

INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Wioleta Ciempiel

OKREŚLENIE WARUNKÓW SYNTEZY, SKŁADU
CHEMICZNEGO I WŁAŚCIWOŚCI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH
POLIMERÓW (EPS) WYTWARZANYCH PRZEZ WYBRANE
JEDNOKOMÓRKOWE GLONY

*Determining of the conditions of synthesis, chemical composition, and properties of
extracellular polymers (EPS) produced by selected unicellular algae.*

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Izabeli Krzemińskiej

oraz

Promotora pomocniczego: dr Magdaleny Czemińskiej

© Wioleta Ciempiel

Lublin 2023

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

data

podpis promotora rozprawy

OŚWIADCZENIE PROMOTORA POMOCNICZEGO ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

data

podpis promotora pomocniczego rozprawy

OŚWIADCZENIA AUTORKI ROZPRAWY

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa doktorska jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Oświadczam również, że w dniu 13.08.2022 zmieniłam nazwisko z Babiak na Ciempiel.

data

podpis autora rozprawy

*Składam serdeczne podziękowania mojej Promotor **dr hab. Izabeli Krzemińskiej** za nieocenioną pomoc podczas realizacji niniejszej rozprawy, oraz za okazaną wyrozumiałość i wsparcie.*

*Dziękuję również mojej Promotor pomocniczej **dr Magdalenie Czemierskiej** za pomoc i wsparcie w prowadzeniu badań, oraz za cenne wskazówki podczas przygotowania rozprawy.*

*Pragnę także złożyć podziękowania wszystkim pracownikom **Zakładu Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych** za pomoc, okazane wsparcie i życzliwą atmosferę pracy.*

Streszczenie

W ostatnich latach rynek produkcji biomasy jednokomórkowych glonów stale się rozwija. Ze względu na zawartość składników odżywczych (białka, węglowodany, lipidy), a także karotenoidów (m. in. astaksantyna i β -karoten), witamin i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (DHA i EPA) biomasa glonów znajduje zastosowanie przede wszystkim w produkcji żywności, suplementów diety i pasz. Ponadto, jednokomórkowe glony syntetyzują również wiele cennych metabolitów, między innymi zewnątrzkomórkowe polimery (EPS), które są następnie wydzielane do podłoża hodowlanego. Fizjologiczną rolą EPS jest ochrona komórek przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Zewnątrzkomórkowe polimery są zróżnicowane pod względem właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych, dlatego celem niniejszej pracy jest prowadzenie badań, które przyczynią się poznania możliwości aplikacyjnych otrzymanych EPS. Kolejnym, ważnym aspektem badań podjętych w ramach rozprawy, jest zagospodarowanie podłoża po hodowli glonów i separacji biomasy. W procesach sorpcji i flokulacji stosowane są często syntetyczne polimery. Z uwagi na coraz większą świadomość zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem, niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych, skutecznych, a przy tym nietoksycznych i biodegradowalnych materiałów o właściwościach sorpcyjnych, które zastąpią stosowane obecnie syntetyczne polimery. Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie koncentrują się na dwóch gatunkach zielenic: *Chlorella vulgaris* i *Parachlorella kessleri* o wysokim potencjale aplikacyjnym wynikającym z wysokiego tempa wzrostu oraz atrakcyjnego składu chemicznego biomasy. Trzecim gatunkiem jest *Vischeria magna* (Ochrophyta), który nie był jak dotąd analizowany w kierunku syntezy EPS, natomiast jest potencjalnym źródłem β -karotenu i kwasów tłuszczowych. W ramach niniejszej rozprawy określono warunki syntezy EPS (źródło azotu, stężenie źródła azotu, natężenie światła, miksotroficzne warunki wzrostu). Następnie określono skład chemiczny EPS otrzymanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych oraz ich właściwości sorpcyjne względem jonów metali ciężkich. Określono wpływ czasu i wartości pH układu na efektywność procesu sorpcji. Oznaczono również aktywność flokulacyjną badanych EPS.

Słowa kluczowe: zewnątrzkomórkowe polimery (EPS), jednokomórkowe glony, sorpcja, kadm, ołów, flokulacja

Abstract

In recent years, the market for the production of microalgae biomass has been developing. The biomass of unicellular algae is used primarily in the production of food, dietary supplements and feed due to the content of nutrients (proteins, carbohydrates, lipids), as well as carotenoids (including astaxanthin and β -carotene), vitamins and polyunsaturated fatty acids (DHA and EPA), the biomass of algae is used primarily in the production of food, dietary supplements and fodder. Moreover, unicellular algae also synthesize many valuable metabolites, including extracellular polymers, which are then secreted into the culture medium. The physiological role of extracellular polymers is to protect cells from adverse environmental conditions. Extracellular polymers are characterized by great diversity in terms of physico-chemical and biological properties, which is why it is important to conduct research that will contribute to the practical application of EPS. Another important aspect of the research undertaken as part of this dissertation is the management of the substrate after algae cultivation and biomass separation. Synthetic polymers are often used in sorption and flocculation processes. Due to the increasing awareness of environmental pollution caused by microplastics, it is extremely important to search for new, effective, and at the same time non-toxic and biodegradable materials that will replace the currently used synthetic polymers with sorption properties. The research presented in this dissertation focuses on two species of green algae: *Chlorella vulgaris* and *Parachlorella kessleri* with high application potential resulting from the high growth rate and attractive chemical composition of the biomass. The third species – *Vischeria magna* (Ochrophyta), which has not been analysed so far for EPS synthesis, however, it is a potential source of β -carotene and fatty acids. As part of this thesis, the conditions for EPS synthesis were determined (nitrogen source, nitrogen source concentration, light intensity, mixotrophic growth conditions). Then, the chemical composition of EPS obtained under autotrophic and mixotrophic conditions and their sorption properties towards heavy metal ions were determined. The influence of time and pH value of the system on the efficiency of the sorption process was determined. The flocculating activity of the tested EPSs was also determined.

Key words: extracellular polymers (EPS), unicellular algae, sorption, cadmium, lead, flocculation

Spis treści

Streszczenie	4
Abstract.....	5
Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	8
Wykaz skrótów	9
1. Wprowadzenie (P.1)	10
1.1. Problematyka.....	10
1.2. Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS).....	11
1.3. Warunki syntezy EPS.....	12
1.4. Organizmy syntetyzujące EPS	13
1.4.1. Bakterie.....	13
1.4.2. Grzyby	15
1.4.3. Glony	15
1.5. Właściwości sorpcyjne EPS.....	19
1.6. Właściwości flokulacyjne EPS	20
1.7. Rola EPS w glebie.....	22
1.8. Zanieczyszczenie środowiska kadmem i ołowiem	22
1.9. Możliwości stosowania EPS w rolnictwie	23
2. Cel pracy i hipotezy badawcze	25
3. Materiały i metody.....	26
3.1. Materiał badawczy	26
3.2. Metody	28
3.2.1. Warunki hodowli glonów	28
3.2.2. Pomiar stężenia biomasy komórkowej	31
3.2.3. Izolacja EPS.....	32
3.2.4 Skład chemiczny EPS	32
3.2.5. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)	35
3.2.6. Właściwości sorpcyjne EPS.....	36
3.2.7. Oznaczanie aktywności flokulacyjnej	37
3.2.8. Pomiar zmian mętności.....	38
3.2.9. Pomiar wielkości cząstek/agregatów	38

3.2.10. Analiza statystyczna	38
4. Wyniki	39
4.1. Selekcja gatunków syntetyzujących EPS	39
4.2. Wpływ wybranych czynników abiotycznych na syntezę EPS.....	40
4.2.1. Źródło azotu.....	40
4.2.2. Stężenie źródła azotu	42
4.2.3. Natężenie światła	44
4.3. Wpływ natężenia światła na skład biochemiczny EPS	46
4.4. Skład chemiczny i właściwości sorpcyjne autotroficznych EPS (P.2.)	49
4.4.1. Skład chemiczny	49
4.4.2. Sorpcja ołowiu i kadmu (ICP-OES)	50
4.4.3. Analiza grup funkcyjnych EPS	50
4.5. Skład chemiczny i właściwości sorpcyjne miksotroficznych EPS (P.3)	52
4.5.1. Wstęp	52
4.5.2. Zawartość cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym.....	53
4.5.3. Wydajność i specyficzna produktywność EPS.....	54
4.5.4. Skład biochemiczny	55
4.5.5. Porównanie widm FTIR EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych	58
4.5.6. Sorpcja ołowiu	59
4.5.7. Analiza grup funkcyjnych EPS (FTIR)	61
4.6. Właściwości flokulacyjne EPS	64
4.6.1. Aktywność autoflokulacyjna EPS syntetyzowanego przez <i>P. kessleri</i>	64
4.6.2. Wpływ pH na aktywność flokulacyjną EPS z <i>P. kessleri</i>	65
4.6.3. Potencjał EPS syntetyzowanych przez <i>P. kessleri</i> , <i>C. vulgaris</i> i <i>V. magna</i> do tworzenia agregatów cząstek stałych.....	67
5. Dyskusja.....	70
6. Wnioski.....	85
7. Bibliografia	87
8. Teksty publikacji.....	100
9. Oświadczenia współautorów	138
10. Życiorys naukowy.....	153

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

P.1. **Babiak W.** (obecnie Ciempiel), Krzemińska I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, 14, 4007.

IF₂₀₂₁: 3,252

MEiN: 140 pkt

P.2. **Ciempiel W.**, Czemińska M., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., Wiącek D., Jarosz-Wilkołazka A., Krzemińska I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities. *Molecules*, 27, 7153.

IF₂₀₂₁: 4,927

MEiN: 140 pkt

P.3. **Ciempiel W.**, Czemińska M., Wiącek D., Szymańska M., Jarosz-Wilkołazka A., Krzemińska I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity.

Tytuł trzeciej publikacji jest tytułem roboczym, gdyż w momencie składania niniejszej rozprawy doktorskiej została ona wysłana do wydawnictwa. Dla wygody manuskrypt ten w dalszej części opisywany będzie jako P.3.

Wykaz skrótów

EPS	zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (ang. <i>Extracellular Polymeric Substances</i>), zewnątrzkomórkowe polimery, egzopolisacharydy
ICP-OES	optyczna spektrometria emisyjna z analizą w indukcyjnie sprzężonej plazmie (ang. <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
PkA	EPS syntetyzowany przez <i>Parachlorella kessleri</i> w warunkach autotroficznych
PkM	EPS syntetyzowany przez <i>Parachlorella kessleri</i> w warunkach miksotroficznych
CvA	EPS syntetyzowany przez <i>Chlorella vulgaris</i> w warunkach autotroficznych
CvM	EPS syntetyzowany przez <i>Chlorella vulgaris</i> w warunkach miksotroficznych
VmA	EPS syntetyzowany przez <i>Vischeria magna</i> w warunkach autotroficznych
VmM	EPS syntetyzowany przez <i>Vischeria magna</i> w warunkach miksotroficznych
rpm	liczba obrotów na minutę (ang. <i>rotation per minute</i>)

1. Wprowadzenie (P.1)

Babiak, W., Krzemińska, I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processe. Energies, 14, 4007.

1.1. Problematyka

Z roku na rok zwiększa się produkcja biomasy glonów na cele przemysłowe. Prognozy rynkowe przewidują wzrost wartości rynku glonów o 10,9% w okresie 2022–2031, z czego 62,8% tego wskaźnika dotyczy jednokomórkowych glonów (Algae Market, Chemicals and Materials, TRMGL14904, 2022, Transparency Market Research, Inc.). Przemysłowa produkcja jednokomórkowych glonów generuje znaczne ilości podłoża pohodowlanego, które najczęściej stanowi odpad (Liu i in., 2016). Ponowne wykorzystanie zużytego podłoża w hodowli glonów jest możliwe, jednak wymaga odpowiedniego przetworzenia, ze względu na wyczerpanie składników mineralnych, pozostałości komórek oraz nagromadzenie metabolitów. Recykling podłoża pohodowlanego jest skuteczną metodą zmniejszenia kosztów produkcji biomasy jednokomórkowych glonów (Fret i in., 2017). Proces ten, choć skuteczny, powoduje jednak utratę cennych metabolitów takich jak polimery zewnątrzkomórkowe (EPS, *extracellular polymers/polymeric substances, exopolysaccharides*), enzymy, kwasy organiczne, lipidy, fitohormony, a także związki allelopatyczne (fitotoksyny) (Liu i in., 2016). Poznanie właściwości badanych EPS oraz warunków ich syntezy, a także określenie ich potencjału aplikacyjnego pozwoli na pełniejsze wykorzystanie hodowli jednokomórkowych glonów. Takie podejście wpisuje się w założenia gospodarki cyrkularnej i zmniejsza obciążenie środowiska. Jednocześnie EPS jako naturalne, nietoksyczne i biodegradowalne polimery, mogą stanowić substytut stosowanych obecnie syntetycznych polimerów, jak na przykład poliakrylamid stosowany jako flokulant (Vandamme i in., 3013). Ponadto EPS, ze względu na liczne właściwości biologiczne, szczególnie przeciwwirusowe, przeciwzapalne i immunomodulujące, a także zdolność do tworzenia hydrożeli, znajdują zastosowanie w rolnictwie, farmacji i medycynie (Raposo i in., 2013; Bhatnagar i in., 2014). Ponadto, dzięki właściwościom konsystencjotwórczym (żelowanie, emulsyfikacja, właściwości

reologiczne) EPS znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym i kosmetycznym (Mota i in., 2020; Silva i in., 2020; Pierre i in., 2019).

1.2. Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS)

Polimery zewnątrzkomórkowe są to metabolity wtórne syntetyzowane między innymi przez jednokomórkowe glony i wydzielane na zewnątrz komórki w odpowiedzi na niekorzystne zmiany warunków środowiska. Biosynteza EPS zachodzi w aparacie Golgiego, przy udziale odpowiednich enzymów, m.in.: transferaz, mutaz, syntaz i dehydrataz (Mazéas i in., 2023). Pierwszym etapem syntezy EPS jest aktywacja monosacharydów (fosforylacja), po czym następuje ich polimeryzacja (tworzenie łańcuchów) przy udziale glikozylotransferaz (Mazéas i in., 2023; Delattre i in., 2016). Utworzone polimery są transportowane za pośrednictwem pęcherzyków transportowych aparatu Golgiego przez siateczkę endoplazmatyczną i błonę komórkową do ściany komórkowej (Cheng i in., 2019), a następnie wydzielane na zewnątrz komórki. EPS tworzą macierz pozakomórkową zwaną również zewnątrzkomórkową materią organiczną. W jej skład, oprócz polisacharydów wchodzi białka, lipidy, kwasy organiczne, kwasy nukleinowe itp. (Liu i in., 2016; Costa i in., 2018). W publikacji **P.1** opisano podział EPS ze względu na oddziaływanie ze ścianą komórkową: niezwiązane ze ścianą komórkową, określane też jako rozpuszczalne w wodzie (*ang. soluble EPS*, S-EPS) luźno związane (*ang. loosely bound EPS*, LB-EPS) oraz ściśle związane ze ścianą komórkową (*ang. tightly-bound EPS*, TB-EPS). Większość EPS to polisacharydy, jednak spotykane są również proteoglikany i glikoproteiny.

Polimery zewnątrzkomórkowe najczęściej zbudowane są z cukrów (1–88%), oprócz tego mogą zawierać białka (1–16%), kwasy uronowe (0–23%), aminokwasy i związki fenolowe (Halaj i in., 2018; Trabelsi i in., 2016). EPS syntetyzowane przez jednokomórkowe zielenice są najczęściej heteropolisacharydami, zawierającymi różne monosacharydy, głównie galaktozę, ramnozę, glukozę, arabinozę i ksylozę, rzadziej mannozę i fukozę (**P.1**). Natomiast w przypadku EPS produkowanych przez glony należące do taksonu ochrofitów (*Ochrophyta*) dominującymi cukrami są zwykle fukoza, mannoza i glukoza (Laroche, 2022). Niektóre polimery mogą być zbudowane tylko z jednego rodzaju monosacharydu i określane są jako homopolisacharydy. Przykładem jest EPS syntetyzowany przez *Dunaliella tertiolecta*, który składa się z monomerów glukozy (Goo i in., 2013).

1.3. Warunki syntezy EPS

Skład chemiczny EPS, a przez to również ich właściwości, jest nie tylko specyficzny gatunkowo, ale zależy również od warunków środowiskowych, w których zachodzi wzrost jednokomórkowych glonów. Warunki syntezy EPS opisano szczegółowo w **P.1**. Do najważniejszych czynników abiotycznych wpływających na skład chemiczny EPS należy skład podłoża hodowlanego. Szczególnie istotne znaczenie ma: rodzaj źródła azotu oraz jego dostępność, obecność węgla organicznego (odżywianie autotroficzne i miksotroficzne), stosunek węgla do azotu w pożywce. Z czynników abiotycznych kluczową rolę w metabolizmie jednokomórkowych glonów pełni też światło – zarówno jego natężenie, jak też cykl dobowy oraz temperatura (Delattre i in., 2016). Natężenie światła i CO₂ są kluczowymi czynnikami w procesie fotosyntezy, przez co w istotny sposób wpływają na podstawowy metabolizm komórek glonów. Węgiel organiczny obecny w podłożu hodowlanym może być pobierany przez niektóre gatunki glonów, m. in. *P. kessleri* i *C. vulgaris* (Piasecka i in., 2017; Zhang i in., 2019). Azot z kolei jest niezbędny do biosyntezy białek (w tym enzymów), a co za tym idzie do prawidłowego wzrostu i proliferacji komórek glonów (Kim i in., 2016). W literaturze naukowej brakuje jednak danych dotyczących wpływu natężenia światła na wydajność i specyficzną produktywność EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*, oraz ich skład chemiczny. Ponadto, z uwagi na niewielką ilość publikacji opisujących egzopolimery syntetyzowane przez *P. kessleri* i ich brak w przypadku EPS *V. magna*, brakuje informacji dotyczących wpływu źródła azotu oraz jego stężenia na proces syntezy EPS. Wpływ różnych źródeł azotu badano jak dotąd jedynie dla *C. vulgaris* i *Tetraselmis* sp. (Kim i in., 2016; Kong i in., 2011). *P. kessleri* charakteryzuje się wysokim tempem wzrostu i produktywnością lipidów (Li i in., 2013) oraz wodoru (Gabrielyan i in., 2017). Z kolei *V. magna*, która jest obiecującym źródłem β-karotenu i kwasów tłuszczowych (Krzemińska i in., 2020) i nie została jak dotąd opisana pod kątem syntezy EPS.

W związku z tym, że EPS są syntetyzowane między innymi pod wpływem czynników stresowych, metabolity te wykazują liczne właściwości w zakresie szeroko pojętej ochrony komórek przed niekorzystnymi zmianami warunków środowiska, m.in.: temperatury (w tym zamrażaniem komórek, gdy temperatura spada poniżej 0°C), natężenia światła, wartości pH, zasolenia, niedoborów substancji mineralnych (C, N, K,

P), obecnością substancji o działaniu toksycznym, mikroplastikiem, suszą itp. (Aslam i in., 2012; El Arroussi i in., 2018; Costa i in., 2018; Gopalakrishnan i Kashian, 2022).

1.4. Organizmy syntetyzujące EPS

Zewnątrzkomórkowe polimery syntetyzowane są przez wiele organizmów, m. in.: bakterie (Fleming i Wigender, 2010; Kumar i in., 2007), grzyby (Osińska-Jaroszuk i in., 2015) i glony (Delattre i in., 2016; Laroche, 2022). EPS wydzielane na zewnątrz komórki tworzą śluzowatą strukturę pełniącą funkcje ochronne wobec niekorzystnych zmian czynników środowiskowych.

1.4.1. Bakterie

Polimery zewnątrzkomórkowe produkowane są między innymi przez bakterie kwasu mlekowego (ang. *lactic acid bacteria*, LAB) oraz bakterie ryzosferowe wspomagające wzrost roślin (ang. *plant growth promoting rhizobacteria*, PGPB) (Naseem i in., 2018; Nguyen i in., 2020). EPS syntetyzowane przez bakterie kwasu mlekowego są istotne ze względu na ich właściwości konsystencjotwórcze, szczególnie w odniesieniu do przetworów mlecznych (Jurášková i in., 2022). Z kolei bakterie wspomagające wzrost roślin wytwarzają biofilm, którego celem jest ochrona korzeni roślin w warunkach stresu abiotycznego, np. niedoboru wody (Bhagat i in., 2021). Ponadto wykazano, że EPS produkowane przez bakterie ryzosferowe wspomagają produkcję enzymów oksydoredukcyjnych (zaangażowanych w eliminację rodników) przez rośliny (Naseem i in., 2018).

Oprócz pożytecznego działania bakteryjnych EPS, znane są także ich działania niepożądane. Dzieje się tak w przypadku EPS syntetyzowanych przez patogeniczne szczepy bakterii, które tworzą biofilm. Powstanie biofilmu skutecznie utrudnia walkę z występującymi w nim bakteriami, co sprawia, że leczenie (w przypadku zakażenia organizmu bakteriami chorobotwórczymi) staje się bardziej skomplikowane (Srinivasan i in., 2021).

Bakterie są również źródłem polimerów zewnątrzkomórkowych stosowanych komercyjnie. Większość z tych EPS wykorzystywanych jest jako stabilizatory w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Do najważniejszych EPS syntetyzowanych przez bakterie należą: celuloza, ksantan, dekstran, kwas hialuronowy, kurdlan i pullan (Donot i in., 2012).

Tabela 1. Przegląd bakteryjnych EPS stosowanych komercyjnie opracowany na podstawie Kumar i in. (2007).

EPS	Gatunek syntetyzujący	Zastosowanie
Celuloza	<i>Acetobacter xylinum</i>	- w procesie gojenia oparzeń lub ran chirurgicznych, - naturalny błonnik, który może być wysycony aminokwasami, witaminami i minerałami, - w technologii separacji,
Ksantan	<i>Xanthomonas campestris</i>	- dodatek do kontrolowania lepkości, sedymentacji i żelowania: pestycydów, detergentów, kosmetyków, farmaceutyków, farb drukarskich, - środek zagęszczający i stabilizujący w produkcji żywności,
Dekstran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	- preparat krwiozastępczy, - w technologii separacji (sita molekularne), - składnik wodnych układów dwufazowych, - mikronośnik w hodowli tkankowej/komórkowej,
Alginiian	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- matryca unieruchamiająca żywe komórki i enzymy, - substancja zapobiegająca wysychaniu korzeni sadzonek, - matryca do mikrokapsułkowania nawozów, pestycydów i składników odżywczych, - tkanka zastępcza do gojenia ran,
Kwas hialuronowy (E415)	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> <i>Streptococcus equii</i>	- zamiennik kropli do oczu, sztuczny płyn łzowy, replika płynu maziowego, - w procesie gojenia ran, - składnik płynów i kosmetyków nawilżających,
Kurdlan	<i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i>	- substancja żelująca, - matryca unieruchamiająca, - kurdlan wraz z zydowudyną (AZT) wykazuje obiecującą wysoką aktywność przeciwretrowirusową (lek przeciw HIV).

1.4.2. Grzyby

W porównaniu z ilością publikacji opisujących bakteryjne EPS, polimery produkowane przez grzyby są znacznie słabiej scharakteryzowane. Z opracowania zespołu Osińska-Jaroszuk i in. (2015) wynika, że grzyby należące do Ascomycota potrafią produkować znaczne ilości EPS: *Aureobasidium pullulans* (42,24 g L⁻¹), *Botryosphaeria rhodina* (17,7 g L⁻¹), *Phoma herbarum* (13,6 g L⁻¹). Natomiast gatunki należące do Basidiomycota syntetyzują znacznie mniejsze ilości polimerów zewnątrzkomórkowych, nie przekraczające 10 g L⁻¹. Grzybowe EPS są najczęściej heteropolisacharydami z przewagą wiązań 1→6 glikozydowych (Osińska-Jaroszuk i in., 2015). EPS syntetyzowane przez Ascomycota i Basidiomycota wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, immunomodulujące i przeciwnowotworowe – niezwykle cenne w kontekście możliwości zastosowania w medycynie. EPS wytwarzane przez grzyby to między innymi: pullan, skleroglukan, schizofylan, galaktan i glukan (Donot i in., 2012).

Ponadto wykazano, że wspólna hodowla grzybów i glonów (na przykładzie *Trametes versicolor* i *C. vulgaris*) prowadzi do uzyskania większych ilości EPS w krótszym czasie niż hodowla tych samych gatunków w monokulturach (Angelis i in., 2012).

1.4.3. Glony

Glony to polifiletyczna grupa organizmów jednokomórkowych lub wielokomórkowych (plechowych), których cechą wspólną jest zdolność do przeprowadzania fotosyntezy (Queiroz i in., 2020). Glony są zróżnicowaną grupą organizmów pod względem taksonomicznym. Sinice (Cyanobacteria) należą do królestwa bakterii, które reprezentują organizmy prokariotyczne (Huisman i in., 2018). Natomiast wśród organizmów eukariotycznych wyróżnia się: zielenice (Chlorophyta), krasnorosty (Rhodophyta) i glaukofity (Glaucophyta) należące do królestwa roślin, oraz ochrofity (Ochrophyta) obejmujące brunatnice (Phaeophyceae), eustigmatofity (Eustigmatophyceae), okrzemki (Bacillariophyta), eugleniny (Euglenophyta), a także bruzdnice (Dinoflagellata) i haptofity (Haptophyta) zaliczane do królestwa protistów (Queiroz i in., 2020). Często w powszechnym rozumieniu, określenie glony stosowane jest w odniesieniu do organizmów eukariotycznych, w odróżnieniu od prokariotycznych sinic (Pierre i in., 2019). Glony zasiedlają głównie ekosystemy wodne, jednak mogą

występować również w glebie, na korze drzew, skałach, murach, a także na śniegu i lodzie (Wehr i Sheath, 2015). Niektóre gatunki glonów zasiedlają także rośliny i zwierzęta. Pasożytniczy gatunek zielenic *Cephaleuros* sp. występuje na powierzchni liści tropikalnych roślin uprawnych (kawa, herbata, mango), natomiast inna tropikalna roślina *Gunnera manicata* wytworzyła symbiozę z sinicami, które wiążą azot atmosferyczny. Glony porastają również sierść leniwców, nadając im zieloną barwę (Wehr i Sheath, 2015).

Glony są jednym z głównych producentów polisacharydów w naturalnym środowisku. Pod tym względem dominują wielokomórkowe glony plechowe, potocznie zwane wodorostami, które w ścianie komórkowej zawierają duże ilości polisacharydów (Shao i Duan, 2022). Polimery zewnątrzkomórkowe syntetyzowane przez jednokomórkowe glony cechują się niezwykle dużym zróżnicowaniem pod względem właściwości fizykochemicznych i biologicznych, dzięki czemu mogą znaleźć zastosowanie w rolnictwie i wielu gałęziach przemysłu, jednak obecnie ich wykorzystanie jest niewielkie (Delattre i in., 2016; Franco-Morgado i in., 2023).

1.4.3.1. Wielokomórkowe glony (makroglony)

Do najważniejszych polisacharydów produkowanych przez makroglony należą agarozę, kwas alginowy i jego pochodne, karagen oraz fukoidan (Chudasama i in., 2021). Agar (E406) jest rozpuszczalnym w wodzie galaktanem produkowanym przez krasnorosty. Dzięki właściwościom żelującym znalazł zastosowanie przede wszystkim w biotechnologii – do zestalania podłoży hodowlanych, jak również w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (Shao i Duan, 2022). Alginian i fukoidan są syntetyzowane przez brunatnice. Kwas alginowy i jego sole (E400-405) są polimerami kwasów mannuronowego i guluronowego, który w obecności jonów wapnia tworzy uporządkowaną strukturę zwaną *egg-box*. Stosowany jest w przemyśle spożywczym i kosmetycznym jako stabilizator (Szekalska i in., 2016). Fukoidan z kolei wykazuje właściwości przeciwzakrzepowe, przeciwmutagenne, immunostymulujące oraz przeciwutleniające, dzięki czemu znalazł zastosowanie w farmacji i medycynie. Karagen (E407) to siarczanowy galaktan syntetyzowany przez krasnorosty, stosowany jako zagęstnik i stabilizator. Natomiast ulwan jest siarczanowym polisacharydem zbudowanym z ramnozy, glukuronianu, iduronianu i ksylozy, syntetyzowanym przez plechowe zielenice. Dzięki właściwościom żelującym może znaleźć zastosowanie w rolnictwie oraz jako biomateriał (Shao i Duan, 2022).

1.4.3.2. Jednokomórkowe glony

Do jednokomórkowych glonów zaliczane są: zielenice, krasnorosty, okrzemki, glaukofity, euglenofity, haptofity, bruzdnice oraz sinice (Queiroz i in., 2020). Biomasa jednokomórkowych glonów stanowi podstawowy obiekt zainteresowań aplikacyjnych m. in. w rolnictwie (żywienie zwierząt), przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym, a także w kontekście pozyskania biopaliw (Siddiki i in., 2022). Wiele gatunków jest zdolnych również do efektywnej produkcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów. EPS otrzymywane z hodowli *Porphyridium cruentum* i *P. purpureum*, *Phaeodactylum ornatum*, *Synechococcus* sp., *Glossomastix* sp., *Chrysothiladentata* sp., *Pavlova* sp. i *Diacronema* sp. stosowane są w kosmetykach jako składnik przeciwstarzeniowy (Pierre i in., 2019; Laroche, 2022). Obecnie trwają badania nad wprowadzeniem opatrunków hydrożelowych wspomagających leczenie ran, a bazujących na EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony: *Tolypothrix tenis* i 3 gatunki *Anabaena* sp. (Laroche, 2022). Jak pokazują badania, EPS sprawdzają się jako biostymulatory roślin i mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w rolnictwie (Rachidi i in., 2021).

Największe ilości EPS (22,35 g L⁻¹) produkowane są przez *Cyanothece* sp., które są sinicami (Delattre i in., 2016). Spośród zielenic, największą produktywnością odznacza się *Botryococcus braunii*, który syntetyzuje nawet do 5,5 g L⁻¹ EPS (Lupi i in., 1994). Przegląd gatunków jednokomórkowych glonów syntetyzujących EPS z uwzględnieniem warunków wzrostu i produktywności zewnątrzkomórkowych polimerów został przedstawiony w Tabeli 2.

Tabela 2. Przegląd gatunków jednokomórkowych glonów należących do Chlorophyta i Ochrophyta (Eustigmatophyta) syntetyzujących EPS.

	Gatunek	Warunki hodowli*	Ilość EPS [g L ⁻¹]	Źródło
Chlorophyta	<i>Botryococcus braunii</i>	27°C, 31 dni	5,5	Lupi i in., 1994
	<i>Dictyosphaerium chlorelloide</i>	25,7 °C	1,075	Kumar i in., 2017
	<i>D. pulchellum</i>	150 μmol m ⁻² s ⁻¹ PAR, 28°C, 14 dni, 2% CO ₂	0,2	Halaj i in., 2019
	<i>D. tetrachutum</i> Růžička	150 μmol m ⁻² s ⁻¹ PAR, 28°C, 14 dni, 2% CO ₂	0,7	Halaj i in., 2019
	<i>D. tetrachutum</i> Fott	150 μmol m ⁻² s ⁻¹ PAR, 28°C, 14 dni, 2% CO ₂	1,2	Halaj i in., 2019
	<i>Dunaliella salina</i>	25°C, 20 dni, De Walne medium, 5 M NaCl	0,94	Mishra i Jha, 2009
	<i>Chlorella autotrophica</i>	25°C, F/2, 3,6% NaCl	2,16	Guzmán-Murillo i Ascencio, 2000
	<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	Z8, 3 lata	0,156	Halaj i in., 2018
	<i>Gloeocystis vesiculosa</i>	Z8, 3 lata	0,064	Halaj i in., 2018
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1/2 SŠ, 28 dni, 2% CO ₂	0,132	Halaj i in., 2018
	<i>Desmococcus olivaceus</i>	BG11, 28°C, 80 μmol m ⁻² s ⁻¹ , 60–90 dni	0,09/dzień	Hu i in., 2003
	<i>Scenedesmus abundans</i>	405 μE m ⁻² s ⁻¹ , 14 h:10 h dzień: noc, 2% (v/v) CO ₂	0,236	Mahesh i in., 2019
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	74 mgL ⁻¹ CaCl ₂ i 422 mg L ⁻¹ NaNO ₃	0,628	Bafana, 2013
	<i>Chlorella vulgaris</i>	B (Bristol), 29°C, 24 h dzień, 3,000 lx, 24 dni	0,95	Angelis i in., 2012
Ochrophyta	<i>Vischeria punctata</i>	Prat, 61 dni, 7500 lux, 15 h dzień/9 h noc, 22–24°C	0,985	Babich i in., 2022
(Eustigmatophyceae)	<i>Trachydiscus minutus</i>	Z8, 3 lata	0,016	Halaj i in., 2018

*Warunki hodowli: pożywka, czas hodowli, temperatura, natężenie światła, cykl oświetlenia, dodatkowe czynniki

1.5. Właściwości sorpcyjne EPS

Jedną z ważniejszych właściwości EPS w kontekście zastosowań środowiskowych jest ich potencjał sorpcyjny. Zewnątrzkomórkowe polimery, ze względu na obecność licznych grup funkcyjnych mogą skutecznie eliminować metale ciężkie z roztworów wodnych bądź też immobilizować je w środowisku glebowym, czyniąc je niedostępnymi dla roślin. Ograniczenie biodostępności toksycznych metali ciężkich jest szczególnie istotne na terenach wykorzystywanych rolniczo, a także podczas wstępnego przetwarzania ścieków o wysokiej zawartości metali ciężkich (More i in., 2014; Shah i Daverey, 2020).

Grupy funkcyjne obecne w EPS stanowią potencjalne miejsca oddziaływania polimeru z jonami metali ciężkich. Należą do nich przede wszystkim grupy:

- karboksylowe (kwasy uronowe, białka),
- karbonylowe (białka),
- hydroksylowe (monosacharydy, białka, związki fenolowe),
- aminowe (aminokwasy, białka, aminocukry),
- fosforanowe,
- pirogronianowe itp. (Lombardi i in., 2005; Naveed i in., 2019).

Sorpcja jest procesem fizykochemicznym zależnym od wielu czynników między innymi: stężenia sorbentu (EPS), stężenia jonów metali, wartości pH, temperatury, czasu kontaktu czy właściwości jonów metali (Naveed i in., 2019; Dobrowolski i in., 2017). Jednym z ważniejszych czynników decydujących o efektywności procesu sorpcji z udziałem biosorbentów jest wartość pH. W roztworze o niskim pH grupy funkcyjne zewnątrzkomórkowych polimerów ulegają deprotonacji, wskutek czego powstają ujemnie naładowane grupy, które mogą następnie oddziaływać z jonami metali (Dobrowolski i in., 2017). Dla każdego metalu proces ten przebiega w innym zakresie wartości pH, co wynika również z charakterystyki danego metalu. W roztworze o pH powyżej 6 może dojść do powstawania wodorotlenków, co utrudnia oddziaływanie metali z EPS (Mathivanan i in., 2021). Dlatego też niezwykle ważne, w kontekście efektywności sorpcji, jest odpowiednie dobranie tego parametru. Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność procesu sorpcji jest czas kontaktu sorbentu (EPS) z jonami metali, potrzebny na wysycenie miejsc sorpcyjnych. Różni się on w zależności od właściwości EPS oraz badanego metalu. Na przykład EPS syntetyzowany przez *Rhodococcus opacus* osiąga maksymalną pojemność sorpcyjną

w ciągu 1 minuty, natomiast egzopolimer produkowany przez *R. rhodochrous* potrzebuje aż 30 minut (Dobrowolski i in., 2017). Z kolei EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* ulega wysyceniu jonami Cd(II) po 50 min (Xie i in., 2021), a wytwarzany przez *Chlorella pyrenoidosa* potrzebuje nawet 90 min w obecności jonów As(III) (Zhang i in., 2020). Największe znaczenie w kontekście właściwości sorpcyjnych EPS mają kwasy uronowe, które są źródłem grup karboksylowych oraz białka, które posiadają dodatkowo grupy aminowe. Jak wynika z danych literaturowych, EPS pozbawione komponentu białkowego wykazują znacznie niższe zdolności sorpcyjne (Xie i in., 2020a). Za potencjał sorpcyjny EPS odpowiadają również grupy hydroksylowe, których źródłem mogą być monosacharydy, tworzące szkielet cukrowy. Zwrócono również uwagę na udział m. in. mannozy i glukozy w oddziaływaniu metali z EPS (Lombardi i in., 2005; Dobrowolski i in., 2017).

Właściwości sorpcyjne EPS czynią je niezwykle wartościowymi metabolitami, dzięki którym jednokomórkowe glony mogą wzrastać w środowisku zanieczyszczonym nie tylko metalami ciężkimi, ale również pestycydami, lekami i mikroplastikiem. EPS mogą być stosowane do usuwania wspomnianych zanieczyszczeń z roztworów wodnych bądź ścieków (Xie i in., 2020a; Xie i in., 2020b, Gopalakrishnan i Kashian, 2022; Tarfeen i in., 2022). EPS mogą usuwać nadmiar jonów azotu i fosforu ze środowiska, co jest szczególnie istotne w kontekście możliwości wykorzystania ścieków o wysokiej zawartości azotanów i fosforanów, do hodowli jednokomórkowych glonów (Wang i in., 2014). Zgromadzone przez EPS jony azotu, fosforu, węgla, a także inne pierwiastki mogą być wykorzystywane przez komórki w okresie niedoboru substancji odżywczych w podłożu wzrostowym (Costa i in., 2018; Wang i in., 2014).

1.6. Właściwości flokulacyjne EPS

Flokulacja jest to proces fizykochemiczny prowadzący do agregacji cząstek fazy stałej (bądź komórek), a następnie ich opadania pod wpływem własnego ciężaru (Sharma i in., 2006). W odniesieniu do wysokich kosztów separacji biomasy jednokomórkowych glonów od podłoża hodowlanego, EPS stały się atrakcyjne ze względu na swoje właściwości flokulacyjne, gdyż stanowią potencjalną alternatywę dla syntetycznych flokulantów, takich jak na przykład poliakryloamid (Vandamme i in., 2013). Przebieg procesu flokulacji oraz jego efektywność zależy od wielu czynników:

- budowy i właściwości flokulanta (dostępność zjonizowanych grup funkcyjnych, masa cząsteczkowa, zawartość białka, gęstość ładunku powierzchniowego);
- obecności jonów dwu- lub trójwartościowych (Ca(II), Mg(II), Zn(II), Fe(III));
- siły jonowej środowiska (stopień zasolenia);
- pH środowiska;
- stężenia flokulanta;
- gęstości cząstek stałych/komórek w układzie;
- temperatury (Salehizadeh i in., 2001; Sharma i in., 2006).

Parametry przebiegu procesu flokulacji w badanym układzie powinny być dość precyzyjnie dobrane z uwzględnieniem charakterystyki badanego układu i właściwości flokulanta. Nadmiar naładowanego polimeru wprowadzony do układu może spowodować efekt odwrotny do zamierzonego, czyli stabilizację układu, na skutek działania sił elektrostatycznych. Z kolei zbyt mała ilość flokulanta, może być niewystarczająca do zaistnienia oczekiwanych zmian w układzie (Liu i in., 2015).

Właściwości flokulacyjne EPS wynikają przede wszystkim z ich składu chemicznego i gęstości ładunku powierzchniowego. Kluczowymi składnikami odpowiadającymi za właściwości flokulacyjne EPS, podobnie jak w przypadku sorpcji, są kwasy uronowe i białka (Badireddy i in., 2010). Właściwości autoflokulacyjne wykazują między innymi EPS syntetyzowane przez hodowle *Scenedesmus obliquus* (Guo i in., 2013) i *Chlorococcum* sp. (Ummalyma i in., 2016). W zdecydowanej większości proces flokulacji wymaga indukcji poprzez zmianę wartości pH (Augustiane i in., 2019), bądź dodatek soli np. ZnCl₂ (Aljuboori i in., 2016), MgCl₂, Al₂(SO₄)₃, MgSO₄, (Augustine i in., 2019), CaCl₂, FeCl₂ (Czemierska i in., 2017).

Bioflokulanty znajdują zastosowanie zarówno w separacji biomasy jednokomórkowych glonów od podłoża hodowlanego, jak również w wytrącaniu osadu ściekowego, oczyszczaniu wody pitnej, usuwaniu barwników z roztworów wodnych bądź ścieków, czy też usuwaniu jonów metali, ze względu na ich właściwości sorpcyjne (Salehizadeh i in., 2014).

