inc., Fullerton, California, USA), and then the conductivity, chloride, nitrate, and phosphate contents were measured from the cell-free supernatants. The only exception was the experiment investigating the effects of drying out on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*, where an absolute control, control and drying out culture were centrifuged on every two days (Multifuge X4R Pro, Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz, Germany), and then the chloride, nitrate and phosphate contents were measured from the cell-free supernatants.

3.4.1. Measurement of conductivity

Conductivity was measured with a Hach Lange HQ30d portable multimeter (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany) using an Intellical™ CDC401 conductivity measuring electrode (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany). The extent of the decrease in conductivity on the last day was given as percentage, the initial values were considered 100%.

3.4.2. Measurement of chloride content

The amount of NaCl uptake was calculated by measuring the chloride content of the media, which was performed by precipitation titration (Németh, 1998), using a silver nitrate measuring solution. The amount of chloride was calculated using the formula given in the method. The measurements were carried out using 12,5 ml (control, 100 – 1 000 mg/l NaCl) and 1 ml (2 000 – 20 000 mg/l NaCl) of the supernatant. The extent of decrease of the chloride content by the last

day was given as percentage, the initial values were considered as 100%.

The only exception was the experiment investigating the effects of drying out on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*, in which the chloride content was measured from the total amount of the supernatants to confirm the increasing concentration of the cultures, and the results were given in mg/l on each sampling day.

3.4.3. Measurement of nutrient content (nitrate and phosphate).

Nitrate and phosphate content were measured using spectrophotometric methods. In the case of nitrate, the salicylic acid - colorimetric method (MSZ 1484-13: 2009) was used, and the acidic phosphorus-molybdate method (MSZ EN ISO 6878: 2004) was used to measure the phosphate content. The extent of reduction of nitrate and phosphate content by the last day was given as percentage, the initial values were considered 100%. The only exception to this was the experiment investigating the effects of drying out on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*, where the results were given in mg/l on each sampling day.

3.5. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates; average values and standard deviations were calculated. During the studying of the salt tolerance and desalination abilities of algae, and the effects of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance, the differences between the trends of the growth curves in the control and treated cultures were analyzed using a one-way analysis of covariance (ANCOVA; Zar, 1996; Hammer et al., 2001). In the experiments dealing with the effects of salinity on the life cycle, the differences in the growth of the cultures over time, and the growth and cell type ratio between the different treatments on each sampling day were determined by one-way analysis of variance (ANOVA).

The extent of conductivity reduction (%), chloride and nutrient removal (%), as well as the chloride and nutrient content (mg/l) in the

experiment investigating the effect of drying out, were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). To determine whether the conductivity, chloride- and nutrient content changed significantly during the experiments dealing with the salt tolerance and desalination abilities of algae, the effects of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance, and the effects of different salt concentrations on the life cycle of *Hameatococcus pluvialis*, the results of the zero and the last day were compared with paired t-test.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Studying the salt tolerance and desalination abilities of algae

All of the studied nine green microalgae isolates can be considered as salt-tolerant, as they were able to grow even in high salt concentrations (e.g.: 1 000 - 10 000 mg/l). The species *Chlorella* and *Chlorococcum*, which often appear in terrestrial environments, seem to have higher salt tolerance than that of the species mainly inhabiting freshwater habitats.

Regarding the conductivity-decreasing ability of the cultures, the treated cultures that were inhibited in their growth showed significant ion accumulation in the case of the most studied isolates, which means that all of them might contribute to decreasing the chloride content as well. The slight decrease of conductivity and chloride removal of the more tolerant, “terrestrial” isolates may be explained by the possibility that in these cases ion exchange mechanisms might be more prevalent than ion accumulation (Fraghl et al., 2015).

The extent of the nitrate removal only decreased significantly at NaCl concentrations of 5 000 mg/l and above, but even in these cases the amount of removed nitrate was remarkable. In solutions with higher concentrations the inhibition of nitrate removal was clearly correlated with the decreased cell numbers due to inhibition of the cultures growth (fewer cells take up less nutrients). The green algae cultures cultured in Bold’s Basal medium (BBM; N:P = 1.7) did not show significant phosphate removal. The existence of intracellular phosphorus pools may be possible (Moudriková et al., 2017), but a more likely reason is

the low extent of phosphate uptake due to lower N:P ratio of the medium (Arora et al., 2019).