1.7. Rola EPS w glebie

Wiele bakterii glebowych wydziela EPS, który oddziałuje z cząstkami gleby, przyczyniając się do ich agregacji i stabilizacji powstałych agregatów, co przekłada się na poprawę właściwości fizycznych i mechanicznych gleby, a także zapobiega erozji (Salehizadeh i in., 2014; Costa i in., 2018). Dzięki swoim zdolnościom do zatrzymywania wody, EPS wspomagają utrzymanie wilgotności gleby, a tym samym chronią rośliny w okresach niedoboru wody i umożliwiają pobieranie minerałów. EPS wchodzi również w skład glebowej materii organicznej, przez co stanowią źródło węgla dla mikroorganizmów wspomagających wzrost roślin oraz wzbogacają ryzosferę (Costa i in., 2018; Renuka i in., 2018). Jednokomórkowe glony zdolne do tworzenia biofilmu mają duże znaczenie na glebach suchych i terenach pustynnych, gdzie jako organizmy samożywne kolonizują wysuszoną glebę lub piasek. Biofilm zatrzymuje wodę i składniki mineralne, a także stabilizuje podłoże, dzięki czemu, z czasem tworzy warunki sprzyjające pojawieniu się roślin wyższych. Struktura powstała w ten sposób określana jest jako biologiczna skorupa gleby (ang. *biological soil crust*) (Abinandan i in., 2019). EPS mogą także znaleźć zastosowanie jako biostymulatory roślin. Polisacharydy wyizolowane z jednokomórkowych glonów indukują szlaki metaboliczne pomidora odpowiedzialne za reakcje obronne (Renuka i in., 2018; Rachidi i in., 2021). Z kolei polisacharydy wyizolowane z *C. vulgaris* i *C. sorokiniana* zwiększają aktywność β -1,3-glukanazy, która odpowiada za rozkładanie ściany komórkowej patogenów (Rachidi i in., 2019). Wykazano również, że EPS syntetyzowane przez *Dunaliella salina* umożliwiają roślinom wzrost w warunkach podwyższonego zasolenia gleby (El Arroussi i in., 2018). EPS wpływają pozytywnie na kiełkowanie nasion, wzrost siewek, korzeni, liści oraz całej rośliny, aktywność fotosyntetyczną i „zmiatanie” reaktywnych form tlenu (Xu i in., 2013; El-Naggar i in., 2020; Rachidi i in., 2021).

1.8. Zanieczyszczenie środowiska kadmem i ołowiem

Ołów i kadm, badane w niniejszej pracy, należą do metali ciężkich najczęściej występujących w środowisku, a jednocześnie wysoce toksycznych wobec organizmów żywych. Są to też pierwiastki, które nie pełnią żadnej funkcji w metabolizmie organizmów (Genchi i in., 2020). Metale ciężkie, w tym ołów i kadm, wprowadzane są do środowiska najczęściej w wyniku działalności człowieka m.in. poprzez nieodpowiednie stosowanie nawozów sztucznych i środków ochrony roślin,

wykorzystywanie metali ciężkich w przemyśle, a następnie niewłaściwe składowanie odpadów, stosowanie benzyny ołowiowej (w przeszłości), odprowadzania ścieków przemysłowych, miejskich, przydomowych oraz rolniczych (Genchi i in., 2020; Amin i in., 2018; Srivastava i in., 2017).

Metale ciężkie obecne w glebie wpływają negatywnie na wzrost roślin, począwszy od fazy kiełkowania, aż po plonowanie (Elango i in., 2022). Ołów wpływa negatywnie między innymi na kiełkowanie nasion, wzrost siewek, zawartość chlorofilu, przebieg fotosyntezy oraz transpirację (Amin i in., 2018; Kushwaha i in., 2018). Jego toksyczność wynika z oddziaływania z enzymami kluczowymi dla prawidłowego rozwoju i metabolizmu komórek (Liu i in., 2003). Kadm natomiast opóźnia kiełkowanie nasion, hamuje wzrost siewek, ogranicza wzrost korzeni, pędów i liści, hamuje syntezę białek i wpływa na efektywność fotosyntezy, a także prowadzi do uszkodzeń błony komórkowej (Elango i in., 2022). Kadm pobierany przez rośliny konkuruje z żelazem i cynkiem, co może prowadzić do wystąpienia chlorozy lub nawet nekrozy liści (przebarwień wynikających z niedoboru Fe i Zn). Obecność Cd w glebie powoduje występowanie stresu osmotycznego, co przyczynia się do zaburzenia dystrybucji wody w roślinie, a także prowadzi do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (Haider i in., 2021).

Rośliny uprawne mogą akumulować metale ciężkie występujące w glebie, co stanowi zagrożenie dla zdrowia zarówno ludzi jak i zwierząt. Zdolność roślin do akumulowania metali ciężkich jest wykorzystywana w procesie fitoremediacji zdegradowanych gleb (Shah i Daverey, 2020). Potwierdzono, że również jednokomórkowe glony mogą być stosowane w procesie bioremediacji (fykoremediacja) (Kandasamy i in., 2021). Kluczowa jest w tym przypadku nie tylko biomasa, która akumuluje jony metali, ale również struktura ściany komórkowej oraz polimery zewnątrzkomórkowe wykazujące zdolności sorpcyjne (Danouche i in., 2021).

1.9. Możliwości stosowania EPS w rolnictwie

Zdolność EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony, do wiązania metali ciężkich może przyczynić się do poprawy jakości prowadzonych na tej glebie upraw (Kandasamy i in., 2021). Metale ciężkie obecne w środowisku glebowym akumulowane są przez uprawiane na tych obszarach rośliny (Alengebawy i in., 2021). Szczególnie podatne na akumulację metali są warzywa liściaste takie jak: sałata, szpinak, endywia, a także marchew (Puschenreiter i in., 2005). Wprowadzenie EPS do

gleby może przyczynić się do poprawy jej struktury, ze względu na właściwości flokulacyjne EPS (Szewczuk-Karpisz i in., 2021). EPS mogą również skutecznie immobilizować inne substancje o działaniu toksycznym względem roślin (pestycydy, nadmiar fosforanów i amoniaku, mikroplastik), a także przedłużać działanie oraz zmniejszać straty nawozów i środków ochrony roślin, co w rezultacie może zmniejszyć stosowane dawki (Campos i in., 2015; Gopalakrishnan i Kashian, 2022; Tarfeen i in., 2022).

Warto zauważyć, że EPS jako naturalny materiał poprawiający właściwości fizykochemiczne gleby, zatrzymujący wodę oraz ograniczający pobieranie przez rośliny toksycznych substancji prowadzi do poprawy jakości produktów roślinnych wykorzystywanych na cele spożywcze. Takie zastosowanie EPS wpisuje się w założenia strategii „od pola do stołu” Europejskiego Zielonego Ładu (<https://www.consilium.europa.eu/pl/policies/green-deal/>, dostęp: 13.10.2023)

2. Cel pracy i hipotezy badawcze

Celem niniejszej rozprawy było określenie wpływu wybranych czynników abiotycznych na syntezę zewnątrzkomórkowych polimerów przez wyselekcjonowane jednokomórkowe glony, analiza składu chemicznego otrzymanych polimerów oraz określenie ich właściwości sorpcyjnych i flokulacyjnych.

Cel główny rozprawy doktorskiej realizowany był poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

- selekcja gatunków glonów jednokomórkowych pod kątem wydajności syntezy egzopolisacharydów;
- określenie wpływu warunków: natężenia światła (40, 60, 350 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), źródła (azotan sodu, azotan amonu, siarczan amonu, mocznik) i stężenia azotu (0 g L^{-1} ; 0,375 g L^{-1} ; 0,75 g L^{-1} ; 1,5 g L^{-1}), sposób odżywiania (autroficzny – CO_2 , miksotroficzny – glukoza) na proces syntezy egzopolisacharydów przez badane jednokomórkowe glony;
- charakterystyka biochemiczna otrzymanych EPS pod kątem zawartości: cukrów całkowitych i redukujących, kwasów uronowych, aminocukrów, białka, aminokwasów oraz substancji fenolowych oraz określenie składu monosacharydów;
- analiza zdolności sorpcyjnych EPS wobec jonów kadmu i ołowiu;
- analiza grup funkcyjnych występujących w EPS oraz ich udział w sorpcji metali w oparciu o analizę z wykorzystaniem spektroskopii FTIR;
- analiza właściwości flokulacyjnych EPS.

W celu wyjaśnienia założeń badawczych sformułowano następujące hipotezy:

1. Natężenie światła, źródła i stężenia azotu oraz sposób odżywiania jednokomórkowych glonów wpływają na proces syntezy wyrażony jako wydajność i specyficzną produktywność badanych EPS.
2. Natężenie światła oraz sposób odżywiania powodują zmiany w składzie chemicznym EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony.
3. Skład chemiczny EPS i dostępność grup funkcyjnych wpływa na właściwości sorpcyjne badanych egzopolisacharydów.
4. Specyficzność gatunkowa i warunki fizyko-chemiczne układu wpływają na właściwości flokulacyjne badanych EPS.

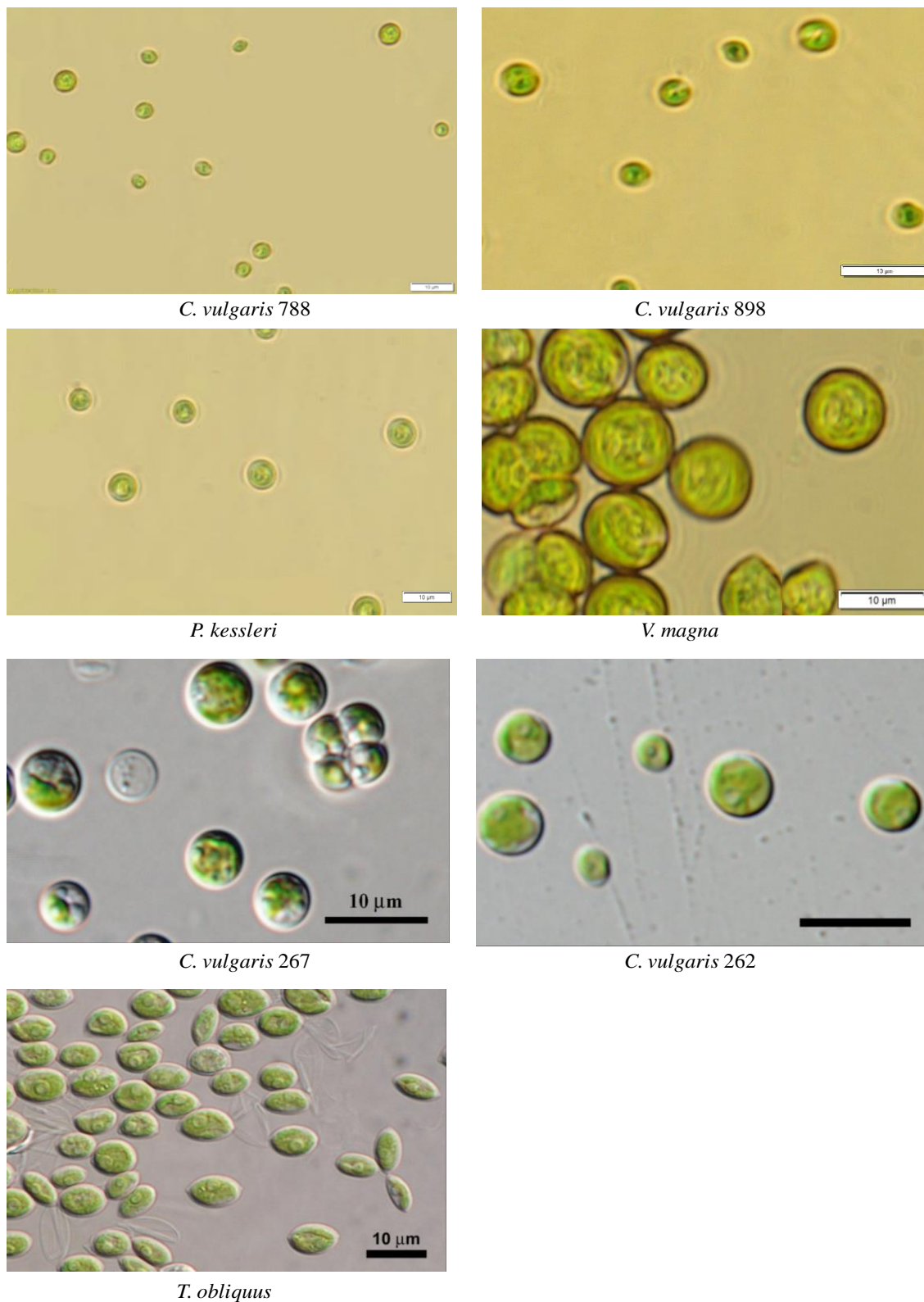
3. Materiały i metody

3.1. Materiał badawczy

Szczepy jednokomórkowych zielenic (Chlorophyta): *Chlorella vulgaris* 262, 267, 788, 898, *Parachlorella kessleri* 250 oraz *Tetrademus obliquus* 453 zakupiono w Kolekcji Kultur Organizmów Autotroficznych (Třeboň, Republika Czeska), *Vischeria magna* (Orchrophyta) pozyskano z Kolekcji Kultur Glonów na Uniwersytecie w Göttingen (Göttingen, Germany).

Tabela 3. Systematyka badanych gatunków jednokomórkowych glonów (AlgaeBase: <https://www.algaebase.org>, dostęp: 31.08.2023).

Nadkrólestwo		Eukaryota		
Królestwo		Plantae		Chromista
Podkrólestwo		Viridiplantae		-
Typ		Chlorophyta		Ochrophyta
Klasa	Trebouxiophyceae	Chlorophyceae		Eustigmatophyceae
Rząd	Chlorellales	Sphaeropleales		Eustigmatales
Rodzina	<i>Chlorellaceae</i>	<i>Scenedesmaceae</i>		<i>Chlorobotryaceae</i>
Gatunek	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Parachlorella kessleri</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>	<i>Vischeria magna</i>



Ryc. 1 Zdjęcia komórek badanych glonów wykonane przy pomocy mikroskopu optycznego. *C. vulgaris* 788, *C. vulgaris* 898, *P. kessleri* i *V. magna* – fotografie własne (Olympus CKX41 z 60x powiększeniem); *C. vulgaris* 262, *C. vulgaris* 267, *T. obliquus* – CCALA (<https://ccala.butbn.cas.cz/>, dostęp: 31.08.2023).

3.2. Metody

3.2.1. Warunki hodowli glonów

Przechowywanie szczepów glonów

Badane szczepy zakupione z kolekcji kultur w formie skosów zestalonych agarem przechowywano w temperaturze 4°C.

Hodowla na podłożu stałym

Pozyskane gatunki przesiano na płytki zawierające podłoże BG11 zestalone 1% agarem. Po inkubacji hodowli w temperaturze 22°C przez 7–10 dni, płytki przeniesiono do temperatury 4°C. W ten sposób przechowywano szczepy wykorzystywane następnie do zakładania hodowli płynnych.

Skład podłoża hodowlanego

Hodowle badanych gatunków jednokomórkowych glonów prowadzono na pożywce BG11 o składzie przedstawionym w Tabeli 4.:

Tabela 4. Skład pożywki BG11 (Allen, i in., 1968).

	Składnik	g L ⁻¹
Roztwór 1	Na ₂ Mg EDTA	0,1
	Cytrynian amonu żelaza (III)	0,6
	Kwas cytrynowy · H ₂ O	0,6
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,6
Roztwór 2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,5
Roztwór 3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4,0
Roztwór 5 (mikroelementy)	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,222
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,079
	COCl ₂ · 6H ₂ O	0,050
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,391

Do przygotowania pożywki użyto po 10 mL roztworów 1–3, następnie dodano 0,02 g Na₂CO₃, 1 mL roztworu 5 i 1,5 g NaNO₃. Całość dopełniono wodą demineralizowaną do objętości 1 L. Wartość pH pożywki ustalono do 7,5 przy użyciu 1 M HCl i wysterylizowano w autoklawie. Ze względu na badanie w niniejszej pracy wpływu różnych źródeł azotu na syntezę EPS, stosowano BG11₀ (niezawierającą 1,5 g L⁻¹ NaNO₃) do której dodawano źródła azotu zgodnie z Tabelą 5.

Hodowla na podłożu płynnym

Hodowle wstępne (*inocula*)

Komórki glonów pobrano z hodowli prowadzonych na płytkach przy pomocy wyjałowionej ezy mikrobiologicznej i wprowadzono do kolb o pojemności 50 mL, zawierających 20 mL sterylnego podłoża BG11. Hodowle prowadzono bez napowietrzania. Po namnożeniu komórek do odpowiedniej gęstości optycznej ($\lambda_{680\text{nm}}$), hodowle przeniesiono do kolb o pojemności 500 mL zawierających 200 mL pożywki. Na kolbach zamontowano system do napowietrzania. Hodowle napowietrzano powietrzem sterylizowanym filtrami przepływowymi Midisart 2000 (Sartorius, Niemcy) o średnicy porów 0,22 μm . Hodowle prowadzono na wytrząsarkach obrotowych o obrotach 90 rpm, w systemie oświetlenia cyklicznego 16 h światło: 8 h ciemność, o natężeniu 60 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$, w temperaturze 25°C±1°C. Czas wzrostu hodowli wstępnych wynosił między 14 a 21 dni, a moment inokulacji wyznaczono na podstawie gęstości optycznej hodowli wstępnej i zależał od gęstości hodowli wymaganej do nastawienia hodowli doświadczalnej.

Hodowle doświadczalne

Na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów gęstości optycznej (OD₆₈₀) hodowli wstępnych obliczono objętość *inoculum* potrzebną do nastawienia nowej hodowli. Następnie odpowiednią ilość *inoculum* przeniesiono do próbek wirówkowych i zwirowano. Zwirowaną biomasę zawieszono w niewielkiej ilości świeżej pożywki i przeniesiono do kolby o pojemności 1 L zawierającej 400 mL pożywki. Podstawowe warunki hodowli, tj.: wytrząsanie, napowietrzanie, oświetlenie i temperatura były takie same jak w hodowlach wstępnych. Natomiast natężenie światła było modyfikowane w doświadczeniu badającym wpływ tego parametru na syntezę EPS.

Warianty podłoża hodowlanego

Źródło azotu

W celu określenia źródła azotu odpowiedniego do syntezy EPS podłoże hodowlane BG11 zmodyfikowano poprzez zastąpienie azotanu sodu innymi źródłami azotu: azotanem amonu, siarczanem amonu oraz mocznikiem. Stężenia poszczególnych źródeł azotu obliczono jako ekwiwalent N tak, aby ilość atomów azotu była jednakowa we wszystkich wariantach, względem zawartości N w pożywce BG11 ($1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$), która stanowiła próbę kontrolną. W celu przygotowania zmodyfikowanych pożywek, azotan sodu zastąpiono odpowiednio: $0,53 \text{ g L}^{-1}$ mocznika, $0,71 \text{ g L}^{-1}$ azotanu amonu i $1,16 \text{ g L}^{-1}$ siarczanu amonu. Hodowle prowadzono przez 15 dni w systemie fotoperiodu 16 h światło: 8 h ciemność, o natężeniu światła $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i temperaturze $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Stężenie azotu

W celu oceny wpływu stężenia azotanu sodu w pożywce na syntezę EPS przez badane gatunki glonów, zastosowano odpowiednio zmniejszone ilości NaNO_3 : $0,75 \text{ g L}^{-1}$ (50% N), $0,325 \text{ g L}^{-1}$ (25% N) i 0 g L^{-1} (0% N). Próbę kontrolną stanowiła pożywka zawierająca $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ (100% N). Hodowle prowadzono przez 15 dni w systemie fotoperiodu 16 h światło: 8 h ciemność, o natężeniu światła $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i temperaturze $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Źródło węgla

W celu sprawdzenia wpływu dodatku organicznego źródła węgla na produkcję EPS, do pożywki BG11 dodano glukozę w ilości 5 g L^{-1} . Kontrolę stanowiły hodowle prowadzone na pożywce BG11, bez dodatku organicznego źródła węgla. Hodowle prowadzono przez 15 dni w systemie fotoperiodu 16 h światło: 8 h ciemność, o natężeniu światła $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i temperaturze $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Wpływ natężenia światła na syntezę EPS

W celu określenia wpływu natężenia światła na syntezę EPS, zastosowano następujące wartości natężenia światła: $40 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LL), $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ML) i $350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (HL). Hodowle prowadzono przez 15 dni w systemie

fotoperiodu 16 h światło: 8 h ciemność, o natężeniu światła $60 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela 5. Zestawienie warunków prowadzenia hodowli jednokomórkowych glonów w niniejszej pracy.

	Podłoże	Natężenie światła	Czas
Hodowla podstawowa	BG11 (= BG11 ₀ + 1,5 g L ⁻¹ NaNO ₃)	60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$	22 dni
Źródło azotu	BG11 ₀ + 1,5 g L ⁻¹ NaNO ₃ BG11 ₀ + 0,53 g L ⁻¹ (NH ₂) ₂ CO BG11 ₀ + 0,71 g L ⁻¹ NH ₄ NO ₃ BG11 ₀ + 1,16 g L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄	60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$	15 dni
Stężenie azotanu sodu	BG11 ₀ + 1,5 g L ⁻¹ NaNO ₃ BG11 ₀ + 0,75 g L ⁻¹ NaNO ₃ BG11 ₀ + 0,325 g L ⁻¹ NaNO ₃ BG11 ₀ + 1,5 g L ⁻¹ NaNO ₃	60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$	15 dni
Natężenie światła	BG11	40 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 400 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$	15 dni
Źródło węgla	BG11 BG11 + 5 g L ⁻¹ glukozy	60 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$	25 dni

3.2.2. Pomiar stężenia biomasy komórkowej

W trakcie hodowli monitorowano wzrost jednokomórkowych glonów poprzez spektrofotometryczny pomiar gęstości hodowli (OD₆₈₀). Po zakończeniu hodowli dokonano pomiaru stężenia biomasy komórkowej na podstawie suchej masy. W tym celu pobierano określoną objętość hodowli i filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem, stosując filtry szklane 0,22 μm Whatmann®GF/C (Whatmann, Wielka Brytania), a następnie suszono w suszarce laboratoryjnej (Ventill VC 111, MMM Group, Niemcy) w temperaturze 90°C. Po upływie 24 h próbki ważono.

3.2.3. Izolacja EPS

Po zakończeniu hodowli podłoże hodowlane odseparowano od biomasy przy pomocy wirowania (9000 rpm, 30 min, 4°C). Supernatant przefiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie zateżono przy użyciu wyparki rotacyjnej (20 mBar, 38°C, Heidolph, Germany). Ekstrakcję EPS przeprowadzono stosując 96% etanol w proporcji 2:1 (dwie części etanolu na jedną część próbki). Całość mieszano przez 30 min i zostawiono na 72 h celem wytrącenia EPS. Po tym czasie zebrano strącony EPS poprzez wirowanie (9000 rpm, 30 min, 4°C). Następnie EPS rozpuszczono w wodzie i przeniesiono do membran dializacyjnych (12–14 kDa). Próbkę dializowano w temperaturze 4°C przez 72 h. Po zakończeniu dializy próbki zamrożono i zliofilizowano (liofilizator Labconco, USA). W celu otrzymania frakcji rozpuszczalnej w wodzie, EPS rozpuszczono w wodzie demineralizowanej i po 24 h zwirowano. Supernatant zebrano, ponownie zamrożono i zliofilizowano. EPS w formie liofilizatu przechowywano do analiz.

3.2.4 Skład chemiczny EPS

Zawartość cukrów całkowitych

Do oznaczenia stężenia cukrów całkowitych w EPS zastosowano metodę fenolowo-siarkową (DuBois i in., 1956; Masuko i in., 2005). W tym celu pobrano 200 µL EPS o stężeniu 1 mg mL⁻¹, a następnie dodano 600 µL stężonego kwasu siarkowego i 120 µL 5% wodnego roztworu fenolu. Próbkę inkubowano przez 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 90°C. Po ostudzeniu mieszaniny reakcyjnej, zawartość cukrów zmierzono przy użyciu spektrofotometru Cary 300 UV-Vis (Varian Medical Systems, Inc., Australia) przy 490 nm. Stężenie cukrów obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla roztworu glukozy w zakresie 200–1000 µg mL⁻¹ (POCH, Polska).

Zawartość białka

Stężenie białka w badanych próbkach oznaczono metodą Bradforda (Piasecka i Baier, 2022; Bradford, 1976). Procedura obejmuje dodanie 100 µL próbki EPS do 1 mL przygotowanego wcześniej odczynnika Bradforda, będącego kwaśnym roztworem barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich, USA) w etanolu. Podczas reakcji białek z barwnikiem powstaje kompleks o niebieskim zabarwieniu z maksimum

absorpcji przy 595 nm. Stężenie białka wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla albuminy bydlęcej o stężeniach w zakresie 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma Aldrich, USA).

Zawartość związków fenolowych

Do ilościowego oznaczenia związków fenolowych w EPS zastosowano metodę spektrofotometryczną z diazosulfanilamidem (DASA) (Malarczyk i in., 2011). Do 0,2 mL badanej próbki dodano 0,2 mL 2% roztworu DASA w 10% HCl oraz 0,2 mL 5% NaNO_3 . Mieszaninę pozostawiono na 1 minutę, po czym dodano 1 mL 20% Na_2CO_3 . Absorbancję barwnego produktu reakcji zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 500 nm. Stężenie związków fenolowych obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej dla kwasu wanilinowego w zakresie 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Hydroliza EPS

Przed przystąpieniem do oznaczenia zawartości cukrów redukujących, kwasów uronowych, aminokwasów, aminocukrów oraz identyfikacji monosacharydów próbki EPS poddano hydrolizie kwasowej z zastosowaniem 4 M kwasu trifluorooctowego (TFA). Proces ten prowadzono w termobloku (Macherey-Nagel, Niemcy) w temperaturze 100°C przez 4 h. Po hydrolizie TFA usunięto z próbek poprzez trzykrotne rozpuszczanie hydrolizatu w wodzie demineralizowanej i odparowywanie. Następnie próbki rozpuszczono w wodzie demineralizowanej i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu przeprowadzenia analiz (Czemierska i in., 2017).

Zawartość cukrów redukujących

Zawartość cukrów redukujących oznaczono metodą Somogyi-Nelsona (Hope i Burns, 1987; Shao and Lin, 2018). W metodzie tej, cukry redukują jony Cu(II) do Cu(I) w słabo zasadowym środowisku winianu sodowo-potasowego. Powstały tlenek miedzi (I) reaguje z kwasem arsenomolibdenowym, co prowadzi do powstania tlenków molibdenu, nadających niebieskie zabarwienie roztworu. Odczynnik miedziowy stosowany w reakcji przygotowuje się bezpośrednio przed pomiarem poprzez zmieszanie odczynnika Somogyi I i Somogyi II w proporcji 1:25. Somogyi I to 15% roztwór CuSO_4 z dodatkiem 2 kropli stężonego kwasu siarkowego. Natomiast Somogyi II jest roztworem zawierającym Na_2SO_4 , winian sodowo-potasowy, NaHCO_3 i Na_2CO_3 . Odczynnik Nelsona przygotowano poprzez rozpuszczenie molibdenianu amonu w wodzie demineralizowanej, dodanie stężonego kwasu siarkowego i arsenianu sodu.

Do 0,5 mL roztworu EPS dodano 0,5 mL wody destylowanej i 1 mL odczynnika miedziowego. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 100°C przez 10 min. Po ostudzeniu mieszaniny, dodano 1 mL odczynnika Nelsona. Zawartość cukrów redukujących mierzono spektrofotometrycznie przy 520 nm, a stężenie wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej dla glukozy w zakresie 100–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (POCH, Polska).

Zawartość kwasów uronowych

Kwasy uronowe oznaczono stosując metodę karbazolowo-siarkową (Bitter i Muir, 1962; Li i in., 2007). Probówki reakcyjne umieszczono w lodzie, a następnie do każdej wprowadzono po 5 mL roztworu stężonego kwasu siarkowego i 0,025 M czteroboranu sodu. Następnie nawarstwiono 1 mL zhydrolizowanego EPS, zawartość probówek wymieszano szklaną bagietką, a następnie przeniesiono do wrzącej łaźni wodnej. Po upływie 15 min probówki ostudzone, dodano 0,2 mL 0,125% roztworu karbazolu w etanolu bezwodnym i ponownie inkubowano w łaźni wodnej przez 10 min. Produkt reakcji kondensacji bezwodników kwasu uronowego z karbazolem mierzono kolorymetrycznie przy 530 nm. Stężenie kwasów uronowych obliczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla kwasu galakturonowego w zakresie 10–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma Aldrich, USA).

Zawartość aminokwasów

Stężenie aminokwasów oznaczono za pomocą metody ninhydrynowej (Bailey i Leggett, 1962; Sun i in., 2006). W tym celu do 0,25 mL EPS dodano 1 mL roztworu ninhydryny rozpuszczonej w 96% etanolu (2 g ninhydryny w 50 mL etanolu). Reakcję przeprowadzono w obecności 0,4 M buforu cytrynianowego o pH 5, który dodano w ilości 0,75 mL. W wyniku reakcji aminokwasów z ninhydryną powstaje fioletowo-niebieski produkt, którego maksimum absorpcji wynosi 570 nm i przy tej długości fali wykonywano pomiary. Krzywą wzorcową wykonano dla roztworów glicyny o stężeniu w zakresie 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (POCH, Polska).

Zawartość aminocukrów

Oznaczenie zawartości aminocukrów przeprowadzono z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Elsona-Morgana (Belcher i in., 1954; Jang i in., 2005). Procedura polega na acetylacji aminocukrów poprzez dodanie 0,5 mL acetyloacetonu

do 1 mL próbki. Następnie do próbki dodano 2,5 mL 99,5% etanolu i 0,5 mL roztworu 4-(dimetyloamino)benzaldehydu (DMAB) w HCl. W wyniku kondensacji acetylowanej pochodnej aminocukrów i DMAB powstaje produkt o barwie różowej. Wartość absorbancji próbek badanych mierzono przy 530 nm. Stężenie aminocukrów obliczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla D-glukozaminy w zakresie 5–50 µg mL⁻¹.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Do oznaczenia składu monosacharydów zastosowano technikę chromatografii cienkowarstwowej (TLC, ang. *thin layer chromatography*). W tym celu 30 µL zhydrolizowanego EPS i roztworów wzorcowych monosacharydów nanoszono na pokryte żelom krzemionkowym płytki TLC (Merck, Niemcy) i wysuszono. Do identyfikacji monosacharydów zastosowano roztwory standardowe glukozy, galaktozy, mannozy, fruktozy, ksylozy, ramnozy (Sigma, USA) o stężeniu 1 mg mL⁻¹. Płytki umieszczano w komorze chromatograficznej uprzednio wysyczonej fazą rozwijającą (1-propanol : octan etylu : woda w proporcji 4:0,5:0,5 v/v). Rozdział prowadzono przez 4 godz. Następnie płytki wysuszono, spryskano 10% H₂SO₄ w etanolu i suszono w temperaturze 100°C przez 15 min w celu wizualizacji rozdzielonych monosacharydów. Następnie wyznaczono współczynnik retencji (R_f, ang. *retention factor*) dla każdego składnika według wzoru 1:

$$R_f = L_s/L_r \quad (1)$$

gdzie: L_s – odległość przebyta przez monosacharyd; L_r – odległość przebyta przez rozpuszczalnik (Czemierska i in., 2016).

3.2.5. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Widma FTIR zliofilizowanych EPS rejestrowano za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA) wyposażonego w przystawkę do osłabionego całkowitego odbicia (ATR, ang. *attenuated total reflectance*). Widma zbierano w zakresie 4000–400 cm⁻¹, w odstępach co 4 cm⁻¹. Rozdzielczość widm wynosiła 128 skanów. Korekcję linii bazowej otrzymanych widm przeprowadzono przy użyciu oprogramowania OMNIC (v.8.2, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) (Piasecka i in., 2020). Wyniki były wizualizowane i analizowane przy użyciu MS Excel 2007.

3.2.6. Właściwości sorpcyjne EPS

Przygotowanie roztworów azotanu (V) kadmu i azotanu (V) ołowiu oraz przebieg doświadczenia sorpcji

Publikacja P.2.: Doświadczenie przeprowadzono dla EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* 898 w warunkach autotroficznych. Przygotowano roztwory $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o stężeniach: 10, 50, 100 i 150 mg L^{-1} . Następnie rozpuszczono EPS w roztworach soli metali do końcowego stężenia 100 mg L^{-1} . Próbę kontrolną stanowił EPS rozpuszczony w wodzie demineralizowanej. Wartość pH roztworów ustalono do 5, za pomocą 0,1 M HCl. Próbki mieszano na wytrząsarce obrotowej przy 120 rpm przez 30 min w temperaturze 25°C.

Publikacja P3.: Doświadczenie przeprowadzono dla EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* 788 i *V. magna* w warunkach miksotroficznych. Przygotowano roztwory azotanu ołowiu o stężeniu 100 mg L^{-1} o pH 4, 5 i 6. Następnie rozpuszczono EPS w przygotowanych roztworach soli metali do końcowego stężenia 100 mg L^{-1} .

Dalsza procedura jest wspólna dla obu doświadczeń. Próbki odwirowano przy 9500 rpm przez 12 min (Rotanta 460 RS, Hettich, Niemcy). Supernatant zebrano i przefiltrowano przy użyciu hydrofilowego filtra PES 0,22 μm (Chemland, Polska). Próbki kontrolne przygotowano według tej samej procedury, jednak EPS rozpuszczono w wodzie zamiast w roztworach soli metali. Następnie filtry wykorzystano do pomiaru stężenia jonów metali za pomocą ICP-OES. Natomiast osad zliofilizowano, a następnie wykorzystano do przeprowadzenia analizy FTIR. Eksperymenty sorpcyjne przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Oznaczenie stężenia jonów metali (ICP-OES)

Do oznaczenia stężenia jonów metali w filtracie zastosowano optyczną spektrometrię emisyjną z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES). Pomiary wykonano przy użyciu aparatu iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, USA) wyposażonego w detektor typu CID (ang. *charge injection device*) oraz oprogramowanie *charge injection device*. Roztwory wzorcowe zostały przygotowane z wielopierwiastkowego wzorca CCS-6 o stężeniu 100 g mL^{-1} (7% HNO_3) (Inorganic Ventures, USA). Urządzenie pracowało przy następujących parametrach: generator RF moc 1150 W, częstotliwość generatora RF 27,12 MHz, natężenie przepływu gazu nośnego 0,65

$\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$, natężenie przepływu gazu chłodzącego $16 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$, oraz gazu pomocniczego $0,4 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$. Długości fal zastosowane do oznaczenia zawartości metali wynosiły odpowiednio: $220,353 \text{ nm}$ dla ołowiu i $214,438 \text{ nm}$ dla kadmu. Do obliczenia procentowego potencjału usuwania (RP, ang. *removal potential*) zastosowano wzór 2, natomiast do obliczenia ilości zaadsorbowanych jonów (q) metali zastosowano wzór 3:

$$\text{RP} [\%] = (c_i - c) / c_i \cdot 100 \% \quad (2)$$

$$q = ((c_i - c) V) / W \quad (3)$$

gdzie: c_i – początkowe stężenie jonów metali [mg L^{-1}]; c – stężenie jonów metali po inkubacji z EPS [mg L^{-1}]; V – objętość próbki [L] po inkubacji z EPS [mg L^{-1}]; V – objętość próbki [L]; W – masa EPS w próbce [mg] (Biswas i in., 2020).

Oznaczono również zawartość Ca, Mg, Mn, P, S i Zn [mg L^{-1}] w roztworze po procesie sorpcji.

3.2.7. Oznaczanie aktywności flokulacyjnej

Aktywność flokulacyjną EPS oznaczano za pomocą metody kaolinowej (Kurane i in., 1994). Kaolin jest minerałem ilastym glinokrzemianowym o wzorze chemicznym $\sim \text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, składającym się głównie z kaolinitu (Kunio i Schreiber, 2013). Przygotowano zawiesinę zawierającą $4,5 \text{ g L}^{-1}$ kaolinu (CAS 1332-58-7) (Sigma Aldrich, USA) i 11 g L^{-1} CaCl_2 w wodzie demineralizowanej. Do roztworu 9 mL zawiesiny kaolinu z dodatkiem $0,1 \text{ M}$ chlorku wapnia dodawano odpowiednio $0,1 \text{ mL}$ EPS o stężeniu 1 g L^{-1} lub wody demineralizowanej, w przypadku próby kontrolnej. Całość mieszano przez 20 sekund przy 2000 rpm przy użyciu wstrząsarki typu Vortex i odstawiano. Po upływie 5 min pobierano $0,9 \text{ mL}$ płynu, zanurzając końcówkę pipety w roztworze na głębokości 7 mm . Płyn przenoszono do kuwety spektrofotometrycznej, dodawano $0,9 \text{ mL}$ wody demineralizowanej i mieszano. Absorbancję mierzono przy 550 nm . Aktywność flokulacyjną obliczono według wzoru 4:

$$\text{Aktywność flokulacyjna} [\%] = (A_K - A_B) / A_K \cdot 100\% \quad (4)$$

gdzie: A_K – absorbancja próby kontrolnej; A_B – absorbancja próby badanej (Czemierska i in., 2016).

3.2.8. Pomiar zmian mętności

Do określenia zdolności flokulacyjnych EPS wykorzystano również pomiary zmian mętności zawiesiny kaolinu. Pomiary wykonano przy użyciu turbidymetru Hach 2100AN (Hach, USA). Próbki przygotowano zawieszając 0,02 g kaolinu w 20 ml elektrolitu pomocniczego, którym był 0,001 M NaCl (kontrola). Badane układy przygotowano dodając 2 mL i 4 mL 500 mg L⁻¹ roztworu EPS, do końcowego stężenia odpowiednio 50 i 100 mg L⁻¹. Dodatkowo zbadano wpływ CaCl₂ (50 mg L⁻¹) na właściwości 50 mg L⁻¹ EPS. Wartość pH badanych próbek doprowadzono do 7 używając 0,1 M HCl. Wyniki odczytywano po 2, 5, 10, 15, 30, 45 i 60 minutach (Szewczuk-Karpisz i in., 2021).

3.2.9. Pomiar wielkości cząstek/agregatów

Przed przystąpieniem do analiz ustalono gradient sacharozy poprzez zmieszanie roztworów 8% i 24%. Po pomiarach zmętnienia próbki przenoszono do analizatora wielkości cząstek DC24000 (Anaheim, USA). Pomiary przeprowadzono przy prędkości obrotowej tarczy równej 2500 obr./min. Wielkość cząstek/agregatów mierzono w zakresie 0,11–5 µm (Szewczuk-Karpisz i in., 2021).

3.2.10. Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są wartościami uśrednionymi z trzech powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym. Do określenia zgodności uzyskanych wyników z rozkładem normalnym przeprowadzono test Shapiro-Wilka. Dane spełniające kryterium normalności poddano analizie wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem testu wielokrotnych porównań – test Tukey’a. Poziom istotności przyjęty w analizach wynosił $p < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 12 (Statsoft, Inc., USA).

4. Wyniki

4.1. Selekcja gatunków syntetyzujących EPS

Pierwszym etapem badań było określenie wydajności oraz specyficznej produktywności syntezy EPS przez cztery gatunki jednokomórkowych glonów: *Vischeria magna*, *Tetrademus obliquus*, *Parachlorella kessleri* oraz *Chlorella vulgaris*, w tym 4 szczepy *Chlorella vulgaris*: 262, 267, 788 i 898.

Tabela 6 przedstawia ilość EPS uzyskanego w stacjonarnej fazie wzrostu komórek (po 22 dniach hodowli). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wydajność syntezy EPS u większości badanych gatunków była w zakresie 10–14 mg L⁻¹. Najniższą wydajność i specyficzną produktywność EPS uzyskano z hodowli *T. obliquus* (2,37 mg L⁻¹; 3,91 mg g⁻¹) i *C. vulgaris* 267 (6,89 mg L⁻¹; 5,53 mg g⁻¹). Najwyższą wydajność i specyficzną produktywność EPS stwierdzono u gatunków: *P. kessleri* (13,1 mg L⁻¹; 16,38 mg g⁻¹), *C. vulgaris* 898 (12,64 mg L⁻¹; 14,76 mg g⁻¹) i *V. magna* (12,54 mg L⁻¹; 11,46 mg g⁻¹).

Tabela 6. Wydajność i specyficzna produktywność EPS, oraz zawartość cukrów całkowitych i białek w EPS syntetyzowanych przez badane gatunki glonów.

Gatunek	Wydajność EPS [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność EPS [mg g ⁻¹]	Cukry [μg mL ⁻¹]	Białko [μg mL ⁻¹]
<i>V. magna</i>	12,54 ± 0,99	11,46 ± 0,45	624,43 ± 27,69	4,43 ± 0,67
<i>P. kessleri</i>	13,10 ± 1,58	16,38 ± 0,82	635,03 ± 21,64	5,46 ± 0,58
<i>T. obliquus</i>	2,37 ± 0,24	3,91 ± 0,92	173,83 ± 7,21	7,85 ± 0,84
<i>C. vulgaris</i> 898	12,64 ± 1,78	14,76 ± 1,46	577,28 ± 19,34	7,46 ± 0,22
<i>C. vulgaris</i> 788	11,55 ± 1,25	8,72 ± 1,46	718,31 ± 24,04	4,16 ± 0,07
<i>C. vulgaris</i> 262	10,49 ± 0,35	7,41 ± 0,14	668,92 ± 23,17	8,37 ± 0,41
<i>C. vulgaris</i> 267	6,89 ± 0,41	5,53 ± 0,45	659,22 ± 29,39	12,11 ± 0,72

W otrzymanych EPS oznaczono zawartość cukrów całkowitych i białek. Badane EPS charakteryzowały się zawartością cukrów całkowitych na poziomie 600–700 μg mL⁻¹, natomiast najwyższe stężenie (718 μg mL⁻¹), zaobserwowano w EPS

syntetyzowanym przez *C. vulgaris* 788. Z kolei zawartość białka w badanych EPS mieściła się w zakresie 4–8,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, z wyjątkiem egzopolimeru syntetyzowanego przez *C. vulgaris* 267, który zawierał 12,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ białka.

Na podstawie otrzymanych wyników dotyczących wydajności i specyficznej produktywności EPS, do dalszych badań wybrano trzy gatunki charakteryzujące się najwyższą wydajnością i specyficzną produktywnością EPS: *V. magna*, *P. kessleri* i *C. vulgaris* 898.

4.2. Wpływ wybranych czynników abiotycznych na syntezę EPS

4.2.1. Źródło azotu

W celu określenia optymalnego źródła azotu dla wzrostu komórek oraz syntezy EPS przeanalizowano cztery związki, zawierające różne formy azotu: amonowa – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amonowa i azotanowa – NH_4NO_3 , azotanowa – NaNO_3 i organiczne źródło azotu – mocznik. Zastosowano równoważne stężenia azotu (atomowego) względem zawartości azotanu sodu w pożywce BG11 – 1,5 g L^{-1} . Badane źródła azotu wpływały istotnie ($p \leq 0,05$) na stężenie biomasy komórkowej badanych gatunków (Tabela 7). Dla wszystkich badanych gatunków największe stężenie biomasy komórkowej otrzymano w hodowlach z dodatkiem azotanu sodu. W przypadku *P. kessleri* i *C. vulgaris* drugim najkorzystniejszym źródłem azotu pod względem produktywności biomasy jest mocznik, natomiast w przypadku *V. magna* jest to azotan amonu.

Wydajność i specyficzną produktywność EPS syntetyzowanych na podłożu zawierającym azotan amonu i mocznik, a w przypadku *V. magna*, również azotan amonu przedstawiono w Tabeli 7. Z hodowli w których zaobserwowano zahamowanie wzrostu nie izolowano EPS. Największą wydajność syntezy EPS (64,9 mg L^{-1} całkowitego EPS i 23,2 mg L^{-1} rozpuszczalnego EPS) uzyskano w hodowli *P. kessleri* prowadzonej na pożywce zawierającej NaNO_3 . W przypadku *C. vulgaris* 898 (17 mg L^{-1} i 14,6 mg g^{-1}) i *V. magna* (18,7 mg L^{-1} i 12,5 mg g^{-1}) najwyższą wydajność i specyficzną produktywność całkowitego EPS stwierdzono w hodowlach prowadzonych na podłożu zawierającym azotan sodu. Natomiast wydajność i specyficzną produktywność rozpuszczalnego EPS z *C. vulgaris* i *V. magna* jest niższa w hodowlach prowadzonych na podłożu zawierającym mocznik. Ilość rozpuszczalnego EPS uzyskana z badanych hodowli jest kilkukrotnie niższa niż ilość całkowitego EPS. Wydajność syntezy rozpuszczalnego EPS stanowi 35,5%, 37% i 11,3% wydajności

całkowitego EPS syntetyzowanego odpowiednio przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* 898 i *V. magna* na podłożu zawierającym azotan sodu. W przypadku hodowli prowadzonej w obecności mocznika udział frakcji rozpuszczalnej EPS jest wyższy i wynosi 54%, 86,8% oraz 36,6% w przypadku *P. kessleri*, *C. vulgaris* 898 i *V. magna*. Oznacza to, że w hodowlach prowadzonych na podłożu zawierającym azotan sodu, ilość frakcji nierozpuszczalnej EPS, która jest różnicą między wydajnością całkowitego i rozpuszczalnego EPS, jest stosunkowo wysoka.

Pomimo wysokiego stężenia biomasy komórkowej *V. magna*, gatunek ten wykazuje niską produktywność rozpuszczalnego EPS w porównaniu do pozostałych badanych gatunków. Wydajność syntezy rozpuszczalnego EPS przez *C. vulgaris* 898 oraz *V. magna* nie wykazuje różnic w zależności od zastosowanego źródła azotu podczas hodowli. Natomiast NH_4NO_3 wpływa istotnie na obniżenie wydajności syntezy EPS w hodowli *V. magna*. W przypadku *P. kessleri*, azotan sodu okazał się optymalnym źródłem azotu pod kątem ilości otrzymanego EPS. W związku z powyższym NaNO_3 wybrano jako optymalne źródło azotu dla tego gatunku. Z uwagi na najwyższy przyrost biomasy komórkowej, a także najwyższą wydajność i specyficzną produktywność całkowitego EPS, a w przypadku *P. kessleri* również rozpuszczalnego EPS, na podłożu zawierającym azotan sodu, związek ten wybrano do dalszych badań.

Tabela 7. Wpływ źródła azotu na stężenie biomasy komórkowej glonów oraz wydajność i specyficzną produktywność całkowitego i rozpuszczalnego EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* 898, *V. magna*.

Gatunek	Źródło azotu	Stężenie biomasy komórkowej [g L ⁻¹]	Całkowity EPS		Rozpuszczalny EPS	
			Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]	Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]
<i>P. kessleri</i>	NaNO ₃	1,9 ± 0,24	64,9 ± 4,03	34,4 ± 1,55	23,2 ± 1,44	12,3 ± 1,41
	CO(NH ₂) ₂	1,4 ± 0,32	19,3 ± 3,28	13,7 ± 1,96	10,7 ± 0,20	7,4 ± 1,34
	NH ₄ NO ₃	0,5 ± 0,12	-	-	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 ± 0,24	-	-	-	-
<i>C. vulgaris</i> 898	NaNO ₃	1,7 ± 0,39	17,0 ± 1,06	14,6 ± 3,26	6,1 ± 0,39	5,4 ± 0,49
	CO(NH ₂) ₂	1,1 ± 0,10	7,7 ± 1,53	7,6 ± 0,86	6,7 ± 0,13	6,2 ± 0,33
	NH ₄ NO ₃	0,4 ± 0,21	-	-	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 ± 0,21	-	-	-	-
<i>V. magna</i>	NaNO ₃	1,5 ± 0,22	18,7 ± 0,61	12,5 ± 1,89	2,02 ± 0,14	1,36 ± 0,28
	CO(NH ₂) ₂	0,8 ± 0,17	4,0 ± 0,72	4,6 ± 0,77	1,97 ± 0,27	2,33 ± 0,45
	NH ₄ NO ₃	1,4 ± 0,18	3,5 ± 0,83	2,47 ± 0,35	1,04 ± 0,17	0,74 ± 0,11
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 ± 0,17	-	-	-	-

4.2.2. Stężenie źródła azotu

Następny etap badań obejmował określenie wpływu stężenia azotanu sodu na przyrost biomasy i ilość produkowanego EPS. Wyniki przedstawione w Tabeli 8 wskazują, że zmniejszenie zawartości azotanu sodu w podłożu wzrostowym do 0,75 g L⁻¹ wpływało na zwiększenie stężenia biomasy końcowej w hodowlach *C. vulgaris* i *V. magna* w stosunku do warunków kontrolnych. Natomiast hodowla *P. kessleri* charakteryzowała się takim samym przyrostem biomasy komórkowej we wszystkich wariantach podłoża zawierających azot. W warunkach braku azotanu sodu w podłożu (0 g L⁻¹) obserwowane były minimalne przyrosty biomasy wszystkich analizowanych gatunków, a także obniżona wydajność syntezy EPS. Najwyższą wydajność syntezy całkowitego EPS oraz rozpuszczalnego EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri*, wynoszącą odpowiednio 30,7 mg L⁻¹ i 10,1 mg L⁻¹, stwierdzono w hodowlach prowadzonych na podłożu zawierającym 1,5 g L⁻¹ NaNO₃. *C. vulgaris*, pomimo niskiego przyrostu biomasy w hodowli niezawierającej źródła azotu, wykazuje

stosunkowo wysoką wydajność syntezy zarówno całkowitego ($25,5 \text{ mg L}^{-1}$), jak i rozpuszczalnego EPS ($12,7 \text{ mg L}^{-1}$). Wartości te są porównywalne z wydajnością syntezy EPS uzyskanymi z hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym $1,5 \text{ g L}^{-1}$ NaNO_3 : $30,6 \text{ mg L}^{-1}$ i $11,6 \text{ mg L}^{-1}$ odpowiednio dla całkowitego i rozpuszczalnego EPS. *V. magna*, podobnie jak *P. kessleri* wykazuje najwyższą wydajność syntezy całkowitego EPS w obecności najwyższego zastosowanego stężenia azotanu sodu ($1,5 \text{ g L}^{-1}$). W przypadku rozpuszczalnego EPS najwyższą wydajność syntezy EPS przez komórki *V. magna* stwierdzono w warunkach stężenia $0,375 \text{ mg L}^{-1}$ azotanu sodu w podłożu hodowlanym. Najwyższe wartości specyficznej produktywności EPS, dla wszystkich badanych gatunków glonów, zaobserwowano w hodowlach prowadzonych w warunkach 0 g L^{-1} azotanu sodu w podłożu, wynoszące odpowiednio $42,1 \text{ mg L}^{-1}$, $82,6 \text{ mg L}^{-1}$ i $20,8 \text{ mg L}^{-1}$ dla EPS z *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*. Specyficzna produktywność EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri* w warunkach braku egzogenego źródła azotu w podłożu hodowlanym jest dwukrotnie wyższa niż w warunkach kontrolnych ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), podczas gdy w przypadku *C. vulgaris* stwierdzono czterokrotny wzrost specyficznej produktywności EPS.

Tabela 8. Stężenie biomasy komórek glonów oraz EPS w hodowlach *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* wzrastających na podłożu zawierającym różne stężenia azotanu sodu (\pm SD).

Gatunek	Stężenie NaNO ₃ [g L ⁻¹]	Stężenie biomasy komórkowej [g L ⁻¹]	Całkowity EPS		Rozpuszczalny EPS	
			Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]	Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]
<i>P. kessleri</i>	0	0,1 ± 0,02	9,3 ± 0,12	42,1 ± 3,26	3,2 ± 0,19	14,5 ± 2,34
	0,375	0,9 ± 0,12	19,7 ± 0,41	15,5 ± 0,31	6,1 ± 0,11	4,8 ± 0,28
	0,75	0,9 ± 0,15	20,3 ± 0,44	16,0 ± 0,45	6,4 ± 0,27	5,1 ± 0,46
	1,5	1,0 ± 0,26	30,7 ± 0,83	18,9 ± 0,66	10,1 ± 0,14	6,2 ± 0,26
<i>C. vulgaris</i> 898	0	0,2 ± 0,10	25,5 ± 0,65	82,6 ± 6,54	12,7 ± 0,34	41,1 ± 3,99
	0,375	1,1 ± 0,10	15,7 ± 0,25	9,2 ± 0,34	6,5 ± 0,15	3,8 ± 0,12
	0,75	1,2 ± 0,19	20,4 ± 1,43	10,3 ± 0,21	7,0 ± 0,05	3,5 ± 0,03
	1,5	0,9 ± 0,12	30,6 ± 0,43	22,2 ± 0,68	11,6 ± 0,21	8,4 ± 0,05
<i>V. magna</i>	0	0,5 ± 0,06	15,6 ± 0,45	20,8 ± 0,52	5,8 ± 0,09	7,7 ± 0,20
	0,375	1,1 ± 0,11	16,2 ± 0,66	8,9 ± 0,34	6,3 ± 0,12	3,5 ± 0,29
	0,75	1,3 ± 0,07	12,7 ± 0,51	6,0 ± 0,21	4,9 ± 0,20	2,3 ± 0,10
	1,5	1,0 ± 0,08	26,4 ± 0,77	18,4 ± 0,21	4,0 ± 0,15	2,8 ± 0,09

4.2.3. Natężenie światła

W celu określenia wpływu natężenia światła na syntezę EPS hodowle jednokomórkowych glonów prowadzono w następujących warunkach natężenia światła: 40 μ mol foton m⁻² s⁻¹ (LL), 60 μ mol foton m⁻² s⁻¹ (ML) i 350 μ mol foton m⁻² s⁻¹ (HL) w systemie oświetlenia 16 h światło: 8 h ciemność. Uzyskane wyniki (Tabela 9) wskazują, że wraz ze wzrostem natężenia światła wzrasta stężenie biomasy komórkowej, a także wydajność i specyficzna produktywność syntetyzowanego EPS – zarówno całkowitego jak i frakcji rozpuszczalnej w wodzie. Wydajność całkowitego EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri* przy niskim natężeniu światła wynosi 33,7 mg L⁻¹, natomiast pod wpływem wysokiego natężenia światła uzyskano 66,5 mg L⁻¹. Podczas gdy *C. vulgaris* syntetyzuje 29,5 mg L⁻¹ EPS (LL) i 131,8 mg L⁻¹ EPS (HL),

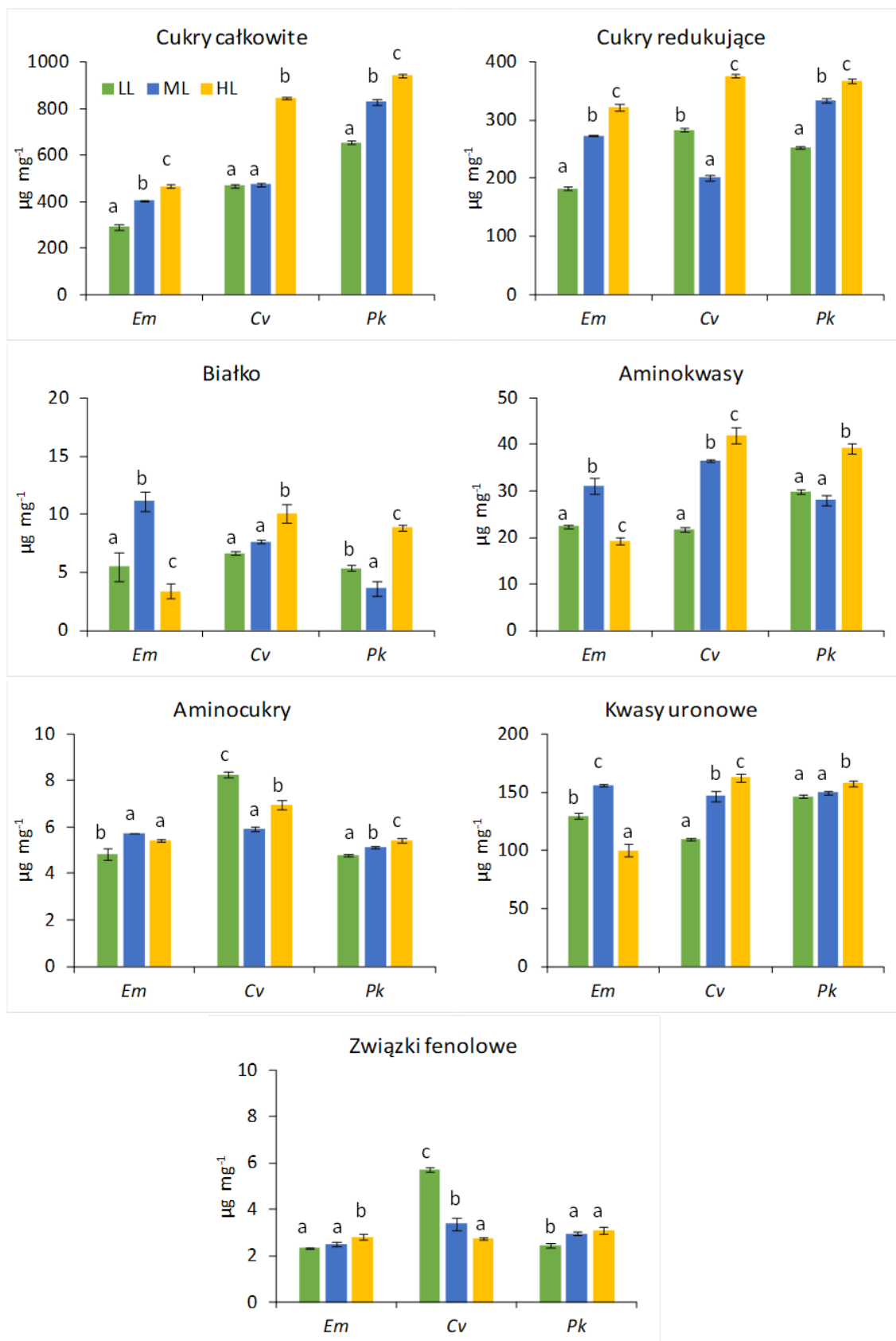
a więc wysokie natężenie światła powoduje ponad czterokrotny wzrost wydajności syntezy EPS przez *C. vulgaris*. W przypadku *V. magna* wzrost wydajności syntezy EPS w warunkach wysokiego natężenia światła jest niemal siedmiokrotnie wyższy niż przy świetle o niskim natężeniu. Natomiast uwzględniając specyficzną produktywność EPS, różnice nie są tak wysokie. Wysokie natężenie światła przyczynia się do wyraźnie zwiększonej syntezy całkowitego EPS przez komórki *V. magna* oraz rozpuszczalnego EPS w przypadku *V. magna* i *C. vulgaris*. *P. kessleri* okazała się gatunkiem najmniej wrażliwym na wysokie natężenie światła.

Tabela. 9. Wpływ natężenia światła [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] na stężenie biomasy oraz wydajność i specyficzną produktywność EPS ($\pm\text{SD}$).

Gatunek	Natężenie światła	Stężenie biomasy komórkowej [g L ⁻¹]	Całkowity EPS		Rozpuszczalny EPS	
			Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]	Wydajność [mg L ⁻¹]	Specyficzna produktywność [mg g ⁻¹]
<i>P. kessleri</i>	40	1,1 ± 0,02	33,67 ± 1,59	30,61 ± 1,44	6,97 ± 0,17	6,33 ± 0,15
	60	1,3 ± 0,18	41,96 ± 0,97	32,42 ± 4,24	12,23 ± 0,28	9,46 ± 1,44
	350	1,7 ± 0,27	49,11 ± 2,88	40,21 ± 3,55	27,26 ± 1,6	16,74 ± 1,48
<i>C. vulgaris</i> 898	40	1,2 ± 0,02	29,49 ± 1,95	25,08 ± 1,87	11,05 ± 0,74	9,85 ± 0,5
	60	1,3 ± 0,12	49,92 ± 1,4	39,01 ± 4,67	25,86 ± 0,72	20,21 ± 2,42
	350	3,5 ± 0,39	131,76 ± 5,02	37,95 ± 3,61	91,74 ± 6,43	26,34 ± 1,78
<i>V. magna</i>	40	1,1 ± 0,07	20,7 ± 1,24	18,27 ± 0,76	5,69 ± 0,12	5,03 ± 0,26
	60	1,1 ± 0,13	41,65 ± 1,79	36,59 ± 2,64	9,65 ± 0,15	8,5 ± 1,02
	350	2,4 ± 0,3	141,61 ± 4,23	59,71 ± 6,08	69,83 ± 2,09	26,34 ± 1,78

4.3. Wpływ natężenia światła na skład biochemiczny EPS

Uzupełnieniem badań dotyczących wpływu natężenia światła na produktywność EPS jest określenie składu chemicznego egzopolimerów syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* 898 i *V. magna*. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie wykresów na Ryc. 2. Zawartość cukrów całkowitych w EPS syntetyzowanym w warunkach wysokiego natężenia światła (HL) względem EPS syntetyzowanych przy niskim natężeniu światła (LL) wzrasta o 30,5%, 44,5% i 35,7%, a cukrów redukujących o 31,3%, 24,8% i 43,2% odpowiednio w EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*. Wysokie natężenie światła zwiększa również zawartość białek (o 39,4% i 33,7%) i aminokwasów (o 23,8% i 48,3%) w EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri* i *C. vulgaris*. W przypadku EPS z *V. magna* wysokie natężenie światła prowadzi do zmniejszenia zawartości białek i aminokwasów (względem LL). Najwyższe stężenia białek i aminokwasów (odpowiednio 11,13 $\mu\text{g mg}^{-1}$ i 31,11 $\mu\text{g mg}^{-1}$) stwierdzono w EPS wyizolowanym z hodowli prowadzonej w warunkach średniego natężenia światła (ML). W przypadku EPS przez *P. kessleri* i *V. magna* istotny statystycznie wzrost stężenia aminocukrów stwierdzono jedynie w próbkach wyizolowanych z hodowli prowadzonych w warunkach wysokiego natężenia światła. Istotnie statystycznie zmiany zawartości aminocukrów obserwowane są w EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris*, gdzie wzrost natężenia światła powoduje spadek zawartości aminocukrów z 8,3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ przy niskim natężeniu światła (LL), do 5,9 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (ML) i 7 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (HL). EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* w warunkach niskiego natężenia światła zawiera 109,2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ kwasów uronowych, natomiast wzrost natężenia światła zwiększa ich ilość o 25,5% (ML) i 32,8% (HL). Wzrost zawartości kwasów uronowych, obserwowany jest również w EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri* pod wpływem wysokiego natężenia światła. W przypadku EPS z *V. magna* najwyższą zawartość kwasów uronowych – 156,1 $\mu\text{g mg}^{-1}$, stwierdzono w próbce syntetyzowanej w warunkach średniego natężenia światła. Badane EPS zawierają również niewielkie ilości substancji fenolowych wynoszące 2–3,5 $\mu\text{g mg}^{-1}$, z wyjątkiem EPS syntetyzowanego przez *C. vulgaris* przy niskim natężeniu światła, który zawiera 5,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$ badanych związków.



Ryc. 2. Skład chemiczny EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* 898 i *V. magna* w warunkach różnego natężenia światła.

Na podstawie uzyskanych wyników, do prowadzenia hodowli badanych gatunków jednokomórkowych glonów w celu uzyskania jak największej wydajności i specyficznej produktywności EPS, wybrano następujące warunki:

- azotan sodu jako źródło azotu,
- stężenie azotanu sodu wynoszące $1,5 \text{ g L}^{-1}$,
- natężenie światła wynoszące $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Wybierając natężenie światła do dalszych hodowli, kierowano się składem biochemicznym analizowanych EPS: zawartością białek, aminokwasów i kwasów uronowych, które są kluczowymi związkami odpowiadającymi za właściwości sorpcyjne EPS, badane w dalszej części pracy. Natężenie światła wynoszące $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ML) okazało się najkorzystniejsze pod względem zawartości kwasów uronowych we wszystkich badanych EPS. Oprócz tego ML zapewnia wysoki poziom aminokwasów w EPS *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*.

4.4. Skład chemiczny i właściwości sorpcyjne autotroficznych EPS (P.2.)

Ciempiel W., Czemińska M., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., Wiącek D., Jarosz-Wilkotłazka A., Krzemińska I. (2022). Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Celem badań opisanych w publikacji **P.2.** było określenie składu chemicznego zewnątrzkomórkowych polimerów syntetyzowanych w warunkach autotroficznych, a także zbadanie ich zdolności do usuwania jonów kadmu (II) i ołowiu (II) z roztworów wodnych zawierających badane jony metali o stężeniu 10 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹ i 150 mg L⁻¹.

4.4.1. Skład chemiczny

EPS wyizolowane z hodowli *P. kessleri* i *C. vulgaris* 898 poddano analizie składu chemicznego z zastosowaniem metod kolorymetrycznych oraz chromatografii cienkowarstwowej. Zawartość pierwiastków w EPS określono za pomocą ICP-OES.

EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* charakteryzuje się wyższą zawartością białek, cukrów redukujących, kwasów uronowych i aminokwasów niż EPS otrzymany z hodowli *P. kessleri*. Wymienione w poprzednim zdaniu związki zawierają grupy karboksylowe i hydroksylowe, co może świadczyć o tym, że EPS z *C. vulgaris* może wykazywać większą pojemność sorpcyjną wobec jonów metali. Na podstawie analizy chromatograficznej (TLC) stwierdzono obecność ramnozy, mannozy i galaktozy w obu badanych EPS, a w EPS z *P. kessleri* stwierdzono również obecność ksylozy.

Dodatkowo przeanalizowano zawartość innych pierwiastków (Ca, Mg, Mn, P, S, Zn) w EPS, a także ich stężenie w roztworze po procesie sorpcji. Analiza stężenia pierwiastków w badanych EPS wykazała wysoką (>18 µg mg⁻¹) zawartość wapnia, magnezu i siarki, a w EPS z *C. vulgaris* również fosforu. W EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris* stwierdzono niemal dwukrotnie wyższą zawartość wapnia i siarki, oraz ponad trzykrotnie wyższe stężenie fosforu, niż w EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri*, który z kolei charakteryzuje się wyższą zawartością magnezu.

4.4.2. Sorpcja ołowiu i kadmu (ICP-OES)

Doświadczenie sorpcji przeprowadzono z zastosowaniem roztworów azotanu ołowiu i azotanu kadmu o stężeniach 10, 50, 100 i 150 mg L⁻¹ i EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* o stężeniu 100 mg L⁻¹. Uzyskane wyniki wskazują, że EPS z *P. kessleri* wykazuje najwyższą skuteczność adsorbowania jonów ołowiu z roztworu o stężeniu 10 mg L⁻¹ Pb(II). Natomiast EPS z *C. vulgaris* najwyższą wartość adsorpcji wykazuje w środowisku zawierającym 100 mg L⁻¹ i 150 mg L⁻¹ Pb(II). W obecności jonów kadmu, oba badane EPS wykazują potencjał usuwania wynoszący 2–5%, a pojemność sorpcyjna tych EPS wobec jonów Cd(II) nie przekracza 50 mg g⁻¹. Z kolei w przypadku jonów Pb(II) wartości te były znacznie wyższe i wynosiły odpowiednio 264,1 mg g⁻¹ dla EPS z *P. kessleri* i 573,6 mg g⁻¹ dla EPS z *C. vulgaris*. Analiza zmian zawartości pierwiastków sorpcji Pb(II) i Cd(II) wykazała, że jony wapnia, magnezu, siarki oraz fosforu są uwalniane do roztworu podczas procesu sorpcji.

4.4.3. Analiza grup funkcyjnych EPS

Widma FTIR badanych EPS z *P. kessleri* i *C. vulgaris* 898 wskazują na obecność pasm typowych dla polisacharydów: grup –OH (3358 cm⁻¹ EPS z *P. kessleri* i 3306 cm⁻¹ EPS z *C. vulgaris*), –CH– (2919 cm⁻¹ i 2938 cm⁻¹), C=O (1730 cm⁻¹), –COO⁻ (1608 cm⁻¹ i 1597 cm⁻¹ oraz 1416 cm⁻¹), P–O/S–O (1247 cm⁻¹ i 1249 cm⁻¹), C–O/C–O–H (1046 cm⁻¹ i 1035 cm⁻¹), oraz C–O i C–H w regionie anomerycznym (900–700 cm⁻¹).

W obecności jonów Cd(II) wzrosła intensywność pasma grup hydroksylowych oraz karboksylowych, pojawiło się pasmo 1623 cm⁻¹, a także intensywne pasmo ok. 1301 cm⁻¹ w EPS syntetyzowanych przez oba gatunki glonów. Natomiast w obecności jonów Pb(II) widma FTIR badanych EPS z *P. kessleri* wykazują inne zmiany niż w przypadku oddziaływania EPS *C. vulgaris* z jonami ołowiu. W EPS z *P. kessleri* nastąpiło przesunięcie pasma 1608 cm⁻¹ na 1574 cm⁻¹, a pasmo 1416 cm⁻¹ uległo przesunięciu na 1404 cm⁻¹, pojawiło się też pasmo 1317 cm⁻¹. Z kolei w *C. vulgaris* EPS zaobserwowano pojawienie się pasma 1621 cm⁻¹, a pasmo 1597 cm⁻¹ uległo przesunięciu na 1574 cm⁻¹ (podobnie jak w przypadku kadmu), pasmo 1416 cm⁻¹ zmieniło maksimum absorbancji na 1398 cm⁻¹ i wyraźnie wzrosła jego intensywność, osiągając najwyższą wartość w obecności 100 mg L⁻¹ Pb(II). Zaobserwowane zmiany

wskazują na udział grup karboksylowych, a w przypadku Cd(II), również hydroksylowych w oddziaływaniu EPS z jonami metali.

4.5. Skład chemiczny i właściwości sorpcyjne miksotroficznych EPS

(P.3)

Celem badań podjętych w publikacji **P.3.** jest określenie wpływu warunków autotroficznych i miksotroficznych na produktywność, skład chemiczny oraz właściwości sorpcyjne EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*.

4.5.1. Wstęp

W związku z wzrastającym zainteresowaniem egzopolimerami wytwarzanymi przez jednokomórkowe glony, istotne jest poszukiwanie warunków wzrostu przyczyniających się do zwiększenia ilości syntetyzowanych EPS. Egzopolimery syntetyzowane przez jednokomórkowe glony wykazują potencjał do bioremediacji środowisk zanieczyszczonych metalami ciężkimi (Ciempiel i in., 2022). Dane literaturowe wskazują, że warunki miksotroficzne wpływają na syntezę zewnątrzkomórkowych polimerów (Cheirsilp i in., 2016; Li i in., 2020a). Spośród badanych źródeł węgla organicznego, najwyższe ilości EPS uzyskano w obecności glukozy (Li i in., 2020b). Zespół Vo i in., wykazał, że rodzaj źródła węgla organicznego wpływa na stężenie zewnątrzkomórkowych cukrów i białek w hodowli *C. vulgaris* (Vo i in., 2020). Miksotroficzne warunki wzrostu wpływają na metabolizm komórkowy, prowadząc do zwiększonej syntezy węglowodanów i EPS (Li i in., 2020a). Z uwagi na to, że miksotrofizm wpływa na metabolizm komórkowy, wprowadzenie organicznego źródła węgla w postaci glukozy może wpływać na skład chemiczny i właściwości zewnątrzkomórkowych polimerów (Babiak i Krzemińska, 2021).

Sorpcja metali jest procesem chemicznym zależnym od wielu czynników takich jak: właściwości sorbentu, wartość pH układu, czas kontaktu, temperatura i rodzaj metalu (Dobrowolski i in., 2017). Poprzednie badania wykazały potencjał sorpcyjny EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* wzrastających w warunkach autotroficznych, wobec jonów Pb(II) i Cd(II) (Ciempiel i in., 2022).

Niniejsza publikacja obejmuje badanie wpływu warunków miksotroficznych na produktywność, skład biochemiczny i właściwości sorpcyjne zewnątrzkomórkowych polimerów otrzymanych z hodowli *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*. W celu wyjaśnienia mechanizmu sorpcji metali przez miksotroficzny EPS i zbadanie jego

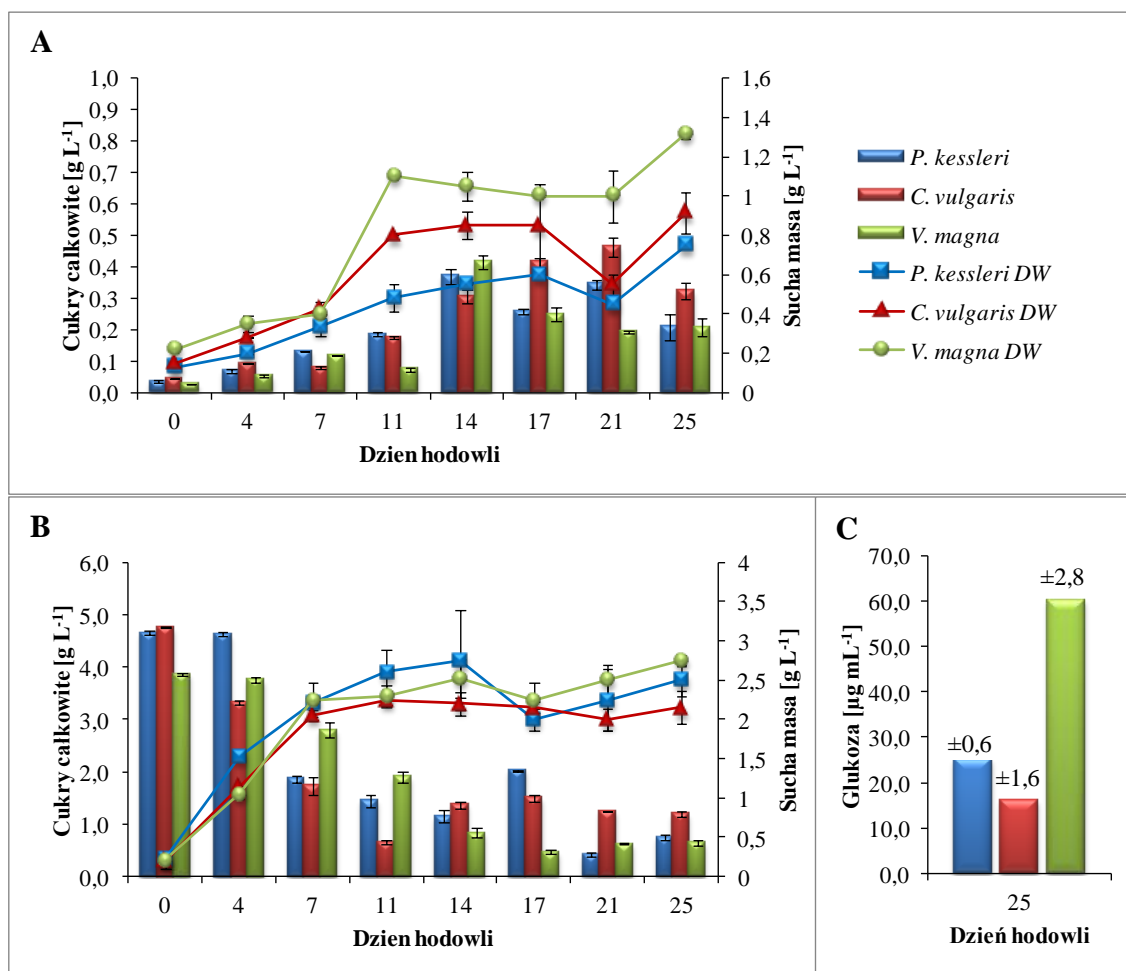
potencjału do zastosowania jako biosorbent, oddziaływanie jonów Pb(II) i EPS badano z wykorzystaniem technik FTIR i ICP-OES.

4.5.2. Zawartość cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym

Zmiany stężenia cukrów całkowitych w czasie trwania hodowli mierzono w podłożu hodowlanym metodą fenolowo-siarkową (DuBois i in., 1956) w celu monitorowania wykorzystania glukozy przez komórki oraz poziomu syntezy EPS. W hodowli autotroficznej zawartość cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym zwiększała się w kolejnych dniach hodowli (Ryc. 3A). Najwyższe stężenie cukrów całkowitych w hodowlach *P. kessleri* i *V. magna* stwierdzono w 14 dniu, a w przypadku *C. vulgaris* w 21 dniu hodowli. Ze względu na brak zewnętrznego źródła węgla, zawartość cukrów całkowitych stwierdzona w hodowli autotroficznej wskazuje na obecność zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) w podłożu hodowlanym.

Natomiast w hodowli mikotroficznej stężenie cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym po 6 h hodowli wynosiło 4,7 g L⁻¹, 4,3 g L⁻¹ i 3,9 g L⁻¹, odpowiednio dla *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* (Ryc. 3B). W kolejnych dniach zawartość cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym spada, wskazując na wykorzystanie glukozy przez komórki glonów, co przekłada się na zwiększony przyrost biomasy glonów w hodowlach mikotroficznych w porównaniu do warunków autotroficznych. Wzrost stężenia cukrów całkowitych obserwowany jest w hodowlach mikotroficznych w 14 dniu (*P. kessleri*), 17 dniu (*C. vulgaris*) i 21 dniu hodowli (*V. magna*), przy czym *P. kessleri* i *C. vulgaris* osiąga maksimum w 17 dniu, a *V. magna* w 25 dniu hodowli.

W celu określenia stopnia wykorzystania glukozy przez komórki glonów, zmierzono jej stężenie w pożywce po zakończeniu hodowli metodą Somogyi-Nelsona. Wyniki wykazały zawartość glukozy w pożywce w zakresie 16–60 mg L⁻¹ (Ryc. 3C). Różnica między stężeniem cukrów całkowitych i glukozy wskazuje na obecność EPS w podłożu hodowlanym.



Ryc. 3. Stężenie cukrów całkowitych w podłożu hodowlanym i stężenie biomasy komórkowej (sucha masa) *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* w warunkach autotroficznych (A) i mikstotroficznych (B) (\pm SD), oraz zawartość glukozy w podłożu pohodowlanym w ostatnim dniu hodowli mikstotroficznej (C).

4.5.3. Wydajność i specyficzna produktywność EPS

Wyniki przedstawione w Tabeli 10 wskazują, że warunki mikstotroficzne wpływają na zwiększenie syntezy zewnątrzkomórkowych polimerów przez badane gatunki glonów. Najwyższą wydajność, jak też specyficzną produktywność EPS zarówno w warunkach autotroficznych jak i mikstotroficznych stwierdzono w hodowli *C. vulgaris*. Dodatek glukozy do podłoża hodowlanego spowodował 4-krotny wzrost ilości rozpuszczalnego EPS produkowanego przez *V. magna*, niemal 10-krotny wzrost w przypadku *P. kessleri* i 19-krotny w przypadku *C. vulgaris*.

Tabela 10. Wydajność [mg L^{-1}] i specyficzna produktywność [mg L^{-1}] całkowitych i rozpuszczalnych EPS (\pm SD) syntetyzowanych w warunkach autotroficznych (A) i miksotroficznych (M).

Gatunek	Warunki troficzne	Całkowity EPS		Rozpuszczalny EPS	
		Wydajność [mg L^{-1}]	Specyficzna produktywność [mg g^{-1}]	Wydajność [mg L^{-1}]	Specyficzna produktywność [mg g^{-1}]
<i>P. kessleri</i>	A	18,9 \pm 2,7	25,2 \pm 0,2	17,2 \pm 0,4	22,9 \pm 0,2
	M	294,8 \pm 19,9	118,5 \pm 9,7	164,6 \pm 6,5	66,2 \pm 5,4
<i>C. vulgaris</i>	A	43,0 \pm 3,7	47,4 \pm 5,7	14,3 \pm 0,7	15,7 \pm 1,9
	M	369,8 \pm 20,4	183,8 \pm 23,5	266,2 \pm 9,6	132,3 \pm 16,6
<i>V. magna</i>	A	21,1 \pm 1,7	16,1 \pm 0,9	19,4 \pm 0,5	15,1 \pm 0,4
	M	156,2 \pm 11,4	56,8 \pm 1,3	92,7 \pm 3,8	33,7 \pm 0,7

4.5.4. Skład biochemiczny

W celu określenia wpływu glukozy na zawartość cukrów całkowitych i redukujących, białek, aminokwasów, aminocukrów, kwasów uronowych i substancji fenolowych w badanych EPS oznaczono skład chemiczny EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych. Otrzymane wyniki (Tabela 11) wskazują, że EPS syntetyzowany w warunkach miksotroficznych charakteryzuje się wyższą zawartością cukrów całkowitych i redukujących niż EPS syntetyzowane przez komórki glonów wzrastające w warunkach autotroficznych. Ilość cukrów całkowitych w EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *V. magna* w warunkach miksotroficznych jest wyższa odpowiednio o 52% i 49% w porównaniu do ich zawartości EPS wyizolowanych z hodowli prowadzonych w warunkach autotroficznych. W przypadku EPS syntetyzowanego przez komórki *C. vulgaris* wzrost zawartości cukrów całkowitych w próbkach miksotroficznych wynosi 23%. Z kolei wzrost zawartości cukrów redukujących w EPS otrzymanych z hodowli miksotroficznych wynosi odpowiednio 62%, 47% i 44% dla *C. vulgaris*, *P. kessleri* i *V. magna*. W warunkach miksotroficznych wzrasta również zawartość białek: o 69% (*P. kessleri*), 65% (*C. vulgaris*) i 43% (*V. magna*) oraz aminokwasów o 17% (*C. vulgaris*) i 73% (*V. magna*) w porównaniu do zawartości tych związków w EPS syntetyzowanym w warunkach

autotroficznych. Otrzymane wyniki wskazują na wzrost zawartości aminokwasów w EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris* i *V. magna* w warunkach mikсотroficznych w porównaniu do warunków autotroficznych. Natomiast w przypadku *P. kessleri* wyższą zawartość aminokwasów stwierdzono w EPS syntetyzowanym w warunkach autotroficznych. EPS syntetyzowany przez *V. magna* w warunkach mikсотroficznych charakteryzuje się wyższą zawartością zarówno aminokwasów, jak też aminocukrów w porównaniu z EPS syntetyzowanym w warunkach autotroficznych. Dodatek glukozy do pożywki prowadzi również do zwiększenia stężenia substancji fenolowych w EPS syntetyzowanych w warunkach mikсотroficznych. Najwyższą zawartość substancji fenolowych stwierdzono w EPS z *V. magna* (5,4%) oraz w EPS z *P. kessleri* (4,9%) syntetyzowanych w warunkach mikсотroficznych. Stężenie kwasów uronowych było wyższe w EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych w stosunku do EPS wyizolowanych z hodowli mikсотroficznych. Zawartość kwasów uronowych mieściła się w zakresie 13,4–15,4%, przy czym najwyższą ilość stwierdzono w EPS produkowanym przez *V. magna* w warunkach autotroficznych.

Mikсотroficzne warunki wzrostu wpłynęły również na skład monosacharydów w badanych EPS. Na podstawie analizy wyników chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono obecność ramnozy, ksylozy, mannozy i galaktozy w EPS syntetyzowanych zarówno w warunkach autotroficznych, jak i mikсотroficznych. Fruktaza występuje we wszystkich EPS, oprócz produkowanego przez *V. magna* w warunkach autotroficznych. Natomiast podstawową różnicą jest pojawienie się glukozy we wszystkich EPS wyizolowanych z hodowli mikсотroficznych (Tabela 12).

Tabela 11. Skład biochemiczny EPS (% w/w) syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* w warunkach autotroficznych i miksotroficznych. Litery w indeksie górnym oznaczają istotność statystyczną przedstawionych wyników, analizowanych za pomocą testu Tukey'a, ANOVA ($p \leq 0,05$) (EPS = 1 mg mL⁻¹; n = 3; \pm SD).