All of the studied species are widespread in a wide variety of water bodies (John et al., 2002), which allow us to assume that following artificial inoculation or natural inhabitation, the community of microalgae would survive and could be efficient in remediation of salty wastewaters (Figler et al., 2019).

4.2. The effect of nutrient content (nitrate and phosphate) to salt tolerance

Our results showed that the slight differences in the nitrate and phosphate content of media (in the “nutrient-rich” category) result in the N:P ratio differing, which can lead to significantly different growth characteristics. The results suggest that high nitrate content (above 100 mg/l) alongside a similarly high phosphate content (resulting in a low N:P ratio) creates less than ideal conditions for the *C. morus* green alga. The studied isolate can be considered as halotolerant, as it shows remarkable growth in media up to 1 000 mg/l NaCl concentrations. It seems that higher nutrient contents support higher halotolerance.

C. morus is capable of removing chloride ions independently of nutrient content and N:P ratio, however, higher nutrient content seemed to be more favourable for the process.

In case of phosphate- and nitrate-uptake it can be stated that these physiological processes are not directly affected by the NaCl content in the studied range, which further confirms the halotolerance of the species. The isolate removed a remarkable amount of nitrate from media with different nutrient contents and N:P ratios with different salt concentrations. High N:P ratios promote phosphate removal, which was more inhibited by the increasing NaCl concentration than nitrate uptake.

In conclusion, a widespread green alga species such as *C. morus* could considerably improve the quality of wastewaters under relatively high nutrient content and adequate (5 or higher) N:P ratio. Detailed analyses of the composition of the biomass produced during the procedure might highlight the benefits of further application of the species (e.g.: pharmaceutical industry, biodiesel production).

4.3. Effects of salinity on life cycle

4.3.1. Effects of different salt concentrations on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*

According to our results it can be stated that the growth of the cultures decreased in accordance with the increasing salt concentration, i.e. increasing salt concentration more and more strongly inhibited the growth of the cultures. The vegetative cell number changes show that EC₅₀ values decreased substantially from day 4 to day 11, suggesting that vegetative cells are less tolerant to high salt concentrations.

Due to the stress caused by salt, vegetative cells transformed into cysts, their number continuously increased up to 1 000 mg/l NaCl. The increasing salt concentration induced carotenoid accumulation in the cysts, which means the salinity increase due to added NaCl induces species-specific defence mechanisms, it does not prevent to complete the natural process. NaCl concentrations above 1 000 mg/l did not induce further cyst formation, which may be due to the destruction of vegetative cells.

Even though the extent of conductivity decrease was lower at higher NaCl concentrations, the studied *H. pluvialis* isolate was still able to remove a remarkable amount of ions even from cultures with high initial salt concentrations.

Regardless of high salt concentrations, the nitrate- and phosphate-removal of the cultures was significant, which results suggest that the studied isolate might be suitable for use in alternative wastewater-treatment procedures.

4.3.2. Effects of drying out on the life cycle of *Haematococcus pluvialis*

Alongside the decreasing volume of the drying out cultures, the higher chloride concentrations have proven the process of increasing concentration; at the same time, the degree of this process was not particularly outstanding based on the chloride content (its maximum degree corresponds to the 250 mg/l NaCl treatment).

The main nutrients, nitrate and phosphate, are depleted at the same time as the concentration increases significantly and the volume decreases. Although the maintenance of culture volume of the absolute control cultures was done by adding culturing medium, the cells were capable of immediately absorbing the replaced nutrients. This explains why the absolute control cultures also removed all phosphate by day 4, and all nitrate by day 7, similarly to the control and to the drying out cultures. After this, the absence of nutrients (phosphate and nitrate) induced transforming vegetative cells into cysts. The fully mature, red cysts appeared sooner in the drying out cultures than in the control cultures, and their proportion was higher than in the control and absolute control cultures. These results suggest that drying out is an additional environmental stress together with the absence of nutrients in the current experimental settings, which induced the maturing of cysts and carotenoid accumulation.

Overall, it can be said that certain green algae are able to survive higher salt concentrations in their vegetative state. Surprisingly, all studied freshwater species can be considered as halotolerant ones, except *Haematococcus pluvialis*. The salt tolerance of isolates often found in terrestrial habitats (*Chlorococcum* sp.; *Chlorella sorokiniana* and *C. vulgaris*; John et al., 2002) was according to expectations. The salt-tolerant freshwater taxa attempt to uphold their osmotic balance by accumulating chloride (and most likely sodium). Chloride accumulation is not typical for more tolerant „terrestrial” species, their osmotic balance might be held up by intensive transport processes (Fraghl et al., 2015). Knowledge of these attributes may be crucial for developing alternative wastewater-treatment procedures.

Haematococcus pluvialis represents a very different approach: it is sensitive to the increase in salinity in its vegetative state, the process induces forming dormant state, i.e. cysts (Spencer, 1989; Borowitzka et al., 1991; Boussiba and Vonshak, 1991). It is also important to mention that the vegetative cells can be described with highly intensive nutrient (nitrate and phosphate) uptake, which makes it hard to point out, which environmental change initiates the process of cyst formation. However, the sooner appearance and higher proportion of green-red and red cysts indicating carotenoid accumulation proves that algae with similar

strategies survive adverse conditions by forming cysts and accumulating nutrients that ensure survival. This characteristic along with the effective nutrient removal might greatly increase the value of the biomass produced during alternative wastewater-treatment procedures.

5. NEW SCIENTIFIC RESULTS

The new scientific results regarding the salt tolerance and desalination abilities of algae are as follows:

- It has been proven that common green algae occurring in diverse habitats can generally be characterized by a broad salt tolerance and can be considered salt-tolerant.
- It was shown that *Chlorella* and *Chlorococcum* species, which often appear in terrestrial environments, can be characterized by higher salt tolerance than species that occur mainly in freshwater habitats.
- There is no clear correlation between salt tolerance and reduction of conductivity and chloride accumulation. The salt tolerance of species typically found in terrestrial environments is not based on ion accumulation.
- The uptake of nitrate and phosphate is not directly affected by the salt concentration, only indirectly, through inhibition of growth.

The new scientific results related to the effect of nutrient content (nitrate and phosphate) on salt tolerance are as follows:

- A low N:P ratio is not favorable for the growth of green algae even with high nutrient content, but at the same time, a high nutrient content improves salt tolerance.

- The high nutrient content has a favorable effect on chloride accumulation.

- The N:P ratio has a clear effect on the extent of phosphate removal: a high N:P ratio favors to efficient phosphate removal.

Regarding the effects of salinity on life cycle, the following new scientific results can be described:

- Salinity increased by the addition of NaCl induces general defense mechanisms in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cyst formation and astaxanthin accumulation.

- Measuring the amount of ion (in this case chloride) that is taken up in a small extent is suitable for confirming the increasing concentration (increase in salinity) that occurs during the volume reduction.

- In addition to the increasing salinity, the rapid depletion of nitrate and phosphate, as well as the decrease in volume and with this, the change in the light conditions of the "habitat", are the main environmental factors that induce cyst formation and the accumulation of metabolic products.



Registry number: DEENK/378/2022.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Aida Figler
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences
MTMT ID: 10073137

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Figler, A.**, Márton, K., B-Béres, V., Bácsi, I.: Effects of Nutrient Content and Nitrogen to Phosphorous Ratio on the Growth, Nutrient Removal and Desalination Properties of the Green Alga *Coelastrum morus* on a Laboratory Scale.
Energies. 14 (8), 1-16, 2021. ISSN: 1996-1073.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/en14082112>
IF: 3.252
2. **Figler, A.**, B-Béres, V., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, S. A., Bácsi, I.: Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates.
Water. 11, 1-17, 2019. EISSN: 2073-4441.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w11122527>
IF: 2.544





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (1)

3. Tumurtogoo, U., **Figler, A.**, Korponai, J., Sajtos, Z., Grigorszky, I., Berta, C., Gyulai, I.: Density and Diversity Differences of Contemporary and Subfossil Cladocera Assemblages: A Case Study in an Oxbow Lake.
Water. 14 (14), 1-14, 2022. EISSN: 2073-4441.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/w14142149>
IF: 3.53 (2021)