Gatunek	Warunki troficzne	Cukry całkowite	Białka	Substancje fenolowe	Cukry redukujące	Kwasy uronowe	Aminocukry	Aminokwasy
<i>P. kessleri</i>	A	41,9 \pm 3,2 ^a	0,5 \pm 0,01 ^a	2,5 \pm 0,2 ^a	15,9 \pm 1,3 ^a	13,9 \pm 1,6 ^{a,b}	0,3 \pm 0,01 ^a	3,8 \pm 0,3 ^a
	M	86,5 \pm 1,4 ^c	1,6 \pm 0,14 ^d	4,9 \pm 0,4 ^c	41,5 \pm 1,1 ^d	13,4 \pm 0,5 ^a	0,4 \pm 0,02 ^b	2,8 \pm 0,3 ^a
<i>C. vulgaris</i>	A	71,8 \pm 2,4 ^b	0,4 \pm 0,01 ^{a,b}	1,6 \pm 0,4 ^b	18,6 \pm 2,8 ^a	14,6 \pm 0,7 ^{b,c}	0,3 \pm 0,00 ^a	3,4 \pm 0,3 ^a
	M	90,6 \pm 1,1 ^c	1,2 \pm 0,05 ^c	2,5 \pm 0,2 ^a	36,6 \pm 1,4 ^c	13,5 \pm 0,5 ^{a,b}	0,4 \pm 0,02 ^b	4,1 \pm 0,2 ^a
<i>V. magna</i>	A	36,9 \pm 1,2 ^a	0,3 \pm 0,03 ^b	2,1 \pm 0,1 ^{a,b}	17,0 \pm 0,7 ^a	15,4 \pm 0,1 ^c	0,2 \pm 0,01 ^c	2,4 \pm 0,1 ^a
	M	72,4 \pm 4,9 ^b	0,5 \pm 0,04 ^a	5,4 \pm 0,3 ^c	30,7 \pm 1,5 ^b	13,4 \pm 0,5 ^a	0,9 \pm 0,02 ^d	8,9 \pm 0,3 ^b

* po hydrolizie 4 M TFA

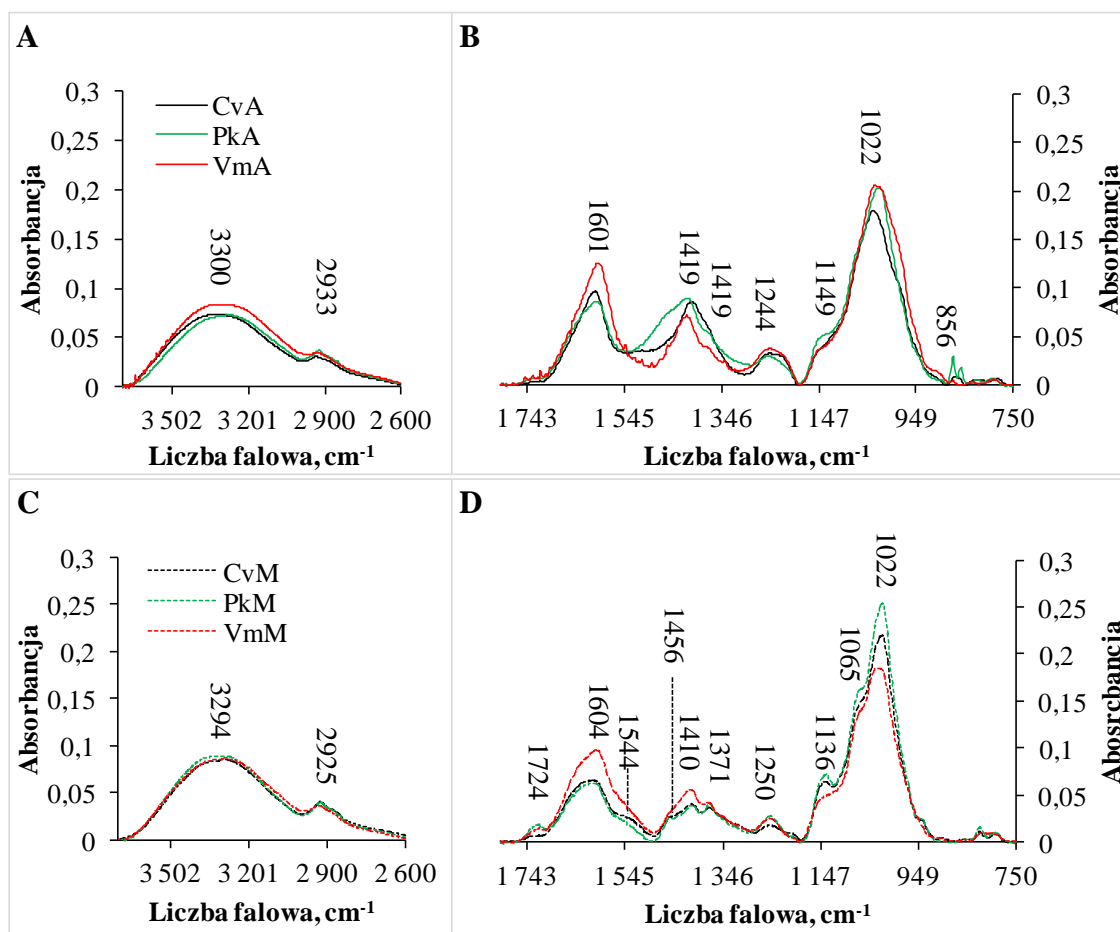
Tabela 12. Skład monosacharydów w EPS syntetyzowanych przez *C. vulgaris*, *P. kessleri* i *V. magnaw* autotroficznych (A) i miksotroficznych (M) warunkach.

Gatunek	Warunki troficzne	Skład monosacharydów
<i>P. kessleri</i>	A	Rha, Xyl, Man, Fru, Gal
	M	Rha, Xyl, Man, Glc, Fru, Gal
<i>C. vulgaris</i>	A	Rha, Xyl, Man, Fru, Gal
	M	Rha, Xyl, Man, Glc, Fru, Gal
<i>V. magna</i>	A	Rha, Xyl, Man, Gal
	M	Rha, Xyl, Man, Glc, Fru, Gal

Rha – ramnoza, Xyl – ksyloza, Man – mannoza, Glc – glukoza, Fru – fruktoza, Gal – galaktoza.

4.5.5. Porównanie widm FTIR EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych

W celu zobrazowania zmian w strukturze EPS wytwarzanych w warunkach autotroficznych i miksotroficznych zastosowano technikę FTIR, a wyniki przedstawiono na Ryc. 4. Analiza uzyskanych widm wykazała obecność pasm 3300 cm^{-1} , 2933 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1419 cm^{-1} , 1244 cm^{-1} i 1022 cm^{-1} w EPS wszystkich badanych gatunków. Ponadto w *PkA* obecne są również pasma 874 cm^{-1} i 856 cm^{-1} , które nie pojawiają się w przypadku *PkM*. EPS syntetyzowane w warunkach miksotroficznych charakteryzują się większym zróżnicowaniem pasm w regionie $1750\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, w porównaniu z próbkami wyizolowanymi z hodowli autotroficznych. W widmach *PkM*, *CvM*, i *VmM* pojawiają się pasma 1730 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1371 cm^{-1} , 1065 cm^{-1} , a także wzrasta intensywność pasma 1136 cm^{-1} w *PkM* i *CvM*. Stwierdzono również, że warunki miksotroficzne nie wpływają (lub wpływają w minimalnym stopniu) na widmo FTIR EPS syntetyzowanych przez *V. magna*.



Ryc. 4. Widma FTIR EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* (PkA, PkM), *C. vulgaris* (CvA, CvM) i *V. magna* (VmA, VmM) w warunkach autotroficznych (A, B) i miksotroficznych (C, D) zakresie liczb falowych 3500–2600 cm⁻¹ (A, C) i 750–1750 cm⁻¹ (B, D).

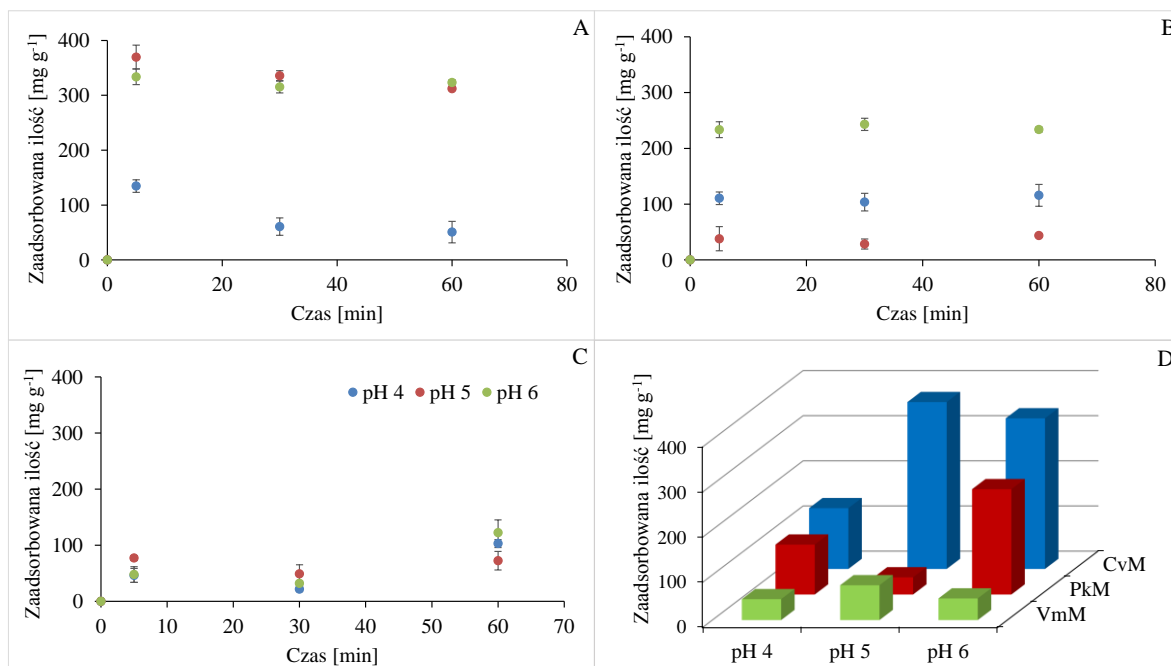
4.5.6. Sorpcja ołowiu

Egzopolimery uzyskane z hodowli miksotroficznych *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* z badano pod kątem właściwości sorpcyjnych w zależności od pH układu (pH 4, 5 i 6) i czasu kontaktu (5 min, 30 min i 60 min), czyli oddziaływania adsorbentu (Pb(II)) z biosorbentem (EPS). Uzyskane wyniki wskazują, że proces sorpcji ołowiu przez EPS z *P. kessleri* i *C. vulgaris* przebiega najefektywniej w ciągu pierwszych 5 minut (Tabela 13, Ryc. 5). Po tym czasie w przypadku EPS z *C. vulgaris* obserwowana jest desorpcja, szczególnie w pH 4. Ilość jonów Pb(II) zaadsorbowanych przez EPS z *P. kessleri* utrzymuje się podobnym poziomie niezależnie od czasu oddziaływania. Natomiast w przypadku EPS z *V. magna* obserwowany jest dalszy wzrost ilości zaadsorbowanych jonów ołowiu.

Analiza wpływu pH na przebieg procesu sorpcji jonów ołowiu przez EPS syntetyzowany przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* w warunkach mikstotroficznych wykazała, że najwyższa ilość jonów ołowiu (50% i 370 mg g⁻¹) została usunięta z roztworu o pH 5 przez EPS wyizolowany z hodowli *C. vulgaris* już po 5 minutach (Ryc. 5, Tabela 13). W pH 6 wydajność procesów sorpcji jest zbliżona, a różnice zmniejszają wraz z wydłużeniem czasu kontaktu. EPS *P. kessleri* po osiągnięciu stanu równowagi utrzymuje stały poziom wysycenia jonami Pb(II), a najwyższą efektywność wykazuje w pH 6 (233–243 mg g⁻¹). Z kolei EPS syntetyzowany przez *V. magna* wykazuje słabsze właściwości sorpcyjne w porównaniu z EPS syntetyzowanymi przez *P. kessleri* i *C. vulgaris*. Najwyższą ilość jonów Pb(II) usuniętych z roztworu wynoszącą 122,3 mg g⁻¹ zarejestrowano przy pH 6, podczas gdy potencjał usuwania wynosił 18,6%. W związku z tym, że pojemność sorpcyjna EPS z *V. magna* osiąga maksimum w 60 minucie, może to sugerować, że wydłużenie czasu kontaktu może wpłynąć na zwiększenie ilości wychwytywanych jonów Pb(II).

Tabela 13. Potencjał usuwania jonów Pb(II) przez mikstotroficzny EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* (CvM), *P. kessleri* (PkM) i *V. magna* (VmM). Litery w indeksie górnym oznaczają istotność statystyczną przedstawionych wyników, opracowaną przy użyciu ANOVA testu Tukey’a ($p \leq 0,05$) (EPS = 1 mg mL⁻¹; n = 3; \pm SD).

RP [%]		Czas kontaktu		
		5 min	30 min	60 min
CvM	pH 4	17,18 \pm 0,11 ^d	7,75 \pm 1,32 ^c	6,48 \pm 0,43 ^c
	pH 5	50,38 \pm 1,43 ^a	45,76 \pm 0,82 ^{a,b}	42,55 \pm 0,43 ^b
	pH 6	50,23 \pm 4,29 ^a	47,43 \pm 1,11 ^{a,b}	48,70 \pm 0,53 ^a
PkM	pH 4	14,10 \pm 1,36 ^b	12,39 \pm 2,78 ^b	14,77 \pm 2,49 ^b
	pH 5	5,22 \pm 2,94 ^a	3,94 \pm 1,23 ^a	5,98 \pm 0,27 ^a
	pH 6	35,85 \pm 2,07 ^c	37,34 \pm 1,57 ^c	35,92 \pm 0,44 ^c
VmM	pH 4	6,63 \pm 2,75 ^a	3,76 \pm 1,78 ^a	13,05 \pm 0,69 ^{b,c}
	pH 5	12,77 \pm 4,15 ^{b,c}	6,64 \pm 1,74 ^a	8,54 \pm 0,14 ^{a,b}
	pH 6	7,31 \pm 2,13 ^{a,b}	4,90 \pm 0,56 ^a	18,61 \pm 2,16 ^c



Ryc. 5. Kinetyka sorpcji Pb(II) przez EPS z *C. vulgaris* (A), EPS z *P. kessleri* (B) i EPS z *V. magna* (C) w pH 4 (niebieskie kropki), pH 5 (czerwone kropki) i pH 6 (zielone kropki). Wykres (D) przedstawia zaadsorbowane ilości Pb(II) po 5 min przez EPS poszczególnych gatunków jednokomórkowych glonów.

4.5.7. Analiza grup funkcyjnych EPS (FTIR)

W celu uzyskania szczegółowych informacji dotyczących oddziaływania jonów ołowiu z mikсотroficznymi EPS, przeprowadzono analizę widm FTIR CvM, PkM i VmM w pH 4, 5 i 6. Zmierzono także wartość pH wodnych roztworów kontrolnych próbek EPS. Kontrolę stanowi EPS syntetyzowany w warunkach mikсотroficznych nie poddawany modyfikacjom pH. Wyniki przedstawione w Tabeli 14 wskazują, że wodne roztwory badanych EPS różniły się pod względem wartości pH (przed modyfikacją). PkM i VmM mają charakter lekko kwasowy, natomiast CvM jest alkalicznym polisacharydem o pH 9,2.

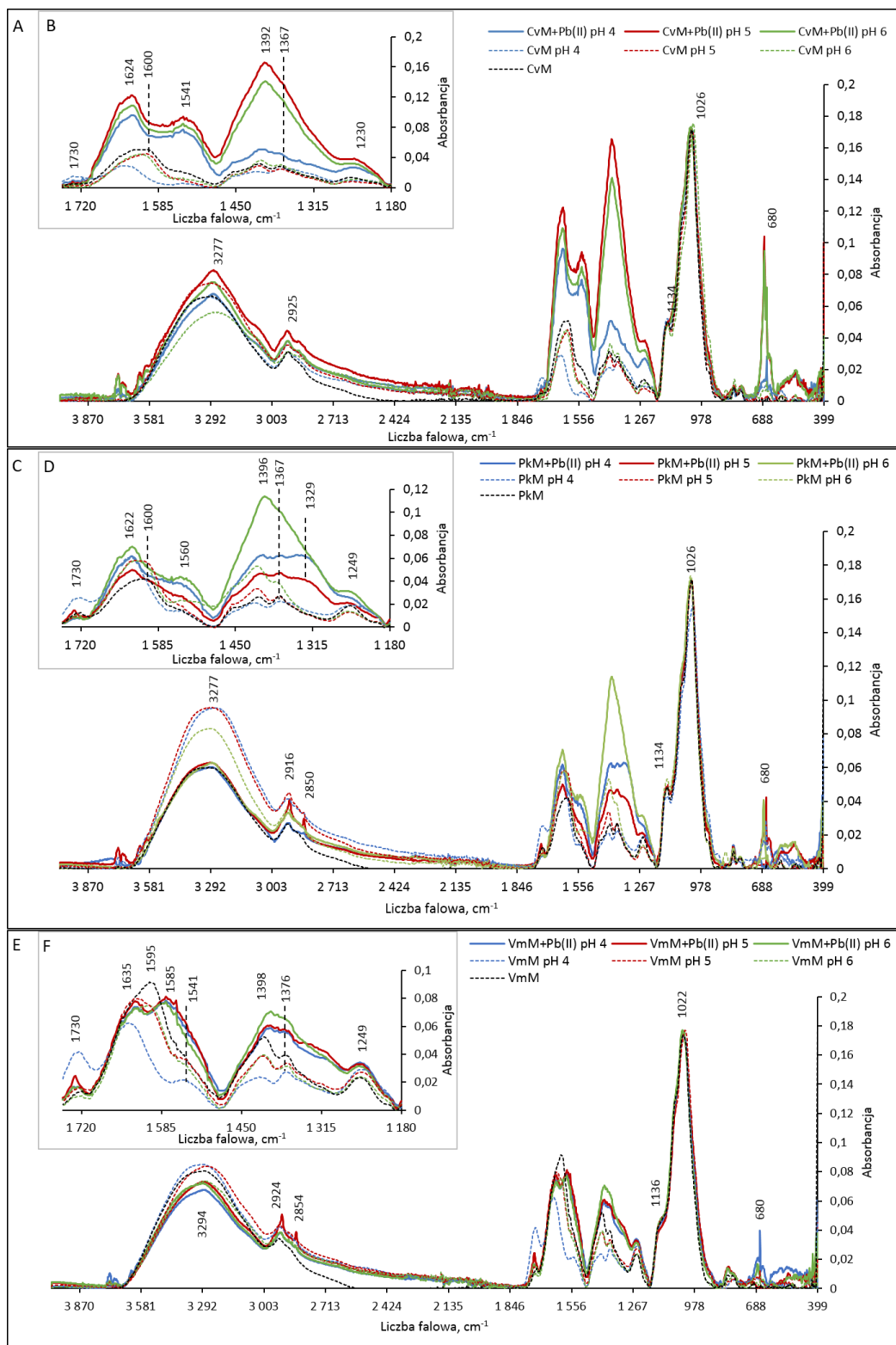
Największe różnice w widmie FTIR po modyfikacji pH zaobserwowano w zakresie 1750–1200 cm⁻¹ (Ryc. 6). We wszystkich badanych próbkach wartość pH wpływała na pasma grup karboksylowych przy 1604–1641 cm⁻¹ i 1406–1419 cm⁻¹, co przedstawiono w Tabeli 15. Zaobserwowano, że pasmo przy ok. 1604 cm⁻¹ przesunęło się w kierunku dalszych liczb falowych wraz ze spadkiem wartości pH układu. Pasma 1408 cm⁻¹ w CvM i PkM oraz 1412 cm⁻¹ w VmM zostało przesunięte w pH 6 do

odpowiednio 1412 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} i 1419 cm^{-1} . Wraz ze spadkiem wartości pH pasma te przesunęły się w kierunku niższych liczb falowych i obserwowano zmniejszenie ich intensywności. Dodatkowo zwiększyła się intensywność pasma 1730 cm^{-1} we wszystkich próbkach w pH 4. Zaobserwowano również wzrost intensywności pasma 3300 cm^{-1} w *PkM* po modyfikacji wartości pH wodnego roztworu EPS. Pasma ok. 1540 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} i 1240 cm^{-1} obserwowano zarówno w próbie kontrolnej (EPS o niezmiennym pH), jak i w EPS po modyfikacji pH.

Tabela 14. Wartość pH roztworów wodnych EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*, $C_{\text{EPS}} = 100 \text{ mg L}^{-1}$.

EPS	<i>PkM</i>	<i>CvM</i>	<i>VmM</i>
pH	5,8 ± 0,02	9,2 ± 0,05	6,3 ± 0,01

Po sorpcji jonów Pb(II) we wszystkich analizowanych EPS zanikło pasmo 1730 cm^{-1} . Widma absorpcji *CvM*-Pb(II) wykazały wzrost intensywności pasm w zakresie 1650–1200 cm^{-1} ; natomiast zanikło pasmo 1367 cm^{-1} . Jak pokazano w Tabeli 15, pasma grup karboksylowych przesunęły się do 1630 cm^{-1} i ok. 1400 cm^{-1} odpowiednio we wszystkich badanych próbkach, względem próby kontrolnej. Pasma ok. 1540 cm^{-1} obserwowane w kontrolnym EPS przesunęło się na 1585 cm^{-1} w *VmM*. Intensywność pasma 1240 cm^{-1} w obecności Pb(II) wzrosła w porównaniu z EPS o zmodyfikowanym pH. Dodatkowo szerokie pasmo na ok. 3300 cm^{-1} przesunęło się do 3277 cm^{-1} i stało się nieco ostrzejsze. Jego intensywność wzrosła w porównaniu z *CvM* o zmodyfikowanym pH. W przypadku *PkM* i *VmM* różnice w paśmie 3277 cm^{-1} nie były tak wyraźne jak w przypadku *CvM*. *PkM* i *VmM* wykazywały wzrost intensywności pasm przy 2924 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} i 1730 cm^{-1} . W *PkM* po sorpcji Pb(II) zaobserwowano pasmo 1329 cm^{-1} w pH 4 i 5. Podobne, chociaż słabsze pasmo obserwowano w *VmM*. Ponadto zaobserwowano ostre pasmo przy 680 cm^{-1} w *CvM*-Pb(II) w pH 5 i 6.



Ryc. 6. Widma FTIR *CvM* (A, B), *PkM* (C, D), *VmM* (E, F) w zakresie 4000–400 cm^{-1} (A, C, E) i 1750–1180 cm^{-1} (B, D, F). Próbkki mikstotroficzne (kontrola) – czarna przerywana linia; EPS o zmodyfikowanym pH – linia przerywana, EPS o zmodyfikowanym pH po sorpcji Pb(II) – linia ciągła; pH 4 (niebieski), pH 5 (czerwony), pH 6 (zielony).

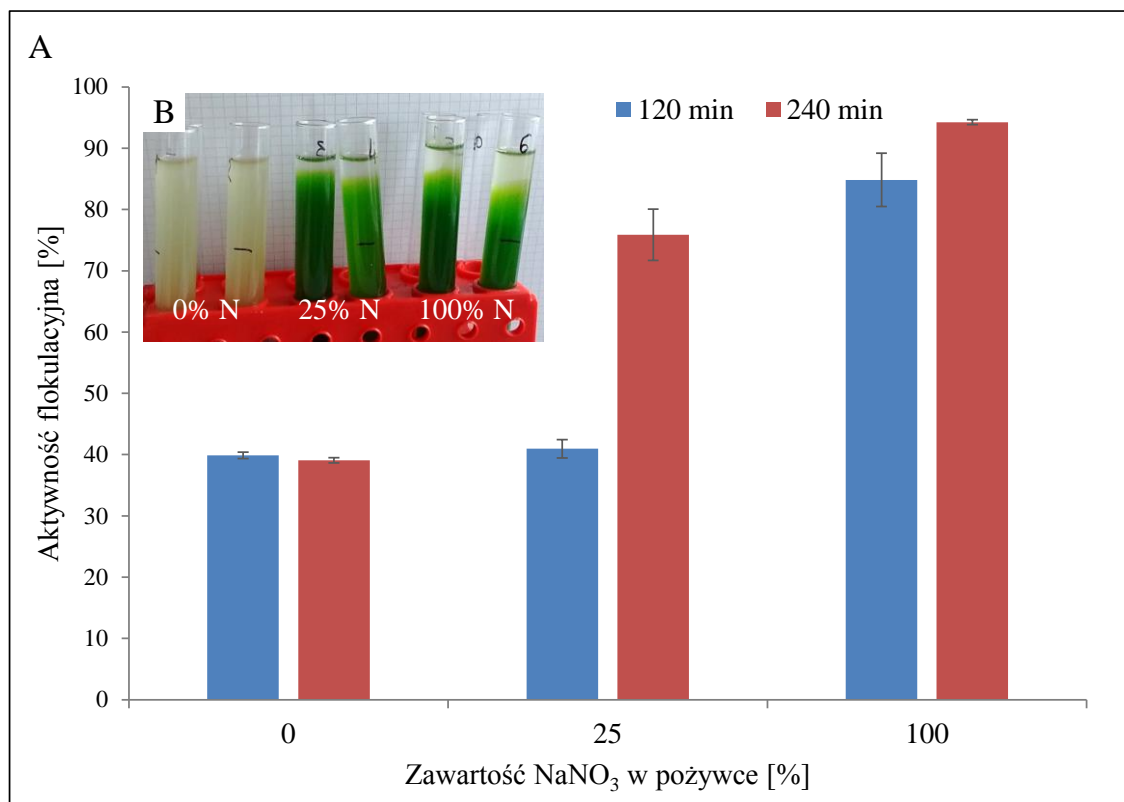
Tabela 15. Liczby falowe (cm^{-1}) pasm grup COO^- w miksotroficznych EPS (kontrola), po modyfikacji pH i w obecności Pb(II) ($C_{\text{Pb(II)}} = 100 \text{ mg L}^{-1}$). Zielona strzałka – przesunięcie w kierunku fal dalszych; czerwona strzałka – przesunięcie w kierunku fal bliższych.

Próbka	Kontrola	pH 6	pH 5	pH 4	pH 6 + Pb(II)	pH 5 + Pb(II)	pH 4 + Pb(II)
<i>CvM</i>	1408	1412	1408	1406	1398	1400	1404
<i>PkM</i>	1408	1417	1412	1412	1398	1406	1400
<i>VmM</i>	1412	1419	1419	1412	1400	1400	1400
<i>CvM</i>	1604	1618	1608	1631	1630	1630	1630
<i>PkM</i>	1608	1608	1624	1641	1631	1630	1630
<i>VmM</i>	1604	1604	1639	1639	1630	1630	1626

4.6. Właściwości flokulacyjne EPS

4.6.1. Aktywność autoflokulacyjna EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri*

Wstępną ocenę właściwości flokulacyjnych EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* przeprowadzono z zastosowaniem testu autoflokulacji. Wyniki przedstawione na Ryc. 7 wskazują, że najwyższą aktywność autoflokulacyjną – 84,8% po 120 min i 94,3% po 240 min wykazuje hodowla prowadzona na pożywce zawierającej $1,5 \text{ g L}^{-1}$ azotanu sodu. W hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym $0,375 \text{ g L}^{-1}$ (25% N) NaNO_3 , aktywność autoflokulacyjna po 120 minutach wynosiła 41%, natomiast po 240 min wartość ta wzrosła do 76%. Aktywność autoflokulacyjna w hodowli niezawierającej źródła azotu wynosiła 39–40%, a czas kontaktu nie wpływał na uzyskane wyniki. Zawartość EPS w próbkach wynosiła $3,68 \text{ mg L}^{-1}$ (0% N), $2,83 \text{ mg L}^{-1}$ (25% N) i $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ (100% N). Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno czas kontaktu jak i stężenie EPS pełnią istotną rolę w procesie autoflokulacji.

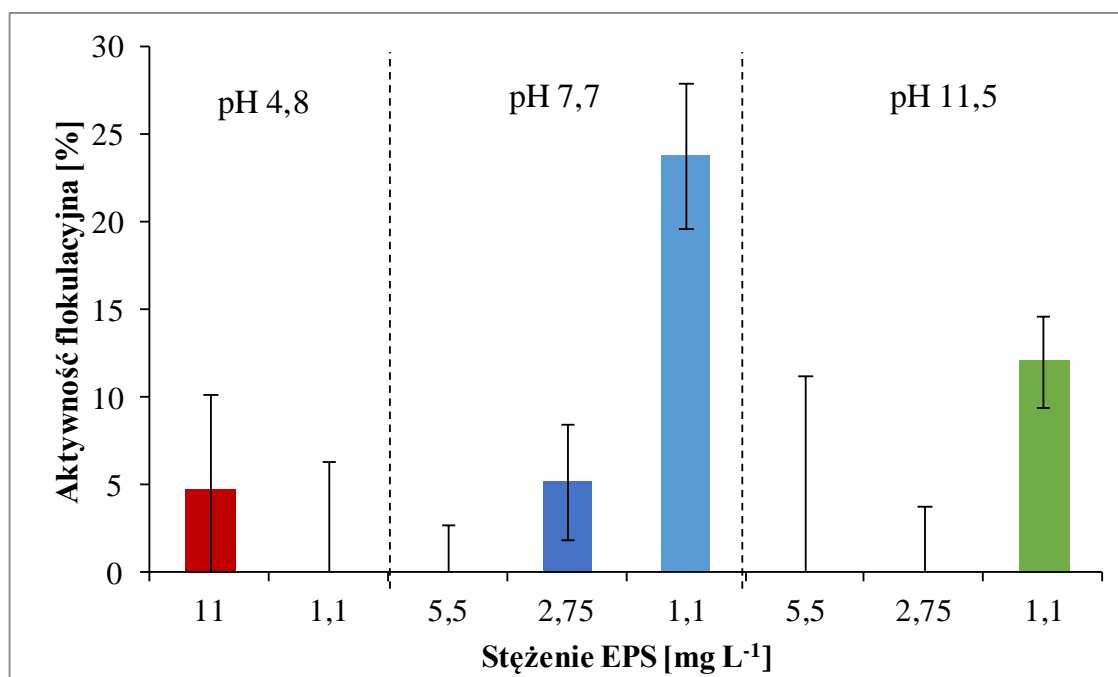


Ryc 7. Aktywność autoflokulacyjna hodowli *P. kessleri* wzrastającej na podłożu o zmiennej zawartości azotanu sodu w podłożu (A). Test autoflokulacji hodowli *P. kessleri* (B).

4.6.2. Wpływ pH na aktywność flokulacyjną EPS z *P. kessleri*

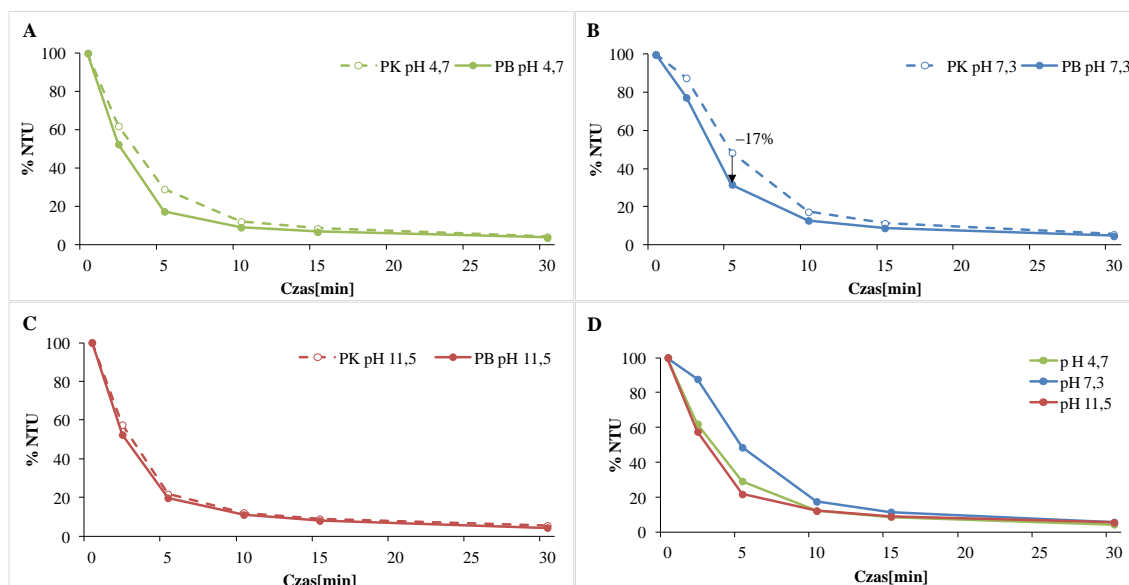
Następnie przeprowadzono pomiary aktywności flokulacyjnej EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* za pomocą metody spektrofotometrycznej z kaolinem. Analizowane warianty obejmowały cztery stężenia EPS (11 mg L⁻¹, 5,5 mg L⁻¹, 2,75 mg L⁻¹, 1,1 mg L⁻¹) oraz trzy wartości pH zawiesiny kaolinu (pH 4,8, 7,7 i 11,5).

Wyniki przedstawione na Ryc. 8 wskazują, że aktywność flokulacyjna EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri* wzrasta wraz ze spadkiem stężenia EPS w środowisku obojętnym i zasadowym. Najwyższą aktywność flokulacyjną stwierdzono w układzie zawierającym EPS w stężeniu 1,1 mg L⁻¹, a uzyskane wartości wynosiły odpowiednio 23,7% w pH 7,3 i 12% w pH 11,5. Natomiast w pH kwaśnym, aktywność flokulacyjną wynoszącą 4,7% stwierdzono po zastosowaniu EPS w stężeniu 11 mg L⁻¹.



Ryc. 8. Aktywność flokulacyjna EPS z *P. kessleri* w zależności od stężenia EPS i wartości pH układu.

Zbadano również wpływ wartości pH na zmiany mętności układu za pomocą turbidymetru, stosując takie same warunki przebiegu procesu. Stężenie EPS w próbce wynosiło 5,5 mg L⁻¹. Wyniki przedstawione na Ryc. 9 wskazują, że w pH 4,7 i 7,3 dodatek EPS syntetyzowanego przez *P. kessleri* zwiększa szybkość opadania cząstek stałych odpowiednio o 11,6% i 16,7% po 5 minutach. Natomiast pH 11,5 nie wpływa na tempo klaryfikacji układu. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż modyfikacja pH układu zawierającego sam kaolin, również prowadzi do zwiększenia szybkości opadania cząstek kaolinu (Ryc. 9D). Pierwsze 5 minut oddziaływania EPS z kaolinem jest to czas, w którym zachodzą najbardziej dynamiczne zmiany w układzie. Jednak dopiero po 10 minutach dynamika zmian zmniejsza się na tyle, że wpływ wartości pH układu przestaje być zauważalny.



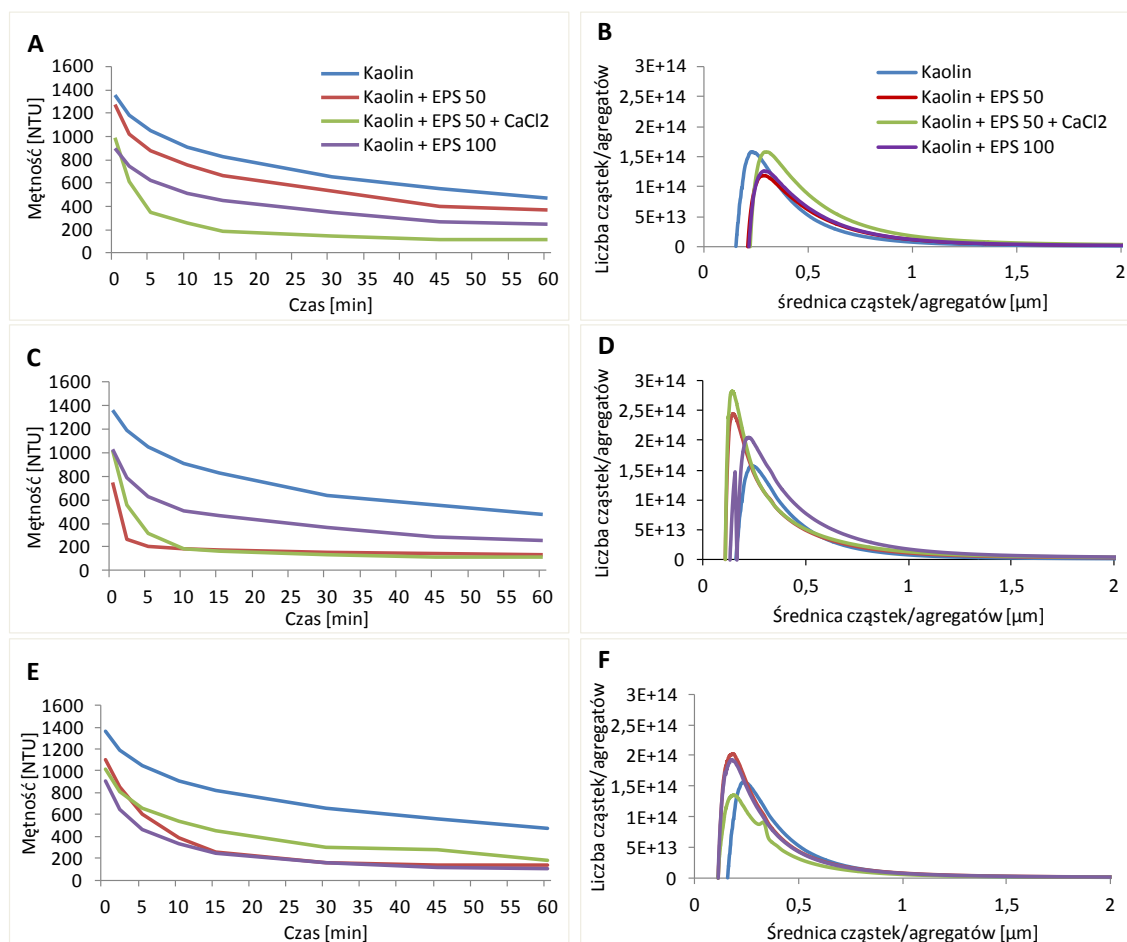
Ryc. 9. Wpływ dodatku EPS *P. kessleri* na mętność zawiesiny kaolinu [% NTU] zawierającej CaCl_2 w pH 4,7 (A), 7,3 (B) i 11,5 (C). PK – kaolin + CaCl_2 ; PB – kaolin + CaCl_2 + EPS *P. kessleri* ($C_{\text{EPS}} = 5,5 \text{ mg L}^{-1}$). (D) Wpływ wartości pH na zmiany mętności zawiesiny kaolinu (PK).

4.6.3. Potencjał EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* do tworzenia agregatów cząstek stałych

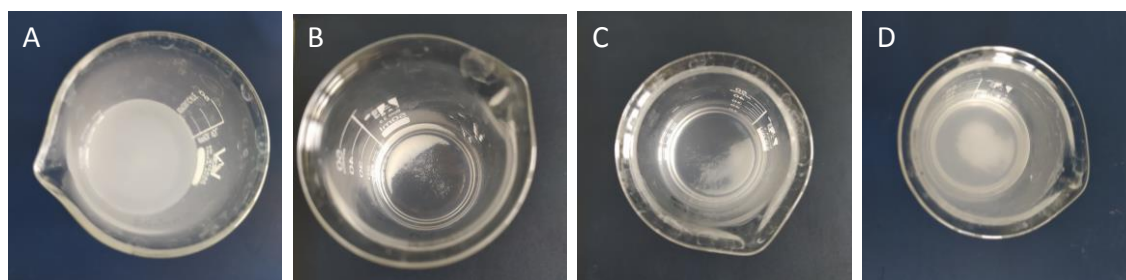
Następnie przeprowadzono analizę zdolności badanych EPS do tworzenia agregatów cząstek stałych przy udziale kaolinu. W tym celu wykonano pomiar mętności zawiesiny kaolinu po dodaniu EPS wyizolowanych z hodowli *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*. Określono także wpływ dodatku CaCl_2 w badanych układach. Po zakończeniu pomiarów mętności określono również wielkość powstałych agregatów przy użyciu analizatora CPS.

Wyniki przedstawione na Ryc. 10A, C, E wskazują, że dodatek EPS prowadzi do destabilizacji zawiesiny kaolinu. EPS syntetyzowane przez *C. vulgaris* i *V. magna* są efektywne już w stężeniu 50 mg L^{-1} , a zwiększenie stężenia EPS do 100 mg L^{-1} , nie prowadzi do uzyskania lepszych rezultatów. Dodatek CaCl_2 zwiększa właściwości flokulacyjne EPS z *P. kessleri* i EPS z *C. vulgaris*, natomiast wykazuje działanie stabilizujące po zastosowaniu razem z EPS z *V. magna*. Zwiększenie wielkości agregatów z $0,23 \mu\text{m}$ do $0,31 \mu\text{m}$ zaobserwowano pod wpływem dodatku EPS z *P. kessleri* (Ryc. 10B, Tabela 16). Agregaty powstałe po dodaniu EPS z *C. vulgaris* i EPS z *V. magna* wykroczyły poza zakres pomiaru analizatora CPS i były obserwowane

makroskopowo, co zostało przedstawione na Ryc. 11. Zaobserwowano natomiast wzrost liczby cząstek o mniejszej średnicy w układzie z dodatkiem EPS *C. vulgaris* i *V. magna* w porównaniu do próby kontrolnej (kaolin) (Ryc. 10, Tabela 16). Wprowadzenie chlorku wapnia do układu zawierającego EPS z *V. magna* spowodowało pojawienie się na widmie dwóch maksimów, z których jedno wskazuje frakcję cząstek o mniejszej średnicy niż kaolin, a drugie (o niższej intensywności) frakcję cząstek o większej średnicy, co wskazuje na tworzenie się agregatów.