Total IF of journals (all publications): 9,326

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 5,796

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

29 July, 2022



6. IRODALOMJEGYZÉK/REFERENCES

- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM (2012) Microalgae and wastewater treatment. Saudi J. Biol. Sci. 19:257–275.
- Arámburo-Miranda IV, Ruelas-Ramírez EH (2017) Desalination of sea water with aquatic lily (*Eichhornia crassipes*). Environ. Sci. Pollut. Res. 24:25676–25681.
- Arora N, Laurens LML, Sweeney N, Pruthi V, Poluri KM, Pienkos PT (2019) Elucidating the unique physiological responses of halotolerant *Scenedesmus sp.* cultivated in sea water for biofuel production. Algal Res. 37:260–268.
- Bayer A (1985) A többcélú hévízhasznosítás vízminőségi kérdései. Hidr. Közl. 4:247–252.
- Borowitzka MA, Huisman JM, Osborn A (1991) Culture of astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. I. Effects of nutrients on growth and cell type. J. Appl. Phycol. 3:295–304.
- Boussiba S, Vonshak A (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol. 32:1077–1082.
- CCAP Media Recipes A. <https://www.ccap.ac.uk/media/documents/BB.pdf> (2021. február 5.).
- CCAP Media Recipes B. <https://www.ccap.ac.uk/media/documents/JM.pdf> (2021. február 5.).
- Delrue F, Álvarez-Díaz PD, Fon-Sing S, Fleury G, Sassi JF (2016) The environmental biorefinery: Using microalgae to remediate wastewater, a win-win paradigm. Energies 9:132.
- Ellegaard M, Ribeiro S. (2018) The long-term persistence of phytoplankton resting stages in aquatic 'seed banks'. Biol. Rev. Camb. Philos. 93:166-183.
- Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Appl.: Microbiol. Biotechnol. 53:530–535.
- Figler A, B-Béres V, Dobronoki D, Márton K, Nagy SA, Bácsi I (2019) Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. Water 11:2527.
- Fraghl AM, Shaddad MAK, Galal HR, Hassan EA (2015) Effect of salt stress on growth, antioxidant enzymes, lipid peroxidation and some metabolic activities in some freshwater and marine algae. Egypt. J. Bot. 55:1–15.
- Gan, X, Shen G, Xin B, Li M (2016) Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. Desalination 400:1–6.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software

- package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:9.
- Hárs, T (2006) A termálvizek környezetterhelési és gazdasági hatásai. PhD Disszertáció, Szent István Egyetem, Gödöllő, HU.
- John, DM, Whitton, BA., Brook, AJ (eds.) (2002) The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kokabian B, Ghimire U, Gude VG (2018) Water deionization with renewable energy production in microalgae — Microbial desalination process. *Renew. Energy* 122:354–361.
- Moudriková S, Sadowsky A, Metzger S, Nedbal L, Mettler-Altmann T, Mojzeš P (2017) Quantification of polyphosphate in microalgae by Raman microscopy and by a reference enzymatic assay. *Anal. Chem.* 89:12006–12013
- Németh, J. (1998) A biológiai vízminősítés módszerei. Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest, HU.
- Sahle-Demessie E, Aly Hassan A, El Badawy A (2019) Bio-desalination of brackish and seawater using halophytic algae. *Desalination* 465:104–113.
- Spencer KG (1989) Pigmentation supplements for animal feed compositions. U.S. Patent No. 4871551.
- Takács J, Nagy S (2009) A termálvíz-hasznosítás környezetvédelmi igénye. *Bányászat* 77:169–180.
- Yao Z, Ying C, Lu J, Lai Q, Zhou K, Wang H, Chen L (2013) Removal of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} from saline-alkaline water using the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 31:1248–1256.
- Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall International, New Jersey, NJ, USA.