Ryc. 10. Pomiar mętności w czasie zmierzony za pomocą turbidymetru (A, C, F) i pomiar wielkości cząstek przy użyciu analizatora CPS (B, D, F). EPS z *P. kessleri* (A, B), EPS z *C. vulgaris* (C, D), EPS z *V. magna* (E, F). EPS 50 – 50 mg L⁻¹ EPS; EPS 100 – 100 mg L⁻¹ EPS.



Ryc. 11. Obserwacje makroskopowe: agregacja cząstek kaolinu (A) oraz kaolinu po dodaniu 50 mg L^{-1} EPS z *C. vulgaris* (B), 50 mg L^{-1} EPS z *C. vulgaris* + 50 mg L^{-1} CaCl_2 (C) oraz 100 mg L^{-1} EPS z *C. vulgaris* (D).

Tabela 16. Średnica agregatów/cząstek [μm] kaolinu, kaolinu z dodatkiem EPS, oraz 50 mg mL^{-1} CaCl_2 . EPS 50 – 50 mg L^{-1} EPS; EPS 100 – 100 mg L^{-1} EPS.

	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>V. magna</i>
Kaolin	0,2329	0,2383	0,2408
Kaolin + EPS 50	0,2915	0,157	0,1921
Kaolin + EPS 50 + CaCl₂	0,3094	0,1551	0,2054; 0,3416
Kaolin + EPS 100	0,3091	0,1557; 0,2292	0,1931

5. Dyskusja

Zewnątrzkomórkowe polimery syntetyzowane są przez różne grupy organizmów (bakterie, grzyby, glony a także rośliny wyższe). Dzięki ich podstawowej funkcji, jaką jest ochrona wytwarzających je komórek przed działaniem niekorzystnych warunków środowiska, EPS syntetyzowane przez jednokomórkowe glony stanowią interesujący obiekt badawczy (Pierre i in., 2019). Obecnie podstawowym źródłem polimerów zewnątrzkomórkowych stosowanych komercyjnie są te produkowane przez bakterie i makroglony (wodorosty). Jednak zwiększająca się produkcja biomasy jednokomórkowych glonów skłania naukowców do dokładniejszego badania substancji wydzielanych do podłoża hodowlanego, w tym właśnie EPS, które charakteryzują się wieloma cennymi właściwościami, oraz możliwości ich wykorzystania. Wśród najważniejszych i najczęściej badanych właściwości EPS wymienić należy potencjał sorpcyjny, flokulacyjny i konsystencjotwórczy (żelowanie i emulsyfikacja) (Xiao i Zheng, 2016). Najważniejszymi właściwościami zewnątrzkomórkowych polimerów jest ich naturalne pochodzenie, biodegradowalność i nietoksyczność (Babiak i Krzemińska, 2021).

Pomimo wielu cennych właściwości, EPS syntetyzowane przez jednokomórkowe glony nie są stosowane komercyjnie, poza nielicznymi wyjątkami. Główną przyczyną jest niska produktywność EPS, dlatego w niniejszej pracy podjęto badania mające na celu zbadanie wpływu czynników: źródła i stężenia azotu, natężenia światła oraz wpływu źródła węgla na wydajność i specyficzną produktywność wytwarzanego EPS.

Badania rozpoczęto od przeglądu literaturowego, który dostarczył informacji dotyczących gatunków jednokomórkowych glonów syntetyzujących EPS, a także wpływu czynników abiotycznych, takich jak m. in. źródło i dostępność azotu, węgla, oraz natężenia światła i systemu oświetlenia na syntezę EPS przez jednokomórkowe glony, ich skład chemiczny i właściwości flokulacyjne. Na podstawie informacji zebranych w **P.1.** dokonano wyboru czynników badanych w ramach niniejszej pracy oraz wybrano gatunki przeznaczone do badań.

Źródło i stężenie azotu

Następnie wybrane gatunki hodowano na pożywce zawierającej następujące źródła azotu: azotan sodu, azotan amonu, siarczan amonu i mocznik. Zastosowane

stężenia azotan amonu i siarczanu amonu okazały się toksyczne dla *C. vulgaris* i *P. kessleri*, prowadząc do zahamowania namnażania się komórek. Możliwą przyczyną, było obniżenie pH podłoża hodowlanego do wartości poniżej 5 (Kong i in., 2011). Podobne obserwacje podczas hodowli *Tetraselmis* sp. opisał zespół Kin i in. (2016). Badacze wykazali, że amonowe formy azotu wpływają niekorzystnie na wzrost zielenicy (*Tetraselmis* sp.), prowadząc do zahamowania namnażania komórek, w porównaniu z hodowlą prowadzoną na podłożu niezawierającym źródła azotu, oraz zawierającą formy azotanowe i organiczne źródła azotu (Kim i in., 2016). Natomiast *V. magna* podczas wzrostu na podłożu zawierającym azotan amonu wykazywała najwyższy przyrost biomasy, pomimo że wartość pH podłoża spadła do 5,7. Jednak wydajność i specyficzna produktywność całkowitego i rozpuszczalnego EPS w hodowli *V. magna* prowadzonej z dodatkiem azotan amonu była najniższa spośród badanych gatunków glonów. Mocznik jest organicznym związkiem, który jest hydrolizowany przez ureazę lub amyloidazę mocznikową do dwóch cząsteczek NH_4^+ i jednej CO_2 (Guzmán-Murillo i in., 2007). Jednak w przeciwieństwie do amonowych form azotu, mocznik nie obniża pH podłoża hodowlanego, a nawet nieznacznie je podnosi (Kong i in., 2011). Natomiast produktywność całkowitego EPS w obecności mocznika jest znacznie niższa niż na podłożu zawierającym azotan sodu. W obecności NaNO_3 wyższa jest też zarówno wydajność, jak i specyficzna produktywność EPS, dlatego związek ten został wybrany jako źródło azotu do dalszych badań.

Azot jest istotnym makroelementem, którego brak w podłożu hodowlanym prowadzi do znacznego ograniczenia namnażania komórek, a co za tym idzie – przyrostu biomasy. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że brak źródła azotu stymuluje komórki glonów do zwiększonej syntezy EPS. Jednak z uwagi na niskie stężenie biomasy ($0,1 \text{ g L}^{-1}$ w przypadku *P. kessleri*, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ *C. vulgaris* oraz $0,5 \text{ g L}^{-1}$ w przypadku *V. magna*), pozytywny wpływ braku źródła azotu na specyficzną produktywność EPS nie przekłada się na wzrost wydajności tego procesu.

Wydajność całkowitego EPS syntetyzowanego przez badane gatunki jednokomórkowych glonów na podłożu zawierającym $1,5 \text{ g L}^{-1}$ NaNO_3 mieściła się w zakresie $26\text{--}31 \text{ mg L}^{-1}$, oraz $18\text{--}22,2 \text{ mg g}^{-1}$. Pod względem wydajności, były to najwyższe uzyskane w tym doświadczeniu wartości. Jednak najwyższe wartości specyficznej produktywności całkowitego EPS uzyskano w hodowlach prowadzonych na podłożu niezawierającym źródła azotu. W hodowli *C. vulgaris* prowadzonej w warunkach braku źródła azotu ilość otrzymanego EPS (g L^{-1}) jest również wysoka

i wynosi 25,5 mg L⁻¹. Biorąc pod uwagę specyficzną produktywność całkowitego EPS (Tabela 7), można jednoznacznie stwierdzić, że brak źródła azotu stymuluje komórki wszystkich badanych gatunków jednokomórkowych glonów do syntezy EPS. Stymulujący wpływ braku źródła azotu na syntezę EPS zaobserwował również Staats, po przeniesieniu hodowli *Cylindrotheca klosterium* (*Bacillariophyceae*) z pełnej pożywki, na nową, niezawierającą źródła azotu (Staats i in., 2000). Jednak z uwagi na niską gęstość biomasy w hodowlach prowadzonych na podłożu bez azotu, rzeczywista ilość uzyskiwanego EPS (mg) w niniejszej pracy jest stosunkowo niska, co przekłada się na wydajność EPS szczególnie w hodowli *P. kessleri*. Przeciwnie wyniki uzyskał zespół Han, który wykazał najwyższą wydajność syntezy EPS przez *Nostoc flagelliforme* (sinica) na podłożu niezawierającym źródła azotu (pozostałe badane warianty: 1,5 i 4,5 g L⁻¹ NaNO₃) (Han i in., 2017).

Natężenie światła

Następnym etapem badań było określenie wpływu natężenia światła na efektywność syntezy EPS przez badane gatunki glonów. Uzyskane wyniki wskazały, że wzrost natężenia światła wpływał pozytywnie na wydajność syntezy EPS. Dane literaturowe dotyczące *C. vulgaris* i *Porphyridium cruentum* wskazują, że optymalne natężenie światła, sprzyjające syntezie EPS mieści się w zakresie 50–80 μmol m⁻² s⁻¹. Wyższe natężenia światła, w zakresie 100–650 μmol m⁻² s⁻¹ i 115–1840 μE m⁻² s⁻¹ były jak dotąd badane w hodowlach sinic, odpowiednio *Cyanobacterium aponinum* i *Anabaena* sp. (Gris i in., 2017; Moreno i in., 1998). W warunkach wysokiego natężenia światła (350 μmol m⁻² s⁻¹) obserwowany jest wzrost gęstości biomasy, jak również wydajności i specyficznego produktywności całkowitego i rozpuszczalnego EPS.

Następnie określono wpływ natężenia światła na skład chemiczny EPS. Uzyskane dane wskazują, że natężenie światła wpływało na zmiany składu chemicznego EPS syntetyzowanych przez badane jednokomórkowe glony. Obserwowany jest wzrost zawartości cukrów całkowitych (o 30,5%, 44,5% i 37,5%) i redukujących (o 31,3%, 24,8% i 43,2%) w EPS wyizolowanych z hodowli odpowiednio *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* prowadzonych w warunkach wysokiego natężenia światła w porównaniu do hodowli prowadzonych w warunkach niskiego natężenia światła. Wzrasta również zawartość białka i aminokwasów (w przypadku *C. vulgaris* i *P. kessleri*) w próbkach pozyskanych z hodowli prowadzonych w warunkach wysokiego natężenia światła w porównaniu do EPS

syntetyzowanych w warunkach oświetlenia o niższym natężeniu. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że wysokie natężenie światła prowadzi zarówno do akumulacji białek, jak i cukrów w EPS syntetyzowanych przez konsorcja mikrogłonowo-bakteryjne w osadzie ściekowym (Fan i in., 2021) oraz *Nostoc* sp. (Ge i in., 2014). Wraz ze wzrostem natężenia światła rośnie zawartość kwasów uronowych w EPS z *C. vulgaris* i *P. kessleri*. Uzyskane wyniki potwierdzają dane przedstawione przez zespół Phélippé, który wykazał istotny statystycznie wpływ wysokiego natężenia światła na zawartość kwasów uronowych w sinicy *Arthrospira platensis* (Phélippé i in., 2019). Natomiast EPS syntetyzowane przez *V. magna* wykazują najwyższą zawartość białek, aminokwasów i kwasów uronowych podczas hodowli w warunkach średniego natężenia światła, a wysokie natężenie światła powoduje znaczne obniżenie ich zawartości. Dodatkowo zawartość kwasów uronowych w EPS syntetyzowanych przez wszystkie badane gatunki glonów jest na podobnym poziomie w warunkach średniego natężenia światła. Ponadto stężenie aminokwasów w EPS *V. magna* nie różni się statystycznie w próbkach pochodzących z ML i HL, a w przypadku związków fenolowych ich stężenie jest minimalnie wyższe w wariancie HL. Brak jest jednak danych literaturowych opisujących skład chemiczny EPS syntetyzowanych przez *V. magna*. Nieliczne są również doniesienia dotyczące zawartości aminokwasów i aminocukrów w EPS syntetyzowanych przez jednokomórkowe glony, a dostępne dane nie uwzględniają analizy ich zawartości pod wpływem zastosowania różnych warunków natężenia światła. Myklestad wykazał jedynie wzrost stężenia zewnątrzkomórkowych aminokwasów wraz z wydłużeniem czasu hodowli okrzemki *Chaetoceros affinis* (Myklestad i in., 1989). Spośród badanych gatunków, najwyższą zawartość aminocukrów i związków fenolowych stwierdzono w EPS wytwarzanym przez *C. vulgaris* w warunkach niskiego natężenia światła ($5,7 \mu\text{g mg}^{-1}$).

Skład chemiczny EPS i właściwości sorpcyjne

Następny etap badań polegał na określeniu składu chemicznego EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* w warunkach autotroficznych. Uzyskane polimery różniły się pod względem składu chemicznego. EPS syntetyzowany przez *P. kessleri* charakteryzuje się wyższą zawartością cukrów całkowitych niż EPS z *C. vulgaris*. Podobne wyniki dotyczące stężenia cukrów całkowitych wykazał Capek (2020) w EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris* oraz Sushytskyi (2020), który badał EPS *P. kessleri*, oba syntetyzowane w warunkach autotroficznych (Capek i in., 2020,

Sushytskyi i in., 2020). Natomiast białka, aminokwasy i związki fenolowe występują w większym stężeniu w EPS wytwarzanym przez komórki *P. kessleri*. Zawartość kwasów uronowych w EPS syntetyzowanych przez badane gatunki w warunkach autotroficznym (13,4–15,4%) jest porównywalna danymi przedstawionymi przez zespoły El-Naggar (2020) i Ogawa (1999), którzy stwierdzili zawartość kwasów uronowych w EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris* wynoszącą odpowiednio 17% i 14% (El-Naggar i in., 2020; Ogawa i in., 1999). Z kolei stężenie kwasów uronowych w glonach z gatunku *Dictyosphaerium* badanych przez zespół Halaj (2019) wynosiła od 6,0% do 14% (Halaj i in., 2019). Obecność kwasów uronowych jest jednym z kluczowych czynników decydujących o zdolności EPS do wiązania jonów metali (Lombardi i in., 2005; Naveed i in., 2019). Jak zasugerowali Lombardi i in. (2005), w proces wiązania jonów miedzi przez EPS pochodzący ze *Scenedesmus acuminatus*, zaangażowane są przede wszystkim grupy karboksylowe kwasów uronowych są przede wszystkim odpowiedzialne za wiązanie (Lombardi i in., 2005). W EPS badanych w niniejszej pracy stwierdzono niewielką ilość aminocukrów wynoszącą 0,42 i 0,38% odpowiednio dla EPS z *P. kessleri* i dla EPS z *C. vulgaris*. Choć aminocukry występują głównie w EPS sinic i Ochrophyta (Laroche, 2022), te związki wykryto także w EPS z *Dictyosphaerium chlorelloides* i *D. tetrachlorum* (0,8–1,6% wag.) (Halaj i in., 2019). Analiza składu chemicznego EPS syntetyzowanych przez gatunki zielenic badane w niniejszej pracy wykazała, że profil biochemiczny EPS *C. vulgaris* może wskazywać na większą pojemność sorpcyjną w porównaniu do EPS syntetyzowanego przez komórki *P. kessleri*. Świadczy o tym wyższa zawartość białek (oraz wyższy stosunek białka do cukru) i kwasów uronowych (Ciempiel i in., 2022).

Skład monosacharydów budujących EPS zależy od wielu czynników. Uzyskane wyniki wykazujące obecność ramnozy, mannozy i galaktozy w obu badanych EPS, a w EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri* również ksylozy, są najbardziej zbliżone do tych uzyskanych przez zespół Ogawa oraz zespół Capek dla EPS syntetyzowanego przez *C. vulgaris* (Capek i in., 2020; Ogawa i in., 1999).

Przeprowadzono również analizę składu pierwiastkowego badanych EPS, która wykazała wyższą zawartość Ca, P i S w EPS syntetyzowanym przez *C. vulgaris*, natomiast Mg, Mn i Zn występowały w większej ilości w EPS pochodzącym z hodowli *P. kessleri*. Pierwiastki występujące w EPS pochodzą z podłoża hodowlanego, a ich stężenie w EPS jest częściowo skorelowane ze stężeniem tych pierwiastków w podłożu hodowlanym (Jiao i in., 2010). Wysoka zawartość siarki może świadczyć o obecności

grup siarczanowych w EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* (El-Naggar i in., 2020). Ponadto wykazano, że jony Ca i Mg mogą brać udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych wskazując na właściwości sieciujące badanych EPS oraz ich udział w stabilizacji agregatów (More i in., 2014; Xiao i Zheng, 2016).

Analiza zdolności badanych EPS do adsorbowania jonów kadmu i ołowiu z roztworów wodnych wykazała, że EPS *P. kessleri* jest skuteczniejszy w obecności niższych stężeń Pb(II). Natomiast wydajność procesu sorpcji jonów ołowiu przez EPS z *C. vulgaris* zwiększa się znacząco w środowisku o wyższej zawartości Pb(II). Spadek efektywności wiązania jonów ołowiu wraz ze wzrostem jego stężenia w roztworze zaobserwowano również w doświadczeniu z wykorzystaniem egzopolimeru syntetyzowanego przez *Phanerochaete chrysosporium* (Li i in., 2020c) co może świadczyć o wysyceniu miejsc sorpcyjnych. Potencjał obu badanych EPS do usuwania jonów kadmu jest zbliżony. Również pojemność sorpcyjna EPS z *P. kessleri* i *C. vulgaris* wobec jonów kadmu jest znacznie niższa (max. 48.67 mg g⁻¹) niż wobec jonów ołowiu (max. 573,6 mg g⁻¹). Dane literaturowe potwierdzają, że jony kadmu wykazują niższe powinowactwo do EPS w porównaniu z jonami ołowiu (Dobrowolski i in., 2017; Reddad i in., 2003). Może to wynikać z faktu, iż jony ołowiu charakteryzują się niższą energią hydratacji [Pb(II) < Cd(II)], wskutek czego wiązanie jonów ołowiu jest dla EPS korzystniejsze energetycznie (Ouyang i in., 2019). Ponadto, jak podają dane literaturowe, jony ołowiu oddziałują z EPS w takim samym stopniu, zarówno w układzie zawierającym sam ołów, jak również w układzie wieloskładnikowym. Kadm z kolei jest podatny na interakcje z innymi metalami (Perez i in., 2008).

Pomiar stężenia pierwiastków (innych niż Cd(II) i Pb(II)) w filtracie po procesie sorpcji jonów Cd(II) i Pb(II) wykazał, że jony wapnia, magnezu, fosforu, siarki i cynku przenikają z EPS do roztworu. Zaobserwowano też, że w próbkach kontrolnych (EPS rozpuszczony w wodzie) stężenie badanych pierwiastków było wyższe niż w próbkach EPS po procesie sorpcji. Szczególnie wyraźne zmniejszenie ilości jonów Ca uwolnionych do roztworu nastąpiło w przypadku EPS *P. kessleri* w obecności jonów kadmu. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność jonów kadmu i ołowiu zmniejsza mobilność pierwiastków występujących w strukturze EPS, szczególnie wapnia. Z badań przeprowadzonych przez Ahad i Syiem, wynika, że obecność jonów Ca(II) zmniejsza ilość zaadsorbowanych jonów Cd(II) przez *Nostoc muscorum* Meg 1 z 94% do 50%. Przytoczone badania wskazują, że wysokie stężenie jonów wapnia w badanych EPS może odpowiadać za niską pojemność sorpcyjną badanych materiałów wobec jonów

kadmu (Ahad i Syiem, 2019). Ponadto Perez wykazał, że kadm jest podatny na oddziaływanie z innymi pierwiastkami, które mogą wpływać niekorzystnie na wydajność procesu sorpcji (Perez i in., 2008). W związku z tym również pozostałe pierwiastki (Mg, Mn, P, S, Zn) występujące w badanych EPS mogą zmniejszać ilość zaadsorbowanych jonów kadmu. Z kolei zespół Zhou (2020) wykazał, że wraz ze wzrostem stężenia jonów Ca(II), zwiększa się też ilość jonów ołowiu usuniętych z roztworu (Zhou i in., 2020).

Analiza widm FTIR wykazała obecność pasm typowych dla polisacharydów. Oprócz drgań O-H, C-H, C=O, C-O, C-O-H, C-C, charakterystyczne dla badanych EPS są również pasma niezestryfikowanych grup karboksylowych (około 1600 cm^{-1} i 1416 cm^{-1}), a także pasmo około 1248 cm^{-1} które może pochodzić od drgań grup fosforanowych bądź siarczanowych (Alam i in., 2014, Fernando i in., 2017). W obecności jonów Cd(II) i Pb(II) pojawia się charakterystyczne pasmo $1392\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, które może pochodzić od drgań N-O w $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Ai i in., 2020; Trivedi i in., 2015). Jony kadmu powodują zmiany intensywności pasma grup -OH, co może sugerować, że jednym z mechanizmów sorpcji Cd przez EPS jest oddziaływanie z grupami hydroksylowymi. W obecności jonów kadmu i ołowiu (tylko w przypadku EPS z *C. vulgaris*) pojawia się też pasmo 1623 cm^{-1} , które może być efektem protonacji niezestryfikowanych grup karboksylowych (Li i in., 2017), bądź ich oddziaływanie z jonami kadmu. Jony metali oddziałują z EPS za pośrednictwem grup karboksylowych, czego dowodem są zmiany maksimum absorbancji tych grup (Parmar i in., 2020; Ellerbrock i Gerke, 2021). W oddziaływanie egzopolimerów z jonami Cd(II) i Pb(II) zaangażowane są głównie grupy -COO^- , -COH i -OH , a także obserwowane są zmiany w grupach C-H i w regionie anomerycznym ($900\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) (Ciempiel i in., 2022).

Dane uzyskane w badaniach właściwości sorpcyjnych EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych wskazują, że zdolność do wiązania jonów metali wykazuje EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris*, co jest związane z wyższą zawartością białka, aminokwasów i kwasów uronowych. EPS zawierające ujemnie naładowane związki, takie jak kwasy uronowe, charakteryzują się wyższą zdolnością do kompleksowania jonów metali, i są uważane za obiecujące materiały w procesie usuwania toksycznych metali ze środowiska (Naveed i in., 2019; Xie i in., 2020).

Następnie przeprowadzono analizy wpływu warunków mikсотroficznych na wydajność i specyficzną produktywność EPS syntetyzowanych przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* oraz ich skład chemiczny w porównaniu do EPS syntetyzowanego

w warunkach autotroficznych. Zbadano także wpływ czasu oddziaływania EPS z Pb(II) i wartości pH na sorpcję jonów ołowiu przez EPS syntetyzowany w warunkach mikotroficznych.

Dodanie glukozy do podłoża hodowlanego spowodowało wzrost wydajności syntezy całkowitego EPS przez badane gatunki glonów. Natomiast specyficzna produktywność EPS syntetyzowanych w warunkach mikotroficznych również jest wyższa niż EPS uzyskanych z tych samych gatunków w warunkach autotroficznych. Podobne zależności zaobserwowane w odniesieniu do rozpuszczalnych EPS potwierdzają również dane przedstawione przez zespół Cheirsilp (Cheirsilp i in., 2016). Ilość EPS syntetyzowanego przez *P. kesseleri* i *C. vulgaris* w warunkach mikotroficznych jest porównywalna z danymi przedstawionymi przez zespół Zhang, który uzyskał 364,3 mg L⁻¹ i 182,3 mg g⁻¹ EPS z hodowli *C. vulgaris* prowadzonej na pożywce BG11 z dodatkiem glukozy (Zhang i in., 2019).

EPS syntetyzowane przez hodowle *V. magna* w warunkach autotroficznych i mikotroficznych zostały opisane po raz pierwszy w niniejszej rozprawie. Przedstawione wyniki stanowią drugie doniesienie wskazujące na syntezę EPS przez gatunki z rodzaju *Vischeria*. Wcześniej wykazano, że *Vischeria punctata*, hodowana w warunkach autotroficznych, syntetyzuje EPS w zakresie 194–253,7 mg g⁻¹ na pożywce Prat (Babich i in., 2022). Dodatek glukozy do podłoża hodowlanego zwiększa stosunek węgla do azotu, co prowadzi do intensywniejszej syntezy EPS (Li i in., 2020a). Jak sugeruje Staats i współpracownicy, nadmiar źródła węgla względem zapotrzebowania komórek prowadzi do jego magazynowania w postaci EPS i może być wykorzystany w sytuacji niedoboru źródła węgla (Staats i in., 2000; Costa i in., 2018). Przedstawione wyniki wykazały, że mikotroficzna strategia odżywiania glonów zwiększa wydajność i specyficzną produktywność EPS przez komórki.

Obecność węgla organicznego w pożywce miała wpływ również na skład chemiczny EPS. Wzrosła między innymi zawartość cukrów całkowitych w EPS otrzymanych z hodowli mikotroficznych w porównaniu do polimerów syntetyzowanych w warunkach autotroficznych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* (El-Naggar i in., 2020; Capek i in., 2020). Podobne zmiany zaobserwowano w publikacji Vo i in. (2020) opisującej zawartość zewnątrzkomórkowych cukrów i białek w podłożu hodowlanym *C. vulgaris* pod wpływem obecności różnych źródeł węgla organicznego (m. in. glukozy, etanolu i glicyny) w pożywce. Vo wskazuje też, że zmienia się stosunek frakcji cukrów i białek związanych ze ścianą komórkową i rozpuszczalnych

w podłożu hodowlanym (Vo i in., 2020). Stężenie cukrów całkowitych w EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri* odpowiada wartościom przedstawianym przez zespoły Sasaki (2021) w warunkach autotroficznych i Lv (2016) w warunkach miksotroficznych (Sasaki i in., 2021; Lv i in., 2016). Z kolei zawartość cukrów całkowitych stwierdzona w *VmA* w niniejszej pracy jest wyższa w porównaniu z wynikami przedstawionymi przez zespół Babich dla *V. punctata* wzrastającej na pożywce BBM-3N (Babich i in., 2022). EPS syntetyzowane przez *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna* w warunkach miksotroficznych zawierają więcej białka niż egzopolimery z hodowli autotroficznych. Wzrost zawartości białka może wynikać z faktu, że miksotroficzne warunki wzrostu przyczyniają się do wyższej akumulacji białek w komórkach (Wan i in., 2011; Piasecka i in., 2020), co może mieć wpływ na ich zawartość w EPS. Ilość aminokwasów w miksotroficznym EPS syntetyzowanym przez *V. magna* jest 4-krotnie wyższa niż w próbkach autotroficznych. Różnice w zawartości aminokwasów w EPS wytwarzanym przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Dane literaturowe dotyczące zawartości aminokwasów w EPS wytwarzanym przez jednokomórkowe glony są ograniczone i zostały opisane jedynie u okrzemek i *Porphyridium cruentum*, dla których określono również skład aminokwasowy (Xiao i Zheng, 2016). Zawartość aminokwasów w EPS *P. cruentum* wynosi 1–2%, co jest wartością niższą niż wyniki uzyskane w niniejszej pracy (Heaney-Kieras i in., 1977). Zawartość kwasów uronowych w EPS syntetyzowanych w warunkach autotroficznych przez badane gatunki glonów wynosi 13,9–15,4%. Uzyskane wyniki są porównywalne z danymi przedstawionymi przez zespół Ogawa, który wskazuje, że EPS syntetyzowane przez komórki *C. vulgaris* w warunkach autotroficznych zawierają 14% kwasu galakturonowego, a zespół El-Naggar wskazuje na zawartość kwasów uronowych w EPS *C. vulgaris* wynoszącą 17% (El-Naggar i in., 2020; Ogawa i in., 1999). Natomiast Sushytskyi wskazał, że stężenie kwasów uronowych w EPS *P. kessleri* wynosi 1,2–3,1%, co jest znacznie niższym wynikiem niż uzyskany w niniejszej pracy (Sushytskyi i in., 2020). Hodowla badanych gatunków glonów w warunkach miksotroficznych spowodowała zmniejszenie stężenia kwasów uronowych w EPS o 3,6%, 7,5% i 13% odpowiednio dla *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*, w stosunku do EPS syntetyzowanych przez te gatunki w warunkach autotroficznych. Badane EPS syntetyzowane w warunkach autotroficznych zawierają również 2,1–2,5% (21–25 mg g⁻¹) związków fenolowych. Natomiast Hajimahmoodi wskazuje na zawartość związków fenolowych w wodnej frakcji EPS *C. vulgaris*

wynoszącą 19,15 mg GAE g⁻¹ (GAE – ekwiwalent kwasu galusowego) (Hajimahmoodi i in., 2010). Warunki miksotroficzne zwiększają zawartość związków fenolowych około dwukrotnie w porównaniu z próbkami autotroficznymi. Wzrost zawartości związków fenolowych w EPS pod wpływem miksotroficznych warunków wzrostu może wpływać pozytywnie na właściwości antyoksydacyjne EPS (Abd El-Baky i in., 2010; Dejsungkranont i in., 2017).

Wszystkie badane EPS zarówno z hodowli autotroficznych jak i miksotroficznych zawierały ramnozę, ksylozę, mannozę, galaktozę oraz fruktozę, której nie stwierdzono jedynie w autotroficznym EPS syntetyzowanym przez *V. magna*. Natomiast wszystkie EPS z hodowli miksotroficznych zawierały również glukozę. Zespół Zhang (2019) podaje, że dominującym cukrem wchodzącym w skład EPS z *C. vulgaris* hodowanej w warunkach miksotroficznych jest galaktoza (45,4%) (Zhang i in., 2019). Dane literaturowe podają, że EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* w warunkach autotroficznych może składać się głównie z: galaktozy, galaktozy i ramnozy, bądź ramnozy (Capek i in., 2020; Ferreira i in., 2020; Ogawa i in., 1999). Jak wskazuje El-Naggar, EPS z *C. vulgaris* może być też zbudowany głównie z glukozy (El-Naggar i in., 2020). Dominującymi monosacharydami budującymi EPS z *P. kessleri* HY1, podobnie jak w przypadku *C. vulgaris*, jest ramnoza i galaktoza (Sushytskyi i in., 2020). Obecność ramnozy, mannozy, galaktozy i glukozy stwierdzono również w EPS uzyskanym z *C. vulgaris* hodowanej w warunkach miksotroficznych (Zhang i in., 2019), podczas gdy fruktozę i ksylozę zidentyfikowano w próbkach EPS z autotroficznych hodowli *C. vulgaris* (Capek i in., 2020; El-Naggar i in., 2020). EPS produkowany przez *Parachlorella* sp. BX1.5 w warunkach miksotroficznych składał się głównie z ramnozy (48,5%), ale zidentyfikowano również glukozę, galaktozę i ksylozę (Sasaki i in., 2021).

Widma FTIR badanych EPS wykazują obecność grup –OH (3338–3278 cm⁻¹) oraz –CH₂ (2937–2924 cm⁻¹) (Zhang i in., 2019). We wszystkich widmach FTIR uzyskanych dla EPS z kultur autotroficznych (Ryc. 2A,B) wykazują charakterystyczne pasma przy ok. 1600 cm⁻¹ i 1419 cm⁻¹, które wskazują na obecność asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających grup COO⁻ lub ich karboksymetylowych form (Szymańska-Chargot i Zdunek, 2013; Šandula i in., 1999). W warunkach miksotroficznych (Ryc. 2C,D) intensywność tych pasm ulega zmniejszeniu, co przypuszczalnie może wskazywać na oddziaływania wewnątrz EPS, na przykład z jonami metali występującymi w EPS m. in. Ca(II) (Tabela 3 w P.2.). Zwiększone oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe mogą być rezultatem większego stężenia EPS

wyzolowanych z hodowli miksotroficznych. Na występowanie oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych wskazuje Fleming (2010), natomiast wpływ jonów Zn(II) na zmniejszenie intensywności pasm 1500–1200 cm⁻¹ w widmie pektyn zaobserwowała Gawkowska (2018) (Fleming i in., 2010; Gawkowska i in., 2018). Zawartość kwasów uronowych w próbkach miksotroficznych i autotroficznych jest podobna. Jedynie w przypadku *VmM* stężenie kwasów uronowych maleje w stosunku do *VmA*. Dodatkowo słabe pasma przy 1718 i 1724 cm⁻¹ wskazują na pojawienie się zestryfikowanych grup C=O w warunkach miksotroficznych (Kozarski i in., 2012). Zmniejszenie intensywności pasm w obszarze 1200–1600 cm⁻¹ zaobserwowano także w EPS wytwarzanym przez *Tetraselmis suecica* w warunkach heterotroficznych (z glukozą jako źródłem węgla) (Parra-Riofrio i in., 2020). Pasma przy 1544 cm⁻¹ prawdopodobnie pochodzą od grup karboksylowych (Zhang, Liu i Chen, 2019). Pasma przy 1456 cm⁻¹ i 1376–1371 cm⁻¹ można przypisać drganiom wiązań węglowodorowych (Cybulska i in., 2016). Obecność grup siarczanowych lub fosforanowych jest wskazywana przez pasma przy 1252–1236 cm⁻¹ (Gómez-Ordóñez i Rupérez, 2011; Alam i in., 2014; Fernando i in., 2017). Pasma w zakresie 1149–1022 cm⁻¹ to obszar wibracyjny C–C, C–O, C–O–C i C–OH polisacharydów i wiązań glikozydowych (Cybulska i in., 2016). Zwiększoną intensywność pasma przy 1065 cm⁻¹ i 1149–1136 cm⁻¹ w *CvM* i *PkM* można przypisać konfiguracji β(1 → 3) EPS (Galichet i in., 2001). Widmo FTIR *CvM* jest porównywalne z widmem uzyskanym przez Zhang i in. (2019) dla *Chlorella vulgaris* UTEX 395 EPS hodowanej w tych samych warunkach żywieniowych (BG11 + 5 g L⁻¹ glukozy) (Zhang i in., 2019).

Egzopolimery syntetyzowane przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* osiągnęły poziom wysycenia jonami ołowiu w ciągu pierwszych 5 minut. Kinetyka sorpcji Pb przez badane EPS jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez zespół Ghorbaniego (2022), który badał właściwości sorpcyjne EPS syntetyzowanego przez *Nostoc* sp. (Ghorbani i in., 2022). Ilość jonów ołowiu zaadsorbowanych przez *PkM* w pH 5 po 30 min (28,7 mg g⁻¹) jest dziesięciokrotnie niższa niż wartość uzyskana dla EPS syntetyzowanego przez ten gatunek w warunkach autotroficznych odnotowane w poprzednim badaniu (264,1 mg g⁻¹). Może to wynikać między innymi z tego, że EPS syntetyzowane w warunkach miksotroficznych charakteryzowały się niższą intensywnością drgań (FTIR) w regionie 1700–1300 cm⁻¹, który wskazuje na obecność grup funkcyjnych biorących udział w procesie sorpcji jonów metali (Ciempiel i in., 2022). Ilość Pb(II) zaadsorbowana przez EPS z *V. magna* nie przekraczała 20 mg g⁻¹. Z kolei

Raungsomboon wykazał, że polisacharyd kapsularny z *Gloeocapsa gelatinosa* adsorbuje 8,59 mg g⁻¹ Pb(II) (Raungsomboon i in., 2006).

Wartość pH jest kluczowym czynnikiem wpływającym na rozpuszczalność jonów metali, jak również na grupy funkcyjne biosorbentu (Wei i in., 2016). W prezentowanych badaniach stwierdzono, że potencjał usuwania jonów Pb(II) przez *PkM* osiągnął maksymalną wartość w pH 6,0 dla wszystkich badanych czasów oddziaływania Pb(II) z biosorbentem. Uzyskane wyniki są zgodne z ustaleniami przedstawionymi przez Wei i in. (2016), którzy oznaczyli maksymalną pojemność sorpcyjną EPS wyekstrahowanego z *Klebsiella* sp. J1 wobec Pb(II) przy pH 6,0 (Wei i in., 2016). W przypadku EPS z *V. magna* i EPS z *C. vulgaris* maksymalny potencjał usuwania Pb(II) po 5 minutach uzyskano przy pH 5. Natomiast po upływie 60 min, najwięcej jonów ołowiu usuwanych jest przy pH 6. Stwierdzono, że pH 4 wpływa niekorzystnie na zdolności sorpcyjne EPS z *C. vulgaris* wobec Pb(II). Niska adsorpcja w kwaśnym pH jest związana ze zwiększoną gęstością ładunku dodatniego na powierzchni, co powoduje odpychanie elektrostatyczne między jonami metali a grupami naładowanymi dodatnio (Sari i in., 2007). Wraz ze wzrostem wartości pH zmniejsza się konkurencja ze strony jonów wodorowych, a ujemnie naładowane grupy funkcyjne EPS mogą adsorbować jony metali (Wei i in., 2016). Otrzymane wyniki wskazują, że EPS wytwarzany przez *C. vulgaris* w warunkach miksotroficznych ma wyższy potencjał usuwania Pb(II) niż EPS z *P. kessleri* i EPS z *V. magna* przy trzech badanych wartościach pH.

Modyfikacja wartości pH EPS otrzymanych z hodowli miksotroficznych (*PkM*, *CvM*, *VmM*) do pH 6 oraz 5 w przypadku EPS z *C. vulgaris* nie spowodowała istotnych zmian w widmie FTIR. Natomiast obniżenie wartości pH do 4 spowodowało pojawienie się drgań C=O w grupie –COOH przy 1730 cm⁻¹ (Ellerbrock i Gerke, 2021). Modyfikacja pH EPS spowodowała przesunięcie pasm grup –COO⁻ z ok. 1604 cm⁻¹ i ok. 1410 cm⁻¹ w kierunku większych liczb falowych względem kontroli (Tabela 14). To przesunięcie może być wynikiem protonowania grup karboksylowych (Li i in., 2017) lub interakcji z kationami obecnymi w EPS (Ellerbrock i Gerke, 2021). Ponadto zmniejszenie intensywności pasma grupy karboksylowej przy ok. 1410 cm⁻¹ może być wynikiem protonowania grup –COO⁻, gdyż jednocześnie wzrosła intensywność drgań –COOH (1730 cm⁻¹) w pH 4 (Elzinga i in., 2012).

Po sorpcji Pb(II) pasmo 1730 cm⁻¹ zanikło, wskazując na wymianę jonową między jonami Pb a grupami –COOH. Obecność jonów ołowiu przesunęła pasma grup

-COO^- do 1630 cm^{-1} i 1400 cm^{-1} we wszystkich badanych próbkach. Może to sugerować kompleksowanie Pb(II) przez grupy -COO^- (Parmar i in., 2020; Ellerbrock i Gerke, 2021). Po sorpcji Pb(II) pasmo grup -OH uległo przesunięciu z ok. 3300 cm^{-1} do 3277 cm^{-1} (EPS z *C. vulgaris* i EPS z *P. kessleri*) i 3294 cm^{-1} (EPS z *V. magna*). Zmienił się także kształt tego pasma z szerokiego na bardziej wyostrome. Zaangażowanie grup hydroksylowych w oddziaływanie EPS-Pb(II) było szczególnie widoczne w EPS z *C. vulgaris* (Mathivanan i in., 2021). Słabe pasmo grup karboksylowych przy 1544 cm^{-1} obserwowane w mikсотroficznym EPS (również po modyfikacji pH) zwiększyło swoją intensywność i przesunęło się w kierunku dalszych liczb falowych, co sugeruje, że odgrywają one ważną rolę w procesie sorpcji Pb(II). Ostrej intensywnie pasmo przy 680 cm^{-1} wskazuje na drgania Pb–O–Pb (Arulmozhi i Mythili, 2013).

C. vulgaris EPS-Pb(II) w pH 5 i 6 oraz *P. kessleri* EPS-Pb(II) w pH 6 wykazywały najwyższą intensywność pasma 1400 cm^{-1} , co odpowiadało największej ilości jonów Pb zaadsorbowanych na EPS po 60 min (Ryc. 6A–C). Z kolei EPS z *P. kessleri* i EPS z *V. magna* wykazywały najniższą sorpcję Pb(II) w pH 5 po 60 min i największą intensywność drgań C–H w zakresie $2850\text{--}2924\text{ cm}^{-1}$ i N–O przy 1329 cm^{-1} (Trivedii in., 2015) oraz wzrost intensywności pasma grup -COOH (1730 cm^{-1}). Udział grup -COO^- (1400 cm^{-1}) w sorpcji Pb(II) przez EPS z *V. magna* i EPS z *P. kessleri* w pH 5 oraz EPS z *C. vulgaris* w pH 4 był porównywalny i odpowiadał najmniejszej ilości związanych jonów metali.

Właściwości flokulacyjne

Aktywność autoflokulacyjna zmierzona dla hodowli *P. kessleri* wzrastającej na podłożu zawierającym różne stężenia NaNO_3 wykazała, że EPS syntetyzowane przez ten gatunek mogą wykazywać aktywność flokulacyjną. Stwierdzono, że aktywność autoflokulacyjna badanych hodowli zależy od stężenia azotanu sodu w podłożu hodowlanym oraz od ilości EPS w hodowli. Najwyższą aktywność autoflokulacyjną zaobserwowano po 240 min w hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym $1,5\text{ g L}^{-1}$ NaNO_3 , która zawierała $5,25\text{ mg L}^{-1}$ EPS. Aktywność autoflokulacyjna hodowli *P. kessleri* uzyskana w ramach niniejszej rozprawy jest znacznie wyższa niż przedstawiona przez Lv i in. (2016). Zespół Lv (2016) wykazał, że aktywność autoflokulacyjna hodowli *P. kessleri* nie przekracza 20% po 180 min, co w porównaniu z *Chlorococcum* sp., jest wielkością ponad czterokrotnie niższą (Lv i in., 2016). Uzyskane wyniki

porównano z danymi dotyczącymi innych gatunków. Zespół Chen (2020) wykazał aktywność autoflokulacyjną hodowli *Desmodesmus* sp. wynoszącą ok. 85% po 2 h (120 min), natomiast po upływie 3,5 h wartość ta wzrastała do około 95% (Chen i in., 2020). Jak wykazał zespół Alam, aktywność autoflokulacyjna *C. vulgaris* CNW11 wynosi 25,6%, natomiast dla szczepu *C. vulgaris* JSC-7 wartość ta wynosi 76,3% (Alam i in., 2014). Wykazano, że pomimo wysokiej aktywności flokulacyjnej płynu pohodowlanego, aktywność ta zmierzona dla wyizolowanych EPS jest znacznie niższa (Chen i in., 2020).

Pomiar aktywności flokulacyjnej EPS wyizolowanego z hodowli *P. kessleri* wykazał aktywność flokulacyjną wynoszącą 23,7% przy zastosowaniu stężenia EPS 1,1 mg L⁻¹. Zarówno w pH 7,7 jak i w pH 11,5 zaobserwowano wzrost aktywności flokulacyjnej wraz ze zmniejszeniem stężenia EPS wprowadzonego do układu. Uzyskany wynik jest porównywalny z danymi przedstawionymi przez zespół Czemińska (2017) gdzie wykazano, że egzopolimer syntetyzowany przez *Rhodococcus rhodochrous*, wykazuje najwyższą aktywność flokulacyjną po zastosowaniu stężenia 2 mg L⁻¹ (Czemińska i in., 2017). Wykazano również, że proces flokulacji z udziałem EPS z *P. kessleri* przebiega najefektywniej w układzie o pH 7,7, tak jak w przypadku EPS badanego przez Czemińska i in. (2017). Natomiast Augustine (2019) zaobserwował wzrost aktywności flokulacyjnej w pH > 9,5 w obecności soli cynku, magnezu, glinu i żelaza. Augustine nie przeprowadził jednak badań z zastosowaniem chlorku wapnia (Augustine i in., 2019). Wartość pH wpływa również na mętność zawiesiny kaolinu. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem turbidymetru wykazały, że w pH 4,7 i 11,5 cząstki kaolinu opadają znacznie szybciej, co wskazuje na destabilizację układu. Natomiast wpływ dodatku EPS jest widoczny jedynie w pH 4,7. Z kolei w układzie o pH 7,3, opadanie cząstek kaolinu przebiega wolniej, a wprowadzenie EPS z *P. kessleri* wyraźnie przyspiesza ten proces. Jak wykazały przeprowadzone analizy (Ryc. 8), odpowiednio dobrane stężenie EPS może poprawić skuteczność procesu flokulacji, bez konieczności modyfikacji pH układu. Jest to istotne szczególnie w kontekście oczyszczania wody pitnej, która powinna mieć pH w zakresie 6,5–9,5 określone rozporządzeniem Ministra Zdrowia (Dz.U. 2017 poz. 2294).

Następnie przeprowadzono pomiary zmian mętności zawiesiny kaolinu z zastosowaniem turbidymetru, w obecności EPS wyizolowanych z *P. kessleri*, *C. vulgaris* i *V. magna*. Uzyskane wyniki wskazują, że badane EPS, przyspieszają opadanie cząstek kaolinu, co potwierdza ich właściwości flokulacyjne (Tian i in., 2020).

Najwyższą aktywność flokulacyjną, a tym samym skuteczność usuwania cząstek kaolinu z układu zaobserwowano w przypadku EPS z *C. vulgaris*, który przy stężeniu 50 mg L⁻¹ powoduje klaryfikację zawiesiny już po 2 min. Zmiany średnicy cząstek/agregatów zarejestrowane przy użyciu analizatora CPS potwierdzają właściwości flokulacyjne EPS z *P. kessleri*. Dodatek do układu EPS syntetyzowanych przez *C. vulgaris* i *V. magna* prowadzi do powstania agregatów widocznych makroskopowo, a obserwowane na wykresie zmniejszenie wielkości cząstek może świadczyć o obecności w układzie bardzo małych cząstek – mniejszych niż cząstki kaolinu (Szewczuk-Karpisz i in., 2021). W przypadku układu z EPS z *V. magna* dominują cząstki o wielkości mniejszej niż średnica kaolinu, ale występują również cząstki o średnicy 0,3414 μm (średnica cząstek kaolinu – 0,2408 μm). Jak wynika z analizy składu chemicznego, polimery otrzymane z *C. vulgaris* i *V. magna* charakteryzują się wyższą zawartością kwasów uronowych w porównaniu z EPS syntetyzowanym przez *P. kessleri*, co może przekładać się na lepsze właściwości flokulacyjne (Lombardi i in., 2005). Nie znaleziono natomiast zależności między zawartością białek w badanych EPS, a ich aktywnością flokulacyjną, choć razem z kwasami uronowymi stanowią główny czynnik determinujący właściwości flokulacyjne EPS, ze względu na zawartość grup karboksylowych (Badireddy i in., 2010; Guo i in., 2017). Badireddy wykazał również pozytywną korelację między zawartością cukrów w EPS a ich aktywnością flokulacyjną (Badireddy i in., 2010). Możliwe zatem, że wysoka zawartość cukrów całkowitych i redukujących w EPS z *C. vulgaris* (syntetyzowanym w warunkach autotroficznych) może wpływać na jego właściwości flokulacyjne. Warto również zwrócić uwagę na obecność w badanych EPS jonów wapnia i magnezu, które mają właściwości sieciujące (Brady i in., 2014). Sumaryczna zawartość Ca i Mg w EPS z *C. vulgaris* (106,75 μg mg⁻¹) jest wyższa niż w EPS z *P. kessleri* (79,42 μg mg⁻¹). Brady (2014) wskazuje, że jony magnezu i wapnia obecne w EPS mogą oddziaływać z anionowymi grupami na powierzchni cząstek stałych (w tym przypadku kaolinu), co może wyjaśniać zdolność EPS z *C. vulgaris* do destabilizacji zawiesiny kaolinu (Brady i in., 2014). Właściwości flokulacyjne zewnątrzkomórkowych EPS są specyficzne nie tylko gatunkowo, ale mogą też znacząco różnić się w zależności od szczepu. Przykładem może być zastosowanie EPS syntetyzowanego przez *C. vulgaris* JSC-7 do flokulacji biomasy w hodowli *C. vulgaris* CNW11 (Alam i in., 2014).

6. Wnioski

W niniejszej rozprawie zbadano wpływ rodzaju i stężenia źródła azotu, oraz natężenia światła na syntezę EPS przez jednokomórkowe glony *C. vulgaris*, *P. kessleri* i *V. magna* w warunkach autotroficznych. Określono również wpływ warunków autotroficznych i miksotroficznych na skład chemiczny i właściwości sorpcyjne badanych EPS. Zbadano także właściwości flokulacyjne autotroficznych EPS oraz wpływ natężenia światła na skład chemiczny EPS. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Badane gatunki jednokomórkowych glonów: *Chlorella vulgaris* 898, *Parachlorella kessleri* i *Vischeria magna* wykazują najwyższą wydajność syntezy polimerów zewnątrzkomórkowych spośród badanych gatunków glonów. Otrzymane egzopolimery zbudowane są głównie z cukrów (57–72%).
2. Największą wydajność syntezy EPS uzyskano na pożywce zawierającej azotan sodu w stężeniu $1,5 \text{ g L}^{-1}$ jako źródło azotu.
3. Brak źródła azotu wpływa na zwiększenie specyficznej produktywności EPS, jednak prowadzi do znacznego obniżenia gęstości biomasy.
4. Wysokie natężenie światła prowadzi do zwiększonej syntezy EPS przez komórki badanych glonów. Natężenie światła wynoszące $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ okazało się najkorzystniejsze uwzględniając zawartość kwasów uronowych i aminokwasów we wszystkich badanych EPS.
5. Miksotroficzne warunki wzrostu zwiększają istotnie wydajność i specyficzną produktywność EPS dla każdego badanego gatunku.
6. EPS syntetyzowane w warunkach miksotroficznych charakteryzują się wyższą zawartością cukrów całkowitych i redukujących, a także białek, substancji fenolowych i aminocukrów w porównaniu do EPS syntetyzowanego w warunkach autotroficznych
7. Badane EPS charakteryzowały się występowaniem grup karboksylowych, hydroksylowych i fosforanowych lub siarczanowych.
8. EPS syntetyzowany przez *C. vulgaris* charakteryzuje się najwyższą pojemnością sorpcyjną wobec jonów ołowiu zarówno w warunkach autotroficznych, jak i miksotroficznych.

9. EPS syntetyzowane w warunkach miksotroficznych przez *P. kessleri* i *C. vulgaris* mogą być efektywnymi sorbentami jonów ołowiu, gdyż wysycenie miejsc sorpcyjnych jonami Pb(II) następuje w ciągu pierwszych 5 minut.
10. EPS syntetyzowane przez *C. vulgaris* i *V. magna* wykazują wyższą aktywność flokulacyjną niż EPS wytwarzane przez *P. kessleri*.

7. Bibliografia

- Abd El-Baky, H.H., El-Baz, F.K. and El Baroty, G.S. (2010) Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments. *J. Sci. Food Agric.*, 90, 299–303. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3815>
- Abinandan S., Subashchandrabose S.R., Venkateswarlu K., Megharaj M. (2019) Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 39 981-998. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1654972>
- Ahad R.I.A., Syiem M.B. (2019) Influence of calcium on cadmium uptake and toxicity to the cyanobacterium *Nostoc muscorum* Meg 1. *Biotech. Res. Innov.*, 3, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.06.002>
- Ai S., Huang Y., Xie T., Zhang X., Huang C. (2020) Fabrication of composites with ultra-low chitosan loadings and the adsorption mechanism for lead ions. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 37927–37937. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09906-7>
- Alam M.A., Wan C., Guo S.L., Zhao X.Q., Huang Z.Y., Yang Y.L., Chang J.S., Bai F.W. (2014) Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *J. Biosci. Bioeng.*, 118, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.021>
- Alengebawy A., Abdelkhalek S.R., Qureshi S.R., Wang M.-Q. (2021) Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9, 42. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Aljuboori A.H.R., Uemura Y., Thanh N.T. (2016) Flocculation and mechanism of self-flocculating lipid producer microalga *Scenedesmus quadricauda* for biomass harvesting. *Biomass Bioenergy*, 93, 38–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.013>
- Allard B., Tazi A. (1992) Influence of growth status on composition of extracellular polysaccharides from two *Chlamydomonas* species. *Phytochemistry*, 32, 41–47. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80103-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80103-L)
- Amin H., Arain B.A., Jahangir T.M., Abbasi M.S., Amin F. (2018) Accumulation and distribution of lead (Pb) in plant tissues of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.): Profitable phytoremediation with biofuel crops. *Geol. Ecol. Landsc.*, 2, 51–60. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1452464>
- Araújo R., Vázquez Calderón F., Sánchez López J., Azevedo I.C., Bruhn A., Fluch S., Garcia Tasende M., Ghaderiardakani F., Ilmjärv T., Laurans M., Mac Monagail M., Mangini S., Peteiro C., Rebours C., Stefansson T., Ullmann J. (2021) Current status of the algae production industry in Europe: An emerging sector of the blue bioeconomy. *Front. Mar. Sci.*, 7, 626389. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Arulmozhi, K.T., Mythili, N. (2013) Studies on the chemical synthesis and characterization of lead oxide nanoparticles with different organic capping agents. *AIP Adv.*, 3, 122122. <https://doi.org/10.1063/1.4858419>
- Aslam S.N., Cresswell-Maynard T., Thomas D.N., Underwood G.J. (2012) Production and characterisation of the intra- and extracellular carbohydrates and polymeric

- substances (EPS) of three sea-ice diatom species, and evidence for a cryoprotective role for EPS. *J. Phycol.*, 48, 1494–1509. <https://doi.org/10.1111/jpy.12004>
- Augustine A., Tanwar A., Tremblay R., Kumar S. (2019) Flocculation processes optimization for reuse of culture medium without pH neutralization. *Algal Res.*, 39, 101437. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101437>
- Babiak W., Krzemińska I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processe. *Energies*, 14, 4007. <https://doi.org/10.3390/en14134007>
- Babich O., Budenkova E., Kashirskikh E., Dolganyuk V., Ivanova S., Prosekov A., Anokhova V., Andreeva A., Sukhikh S. (2022) Study of the polysaccharide production by the microalga *Vischeria punctata* in relation to cultivation conditions. *Life*, 12, 1614. <https://doi.org/10.3390/life12101614>
- Badireddy A.R., Chellam S., Gassman P.L., Engelhard M.H., Lea A.S., Rosso K.M. (2010) Role of extracellular polymeric substances in bioflocculation of activated sludge microorganisms under glucose-controlled conditions. *Water Res.*, 44, 4505–4516. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.024>
- Bhagat N., Raghav M., Dubey S., Bedi N. (2021) Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 1045–1059. <https://doi.org/10.4014/jmb.2105.05009>
- Bhatnagar M., Parwani L., Sharma V., Ganguly J., Bhatnagar A. (2014) Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena* sp. (Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents for wound management. *Carbohydr. Polym.*, 99, 692–699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.005>
- Biswas, J.K., Banerjee, A., Sarkar, B., Sarkar, D., Sarkar, S.K., Rai, M (2020) Exploration of an extracellular polymeric substance from earthworm gut bacterium (*Bacillus licheniformis*) for bioflocculation and heavy metal removal potential. *Appl. Sci.*, 10, 349. <https://doi.org/10.3390/app10010349>
- Bitter, T., Muir, H.M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330–334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brady P.V., Pohl P.I., Hewson J.C. (2014) A coordination chemistry model of algal autoflocculation. *Algal Res.* 5, 226–230. <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.004>
- Campos E.V.R., de Oliveira J.L., Fraceto L.F., Singh B. (2015) Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 47–66. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0263-0>
- Capek P., Matulová M., Šutovská M., Barboríková J., Molitorisová M., Kazimierová I. (2020) *Chlorella vulgaris* α -L-arabino- α -L-rhamno- α,β -D-galactan structure and mechanisms of its anti-inflammatory and anti-remodelling effects. *Int. J. Biol. Macromol.*, 162, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.151>
- Cheirsilp B., Mandik Y.I., Prasertsan P. (2016) Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymeric

substances and pigments. *Aquacult. Int.*, 24, 313–326.
<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9927-2>

- Chen Z., Shao S., He Y., Luo Q., Zheng M., Zheng M., Chen B., Wang M. (2020) Nutrient removal from piggery wastewater coupled to lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Desmodesmus* sp. PW1. *Bioresour. Technol.* 302, 122806. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
- Cheng P., Okada S., Zhou C., Chen P., Huo S., Li K., Addy M., Yan X., Ruan R.R. (2019) High-value chemicals from *Botryococcus braunii* and their current applications – A review. *Bioresour. Technol.*, 291, 121911. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121911>
- Chudasama N.A., Sequeira R.A., Moradiya K., Prasad K. (2021) Seaweed polysaccharide based Products and materials: An assessment on their production from a sustainability point of view. *Molecules*, 26, 2608. <https://doi.org/10.3390/molecules26092608>
- Ciempiel W., Czemińska M., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., Wiącek D., Jarosz-Wilkolazka A., Krzemińska I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities. *Molecules*, 27, 7153. <https://doi.org/10.3390/molecules27217153>
- Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. (2018) Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.*, 9, 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Czemińska M., Szcześ A., Hołysz L., Wiater A., Jarosz-Wilkolazka A. (2017) Characterisation of exopolymer R-202 isolated from *Rhodococcus rhodochrous* and its flocculating properties. *Europ. Polym. J.*, 88, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.008>
- Czemińska M., Szcześ A., Pawlik A., Wiater A., Jarosz-Wilkolazka, A. (2016) Production and characterisation of exopolymer from *Rhodococcus opacus*. *Biochem. Eng. J.*, 112, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.015>
- Dejsungkranont M., Chisti Y., Sirisansaneeyakul S. (2017) Simultaneous production of C-phycoerythrin and extracellular polymeric substances by photoautotrophic cultures of *Arthrospira platensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92, 2709–2718. <https://doi.org/10.1002/jctb.5293>
- Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud, P. (2016) Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 34, 1159–1179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
- Dobrowolski R., Szcześ A., Czemińska M., Jarosz-Wilkolazka A. (2017) Studies of cadmium(II), lead(II), nickel(II), cobalt(II) and chromium(VI) sorption on extracellular polymeric substances produced by *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus rhodochrous*. *Bioresour. Technol.*, 225, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.040>
- Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galingo S. (2012) Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.*, 87, 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>

- DuBois M. Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El Arrousi H., Benhma R., R., Elbaouchi A., Sijilmassi B., El Mernissi N. Aafsar A., Meftah-Ksdmiri I., Bendaou N., Smouni A. (2018) *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Appl. Phycol.*, 30, 2929–2941. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1382-1>
- Elango D., Devi K.D., Jeyabalakrishnan H.K., Rajwdran K., Haridass V.K.T., Dharmaraj D., Charuchandran C.V., Wang W., Fakude M., Mishra R., Vembu K., Wang X. (2022) Agronomic, breeding, and biotechnological interventions to mitigate heavy metal toxicity problems in agriculture. *J. Agric. Food Res.*, 10, 100374. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100374>
- Ellerbrock R.H., Gerke H.H. (2021) FTIR spectral band shifts explained by OM–cation interactions. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.*, 184, 388–397. <https://doi.org/10.1002/jpln.202100056>
- El-Naggar N.E.-A.Hussein M.H., Shaaban-Dessuuki S.A., Dalal S.R. (2020) Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. *Sci. Rep.*, 10, 3011. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59945-w>
- Elzinga E.J. Huang J.H., Chorover J., Kretzschmar R., (2012) ATR-FTIR spectroscopy study of the influence of pH and contact time on the adhesion of *Shewanella putrefaciens* bacterial cells to the surface of hematite. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 12848–12855. <https://doi.org/10.1021/es303318y>
- Fan S., Zhu L., Ji B. (2021) Deciphering the effect of light intensity on microalgal-bacterial granular sludge process for non-aerated municipal wastewater treatment. *Algal Res.*, 58, 102427. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102437>
- Fernando I.P.S., Sanjeewa K.K.A., Samarakoon K.W., Lee, W.W., Kim H.-S., Kim E.-A., Gunasekara U.K.D.S.S., Abeytunga D.T.U., Nanayakkara C., de Silva E.D. (2017) FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. *Algae*, 32, 75–86. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.12.1>
- Flemming H.C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Franco-Morgado M., Amador-Espejo G.G., Pérez-Cortés M., Gutiérrez-Urbe J.A. (2023) Microalgae and cyanobacteria polysaccharides: Important link for nutrient recycling and revalorization of agro-industrial wastewater. *Appl. Food Res.* 3, 100296. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100296>
- Fret J., Roef L., Blust R., Diels L., Tavernier S., Vyverman W., Michels M. (2017) Reuse of rejuvenated media during laboratory and pilot scale cultivation of *Nannochloropsis* sp. *Algal Res.*, 27, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.018>
- Gabrielyan L., Hakobyan L., Trchounian A. (2017) Characterization of light-dependent hydrogen production by new greenmicroalga *Parachlorella kessleri* in various

- conditions. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 175, 207-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.09.006>
- Gawkowska D., Cybulska J., Zdunek A. (2018) Cross-linking of sodium carbonate-soluble pectins from apple by zinc ions. *Carbohydr. Polym.* 196, 1-7. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.024>
- Ge H., Xia L., Zhou X., Zhang D., Hu, C. (2014) Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *J. Microbiol.* 52, 179–183. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-2720-5>
- Genchi G., Sinicropi M., Lauria G., Carocci A., Catalano A. (2020) The effect of cadmium toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Ghorbani E., Nowruzi B., Nezhadali M., Hekmat A. (2022) Metal removal capability of two cyanobacterial species in autotrophic and mixotrophic mode of nutrition. *BMC Microbiol.*, 22, 58. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02471-8>
- Goo B.G., Baek G., Choi D.J., Park Y.I., Synytsya A., Bleha R., Seong D.H., Lee C.-G., Park J.K. (2013) Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.*, 129, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.077>
- Gopalakrishnan K., Kashian D.R. (2022) Extracellular polymeric substances in green alga facilitate microplastic deposition. *Chemosphere*, 286, 131814. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131814>
- Gris B., Sforza E., Morosinotto T., Bertucco A., La Rocca N. (2017) Influence of light and temperature on growth and high-value molecules productivity from *Cyanobacterium aponinum*. *J. Appl. Phycol.*, 29, 1781–1790. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1133-3>
- Guo S.L., Zhao X.Q., Wan C., Huang Z.Y., Yang Y.L., Alam M.A., Ho S.H., Bai F.W., Chang, J.-S. (2013) Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. *Bioresour. Technol.*, 145, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.120>
- Guo H., Hong C., Zheng B., Lu F., Jiang D., Qin W. (2017) Bioflocculants' production in a biomass-degrading bacterium using untreated corn stover as carbon source and use of bioflocculants for microalgae harvest. *Biotechnol. Biofuel.* 10, 306. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0987-6>
- Guzmán-Murillo M.A., López-Balaños C.C., Ledesma-Verdejo T., Roldan-Liberson G., Cadena-Roa M.A., Ascencio F. (2007) Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin). *J. Appl. Phycol.*, 19, 33-41. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9108-9>
- Haider F.U., Liqun C., Coulter J.A., Cheema S.A., Wu J., Zhang R., Wenjun M., Farooq M. (2021) Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotox. Environ. Saf.*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N. (2010) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic

contents of some strains of microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 22, 43–50. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>

- Halaj M., Chválová B., Cepák V., Lukavský J., Capek P. (2018) Searching for microalgal species producing extracellular biopolymers. *Chem. Pap.*, 72, 2673–2678. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0517-4>
- Halaj, M.; Paulovičová, E.; Paulovičová L., Jantová S., Cepák V., Lukavský J., Capek P. (2019) Extracellular biopolymers produced by *Dictyosphaerium* family—Chemical and immunomodulative properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 121, 1254–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.116>
- Han P.P., Yao S.Y., Guo R.J., Yan R.R., Wu Y.K., Shen S.G., Jia S.R. (2017) Influence of culture conditions on extracellular polysaccharide production and the activities of enzymes involved in the polysaccharide synthesis of *Nostoc flagelliforme*. *RSC Adv.*, 7, 45075. <https://doi.org/10.1039/C7RA07982F>
- Heaney-Kieras J., Rodén L., Chapman D.J. (1977) The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochem. J.*, 165, 1–9. <https://doi.org/10.1042/bj1650001>
- Hope C.F.A., Burns R.G. (1987) Activity, origins and location of cellulases in a silt loam soil. *Biol. Fertil. Soils*, 5, 164–170. <https://doi.org/10.1007/BF00257653>
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Verspagen J.M.H., Visser P.M. (2018) Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- Jang J.H., Hia H.C., Ike M., Inoue C., Fujita M., Yoshida T. (2005) Acid hydrolysis and quantitative determination of total hexosamines of an exopolysaccharide produced by *Citrobacter* sp. *Biotechnol. Lett.*, 27, 13–18. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-6305-y>
- Jiao Y., Cody G.D., Harding A.K., Wilmes P., Schrenk M., Wheeler K.E., Banfield J.F., Thelen M.P. (2010) Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 2916–2922. <https://doi.org/10.1128/AEM.02289-09>
- Jurášková D., Riberto S.C., Silva C.C.G. (2022) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11, 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Kandasamy S., Narayanan M., He Z., Liu G., Ramakrishnan M., Thangavel P., Pugazhendhi A., Raja R., Carvalho I.S. (2021) Current strategies and prospects in algae for remediation and biofuels: An overview. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 35, 102045. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102045>
- Kim G., Mujtaba G., Lee K. (2016) Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*. 31, 257–266. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.18>
- Kong W., Song H., Cao Y., Yang H., Hua S., Xia C. (2011) The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *Afr. J. Biotechnol.*, 10, 55, 11620–11630 DOI: 10.5897/AJB11.617.

- Kryvenda A., Rybalka N., Wolf M., Friedl T. (2018) Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. *Eur. J. Phycol.*, 53, 471–491. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1475015>
- Krzemińska I., Oleszek M., Wiącek D. (2019) Liquid anaerobic digestate as a source of nutrients for lipid and fatty acid accumulation by *Auxenochlorella protothecoides*. *Molecules*, 24, 3582. <https://doi.org/10.3390/molecules24193582>
- Krzemińska I., Nosalewicz A., Reszczyńska E., Pawlik-Skowrońska B. (2020) Enhanced light-induced biosynthesis of fatty acids suitable for biodiesel production by the yellow-green alga *Eustigmatos magnus*. *Energies*, 13, 6098. <https://doi.org/10.3390/en132260>
- Kumar A.S., Mody K., Jha B. (2007) Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.*, 47, 103–117. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>
- Kushwaha A., Hans N., Kumar S., Rani R. (2018) A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 147, 1035–1045. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.049>
- Laroche. C. (2022) Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: diversity of strains, production strategies, and applications. *Mar. Drugs*, 20, 336. <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- Li C.C., Wang Y.J., Du H., Cai P., Peijnenburg W.J.G.M., Zhou D.M., (2017) Influence of bacterial extracellular polymeric substances on the sorption of Zn on γ -alumina: A combination of FTIR and EXAFS studies. *Environ. Pollut.*, 220, 997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.048>
- Li J. Kisara K., Danielsson S., Lindström M.E., Gellerstedt G. (2007) An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 342, 1442–1449. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.03.031>
- Li X., Příbyl P., Bišová K., Kawano S., Cepák V., Zachleder V., Čížková M., Brányiková I., Vítová M. (2013) The microalga *Parachlorella kessleri*—A novel highly efficient lipid producer. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 97–107. <https://doi.org/10.1002/bit.24595>
- Li S., Ji L., Chen C., Zhao S., Sun M., Gao Z., Wu H., Fan J. (2020a) Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioresour. Technol.*, 309, 123362. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123362>
- Li Y., Wang C., Liu H., Su J., Lan C.Q., Zhong M., Hu X. (2020b) Production, isolation and bioactive estimation of extracellular polysaccharides of green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Algal Res.*, 48, 101883. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101883>
- Li N., Liu J., Yang R., Wu L. (2020c) Distribution, characteristics of extracellular polymeric substances of *Phanerochaete chrysosporium* under lead ion stress and the influence on Pb removal. *Sci. Rep.*, 10, 17633. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74983-0>

- Liu J., Li K., Xu J., Zhang Z., Ma T., Lu X., Yang J., Zhu Q. (2003) Lead toxicity, uptake, and translocation in different rice cultivars. *Plant Sci.*, 165, 793-802. [http://doi:10.1016/S0168-9452\(03\)00273-5](http://doi:10.1016/S0168-9452(03)00273-5)
- Liu L., Pohnert G., Wei D. (2016) Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Mar. Drugs*, 14, 191. <https://doi.org/10.3390/md14100191>
- Liu W., Zhao C., Jiang J., Lu Q., Hao Y., Wang L., Liu C. (2015) Bioflocculant production from untreated corn stover using *Cellulosimicrobium cellulans* L804 isolate and its application to harvesting microalgae. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 8, 170. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0354-4>
- Lombardi A.T., Hidalgo T.M.R., Vieira, A.A.H. (2005) Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, 60, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.071>
- Lv J., Guo J., Feng J. Liu Q., Xie S. (2016) A comparative study on flocculating ability and growth potential of two microalgae in simulated secondary effluent. *Bioresour. Technol.*, 205, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.047>
- Malarczyk E., Paździoch-Czochra M., Graż M., Kochmańska-Rdest J., Jarosz-Wilkolazka A. (2011) Nonlinear changes in the activity of the oxygen-dependent demethylase system in *Rhodococcus erythropolis* cells in the presence of low and very low doses of formaldehyde. *Nonlinear Biomed. Phys.* 5, 9. <https://doi.org/10.1186/1753-4631-5-9>
- Mathivanan K., Chandrika J.U., Mathimani T., Rajaram R., Annadurai G., Yin H. (2021) Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 208, 111567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111567>
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I., Lee Y.C. (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* 339, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Mazéas L., Yonamine R., Barbeyron T., Henrissat B., Drula E., Terrapon N., Nagasato C., Hervé C. (2023) Assembly and synthesis of the extracellular matrix in brown algae. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 134, 112-124. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2022.03.005>
- More T.T., Yadav J.S.S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. (2014) Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications, *J. Environ. Manage.* 144, 1-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>
- Moreno J., Vargas M.A., Olivares H., Rivas J., Guerrero M.G. (1998) Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.*, 60, 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00003-0)
- Mota R., Vidal R., Pandeirada C., Flores C., Adessi A., De Philippis R., Nunes C., Coimbra M.A., Tamagnini P. (2020) Cyanoflan: A cyanobacterial sulfated carbohydrate polymer with emulsifying properties. *Carbohydr. Polym.*, 229, 115525. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115525>

- Myklestad S., Holm-Hansen O., Varum K.M., Volcani B.E. (1989) Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *J. Plankton Res.*, 11, 763-773.
- Naseem H., Ahsan M., Shahid M.A., Khan N. (2018) Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *J. Basic Microbiol.*, 58, 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
- Naveed S., Li C., Lu X., Chen S., Yin B., Zhang C., Ge Y. (2019) Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 49, 1769–1802. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1583052>
- Nguyen T.D.P., Vo C.T., Nguyen-Sy T., Tran T.N.T., Le T.V.A., Chiu C.-Y., Sankaran R., Show P.L. (2020) Utilization of microalgae for self-regulation of extracellular polymeric substance production. *Biochem. Eng. J.*, 159, 107616. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107616>
- Ogawa K., Ikeda Y., Kondo S. (1999) A new trisaccharide, a-D-glucopyranuronosyl-(1→3)-a-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-a-L-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. *Carbohydr. Res.*, 321, 128-131. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00176-7)
- Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkolażka A., Jaroszuk-Ścisiel J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M. (2015) Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1823–1844. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1937-8>
- Ouyang D., Zhuo Y., Hu L., Zeng Q., Hu Y., He Z. (2019) Research on the adsorption behavior of heavy metal ions by porous material prepared with silicate tailings. *Minerals*, 9, 291. <https://doi.org/10.3390/min9050291>
- Parmar P., Shukla A., Goswami D., Gaur S., Patel B., Saraf M. (2020) Comprehensive depiction of novel heavy metal tolerant and EPS producing bioluminescent *Vibrio alginolyticus* PBR1 and *V. rotiferianus* PBL1 confined from marine organisms. *Microbiol. Res.*, 238, 126526. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126526>
- Perez J.A.M., Garcia-Ribera R., Quesada T., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sanchez M. (2008) Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 2699–2704. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9800-9>
- Phélippé M., Gonçalves O., Thouand G., Cogne G., Laroche L. (2019) Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Res.*, 38, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101426>
- Piasecka A., Baier A. (2022) Metabolic and proteomic analysis of *Chlorella sorokiniana*, *Chloroidium saccharofilum*, and *Chlorella vulgaris* cells cultured in autotrophic, photoheterotrophic, and mixotrophic cultivation modes. *Molecules* 27, 4817. <https://doi.org/10.3390/molecules27154817>
- Piasecka A., Krzemińska I., Tys J. (2017) Enrichment of *Parachlorella kessleri* biomass with bioproducts: oil and protein by utilization of beet molasses. *J. Appl. Phycol.*, 29, 1735–1743. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1081-y>

- Piasecka A., Nawrocka A., Wiącek D., Krzemińska I. (2020) Agro-industrial by-product in photoheterotrophic and mixotrophic culture of *Tetrademus obliquus*: Production of ω 3 and ω 6 essential fatty acids with biotechnological importance. *Sci. Rep.*, 10, 6411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63184-4>
- Pierre G., Delattre C., Dubessay P., Jubeau S., Vialleix C., Cadoret J.P., Probert I., Michaud P. (2019) What is in store for EPS microalgae in the next decade? *Molecules*, 24, 4296. <https://doi.org/10.3390/molecules24234296>
- Puschenreiter M., Horak O., Friesl W., Hartl W. (2005) Low-cost agricultural measures to reduce heavy metal transfer into the food chain – a review. *Plant, Soil Environ.*, 51, 1-11. DOI: 10.17221/3549-PSE
- Queiroz M.I., Vieira J.G., Maroneze M.M. (2020) Morphophysiological, structural, and metabolic aspects of microalgal. in: Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Elsevier, 25-48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00002-6>
- Rachidi F., Benhima R., Kasmi Y., Sbabou Y., El Arrousi H. (2021) Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Sci. Rep.*, 11, 930. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>
- Rachidi F., Chanda M.J., Benhima R., El Mernissi N., Aasfar A., Laila S., El Arrousi H. (2019) Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 188, 225–240. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2916-y>
- Raposo M.F.J., Morais R.M.S.C., Morais A.M.M.B. (2013) Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Mar. Drugs*, 11, 233-252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- Raungsomboon S., Chidthaisong A., Bunnag B., Inthorn D., Harvey N.W. (2006) Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Res.*, 40, 3759–3766. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.013>
- Reddad Z., Ge C., Cloirec P.L. (2003) Cadmium and lead adsorption by a natural polysaccharide in MF membrane reactor: Experimental analysis and modelling. *Water Res.*, 37, 3983–3991. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00295-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00295-1)
- Renuka N., Guldhe A., Prasanna R., Singh P., Bux F. (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.*, 36, 1255-1273. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.004>
- Rossi F., De Philippis R. (2015) Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life*, 5, 1218–1238. <https://doi.org/10.3390/life5021218>
- Salehizadeh H., Shojaosadati S.A. (2001) Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.*, 19, 371–385. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00071-4)
- Sari A., Tuzen M., Soylak M. (2007) Adsorption of Pb(II) and Cr(III) from aqueous solution on Celtek clay. *J. Hazard. Mater.*, 144, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.080>

- Sasaki M., Takagi A., Ota S., Kawano S., Sasaki S., Asayama M. (2020) Coproduction of lipids and extracellular polysaccharides from the novel green alga *Parachlorella* sp. BX1.5 depending on cultivation conditions. *Biotechnol. Rep.*, 25, e00392. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00392>
- Sasaki M., Takagi A., Sasaki D., Nakamura A., Asayama M. (2021) Characteristics and function of an extracellular polysaccharide from a green alga *Parachlorella*. *Carbohydr. Polym.*, 254, 117252. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117252>
- Shah V., Daverey A. (2020) Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil, *Environ. Technol. Innov.*, 18, 100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
- Shao Z., Duan D. (2022) The cell wall polysaccharides biosynthesis in seaweeds: A molecular perspective. *Front. Plant Sci.*, 13, 902823. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.902823>
- Shao Y., Lin A.H.-M. (2018) Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chem.* 240, 898–903. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.083>
- Sharma A.K., Parul, General T. (2019) Variation of both chemical composition and antioxidant properties of newly isolated *Parachlorella kessleri* GB1, by growing in different culture conditions. *LWT*, 112, 108205. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.103>
- Sharma B.R., Dhuldhoya N.C., Merchant U.C. (2006) Flocculants — An ecofriendly approach. *J. Polym. Environ.*, 2006, 14, 195–202. <https://doi.org/10.1007/s10924-006-0011-x>
- Siddiki S.Y.A., Mofijur M., Kumar P.S., Ahmed S.F., Inayat A., Kusumo F., Badruddin I.A., Khan T.M.Y., Nghiem L.D., Ong H.C., Mahlia T.M.I. (2022) Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel* 307, 121782. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121782>
- Silva M.B., Azero E.G., Teixeira C.M.L.L., Andrade C.T. (2020) Influence of culture conditions on the production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Arthrospira platensis*. *Bioresour. Bioprocess.*, 7, 47. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00337-3>
- Srinivasan R., Santhkakumari S., Poonguzhali P., Geetha M., Dyavaiah M., Xiangmin L. (2021) Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Front. Microbiol.*, 12, 676458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>
- Srivastava V., Sakar A., Singh S., Singh P., de Araujo A.S.F., Singh R.P. (2017) Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances. *Front. Environ. Sci.*, 5, 64. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00064>
- Staats N., Stal L., Mur L.R. (2000) Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249, 1, 13-27. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00166-0)



- Sun S.W., Lin Y.C., Weng Y.M., Chen M.J. (2006) Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.006>
- Sushytskyi L., Lukáč P., Synytsya A., Bleha R., Rajsiglová L., Capek P., Pohl R., Vannucci L., Čopíková J., Kaštánek P. (2020) Immunoactive polysaccharides produced by heterotrophic mutant of green microalga *Parachlorella kessleri* HY1 (Chlorellaceae). *Carbohydr. Polym.* 246, 116588. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116588>
- Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., Winnicka, K. (2016) Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *Int. J. Polymer Science* 2016, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>
- Szewczuk-Karpisz K., Tomczyk A., Komanińska I., Choma A., Adamczuk A., Sofińska-Chmiel W. (2021) Impact of *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide on adsorption and aggregation in the copper(II) ions/supporting electrolyte/kaolinite system. *Materials*, 14, 1950. <https://doi.org/10.3390/ma14081950>
- Szymańska-Chargot M., Zdunek A. (2013) Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys.* 8, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- Talari A.C.S., Martinez M.A.G., Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U. (2017) Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 52, 456–506. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>
- Tarfeen N., Nisa K.I., Hamid B., Bashir Z., Yatoo A.M., Dar M.A., Mohiddin F.A., Amin Z., Ahmad R.A., Sayyed R.Z. (2022) Microbial remediation: A promising tool for reclamation of contaminated sites with special emphasis on heavy metal and pesticide pollution: A review. *Processes*, 10, 1358. <https://doi.org/10.3390/pr10071358>
- Tian D., Zhou Y., An K., Kang H. (2020) Preparation and flocculation properties of biodegradable konjac glucomannan-grafted poly(trimethyl allyl ammonium chloride). *Polym. Bull.* 77, 1847–1868. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02836-6>
- Trabelsi L., Chaieb O., Mnari A., Abid-Essafi S., Aleya L. (2016) Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16, 210. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1198-6>
- Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. (2013) Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.*, 31, 233–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>
- Vo H.N.P., Ngo H.H., Guo W., Liu Y., Chang S.W., Nguyen D.D., Zhang X., Liang H., Xue S. (2020) Selective carbon sources and salinities enhance enzymes and extracellular polymeric substances extrusion of *Chlorella* sp. for potential co-metabolism. *Bioresour. Technol.*, 303, 122877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122877>
- Wan M., Liu P., Xia J., Rosenberg J.N., Oyler G.A., Betenbaugh M.J., Nie Z., Qiu G. (2011) The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 835–844. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3399-8>

- Wang M., Kuo-Dahab W.C., Dolan S., Park C. (2014) Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.*, 154, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.047>
- Wehr J.D., Sheath R.D. (2015) Habitats of Freshwater Algae, in: Freshwater algae of North America. Academic Press. Elsevier, 13-74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00002-5>
- Wei W., Wang O., Li A., Yang J., Ma F., Pi S., Wu D. (2016) Biosorption of Pb (II) from aqueous solution by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1: Adsorption behavior and mechanism assessment. *Sci. Rep.*, 6, 31575. <https://doi.org/10.1038/srep31575>
- Xiao R., Zheng Y. (2016) Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.*, 34, 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Xie P., Chen C., Zhang C., Su G., Ren N.Q., Ho S.H. (2020b) Revealing the role of adsorption in ciprofloxacin and sulfadiazine elimination routes in microalgae. *Water Res.*, 172, 115475. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115475>
- Xie Q., Liu N., Lin D., Qu R., Zhou Q., Ge F. (2020a) The complexation with proteins in extracellular polymeric substances alleviates the toxicity of Cd (II) to *Chlorella vulgaris*. *Environ. Pollut.*, 263, 114102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114102>
- Xu Y., Rossi F., Colica G., Deng S., De Philippis R., Chen L. (2013) Use of cyanobacterial polysaccharides to promote shrub performances in desert soils: a potential approach for the restoration of desertified areas. *Biol. Fertil. Soils*, 49, 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0707-0>
- Zhang J., Liu L., Chen F. (2019) Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 134, 976–983. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.117>
- Zhang J., Zhou F., Liu Y., Huang F., Zhang C. (2020) Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Sci. Total Environ.*, 704, 135368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135368>
- Zhou J., Jiang Z., Qin X., Zhang L., Huang Q., Xu G. (2020) Effects and mechanisms of calcium ion addition on lead removal from water by *Eichhornia crassipes*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 928. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030928>

8. Teksty publikacji

Review

Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes

Wioleta Babiak  and Izabela Krzemińska * 

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; w.babiak@ipan.lublin.pl

* Correspondence: i.krzeminska@ipan.lublin.pl; Tel.: +48-(81)-744-50-61

Abstract Microalgae are natural resources of intracellular compounds with a wide spectrum of applications in, e.g., the food industry, pharmacy, and biofuel production. The extracellular polymeric substances (EPS) released by microalgal cells are a valuable bioproduct. Polysaccharides, protein, lipids, and DNA are the main constituents of EPS. This review presents the recent advances in the field of the determinants of the synthesis of extracellular polymeric substances by microalgal cells and the EPS structure. Physical and chemical culture conditions have been analyzed to achieve useful insights into the development of a strategy optimizing EPS production by microalgal cells. The application of microalgal EPS for flocculation and mechanisms involved in this process are also discussed in terms of biomass harvesting. Additionally, the ability of EPS to remove toxic heavy metals has been analyzed. With their flocculation and sorption properties, microalgal EPS are a promising bioproduct that can potentially be used in harvesting algal biomass and wastewater management.