6.1. Szabványhivatkozások/Standards

- European Standard EN 15204: Water Quality-Guidance Standard on the Enumeration of Phytoplankton Using Inverted Microscopy (Utermöhl Technique). Online elérhető: <https://standards.itih.ai/catalog/standards/cen/d9020a71-2bd3-478f-867f-46ea3a0c0620/en-15204-2006> (elérhető: 2022. január 24).
- MSZ 1484-13: 2009 Vízminőség. 13. rész: A nitrát- és a nitrattartalom meghatározása spektrofotometriás módszerrel.
- MSZ EN ISO 6878: 2004 Vízminőség. Foszfor meghatározása. Ammónium-molibdenátos spektrometriás módszer (ISO 6878:2004).

7. A JELÖLT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE/SCIENTIFIC ACTIVITY

Az értekezés témájában megjelent közlemények/Publications related to the dissertation (IF:5.796)

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven/Publications published in refereed international journals in a foreign language (English):

Figler A, B-Béres V, Dobronoki D, Márton K, Nagy SA, Bácsi I. (2019) Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. Water 11, 2527: 1-17. IF: 2.544; Q2

Figler A, Márton K, B-Béres V, Bácsi I. (2021) Effects of nutrient content and nitrogen to phosphorous ratio on the growth, nutrient removal and desalination properties of the green alga *Coelastrum morus* on a laboratory scale. Energies 14, 2112: 8. IF: 3.252; Q2

Nemzetközi konferenciák, poszterek/International conferences, posters:

Figler A, Bácsi I (2018) *Chlorella* fajok sótoleranciájának és sótelenítő képességének vizsgálata/ Study of the salt tolerance and desalination capacity of *Chlorella* species. 19. Kolozsvári Biológus Napok, 2018. április 13-14., Kolozsvár, Románia.

Figler A, Bácsi I (2018) Effects of different salt concentrations on growth, chloride-, phosphate- and nitrate-uptake of *Chlorella* species. Scientific conference for student and high school teachers, 2018. May 25., Oradea, Romania.

Figler A, Gácsi M, Fekete BR, Kerekes D, Bácsi I (2019) Salt tolerance

of common green algae – possible economical benefits. 7th European Phycological Congress, 2019. August 25-30., Zagreb, Croatia.

Figler A, Márton K, Bácsi I (2022) Salinity stress and encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. International Conference of Students and PhD Students „NATURE AND SCIENCE”, 2022. May 20-22., Stana de Vale, Romania.

Hazai konferenciák, poszterek/ Hungarian conferences, posters:

Figler A, Gácsi M (2017) *Chlorella* és *Scenedesmus* fajok sótoleranciájának és sótoleráló képességének vizsgálata. Őszi Tudományos Diákköri Konferencia, 2017. november 24., Debrecen.

Figler A, Gácsi M (2018) *Chlorella* és *Scenedesmus* fajok sótoleranciájának és sótoleráló képességének vizsgálata. Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia, 2018. május 10-12., Budapest.

Figler A, Gácsi M, Fekete BR, Kerekes D, Bácsi I (2019) Édesvízi zöldalgák sótoleranciája. XII. Algológiai találkozó és továbbképzés, 2019. május 9., Budapest.

Figler A, Márton K, Bácsi I (2019) *Coelastrum morus* édesvízi zöldalga foszfáteltávolító képessége sós környezetben. LXI. Hidrobiológus Napok, 2019. október 2-4., Tihany.

Figler A, Márton K, Bácsi I (2021) A *Haematococcus pluvialis* zöldalga cisztaképzése kiszáradás hatására. LXII. Hidrobiológus Napok, 2021. október 6-8., Tihany.

Figler A, Márton K, Bácsi I (2022) Különböző környezeti tényezők

(kiszáradás, sókoncentráció, tápanyagellátás) hatásai a *Haematococcus pluvialis* zöldalga életciklusára. DE Intézményi Konferencia, 2022. január 31., Debrecen.

Egyéb megjelent közlemények/ Other publications (IF:3.530)

Referált folyóiratokban megjelent közlemények idegen (angol) nyelven/Publications published in refereed international journals in a foreign language (English):

Tumurtogoo U, **Figler A**, Korponai J, Sajtos Z, Grigorszky I, Berta C, Gyulai I (2022) Density and diversity differences of contemporary and subfossil cladocera assemblages: A case study in an oxbow lake. *Water* 14:2149. **IF: 3.530; Q1**