Keywords: extracellular polymeric substances; microalgae cultivation; flocculation; harvesting; biomass



Citation: Babiak, W.; Krzemińska, I. Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. *Energies* 2021, 14, 4007. <https://doi.org/10.3390/en14134007>

Academic Editor: Constantine D. Rakopoulos

Received: 23 May 2021
Accepted: 30 June 2021
Published: 2 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Microalgae are a widespread and diverse group of photosynthetic microorganisms. Since microalgal biomass is a rich source of many compounds, e.g., carotenoids, polysaccharides, proteins, fatty acids, lipids, and vitamins, these organisms have a wide range of applications in the food and feed, pharmacy, and cosmetics industries as well as biofuel production [1,2]. Besides valuable intercellular components, microalgae also secrete high-molecular polymers outside the cell referred to as extracellular polymeric substances (EPS). The mechanism of microalgal adaptation to certain stress factors, e.g., light intensity and continuity, temperature, pH, nutrient deficiency, and toxic substances, involves secretion of extracellular polymeric substances [3].

Extracellular polymeric substances are macromolecules with a highly diverse chemical composition and structure related to species and growth conditions. Polysaccharides and proteins are the main components. Additionally, fatty acids, nucleic acids, humic acids, amino acids, and other molecules are present in smaller amounts [4].

Due to their various physicochemical properties, EPS are applied in many branches of industry, e.g., food, paper, textile, biotechnological, pharmaceutical, and cosmetics industries and for water retention [5,6]. Furthermore, EPS exhibit many biomedical properties: antimicrobial, anti-tumor, anti-inflammation, or antioxidative activity; hence, they can be applied in medicine [2,6]. Microalgal EPS have different properties determined by the strain, growth medium composition, environmental stress, and culture age [2,6].

This review describes the latest findings about the determinants of the synthesis of microalgal bioproducts: extracellular polymeric substances and their structure. This

manuscript presents a comprehensive review comparing studies on the individual and mutual effects of culture conditions, cultivation systems, and nutrients on the EPS synthesis with reference to optimization of EPS bioproduction. The use of microalgal extracellular polymeric substances synthesized by microalgae in flocculation and the mechanisms involved in this process in terms of biomass harvesting has been discussed sporadically; therefore, this manuscript provides an overview of relevant reference data published so far.

2. Characteristics of Extracellular Polymeric Substances

Extracellular polymeric substances (EPS) are a group of macromolecular compounds secreted outside the cell. These molecules create a slimy coating around cells, which acts as a protective barrier against some environmental stresses. EPS synthesis in microalgae takes place in the Golgi apparatus [2].

Extracellular polymeric substances are characterized by a variety of chemical structures and a homopolymeric or heteropolymeric structure [7]. Microalgal EPS have a complex structure, which has evolved in response to diverse biotic and abiotic environmental conditions [8]. Depending on their properties and ability to bind to cells, several types of EPS have been reported in the literature. EPS that are weakly bound with cells and are secreted into the medium are referred to as soluble EPS (SL-EPS). In turn, bound EPS represent a type that is bound with cells [3]. This fraction is divided into loosely bound EPS (LB-EPS) and tightly bound EPS (TB-EPS). LB-EPS and TB-EPS show a different composition and functionalities. As reported by Li et al. (2020), LB-EPS show the highest Pb(II) adsorption abilities in comparison to TB-EPS and SB-EPS (soluble EPS) [9]. The role of LB-EPS seems to be more important in response to adverse environmental changes than the role of other EPS fractions; hence, they serve a protection function in algal metabolism [10]. Both EPS fractions exert a different effect on the flocculating ability, as described in Section 5.1. EPS may be involved in nutrient distribution, as the extracellular matrix contains some metabolites released by algal cells, e.g., nucleic acids, enzymes, lipopolysaccharides, and phospholipids. EPS components (proteins and humic substances) may be involved in redox processes as well. Wang et al. (2020) suggest that proteins may be transferred from the inner layer (TB-EPS) to the outside of the cell (LB-EPS and SB-EPS). They also observed a decrease in protein content in TB-EPS in the death phase, whereas the protein content was comparable during the logarithmic growth phase in all EPS fractions [11].

However, the terminology of EPS is inconsistent; therefore, other terms for total EPS can be found in the literature, for example, exopolysaccharides, extracellular polysaccharides, extracellular proteoglycan (EPG), exopolymeric substances, or extracellular polymers. Both fractions exhibit different properties and composition [4,12]. However, Rossi et al. (2016) claim that there are no significant differences. This review focuses on a released fraction referred to as EPS [13].

EPS are composed primarily of polysaccharides, proteins, lipids, and nucleic acids [4]. Extracellular polymeric substances may occur as polysaccharides (with the predominance of sugar components), proteoglycans (containing proteins in sugar chains), or glycoproteins (with proteins as the major elements of the polymer) or they exhibit a different polymer type [14]. EPS have high molecular weight, but there is also a fraction of low molecular weight polymeric substances [15]. The weight of a polymer extracted from *Chlorella vulgaris* JSC-7 was $9.86 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ [16]. Whereas EPS from *Dictyosphaerium* strains contained a high molecular weight fraction (which was from $1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ to, more than $2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$), as well as low molecular weight compounds in the range of $9000\text{--}56,000 \text{ g mol}^{-1}$ [14]. They are mostly negatively charged (hydrophobic) due to the presence of hydrolyzed functional groups. FTIR spectra show the presence of carboxyl, hydroxyl, and amino groups [14,16,17].

Polysaccharides are one of the main components of EPS, accounting for 45–95% of EPS [3]. The sugar units observed in microalgal EPS include glucose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose, and fucose (Table 1), with glucose and galactose as the most frequent

sugars. An exception are the EPS derived from *Dunaliella salina*, which are composed mainly of fructose [18].

Table 1. Monosaccharide composition (% w/w) of extracellular polymeric substances (EPS) produced by Chlorophyta.

Species	fuc	gal	ara	glc	man	xyl	rib	rha	fru	UA	glcA	galA	glcN	Other	Source
<i>Botryococcus braunii</i> ^c CCALA 778	13	26	2	42	15	2		1			<1	2	1		[19]
<i>Botryococcus braunii</i> CCALA 778	31	51		4							3	9		OMe	[20]
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	23.7	18.4	14.8	27.8	4.5	5	2.3	3.3		12.8					[21]
<i>Chlamydomonas sajuo</i>		77.6	13.5	3.8	1	7.5		2.3		12.9					[21]
<i>Desmococcus olivaceus</i>		28.8	13.1	27.6	5.9	12.4		7			trace	trace			[22]
<i>Dictiosphaerium chloroellatides</i>	trace	42 ^b	2.4	8 ^b	13.7	4 ^b		18.5						UH 12	[23]
<i>Dictiosphaerium tetrachlorum</i> Ruzicka	11.6	46.6	8	1	7.8	2.9		12				4.8 ^a	1.6 ^a	OMe	[14]
<i>Dictiosphaerium tetrachlorum</i> Fott	15.7	32.8 ^b	1.3	8.9	2.2	18.7		2.5			12.4 ^a		0.8 ^a	OMe	[14]
<i>Dictiosphaerium pulchellum</i>	6.9	35 ^b	2.2	6.4	2.9	9.8		16.6			5.2 ^a		1.4 ^a	OMe	[14]
<i>Dunaliella tertiolecta</i> UTEX LB 999				89											[24]
<i>Graecielia</i> sp.	32	16.3	12.5	12.1	11.5	10.3	2.7	2.3		23					[25]
<i>Neochloris oleabundans</i>		18.9	4.6	40.7	19	8.7	6.9	1.2							[26]

ara—arabinose, fru—fructose, fuc—fucose, gal—galactose, glc—glucose, man—mannose, rha—rhamnose, rib—ribose, xyl—xylose, UA—uronic acids, glcA—glucuronic acid, galA—galacturonic acid, glcN—glucosamine. ^a Measured by HPAE chromatography; ^b with methyl derivatives; ^c approximate values (read from graph); UH—unidentified methyl hexoses; OMe—methylated sugars.

Monosaccharides can be modified by non-sugar residues such as pyruvate, sulfates, acyl groups, phosphates, O-acetyl-, and O-methyl groups [2,14,16,27,28]. EPS from *Porphyridium* sp. are mainly composed of xylose, glucose, and galactose. Protein accounts for 5.5% of the polymer. The negative charge of EPS is associated with the presence of negatively charged sulfate groups and glucuronic acids [29]. EPS from Chlorophyta is characterized by high contents of galactose [8].

Polysaccharides may form linear or branching structures with regular or irregular morphology related to the presence of various glycosidic bonds [30]. As reported by Delattre et al. (2016), α -(1,3), β -(1,3), β -(1,4), and (2,1)- β are linkages observed in EPS. Most EPS are heteropolymers [2]. However, homopolysaccharides are observed in some cases, for example, the EPS synthesized by *Dunaliella tertiolecta* are (1 \rightarrow 4)- α -D-glucans [24].

Proteins are one of the main components of microalgal EPS. In terms of their functions, there are non-enzymatic structural proteins, which stabilize the EPS matrix [6], and enzymatic proteins degrading exopolysaccharides, which can be a source of carbon and energy for cells [31]. As reported by Xiao and Zheng (2016), the content of extracellular total protein per mg L⁻¹ of supernatant in different microalgae (green microalgae, diatoms, and red algae) is in the range from 0.5 mg L⁻¹ to 11 mg L⁻¹; when expressed as weight % of total EPS, it ranges from 0.5% to 16.9% [6]. The analysis of experimental results of the protein content shown in literature reports reveals a large variation among Chlorophyta, which suggests that the protein content in EPS is not a species-specific trait. Analyses of

the composition of *Chlorella vulgaris* EPS showed protein and carbohydrate contents of 25.6 mg L⁻¹ and 31.1 mg L⁻¹, respectively [32]. In turn, EPS synthesized by *Chlamydomonas reinhardtii*, i.e., another representative of Chlamydomonadales, contained 42.1% of proteins [33]. Investigations conducted by Liu and Miao (2017) on the effect of MgSO₄ on EPS production by *Heynigia riparia* (Chlorophyta) showed a protein level in EPS in the range from 15.27% to 24.19% [34]. The EPS of Chlorophyta typically contains glycoproteins [35].

3. Effect of Culture Conditions on the EPS Synthesis Process

The process of EPS synthesis by microalgal cells is influenced by many factors: culture conditions, such as light, temperature, culture aeration, age of culture, as well as the availability of nutrients, including nitrogen and carbon sources, and their concentration, type of nutrition, and salinity. Optimal conditions for EPS production are different from the optimal conditions for the growth of microalgal cells. Maximum EPS production is accompanied by a decline in the specific growth rate [36]. Therefore, appropriate adjustment of culture conditions may promote EPS synthesis.

3.1. Effect of Light

Light and the light regime are two crucial factors determining microalgal growth and metabolic pathways in autotrophic conditions [37]. The production of EPS by microalgal cells is a light-dependent process. The synthesis of extracellular polysaccharides is a function of the photosynthetic activity and reproduction of autotrophic algal cells; therefore, factors that exert an impact on the photosynthesis process also influence the synthesis of EPS [38].

It has been shown that increasing light intensity can enhance EPS production. As demonstrated by Liqin et al. (2008), EPS production by *Porphyridium cruentum* was enhanced with an increase in light intensity up to the light saturation point, above which the production declined (Table 2) [39]. The highest EPS production level was achieved at the light intensity of 80 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [39]. These results are in agreement with those reported by You and Barnett (2004), who observed an increase in extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* in the light intensity range from 39 to 70 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ [40]. Above this level, i.e., at the light saturation point, the polysaccharide production was found to decline. However, in a study conducted by Clément-Larosière (2014), specific EPS production of *C. vulgaris* (excreted per cell) decreased with increasing light intensity (50, 120, 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). The highest specific EPS production was recorded at the lowest light intensity of 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [41].

Research on the influence of light intensity on EPS production was also carried out on cyanobacteria (Table 2). Continuous light and high light intensity were found to favor EPS production by Cyanobacteria [42]. *Cyanobacterium aponinum* is able to synthesize EPS at light intensity of 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [43], likewise *Anabena* spp. with maximum EPS production were detected at 460 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [44]. Chentir et al. (2017) observed an increase in EPS production by Cyanobacteria with increasing light intensity [45]. However, after salt stress application, there was no such a relationship or the amount of EPS was decreasing [45]. Similarly, other studies confirm the increase in the EPS yield accompanying enhanced light intensity. In investigations of *Nostoc* sp. cyanobacteria, an increase in light intensity from 40 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ to 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ contributed to intensified EPS production and higher protein content in EPS [46].

Table 2. Effect of light intensity on EPS production.

Species	Light Intensity	EPS Production	References
<i>Porphyridium cruentum</i>	30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.56 \pm 0.06 (g L ⁻¹)	[39]
	40 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.66 \pm 0.08 (g L ⁻¹)	
	50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.79 \pm 0.06 (g L ⁻¹)	
	60 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.82 \pm 0.10 (g L ⁻¹)	
	80 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.95 \pm 0.09 (g L ⁻¹)	
	100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.77 \pm 0.07 (g L ⁻¹)	
<i>Porphyridium cruentum</i>	150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.31 \pm 0.06 (g L ⁻¹)	[40]
	39 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.18 (g L ⁻¹)	
	48 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.30 (g L ⁻¹)	
	60 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.55 (g L ⁻¹)	
	70 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.95 (g L ⁻¹)	
<i>Chlorella vulgaris</i>	90 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.45 (g L ⁻¹)	[41]
	50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	6.79 \pm 0.3 (pg CO ₂ cell ⁻¹)	
	120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	5.58 \pm 0.27 (pg CO ₂ cell ⁻¹)	
<i>Cyanobacterium aponinum</i>	180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	4.58 \pm 0.32 (pg CO ₂ cell ⁻¹)	[43]
	15 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~84 (mg g DW ⁻¹)	
	40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~83 (mg g DW ⁻¹)	
	70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~80 (mg g DW ⁻¹)	
	100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~70 (mg g DW ⁻¹)	
	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~60 (mg g DW ⁻¹)	
	300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~60 (mg g DW ⁻¹)	
500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~70 (mg g DW ⁻¹)		
650 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	~63 (mg g DW ⁻¹)		
<i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047	115 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~2 (g L ⁻¹)	[44]
	185 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~3 (g L ⁻¹)	
	345 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~2.5 (g L ⁻¹)	
	460 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~12.5 (g L ⁻¹)	
	920 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~12 (g L ⁻¹)	
1840 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	~11 (g L ⁻¹)		
<i>Spirulina</i> sp.	10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.152 (g g ⁻¹)	[45]
	65 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.192 (g g ⁻¹)	
	120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	0.454 (g g ⁻¹)	

The irradiation time is another factor influencing EPS production by *P. cruentum* [39]. The maximum polysaccharide production in the analyzed range of light/dark cycle periods (24:0 h, 16:8 h, 18:6 h, 12:12 h, 10:14 h) was observed under the 18:6 h light/dark cycle. The beneficial impact of light: dark cycles on EPS productivity in comparison with the use of continuous illumination was reported in cultivation of *Botryococcus braunii* under high light intensity (2000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [20]. In turn, a study conducted by Lupi et al. (1994) indicated that the concentration of exopolysaccharide in *Botryococcus braunii* UC 58 decreased after introduction of a photoperiod (14 h light/10 h dark) in comparison with the use of continuous illumination [47]. In turn, a similar level of specific production of exopolysaccharide was found when the same phase of growth was considered. The light intensity was lower than that used by García-Cubero et al. (2018) [20], i.e., it was 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [47].

Another factor that has an impact on the EPS yield is the light wavelength. Results showed that blue light (400–500 nm) and red light (600–700 nm) increase extracellular polysaccharide production [40]. In a study on *Porphyridium purpureum*, the application of multi-chromatic LED wavelengths (red, green, and blue: 620–625, 520–525, and 465–468 nm, respectively) in the culture induced an increase in the EPS yield [40]. In turn, the use of a specific narrow light-emitting diode: red (620–625 nm), green (520–525 nm), and blue (465–468 nm) wavelengths did not cause differences in the EPS yield [48]. The results of a

study conducted by Medina-Cabrera et al. (2020) indicated white light as the most suitable type for EPS production in *Porphyridum* strains [49].

Studies on the effect of light intensity on EPS production demonstrate that this factor is associated with other environmental variables. Dayananda et al. (2007) tested the impact of continuous light and photoperiod (16 h light: 8 h dark) on EPS synthesis in two *B. braunii* strains, SAG 30.81 and LB 572, cultivated in shaken and non-shaken cultures on different growth media [50]. Cultures growing in the continuous light in the shaking variant were characterized by higher production of exopolysaccharide than cultures conducted with the photoperiod and continuous light without shaking [50]. These investigation results are in agreement with the findings reported by Cordoba-Castro et al. (2012), who showed an effect of light intensity, agitation, and carbon source availability on EPS production by *Scenedesmus obliquus* [51]. The highest concentration of EPS was observed at the highest of the three light intensity values applied in the study (80, 130, 180 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The increase in the light intensity from 80 to 180 contributed to an increase in the EPS concentration from 16.17 mg L^{-1} to 24 mg L^{-1} in the variant based on the use of the maximum values of the three variables tested [51]. The effect of the mixing time, light, and glycine on the production of EPS by *Chlorella vulgaris* was confirmed by Shen et al. (2015) [52]. The maximum levels of bound EPS production were 47.3 mg g^{-1} at 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity (mixing time 3 days, glycine concentration of 0.1 g L^{-1}) and 44.2 mg g^{-1} at 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity (mixing time 3 days, glycine concentration of 1 g L^{-1}) [52]. Light intensity is an important determinant of EPS synthesis by photoautotrophic microalgal cells. Most studies have shown enhanced EPS production by higher light intensity up to the light saturation point. The enhancement of EPS production in the conditions of increasing light intensity may be related to the protection of the cell against the harmful effects of the external factors. Results of investigations of the effect of light intensity also indicate that the EPS production cell response at high light intensity is species-specific. An accurate comparison is difficult, as different values are defined as high light intensity in different studies; additionally, investigations of EPS production often do not take into account the cellular biomass productivity.

3.2. Effect of Temperature

Temperature is one of the key parameters influencing metabolic processes in microalgal cells. Temperature can also have an impact on EPS production, and its optimal value for EPS synthesis is species-specific. In investigations of the effect of light intensity and temperature on EPS production by a thermophilic *Graesiella* strain, the highest EPS yield was obtained at the highest temperature tested, i.e., 40 °C, and at the lowest light intensity of 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table 3) [53]. As indicated by the authors, the increase in temperature was the main determinant of the higher EPS production, whereas no correlation was found between the amount of EPS and light intensity. The increase in the EPS synthesis by the thermophilic strain induced by the temperature rise from 20 to 40 °C is indicated as a process of protection of cellular metabolic pathways [53]. The effects of irradiance and temperature on EPS production were also shown by Kumar et al. 2017 in their study of *Dictyosphaerium chlorelloides* [36]. The maximum production of EPS was observed at a moderate temperature (25.7 °C) and light intensity of 50.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At the optimal temperature ensuring maximum EPS production, a decline in the specific growth rate of *D. chlorelloides* was observed [36]. Investigations of the production of soluble EPS by *B. braunii* showed the highest EPS productivity in the temperature range of 25–30 °C, which was consistent with the optimum range for algal growth [54].

Temperature seems to be an important factor in EPS production, and its optimum value for EPS synthesis is species-specific. To optimize EPS production, it is important to select an appropriate strain with a temperature range that is optimal for both algal growth and EPS production.

Table 3. Effect of temperature on EPS production.

Species	Temperature (°C)	EPS Production	References
<i>Graesiella</i> sp.	40	11.7 mg L ⁻¹ day ⁻¹	[53]
<i>Dictyosphaerium chilorellodes</i>	25.7	1075 mg L ⁻¹	[36]
<i>Botryococcus braunii</i> UC 58	25–30	4500–5500 mg L ⁻¹	[54]

3.3. Effect of Growth Phase

One of the determinants of the amount of EPS synthesized by algal cells is the growth phase. The largest amount of synthesized EPS was detected during the stationary phase or the death phase [28,55]. The impact of the growth phase (logarithmic and stationary phases) on the rate of polysaccharide release was also shown in studies of marine diatoms [56]. The end of the growth phase is often correlated with nitrate starvation conditions, which induce changes in the C/N ratio, and the beginning of extracellular polysaccharide production [29,57]. Li et al. (2020) reported a gradual increase in the EPS content during the logarithmic growth phase in *Porphyridium purpureum* [58].

3.4. Cultivation Systems

One of the strategies to optimize the production of exopolysaccharide is the two-stage cultivation system. In the first stage, algal cells are cultivated in optimum conditions to allow an increase in the biomass concentration. The second stage consists in application of a stress factor or introduction of changes in culture conditions to enhance the production of the target metabolite. Medina-Cabrera et al. (2020) showed that the two-stage cultivation system strategy enhanced the production of EPS in *Porphyridium* strains *P. sordidum* and *P. purpureum* [49]. The use of semi-continuous culture was found to lead to an increase in EPS productivity in comparison with batch cultures of *Porphyridium marinum* [59].

Another solution to increase the production of EPS may be provided by the co-culture system. In the study conducted by Angelis et al. (2012), microalgae (*Chlorella* sp.) and cyanobacteria (*Spirulina* sp.) were cultivated with *Basidiomycetes* [60]. Algal and fungal substrate mixed at a 1:1 ratio was the growth medium in this method. The results showed that the co-culture increased and accelerated EPS synthesis, in contrast to monocultures. Each of the strains used in those experiments was able to produce EPS, but the polymer obtained from the co-culture was a mix of both EPS synthesized by the microalgae and fungi separately, with predominance of fungal EPS. The presence of fungal strains is a stress factor for algae [60]. As underlined by the authors, the increased EPS production in the co-culture conditions may be associated with nutrient competition, response to toxins, growth factors released by other microorganisms, or increased amounts of carbon dioxide and vitamins [13,61,62]. Co-cultures of microalgae and other microorganisms could be a promising and useful biotechnological tool to enhance production of numerous valuable products.

4. Optimization of the Growth Medium for Production of Extracellular Polymeric Substances

4.1. Nitrogen

Investigations on the optimization of the medium to increase EPS production highlight the role of sodium nitrate. As shown by Bafana (2013), NaNO₃ and CaCl₂ significantly increased EPS production by *Chlamydomonas reinhardtii* [63]. A pH value of 7 was the optimum value for EPS production. The addition of EDTA exerted a negative effect on this process [18]. Similarly, other studies conducted on the red microalga *Porphyridium* sp. with the use of potassium nitrate, ammonium hydrocarbonate, and ammonium nitrate resulted in the highest productivity of EPS in the presence of sodium nitrate [64]. Among the different sources of nitrogen (potassium nitrate, urea, and ammonium carbonate), the highest production of EPS was detected in the presence of nitrate and the lowest yield was obtained upon the application of urea, where the pH value was approximately 5 in

the presence of urea and ammonium carbonate and 7 for potassium nitrate [47]. This may suggest that the pH value of the growth medium determined by the nitrogen source has some influence on the EPS synthesis.

One of the factors contributing to an increase in EPS synthesis by microalgal cells is the nitrogen nutrient limitation. Overproduction of EPS in nitrogen-deficient conditions (BG11 without NaNO_3 ; 2% CO_2) was confirmed by Sasaki et al. (2020) in investigations of microalgae *Parachlorella* sp. BX1.5 [65]. A large amount of acidic EPS was produced in such conditions. The effect of the reduced nitrogen content in the medium on higher EPS production by *B. braunii* was confirmed by Bayona and Garcés (2014) [66]. Lupi et al. (1994) compared the impact of three concentrations of potassium nitrate (0.5, 2, and 8 mM) on EPS synthesis in *B. braunii* [47]. The highest EPS-specific productivity (g g^{-1} dry biomass) was obtained in the presence of 2 mM KNO_3 . Cultures with 0.5 mM addition contained a similar amount of EPS, but the production ceased after 20 days due to nitrogen depletion (while both other cultures were cultivated up to day 36). The lowest specific production of EPS was detected in a culture supplied with 8 mM KNO_3 . However, the highest EPS yield (g L^{-1}) at the end of the culture time was noted in the presence of 8 mM KNO_3 [47]. The nitrogen (nitrate) limitation increases specific EPS production. However, it also induces a strong decrease in the biomass concentration; thus, the yield of EPS may be much lower. In turn, it has been shown that high N concentrations in wastewater result in high protein content in EPS [67].

In addition to N availability, the carbon-to-nitrogen ratio was found to improve EPS production. An increased C/N ratio (in nitrogen limitation conditions) in the medium was reported to promote EPS release by *Porphyridium purpureum* [58]. From the tested 0.96 (low), 3.84 (medium), and 12.82 (high) ratios, the most effective productivity at the end of culture time (day 20) was estimated at 3.84 [58]. However, the high C/N ratio accelerated the EPS synthesis, and the amount of secreted polysaccharides on day 12 was approximately 40% higher than at the medium ratio. In turn, the EPS productivity at the low C/N ratio was significantly lower than in the other variants, but strongly increased in the last days of cultivation and finally reached 1.25 g L^{-1} . As observed by the authors, a high C/N ratio may affect protein degradation. The resulting new nitrogen source can be used for EPS and lipid synthesis [58]. Supplementation with glycerol to increase the C/N ratio under nitrogen limitation additionally increased the EPS yield [60]. In turn, a decline in the C/N ratio led to changes in the EPS composition. In investigations of mixed microalgae (with predominance of *Scenedesmus* sp.), a fivefold increase in the NO_3 concentration in the municipal effluent resulted in reduction of C/N, from 41.4 to 2.9, which contributed to an increase in the protein content in bound EPS [64]. Data shown by Razaghi et al. (2014) indicate that the optimal N/P ratio for carbohydrate synthesis is less than 4.9:1, whereas biomass production requires a 35:1–50:1 ratio [68]. The results are similar to those obtained by Soanen et al. (2016), who achieved optimal EPS production at an N/P ratio of 3.97 [59]. In turn, Nur et al. (2019) showed that, in the case of *Phaeodactylum tricomutum*, the N/P molar ratio had no significant influence on EPS production in contrast to the nitrogen source and temperature [69].

4.2. Phosphorus

The influence of phosphate limitation on the growth and EPS synthesis by the diatom *Cylindrotheca fusiformis* was studied by Magaletti et al. (2004) [70]. The results indicate that a low phosphate concentration has an impact not only on the increase in total EPS synthesis but also on the composition of the dissolved carbohydrates [70]. A comparison of the influence of one-stage and two-stage phosphorus depletion on EPS synthesis by cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Microcystis aeruginosa* demonstrated that the two-stage phosphorus depletion resulted in an approximately threefold higher EPS yield in comparison to the one-stage depletion in the case of both species [71]. Similar to nitrogen depletion, phosphorus starvation causes inhibition of culture growth; hence, two-stage cultivation contributes to higher EPS yields [71]. As shown in a study of marine

diatoms, under nutrient limitation (variations in the nitrogen/phosphorous/silicon ratio), the process of extracellular polysaccharide excretion is species-specific and none of the limiting factors influences EPS release in the same way [56].

4.3. Carbon

An important determinant of EPS release by cells is the carbon metabolic mode [13]. In mixotrophic and heterotrophic growth conditions, carbon contained in the medium contributes to increased accumulation of intracellular polysaccharides and soluble extracellular polysaccharides [29]. This was confirmed by investigations conducted by Zhang et al. (2019) demonstrating higher EPS production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic conditions, i.e., 364.3 mg L⁻¹ (BG11 with glucose 5 g L⁻¹), in comparison with EPS amounts produced in autotrophic conditions: 235 mg L⁻¹ [72]. Cheirslip et al. (2016) reported that *Chlorella* sp. showed higher EPS production upon an increase in the glucose concentration in the growth medium from 0.2% to 1% (w/v) [73]. In the semi-continuous cultivation system, the amount of EPS in each cycle ranged from approximately 1.25 g L⁻¹ in the first three cycles to 1.45 g L⁻¹ in the fourth and fifth cycles (on days 5 and 6, respectively). Higher EPS production in heterotrophic (0.5 g L⁻¹ EPS) vs. autotrophic conditions (0.39 g L⁻¹ EPS) has been reported [73]. Investigations of the impact of the photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic cultivation modes on EPS production by *Neochloris oleabundans* demonstrated that only mixotrophic cultivation (with 20% lactose and CO₂ from air as a carbon source) ensured production of large quantities of EPS: 5 g L⁻¹ [74]. No EPS were detected in the same mixotrophic conditions with glucose as a carbon source; likewise in the heterotrophic and photoautotrophic conditions (5% CO₂). The authors highlight the role of lactose as a precursor for the biosynthesis of EPS [74]. In turn, in the case of *Nostoc flagelliforme* cultured in heterotrophic conditions with glucose, sucrose, and fructose as a carbon source, the highest levels of EPS production were found in the glucose-supplemented variant [75].

In turn, in the study conducted by Přibyl and Cepák (2019), EPS production by *Dictyosphaerium chlorelloides* did not differ between the mixotrophic and photoautotrophic modes [76]. The highest level of algal organic matter (which is closely related to EPS) produced by *Scenedesmus obliquus* in photoautotrophic conditions was reported by Choi et al. (2019) [77].

Carbon sources were found to exert an effect on EPS production by *Chlorella* sp. [78]. Under 0.1% salinity, *Chlorella* sp. was found to produce the largest amounts of EPS in cultures with ethanol and glycine as a carbon source. In turn, at a higher salinity level, i.e., 3.5%, the concentration of EPS increased, and the highest EPS concentration (31 mg/L) was achieved in glycine-supplemented cultures [78]. Fabregas et al. (1999) cultivated red microalga *P. cruteum* using 15% of potato extract as an organic carbon source [79]. The mixotrophic growth yielded 0.33 g L⁻¹ EPS, whereas the EPS level in autotrophic conditions reached 0.13 g L⁻¹ [79]. Literature provides few reports on mixotrophy and heterotrophy in microalgal cultivation. Nevertheless, the data cited above show that supplementation with an organic carbon source may be a promising factor increasing EPS productivity.

In the photoautotrophic mode, microalgal cells utilize carbon dioxide as a carbon source. At low carbon dioxide concentrations, the carbon-concentrating mechanism leads to concentration of inorganic carbon from the environment to optimize carbon acquisition [13]. A study conducted by Clement-Larosiere et al. (2014) demonstrated that an increase in the CO₂ concentration from 2% to 13% was accompanied by a 1.4-fold increase in the total exopolymer excretion by *Chlorella vulgaris*, but the EPS concentration per cell was not significantly altered [41]. This may have been related to the limited availability of light in the culture with higher carbon availability (13%), which led to limitation of further carbon fixation and EPS secretion [41]. In their study, Li et al. (2016) highlighted the synergistic effect of CO₂ and temperature on EPS productivity in the green alga *Scenedesmus acuminatus*, the diatom *Cyclotella meneghiniana*, and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [38]. The amount of extracellular carbohydrates in the *S. acuminatus* culture increased with the rising temperature and CO₂. In the case of *C. meneghiniana* and *M. aeruginosa*, the level of

extracellular carbohydrates increased at the higher temperature values [38]. The secretion of exopolysaccharides by microalgal cells in excess carbon dioxide conditions may be a result of overflow metabolism, which is defined as the excess binding of carbon dioxide in relation to growth requirements [80].

4.4. Wastewater

Investigations of microalgal EPS of *Chlorella* sp. in wastewater cultivation conditions demonstrate the effect of higher initial concentrations of nutrients and/or organic substrate on higher production of soluble EPS [81]. The increase in their concentration was accompanied by a decline in the concentration of carbohydrates and an increase in the protein concentration in bound EPS [81]. Wang and Park (2015) cultured *Micractinium* sp. and *Chlorella* sp. on secondary effluent mixed with primary effluent [82]. The use of wastewater for the algal culture resulted in relatively higher protein content in EPS [82].

4.5. Metals

As reported in literature, environmental stresses lead to increased production of extracellular polysaccharides, while there are few reports on the effect of metals on EPS production [83]. Chen et al. (2015) studied the influence of cadmium stress on the growth rate and EPS production in *C. vulgaris* [84]. In the culture supplied with $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, the amount of soluble and bounded EPS was higher in comparison to the control [84]. Mona and Kaushik (2015) examined the effect of chromium and cobalt on EPS production by *Nostoc linckia* [85]. The results showed that the presence of the tested metals significantly increased the synthesis of EPS, i.e., about 5 times by cobalt and 4 times by chromium. The highest EPS concentration was achieved at 40 mg L^{-1} of Co^{2+} and Cr^{6+} [85]. It has been found that a cyanobacterial *Synechocystis* sp. strain produces increased amounts of EPS when exposed to chromium, cadmium, and combination of the metals (chromium + cadmium) applied at 35 ppm [83].

4.6. Effect of pH

EPS synthesis in unicellular algae begins in the stationary phase when pH of the culture medium rises to 8–9. This is a natural change resulting from culture aging. De Philippis et al. (1991) did not observe an effect of more alkaline pH compared with the physiological value [86]. However, in investigations of the effect of different nitrogen sources on EPS production, the pH value of a growth medium with urea and ammonium carbonate addition was about 5, whereas pH 7 was determined in the presence of potassium nitrate. The results showed that EPS synthesis was more effective in a culture with KNO_3 addition. Differences in the EPS yield may be connected with pH of the growth medium rather than the nitrogen source [54].

5. Flocculation

Due to the large amount of acidic functional groups and long-chain molecules, EPS can be used as natural flocculants [6]. Nowadays, microalgae are mostly cultured for biomass production. As reported by Aljuboori et al. (2016), the addition of ZnCl_2 to EPS-producing *Scenedesmus quadricauda* suspension is sufficient to induce flocculation and thus biomass harvesting [87]. Nowadays, the use of microalgal EPS is limited to high-value products, e.g., pharmaceuticals and cosmetics. This is caused by the high cost of algal biomass harvesting and the low concentration of EPS in the growth medium [8]. The development of an effective and low-cost method for EPS-dependent flocculation may potentially reduce these costs and increase the use of microalgal EPS in industry. Flocculation is one of the methods of separation of the solid fraction from liquid suspensions. The process consists in association of small particles in the colloid solution to form larger aggregates with high molecular weight, allowing the particles to settle [88]. The flocculation process is applied in algal harvesting [89], wastewater treatment [84], paper manufacture, clarification of

sugarcane juice in the sugar industry [90,91], metal binding [92], and removal of color from textile wastewaters [93].

Substances used as flocculants must have specific properties, e.g., molecular weight, type, and ionic strength. Large amounts and small sizes of colloidal particles as well as their low distribution increase flocculation efficiency [91]. Synthetic polymers (polyacrylamide) cause contamination of harvested biomass with metals, metal hydroxides, and non-biodegradable polymers. Additionally, polyacrylamide-based flocculants may be contaminated by acrylamide monomers, which exhibit neurotoxicity and carcinogenicity [94]. This excludes further processing in food, feed, or other applications requiring contamination-free biomass [95,96].

In turn, since they are non-toxic, biodegradable, and inexpensive, natural polymers are the most environmentally friendly group of this type of compound [91]. Natural polymers used in the flocculation process comprise EPS, chitosan, cellulose, starch, and natural gums with their derivatives. They are characterized by high molecular weight, fixed molecular constitution, and mostly long chains. One of the prerequisites for flocculation of microalgal biomass to occur is the positive charge of the polymer (since the surface charge of algal cells is negative); however, it is not common in the environment [91,95]. Inorganic salts (ferric chloride, aluminium sulphate) are coagulants and may induce polymer flocculation [95].

5.1. Extracellular Polymeric Substances in Flocculation

Extracellular polymeric substances have high molecular weight, long chains, and numerous functional groups that are crucial for effective flocculating activity [6]. EPS are mainly negatively charged due to the dominance of carboxyl and hydroxyl residues, mostly from uronic acids and proteins [97]. Badireddy et al. (2010) showed the role of O-acetylated and acidic carbohydrates and the secondary structure of proteins, which are changing during the exponential and stationary phases, in bioflocculation of activated sludge microorganisms [28]. An essential issue is the use of an appropriate biopolymer concentration to achieve flocculation. As suggested by Liu et al. (2015), an insufficient concentration of the bioflocculant is ineffective in the flocculation process, as the polymer chains cannot bind to all cells [98]. In turn, an excessive dose of the negatively charged biopolymer increases repulsion between particles and results in greater stability of the suspension [98].

The flocculating properties are associated with the type of EPS. It has been reported that TB-EPS have much higher flocculating abilities than LB-EPS [17]. A relatively low amount of LB-EPS should be provided to trigger the flocculation process; otherwise, the free polymer may impede cell aggregation. Another explanation is based on the DLVO theory. According to this theory, TB-EPS have no interaction energy and the LB-EPS fraction is the determinant of the flocculating abilities [99].

The process of flocculation with EPS depends on the presence of metal ions, which partly neutralize the negative charge of the cell surface and facilitate polymer adsorption. Divalent cations may also cross-link polymers attached to different cells [100]. The most common and effective are Ca^{2+} [101], Mg^{2+} [98], and Zn^{2+} [87,102]. The addition of ZnCl_2 was reported to increase the flocculating efficiency of EPS derived from *Scenedemus quadricauda* from 26.5% to 82.7% [87]. In contrast, Liu et al. (2014) observed no influence of Mg^{2+} and Ca^{2+} ions on flocculation of *Chlorella zofingiensis* and *C. vulgaris* [103]. Therefore, the main mechanism involved in EPS bioflocculation is cation bridging [99]. The pH value is another factor influencing the flocculating activity. Biopolymers differ in the dissociation of functional groups at different pH values. This determines the number and type of dissociated groups and the effectiveness of polymer adsorption [104]. The thermal properties of the biopolymer require adjustment of temperature. It has been found that EPS mostly consisting of sugars have high thermal stability; however, when the content of proteins increases, their stability decreases [100]. For example, Surendhiran and Vijay (2013) observed the highest bioflocculation efficiency of *Chlorella salina* at 30.63 °C (tested

temperature range: 20–40 °C) with a microbial flocculant [105]. There are few reports on self-flocculating microalgae synthesizing EPS with flocculating abilities [16,17,87,106].

5.2. Mechanism of EPS-Dependent Flocculation

Aggregate formation in microalgal culture is difficult due to the small size and low density of cells [107]. Additionally, most functional groups on the cell surface are anionic (carboxyl, hydroxyl, and phosphate); hence, even if the cells are relatively close to each other, the electrostatic repulsive forces keep them dispersed [108].

The mechanism of flocculation depends on different factors, including the molecular weight, concentration, and type of the flocculant, pH, ionic strength, and the size of particles in the solution [89,91]. To initiate this process in algal culture, it is necessary to neutralize the negatively charged cell surface [109]. There are several ways of formation of flocculants: double layer compression, charge neutralization (patching and sweeping), and bridging [88].

5.2.1. Double Layer Compression (DLVO Theory)

Particles in colloid suspensions are coated with an electrical double layer. This structure consists of two layers. The first (stern) layer surrounding a negatively charged cell is created by cations, which adhere to the particle strongly. In the second layer (diffuse), the concentration of ions decreases as the distance from the molecule increases (Figure 1). Hence, the force of the interaction with the opposite ion decreases and it can diffuse to the suspension. Finally, the charge equalizes with the environment. The potential on the outer side of the diffusion layer is called zeta potential (ζ). It determines repulsion between particles and sustains the dispersion of the suspension [110]. According to the DLVO theory, which explains the double layer compression, the total energy is the sum of the electrical double layer (repulsion) and Lifshitz-van der Waals energy (attraction). Attractive forces depend on the ionic strength of the suspension. When the suspension has high ionic strength, the thickness of the double layer is reduced. For aggregation to occur, the force of attraction must be higher than repulsion. This can be achieved by addition of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , or Fe^{2+} cations to the suspension with low ionic strength [99,110]. This type of flocculation can occur, for example, as a consequence of mixing seawater with freshwater, which have high and low ionic strength, respectively [88]. In algal cells there are LB-EPS and TB-EPS, which may be considered as stern and diffuse layers [95].

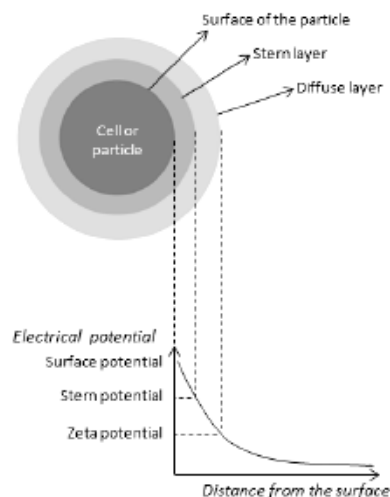


Figure 1. Scheme of double layer compression (DLVO theory).

5.2.2. Charge Neutralization

Negatively charged cells are surrounded by a double layer, which keeps them dispersed. In the presence of positively charged polymers or hydrolyzing metal salts (coagulants), the zeta potential changes to values close to zero. This reduces repulsion forces and facilitates interactions between cells. The effectiveness of this type of flocculation depends on the charge density of the polymer. The amount of the flocculant used should be quite precisely suited to the biomass concentration and charge [111]. One of the types of flocculation involving charge neutralization is the electrostatic patch model (Figure 2).

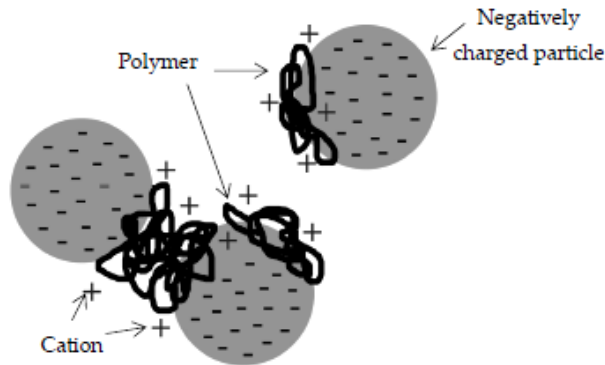


Figure 2. Mechanism of patching flocculation.

Polymers with high charge density attach strongly and locally to the cell surface, thereby forming positively charged patches, which are tightly fitted to the surface and can match other cells. In this way, aggregates are gradually becoming larger and heavier and finally sediment. Short-chain polymers are often engaged in this mechanism [89].

5.2.3. Bridging

The mechanism of linking particles by the adsorption polymer to the cell surface involves long-chain EPS. The functional groups of the polymer attach to the surface locally in several areas to form specific structures: loops, trains, and free tails (Figure 3) [88,112].

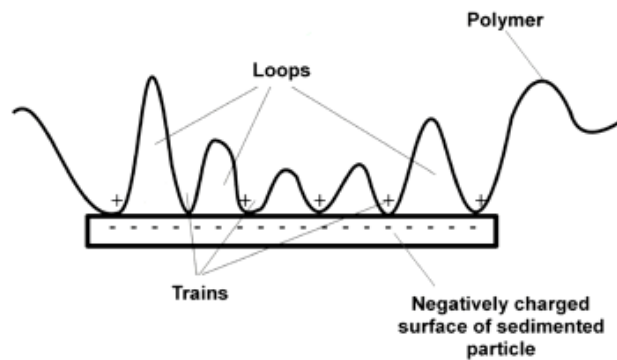


Figure 3. Polymer adsorption on surface of solid particle.

The affinity of a single train may not be very strong, as there are more sites of interactions. Long-chain non-branched polymers are preferred for effective bridging, as this increases the possibility of interactions with more than one particle in a dispersed suspension (Figure 4) [88].

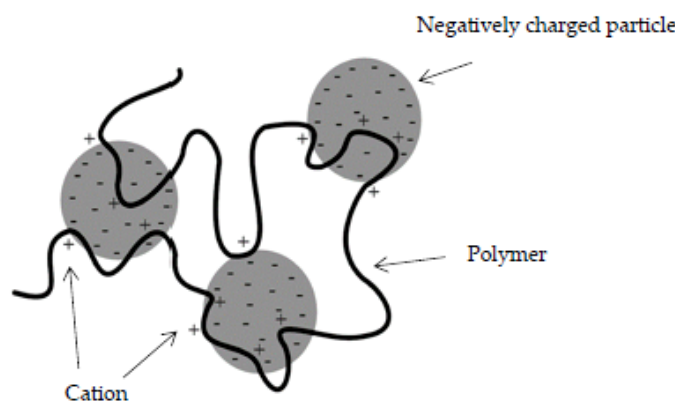


Figure 4. Mechanism of bridging flocculation.

With time, the distance between cells decreases and the same polymer can aggregate more particles using the free part of the chains or loops, resulting in an increase in the flocculant size and weight. In addition, aggregates formed in this way are more stable than others. The bridging mechanism occurs in the presence of non-ionic polymers with high molecular weight and low charge density polyelectrolytes with high molecular mass [88,99,112].

Bridging can be also an effect of the cation bridging mechanism. Divalent cations bind to the anionic groups of the biopolymer surrounding microorganisms and cross-link the matrix. This kind of flocculation depends on the ratio of monovalent to divalent cations, which should be equal to or less than 2 [110,113]. Bridging with divalent cations is non-specific, whereas these cations bind to the polymer in a specific way and may form a regular structure, according to the alginate theory.

5.3. Bioflocculation

Bioflocculation is a method in which other microorganisms (microalgae, bacteria, fungi) or their products (extracellular polymeric substances) are used to induce particle aggregation [114]. In contrast to biopolymers, which are costly, bioflocculation can be used for large-scale applications [115]. The first report on microalgal bioflocculation was presented by Schuessler [116]. The investigations demonstrated potential flocculating properties of EPS [116]. *Chlorophyta* microalgae and their flocculation efficiency are presented in Table 4. Most of them are effective in the first 30 min. Flocculation efficiency (FE) [%] is the amount of settled algal biomass as a result of autoflocculation [16,27,106,116–118], EPS addition [17,119], the use of autoflocculating algae to harvest non-flocculating species [120], or the presence of $ZnCl_2$ [87]. Aljuboori et al. (2016) investigated the role of EPS surrounding *Scenedesmus quadricauda* cells in flocculation [87]. It was shown that EPS-free cells were unable to flocculate in the presence of a coagulant ($ZnCl_2$) [87]. In turn, the use of untreated cells resulted in flocculation of 80–85% of non-flocculating *C. vulgaris* CNW-11 and *S. obliquus* FSP-3 biomass [17]. Similar results were observed for self-flocculating *Desmodesmus* sp. PW1. In this case, the addition of *Desmodesmus* sp. PW1 to non-flocculating microalgae *C. vulgaris*, *S. obliquus*, and *N. oceanica* resulted in an increase in flocculation efficiency from 10.5%, 12.3%, and 9.1% to 80.5%, 89.4%, and 54.7%, respectively [118].

Table 4. Culture conditions and flocculation efficiency (FE) of Chlorophyta.

Species	Culture Conditions	FE [%] *	Settling Time [min]	Source
<i>Chlorella vulgaris</i> JSC-7	BBM medium, 28 °C, 11/13 h light/dark cycle, light intensity 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	76.3	30	[16]
<i>Chlorococcum</i> sp. GD	Simulated secondary effluent, 25 °C, 14/10 h light/dark cycle, light intensity 3000 lux	84.4 47.7	180 30	[106]
<i>Scenedesmus obliquus</i> AS-6-1	DM medium, 28 °C, 14/10 h light/dark cycle, light intensity 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	80–85	30	[17]
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	BG-11 medium, 26 °C, continuous illumination, light intensity 10,000 lux, aeration min^{-1} , initial pH 7.1, ZnCl_2 , photobioreactor	86.7	30	[87]
<i>Neochloris texensis</i>	Freshwater medium, 25 °C, aeration 3 L min^{-1} with 2% CO_2 , light intensity 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,	55	20	[120]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Marine medium containing NaCl, 25 °C, aeration 3 L min^{-1} with 2% CO_2 , light intensity 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 100 rpm	72	20	[120]
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Freshwater, 25 °C, aeration 3 L min^{-1} with 2% CO_2 , 16/8 h light/dark, light intensity 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 100 rpm	50	20	[120]
<i>Chlorococcum</i> sp.	MA medium, pH 6.8, 30 °C, 14/10 h light/dark cycle, 3 weeks	75	10	[119]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	F medium, 20 °C, 12/12 h light/dark cycle, light intensity 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 8 days, aeration with 400 ppm CO_2 , 110 rpm (flocculating pH 10.4 at the end)	90	10	[117]
<i>Scenedesmus rubescens</i> SX	Synthetic wastewater, pH 7.8, 25 °C, 14/10 h light/dark cycle, light intensity 55.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 160 rpm, 8 days	81–90.9	180	[27]
<i>Desmodesmus</i> sp. PW1	Piggery wastewater, 25 °C, 150 rpm, continuous illumination	~90	150	[118]

* FE was calculated with the following formula $\text{FE} [\%] = (A - B)/A \cdot 100\%$, where A is initial suspension density and B is suspension density after flocculation.

Bioflocculation can be carried out by other microorganisms, e.g., fungi [115], bacteria [121], and autoflocculating microalgae [89]. Flocculating microorganisms can be cultured together with the main species (as co-culture) or separately and can be added just before harvesting [95].

Fungal hyphae are positively charged and may act as a cationic flocculant entrapping microalgal cells. Additionally, the mycelium has a self-pelletization capability enhancing microalgal flocculation [115]. Addition of *Aspergillus niger* [122] and *Aspergillus oryzae* [123] to *C. vulgaris* resulted in more than 90% and 93% efficiency of flocculation, respectively. Bacteria are known for production of large quantities of EPS in a short time, which is desirable for large-scale applications. Bacterial bioflocculation has been well examined and shown to be very effective [100,124]. Ndikubwimana et al. (2014) reported that a flocculant from *Bacillus licheniformis* harvested 99% of *Desmodesmus* sp. biomass [125]. The polymer consisted of D- and L- glutamic acid (poly-gamma-glutamic acid). The optimal flocculation efficiency was achieved at pH 2–3.3 after 4 h. Moreover, the bioflocculant was more effective at a higher biomass density (0.5–1.5 g L^{-1}). The most effective flocculant concentration was 2.5 mL L^{-1} , as it harvested 99.5% of *Desmodesmus* sp. biomass at a

concentration of 0.5 g L⁻¹ [125]. Similar results were obtained after addition of poly-gamma-glutamic acid derived from *Bacillus subtilis* to *Chlorella salina* culture [125]. In turn, the effectiveness of *Shinella albus* EPS in *C. vulgaris* biomass harvesting was estimated at 85.6% [121]. The bioflocculant from *S. albus* was the most effective (>80%) in *C. vulgaris* biomass harvesting at a temperature of 60–80 °C. The activity decreased only at 121 °C to values < 70%. Flocculating agents contain some proteins, but due to their high thermal stability point, they are not engaged in flocculation. Moreover, neutral and alkaline pH values are more favorable for this process. However, the flocculation efficiency sharply decreased after dialysis from almost 80% in the control to 4.9%. This indicates that *S. albus* produce low molecular weight agents with high flocculation potential [121]. A limitation of the application of bacterial bioflocculation for algal biomass harvesting is the necessity of supplying organic carbon for bacterial growth, which increases costs.

One of the most promising methods for bioflocculation is the use of autoflocculating microalgae to induce flocculation of non-flocculating species. Salim et al. (2011) used autoflocculating microalgae *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus obliquus*, and *Tetraselmis suecica* to achieve flocculation of non-flocculating *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans* [89].

5.4. Autoflocculation

The process of autoflocculation is a result of interactions between cells and depends on such cell characteristics as the cell size (large cells settle more easily), morphology, cell wall composition, culture aging, cell density, and changes in the pH value during culture growth [107,126]. The autoflocculation process is influenced by the substrate pH value. The ratio between CO₂ and metal ions keeps pH stable. Growing predominance of calcium and magnesium ions in culture broth decreases repulsion between cells, and cations start binding to negatively charged functional groups. Alkaline pH promotes generation of magnesium and calcium hydroxide and calcium phosphate precipitates, which contributes to formation of larger aggregates [108].

Microalgae producing flocculating EPS may spontaneously form aggregates using these biopolymers. In this case, the flocculation efficiency and the time of harvesting may be induced by changing culture conditions, including irradiance and temperature [126]. To date, several species of green microalgae have been reported as bioflocculant producers. These include *Chlorococcum* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Scenedesmus quadricauda* [16,17,87,106].

Both pH-induced and EPS-assisted autoflocculation occur at the end of the exponential phase or in the stationary phase when the flocculating factors have been accumulated [126]. The process of autoflocculation has not been elucidated to date, and it is necessary to know the mechanism so that the process can run in a controlled manner [108,109].

6. Applications of Extracellular Polymeric Substances in Biomass Harvesting and Heavy Metal Removal

One of the main applications of flocculating EPS is algal biomass harvesting. This process carried out with conventional techniques is extremely costly. It can constitute even 30% of the total biomass production costs. Centrifugation is the most effective method for harvesting within a short time, but it is the most expensive technique [127]. The sedimentation process is a more cost-efficient method; however, it is characterized by low efficiency. Biomass can also be harvested in the processes of filtration and flocculation. Filtration is not an appropriate solution when the biomass should not be contaminated with particles from the filter (cellulose or diatomaceous earth) [127]. The most economically satisfying solutions are autoflocculation or bioflocculation through co-culture with spontaneously flocculating algal species or the use of EPS. However, co-culture cannot be employed when pure culture has to be obtained. The most promising method for algal biomass separation that causes no additional contamination is the use of EPS or other biopolymeric substances. The level of self-flocculation of *C. vulgaris* JSC-7 was 76.3% or 85% when it was added to non-flocculating algae [16]. *S. obliquus* AS-6-1 EPS was reported to harvest 88% of non-

flocculating *S. obliquus* FSP-3 [17]. EPS play an important role in sludge dewatering [128], flocculant stability and removal of heavy metals [92,129].

The ability of EPS to bind metals can be used for removal of heavy metals from wastewater and soil. The capability of metal binding by exopolysaccharides is related to the content of acidic groups (-COOH) derived from galacturonic and glucuronic acid as well as proteins. Other functional groups engaged in metal binding are -NH, -OH, -CO-, phosphate, pyruvate, succinyl [130], and sulfate [131]. It is also suggested that mannose and rhamnose play an important role in metal complexing [6,130]. The interactions between EPS and metal ions include electrostatic attraction or covalent bonding [130]. The capability of copper binding by *Scenedesmus acuminatus* was examined by Lombardi et al. (2005) [130]. This microalga produces EPS that are a strong copper-complexing ligand. The authors have found that the results are comparable with those obtained for Cyanobacteria, which are known to have better metal complexing abilities than Chlorophyta. The polymer contains 76% of mannose and 12% of uronic acids, which are crucial for the ability to bind metals by EPS [130]. In earlier studies, Lombardi and Vieira (1999) showed the copper and lead complexing ability by EPS produced by *Kirchneriella aperta*, which contained 19% of acidic sugars [132]. Kaplan et al. (1987) observed the metal binding capacity of *Chlorella stigmatophora* EPS at the level of 0.215, 0.310, 0.03, and 1 mg g⁻¹ in the case of Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Cu²⁺, respectively [131]. EPS extracted from *C. vulgaris* accumulated 0.13 µg mg⁻¹ of silver ions, which was 69% of the total metal concentration in the tested system [133]. EPS-coated *Chlorella pyrenoidosa* cells adsorbed 36.7% and 22.8% higher amounts of As(III) and As(V), respectively, than cells without EPS [134]. Similar results were obtained by Xie et al. (2020) for *C. vulgaris*. EPS-coated cells adsorbed about twofold higher amounts of cadmium ions than EPS-free cells [135]. The authors also investigated the role of proteins in the process of cadmium adsorption. The results showed that deproteinized EPS reduced adsorption capacity by 70% [135]. In other studies, Freire-Nordi et al. (2005) found the highest manganese sorption (8.52 mg g⁻¹) by EPS in cyanobacteria *Anabaena spiroides*. This polymer has a high content of mannose (which is one of the three main sugars) and 8% of uronic acid [129].

7. Conclusions

Currently, the interest in algal biomass is mainly focused on its commercial use, whereas algal post-culture media, which are a source of extracellular polymeric substances released by algal cells, are unused. The analysis of the studies presented in this review shows that the physical and chemical culture conditions are largely involved in increasing productivity and in the properties of microalgal extracellular polymeric substances. Additionally, many studies have reported that EPS production is influenced simultaneously by several factors and the cell response is also species-specific. Given the induction of EPS by the presence of metals and their sorption properties, EPS can be applied in wastewater management. Bioflocculants, such as microalgal extracellular polymeric substances, significantly increase the safety of harvested biomass, as they are biodegradable but not toxic. Moreover, they enrich biomass or can be extracted in further processing and used in accordance with their properties. Research on extracellular polymeric substances is important for application thereof in the processes of wastewater bio-management and microalgal harvesting.

Author Contributions: Writing—original draft: W.B., I.K.; writing—review and editing: W.B., I.K.; conceptualization I.K.; supervision: I.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Magierek, E.; Krzemińska, I. Effect of stress conditions on improvement of lipid and carbohydrate accumulation under photoautotrophic cultivation of Chlorophyta. *Phycologia* **2018**, *57*, 601–618. [\[CrossRef\]](#)
- Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Michaud, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1159–1179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Naveed, S.; Li, C.; Lu, X.; Chen, S.; Yin, B.; Zhang, C.; Ge, Y. Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, 1769–1802. [\[CrossRef\]](#)
- Shi, Y.; Huang, J.; Zeng, G.; Gu, Y.; Chen, Y.; Hu, Y.; Tang, B.; Zhou, J.; Yang, Y.; Shi, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere* **2017**, *180*, 396–411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Casillo, A.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Corsaro, M.M. Exopolysaccharides from marine and marine thermophilic bacteria: Structures, properties, ecological roles and application. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Xiao, R.; Zheng, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1225–1244. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Paniagua-Michel, J.; Olmos-Soto, J.; Morales-Guerrero, E.R. Algal and microbial exopolysaccharides: New insights as biosurfactants and bioemulsifiers. *Adv. Food Nutr. Res.* **2014**, *73*, 221–257.
- Gaignard, C.; Laroche, C.; Pierre, G.; Dubessay, P.; Delattre, C.; Gardarin, C.; Gourvil, P.; Probert, I.; Dubuffet, A.; Michaud, P. Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers. *Algal Res.* **2019**, *44*, 101711. [\[CrossRef\]](#)
- Li, Y.; Xin, M.; Fan, S.; Ma, J.; Liu, K.; Yu, F. Variation in extracellular polymeric substances from *Enterobacter* sp. and their Pb²⁺ adsorption behaviors. *ACS Omega* **2021**, *6*, 9617–9628.
- Pan, M.; Zhu, L.; Chen, L.; Qiu, Y.; Wang, J. Detection techniques for extracellular polymeric substances in biofilms: A review. *BioResources* **2016**, *11*, 8092–8115.
- Wang, Q.; Pang, W.; Mao, Y.; Ge, S.; Yu, H.; Dai, C.; Zhao, M. Changes of extracellular polymeric substance (EPS) during *Microcystis aeruginosa* blooms at different levels of nutrients in a eutrophic microcosmic simulation device. *Pol. J. Environ. Stud.* **2020**, *29*, 349–360. [\[CrossRef\]](#)
- Pierre, G.; Delattre, C.; Dubessay, P.; Jubeau, S.; Vialleix, C.; Cadoret, J.P.; Probert, I.; Michaud, P. What is in store for EPS microalgae in the next decade? *Molecules* **2019**, *24*, 4296. [\[CrossRef\]](#)
- Rossi, E.; de Philippis, R. Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. In *The Physiology of Microalgae*; Borowitzka, M., Beardall, J., Raven, J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; Volume 6, pp. 565–590.
- Halaj, M.; Paulovičová, E.; Paulovičová, L.; Jantová, S.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Extracellular biopolymers produced by Dictyosphaerium family—Chemical and immunomodulative properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 1254–1263. [\[CrossRef\]](#)
- Villarcorte, L.O.; Ekowai, Y.; Neu, T.R.; Kleijn, J.M.; Winters, H.; Amy, G.; Schippers, J.C.; Kennedy, M.D. Characterisation of algal organic matter produced by bloom-forming marine and freshwater algae. *Water Res.* **2015**, *73*, 216–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Alam, M.A.; Wan, C.; Guo, S.-L.; Zhao, X.-Q.; Huang, Z.-Y.; Yang, Y.-L.; Chang, J.-S.; Bai, F.-W. Characterization of the flocculating agent from the spontaneously flocculating microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *118*, 29–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Guo, S.-L.; Zhao, X.-Q.; Wan, C.; Huang, Z.-Y.; Yang, Y.-L.; Alam, M.A.; Ho, S.-H.; Bai, F.-W.; Chang, J.-S. Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest. *Bioresour. Technol.* **2013**, *145*, 285–289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mishra, A.; Jha, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3382–3386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gouveia, J.D.; Moers, A.; Griekspoor, Y.; van den Broek, L.A.M.; Springer, J.; Sijtsma, L.; Sipkema, D.; Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J. Effect of removal of bacteria on the biomass and extracellular carbohydrate productivity of *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 3453–3463. [\[CrossRef\]](#)
- García-Cubero, R.; Cabanelas, I.T.D.; Sijtsma, L.; Kleinegris, D.M.M.; Barbosa, M.J. Production of exopolysaccharide by *Botryococcus braunii* CCALA 778 under laboratory simulated Mediterranean climate conditions. *Algal Res.* **2018**, *29*, 330–336. [\[CrossRef\]](#)
- Bardlay, W.R.; Lewin, R.A. Microalgal polysaccharide production for the conditioning of agricultural soils. *Plant Soil* **1985**, *88*, 159–169. [\[CrossRef\]](#)
- Hu, C.; Liu, Y.; Paulsen, B.S.; Petersen, D.; Klavenes, D. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 33–42. [\[CrossRef\]](#)
- Halaj, M.; Paulovičová, E.; Paulovičová, L.; Jantová, S.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Biopolymer of *Dictyosphaerium chlorelloides*—Chemical characterization and biological effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *113*, 1248–1257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goo, B.G.; Baek, G.; Choi, D.J.; Park, Y.I.; Synytsya, A.; Bleha, R.; Seong, D.H.; Lee, C.-G.; Park, J.K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 343–350. [\[PubMed\]](#)
- Trabelsi, L.; Chaieb, O.; Mnari, A.; Abid-Essafi, S.; Aleya, L. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Li, Y.; Wang, C.; Liu, H.; Su, J.; Lan, C.Q.; Zhong, M.; Hu, X. Production, isolation and bioactive estimation of extracellular polysaccharides of green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Algal Res.* **2020**, *48*, 101883. [CrossRef]
27. Lv, J.; Guo, B.; Feng, J.; Liu, Q.; Nan, F.; Liu, X.; Xie, S. Integration of wastewater treatment and flocculation for harvesting biomass for lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Scenedesmus rubescens* SX. *J. Clean. Prod.* **2019**, *240*, 118211. [CrossRef]
28. Badireddy, A.R.; Chellam, S.; Gassman, P.L.; Engelhard, M.H.; Lea, A.S.; Rosso, K.M. Role of extracellular polymeric substances in bioflocculation of activated sludge microorganisms under glucose-controlled conditions. *Water Res.* **2010**, *44*, 4505–4516. [CrossRef]
29. Pignolet, O.; Jubeau, S.; Vaca-García, C.; Michaud, P. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 781–796. [CrossRef]
30. Cybulska, J.; Halaj, M.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Nanostructure features of microalgae biopolymer. *Starch/Stärke* **2016**, *68*, 629–636. [CrossRef]
31. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633. [CrossRef]
32. Nguyen, T.D.P.; Vo, C.T.; Nguyen-Sy, T.; Tran, T.N.T.; Le, T.V.A.; Chiu, C.-Y.; Sankaran, R.; Show, P.L. Utilization of microalgae for self-regulation of extracellular polymeric substance production. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *159*, 107616. [CrossRef]
33. Zhu, C.; Chen, C.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Yang, J.; Song, L.; Yang, S. Bioflocculant produced by *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 1245–1251. [CrossRef]
34. Liu, G.; Miao, X. Switching cultivation for enhancing biomass and lipid production with extracellular polymeric substance as co-products in *Heynigia riparia* SX01. *Bioresour. Technol.* **2017**, *227*, 214–220. [CrossRef] [PubMed]
35. Paulsen, B.S.; Aslaksen, T.; Freire-Nordi, C.S.; Vieira, A.A. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **1998**, *34*, 638–641. [CrossRef]
36. Kumar, D.; Kvidrová, J.; Kaštánek, P.; Lukavský, J. The green alga *Dictyosphaerium chlorelloides* biomass and polysaccharides production determined using cultivation in crossed gradients of temperature and light. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 1030–1038. [CrossRef] [PubMed]
37. Krzemińska, I.; Nosalewicz, A.; Reszczyńska, E.; Pawlik-Skowrońska, B. Enhanced light-induced biosynthesis of fatty acids suitable for biodiesel production by the yellow-green alga *Eustigmatos magnus*. *Energies* **2020**, *13*, 6098. [CrossRef]
38. Li, W.; Xu, X.; Fujibayashi, M.; Niu, Q.; Tanaka, N.; Nishimura, O. Response of microalgae to elevated CO₂ and temperature: Impact of climate change on freshwater ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 19847–19860. [CrossRef] [PubMed]
39. Liqin, S.; Wang, C.; Lei, S. Effects of light regime on extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* cultured in flat plate photobioreactors. In Proceedings of the 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Shanghai, China, 16–18 May 2008; pp. 1488–1491. [CrossRef]
40. You, T.; Barnett, S.M. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *19*, 251–258. [CrossRef]
41. Clément-Larosière, B.; Lopes, F.; Gonçalves, A.; Taidi, B.; Benedetti, M.; Minier, M.; Pareau, D. Carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO₂ concentrations and light intensities. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14*, 509–519. [CrossRef]
42. Pereira, S.; Zille, A.; Micheletti, E.; Moradas-Ferreira, P.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 917–941. [CrossRef]
43. Gris, B.; Sforza, E.; Morosinotto, T.; Bertucco, A.; La Rocca, N. Influence of light and temperature on growth and high-value molecules productivity from *Cyanobacterium aponinum*. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *29*, 1781–1790. [CrossRef]
44. Moreno, J.; Vargas, M.A.; Olivares, H.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* **1998**, *60*, 175–182. [CrossRef]
45. Chentir, I.; Hamdi, M.; Doumandji, A.; HadjSadok, A.; Ouada, H.B.; Nasri, M.; Jridi, M. Enhancement of extracellular polymeric substances (EPS) production in *Spirulina (Arthrospira)* sp. by two-step cultivation process and partial characterization of their polysaccharidic moiety. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105 Pt 2*, 1412–1420. [CrossRef] [PubMed]
46. Ge, H.; Xia, L.; Zhou, X.; Zhang, D.; Hu, C. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *J. Microbiol.* **2014**, *52*, 179–183. [CrossRef] [PubMed]
47. Lupi, F.M.; Fernandes, H.M.L.; Tomé, M.M.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzym. Microb. Technol.* **1994**, *16*, 546–550. [CrossRef]
48. Coward, T.; Fuentes-Grünwald, C.; Silkina, A.; Oatley-Radcliffe, D.L.; Llewellyn, G.; Lovitt, R.W. Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Bioresour. Technol.* **2016**, *221*, 607–615. [CrossRef]
49. Medina-Cabrera, E.V.; Rühmann, B.; Schmid, J.; Sieber, V. Optimization of growth and EPS production in two *Porphyridium* strains. *Bioresour. Technol. Rep.* **2020**, *11*, 100486. [CrossRef]
50. Dayanada, C.; Sarada, R.; Usharani, M.; shamala, T.; Ravishankar, G. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioenergy* **2007**, *31*, 87–93. [CrossRef]
51. Córdoba-Castro, N.M.; Montenegro-Jaramillo, A.M.; Pireto, R.E.; González-Mariño, G.E. Analysis of the effect of the interaction among three processing variables for the production of exopolysaccharides in the microalgae *Scenedesmus obliquus* (UTEX 393). *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* **2012**, *19*, 60–69.

52. Shen, Y.; Fan, Z.; Chen, C.; Xu, X. An auto-flocculation strategy for *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 75–80. [CrossRef]
53. Mezhoud, N.; Zili, F.; Bouzidi, N.; Helaoui, F.; Ammar, J.; Ouada, H.B. The effects of temperature and light intensity on growth, reproduction and EPS synthesis of a thermophilic strain related to the genus *Graesiella*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2014**, *37*, 2271–2280. [CrossRef] [PubMed]
54. Lupi, F.M.; Fernandes, H.M.L.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M. Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii* Kütz. UC 58. *J. Appl. Phycol.* **1991**, *3*, 35–42. [CrossRef]
55. Raungsomboon, S.; Chidthaisong, A.; Bunnag, B.; Inthorn, D.; Harvey, N.W. Production, composition and Pb²⁺ adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa gelatinosa*. *Water Res.* **2006**, *4*, 3759–3766. [CrossRef] [PubMed]
56. Penna, A.; Berluti, S.; Penna, N.; Magnani, M. Influence of nutrient ratios on the in vitro extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *J. Plankton Res.* **1999**, *21*, 1681–1690. [CrossRef]
57. Villay, A.; Laroche, C.; Roriz, D.; El Alaoui, H.; Delbac, F.; Michaud, P. Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 732–735. [CrossRef] [PubMed]
58. Li, S.; Ji, L.; Chen, C.; Zhao, S.; Sun, M.; Gao, Z.; Wu, H.; Fan, J. Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioresour. Technol.* **2020**, *309*, 123362. [CrossRef]
59. Soanen, N.; Da Silva, E.; Gardarin, C.; Michaud, P.; Laroche, C. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 231–238. [CrossRef] [PubMed]
60. Angelis, S.; Novak, A.C.; Sydney, E.B.; Socol, V.T.; Carvalho, J.C.; Pandey, A.; Nosedá, M.D.; Tholozan, J.L.; Lorquin, J.; Socol, C.R. Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: Process preliminary optimization and partial characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 1092–1106. [CrossRef] [PubMed]
61. Bell, W.H. Bacterial utilization of algal extracellular products. 3. The specificity of algal-bacterial interaction. *Limnol. Oceanogr.* **1983**, *28*, 1131–1143. [CrossRef]
62. Fernandes, H.L.; Tomé, M.M.; Lupi, F.M.; Fialho, A.M.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M. Biosynthesis of high concentrations of an exopolysaccharide during the cultivation of the microalga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11*, 433–436. [CrossRef]
63. Bafana, A. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95*, 746–752. [CrossRef] [PubMed]
64. Arad, S.; Friedman, O.; Rotem, A. Effect of nitrogen on polysaccharide production in a *Porphyridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2411–2414. [CrossRef]
65. Sasaki, M.; Takagi, A.; Ota, S.; Kawano, S.; Sasaki, S.; Asayama, M. Coproduction of lipids and extracellular polysaccharides from the novel green alga *Parachlorella* sp. BX1.5 depending on cultivation conditions. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *25*, e00392.
66. Bayona, K.C.D.; Garcés, L.A. Effect of different media on exopolysaccharide and biomass production by the green microalga *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 2087–2095. [CrossRef]
67. Wang, M.; Kuo-Dahab, W.C.; Dolan, S.; Park, C. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **2014**, *154*, 131–137. [CrossRef] [PubMed]
68. Razaghi, A.; Godhe, A.; Albers, E. Effect of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruteum*. *Cent. Eur. J. Biol.* **2014**, *9*, 156–162.
69. Nur, M.M.A.; Swaminathan, M.K.; Boelen, P.; Buma, A.G.J. Sulfated exopolysaccharide production and nutrient removal by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* growing on palm oil mill effluent. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 2335–2348. [CrossRef]
70. Magaletti, E.; Urbani, R.; Sist, P.; Ferrari, C.R.; Cicero, A.M. Abundance and chemical characterization of extracellular carbohydrates released by the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* under N- and P-limitation. *Eur. J. Phycol.* **2004**, *39*, 133–142. [CrossRef]
71. Deb, D.; Mallick, N.; Bhadoria, P.B.S. Analytical studies on carbohydrates of two cyanobacterial species for enhanced bioethanol production along with poly-β-hydroxybutyrate, C-phycoerythrin, sodium copper chlorophyllin, and exopolysaccharides as co-products. *J. Clean. Prod.* **2019**, *221*, 695–709. [CrossRef]
72. Zhang, J.; Liu, L.; Chen, F. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *134*, 976–983. [CrossRef] [PubMed]
73. Cheirsilp, B.; Mandik, Y.L.; Prasertsan, P. Evaluation of optimal conditions for cultivation of marine *Chlorella* sp. as potential sources of lipids, exopolymers and pigments. *Aquac. Int.* **2016**, *24*, 313–326. [CrossRef]
74. Wu, N.; Li, Y.; Lan, C.Q. Production and rheological studies of microalgal extracellular biopolymer from lactose using the green alga *Neochloris oleoabundans*. *J. Polym. Environ.* **2011**, *19*, 935–942. [CrossRef]
75. Ding, Z.; Jia, S.; Han, P.; Yuan, N.; Tan, N. Effects of carbon sources on growth and extracellular polysaccharide production of *Nostoc flagelliforme* under heterotrophic high-cell-density fed-batch cultures. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 1017–1021. [CrossRef]
76. Přibyl, P.; Cepák, V. Screening for heterotrophy in microalgae of various taxonomic positions and potential of mixotrophy for production of high-value compounds. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1555–1564. [CrossRef]
77. Choi, W.J.; Chae, A.N.; Song, K.G.; Park, J.; Lee, B.C. Effect of trophic conditions on microalga growth, nutrient removal, algal organic matter, and energy storage products in *Scenedesmus (Acutodesmus) obliquus* KGE-17 cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2019**, *42*, 1225–1234. [CrossRef]





78. Vo, H.N.P.; Ngo, H.H.; Guo, W.; Liu, Y.; Chang, S.W.; Nguyen, D.D.; Zhang, X.; Liang, H.; Xue, S. Selective carbon sources and salinities enhance enzymes and extracellular polymeric substances extrusion of *Chlorella* sp. for potential co-metabolism. *Bioresour. Technol.* **2020**, *303*, 122877. [CrossRef]
79. Fabergas, J.; Garcia, D.; Morales, E.D.; Lamela, T.; Oteño, A. Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *Porphyridium cruentum*. *Cryptogam. Algal.* **1999**, *20*, 89–94. [CrossRef]
80. Staats, N.; Stal, L.J.; Mur, L.R. Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: Effects of nutrient conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2000**, *249*, 13–27. [CrossRef]
81. Ge, S.; Champagne, P. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. *Water Res.* **2016**, *88*, 604–612. [CrossRef] [PubMed]
82. Wang, M.; Park, C. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass Bioenergy* **2015**, *80*, 30–37. [CrossRef]
83. Ozturk, S.; Aslim, B.; Suludere, Z.; Tan, S. Metal removal of cyanobacterial exopolysaccharides by uronic acid content and monosaccharide composition. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 265–271. [CrossRef] [PubMed]
84. Chen, B.; Li, E.; Liu, N.; Ge, F.; Xiao, H.; Yang, Y. Role of extracellular polymeric substances from *Chlorella vulgaris* in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium. *Bioresour. Technol.* **2015**, *190*, 299–306. [CrossRef] [PubMed]
85. Mona, S.; Kaushik, A. Chromium and cobalt sequestration using exopolysaccharides produced by freshwater cyanobacterium *Nostoc linckia*. *Ecol. Eng.* **2015**, *82*, 121–125. [CrossRef]
86. De Philippis, R.; Sili, C.; Tassinato, G.; Vincenzini, M.; Materassi, R. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulate*. *Bioresour. Technol.* **1991**, *38*, 101–104. [CrossRef]
87. Aljuboori, A.H.R.; Uemura, Y.; Thanh, N.T. Flocculation and mechanism of self-flocculating lipid producer microalga *Scenedesmus quadricauda* for biomass harvesting. *Biomass Bioenergy* **2016**, *93*, 38–42. [CrossRef]
88. Sharma, B.R.; Dhuldhoya, N.C.; Merchant, U.C. Flocculants—An ecofriendly approach. *J. Polym. Environ.* **2006**, *14*, 195–202. [CrossRef]
89. Salim, S.; Bosma, R.; Vermeu, M.H.; Wijffels, R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 849–855. [CrossRef]
90. Deng, S.B.; Bai, R.B.; Hu, X.M.; Luo, Q. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 588–593. [CrossRef] [PubMed]
91. Suresha, P.R.; Badiger, M.V. Flocculation of kaolin from aqueous suspension using low dosages of acrylamide-based cationic flocculants. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *136*, 47286. [CrossRef]
92. Dobrowolski, R.; Szczech, A.; Czemińska, M.; Jarosz-Wikolazka, A. Studies of cadmium(II), lead(II), nickel(II), cobalt(II) and chromium(VI) sorption on extracellular polymeric substances produced by *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus rhodochrous*. *Bioresour. Technol.* **2017**, *225*, 113–120. [CrossRef]
93. More, T.T.; Yadav, J.S.S.; Yan, S.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *J. Environ. Manag.* **2014**, *144*, 1–25. [CrossRef]
94. Tepe, Y.; Çebi, A. Acrylamide in environmental water: A review on sources, exposure, and public health risks. *Expo Health* **2019**, *11*, 3–12. [CrossRef]
95. Vandamme, D.; Foubert, I.; Muylaert, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 233–239. [CrossRef] [PubMed]
96. Wyatt, N.B.; Gloe, L.M.; Brady, P.V.; Hewson, J.C.; Grillet, A.M.; Hankins, M.G.; Pohl, P.I. Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 493–501. [CrossRef] [PubMed]
97. Guo, H.; Hong, C.; Zheng, B.; Lu, F.; Jiang, D.; Qin, W. Bioflocculants' production in a biomass-degrading bacterium using untreated corn stover as carbon source and use of bioflocculants for microalgae harvest. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 306. [CrossRef] [PubMed]
98. Liu, W.; Zhao, C.; Jiang, J.; Lu, Q.; Hao, Y.; Wang, L.; Liu, C. Bioflocculant production from untreated corn stover using *Cellulosimicrobium cellulans* L804 isolate and its application to harvesting microalgae. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 170. [CrossRef] [PubMed]
99. Lai, H.; Fang, H.; Huang, L.; He, G.; Reible, D. A review on sediment bioflocculation: Dynamics, influencing factors and modeling. *Sci. Total Environ.* **2018**, *642*, 1184–1200. [CrossRef]
100. Salehizadeh, H.; Shojaosadati, S.A. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 371–385. [CrossRef]
101. Tang, W.; Song, L.; Li, D.; Qiao, J.; Zhao, T.; Zhao, H. Production, characterization, and flocculation mechanism of cation independent, pH tolerant, and thermally stable bioflocculant from *Enterobacter* sp. ETH-2. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114591. [CrossRef] [PubMed]
102. Ndikumbwimana, T.; Zeng, X.; Murwanashyaka, T.; Manirafasha, E.; He, N.; Shao, W.; Lu, Y. Harvesting of freshwater microalgae with microbial bioflocculant: A pilot-scale study. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 47. [CrossRef] [PubMed]
103. Liu, J.; Tao, Y.; Wua, J.; Zhu, Y.; Gao, B.; Tang, Y.; Li, A.; Zhang, C.; Zhang, Y. Effective flocculation of target microalgae with self-flocculating microalgae induced by pH decrease. *Bioresour. Technol.* **2014**, *167*, 367–375. [CrossRef]
104. Czemińska, M.; Szczech, A.; Hołysz, L.; Wiaterek, A.; Jarosz-Wikolazka, A. Characterisation of exopolymer R-202 isolated from *Rhodococcus rhodochrous* and its flocculating properties. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 21–33. [CrossRef]

105. Surendhiran, D.; Vijay, M. Influence of bioflocculation parameters on harvesting *Chlorella salina* and its optimization using response surface methodology. *J. Environ. Chem. Eng.* **2013**, *1*, 1051–1056. [CrossRef]
106. Lv, J.; Guo, J.; Feng, J.; Liu, Q.; Xie, S. A comparative study on flocculating ability and growth potential of two microalgae in simulated secondary effluent. *Bioresour. Technol.* **2016**, *205*, 111–117. [CrossRef]
107. Augustine, A.; Tanwar, A.; Tremblay, R.; Kumar, S. Flocculation processes optimization for reuse of culture medium without pH neutralization. *Algal Res.* **2019**, *39*, 101437. [CrossRef]
108. Brady, P.V.; Pohl, P.L.; Hewson, J.C. A coordination chemistry model of algal autoflocculation. *Algal Res.* **2014**, *5*, 226–230. [CrossRef]
109. Salim, S.; Kosterink, N.R.; Tchetskoua Wacka, N.D.; Vermuë, M.H.; Wijffels, R.H. Mechanism behind autoflocculation of unicellular green microalgae *Ettlia texensis*. *J. Biotechnol.* **2014**, *174*, 34–38. [CrossRef] [PubMed]
110. Sobock, D.C.; Higgins, M.J. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Res.* **2002**, *36*, 527–528. [CrossRef]
111. Gregory, J.; Duan, J. Hydrolyzing metal salts as coagulants. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 2017–2026. [CrossRef]
112. Bolto, B.; Gregory, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Res.* **2007**, *41*, 2301–2324. [CrossRef] [PubMed]
113. Higgins, M.J.; Tom, L.A.; Sobock, D.C. Case study I: Application of the divalent cation bridging theory to improve bioflocculation properties and industrial activated sludge system performance—direct addition of divalent cations. *Water Environ. Res.* **2004**, *76*, 344–352. [CrossRef] [PubMed]
114. Alam, M.A.; Vandamme, D.; Chun, W.; Zhao, X.; Foubert, I.; Wang, Z.; Muylaert, K.; Yuan, Z. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2016**, *15*, 573–583. [CrossRef]
115. Ummalyma, S.B.; Gnansounou, E.; Sukumaran, R.K.; Sindhu, R.; Pandey, A.; Sahoo, D. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae—An overview. *Bioresour. Technol.* **2017**, *242*, 227–235. [CrossRef] [PubMed]
116. Lavoie, A.; de la Noüe, J. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewaters: Auto- or bioflocculation? *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 852–859. [CrossRef] [PubMed]
117. Tran, N.-A.T.; Seymour, J.R.; Siboni, N.; Evenhuis, C.R.; Tamburic, B. Photosynthetic carbon uptake induces autoflocculation of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Algal Res.* **2017**, *26*, 302–311. [CrossRef]
118. Chen, Z.; Shao, S.; He, Y.; Luo, Q.; Zheng, M.; Zheng, M.; Chen, B.; Wang, M. Nutrients removal from piggery wastewater coupled to lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Desmodesmus* sp. PW1. *Bioresour. Technol.* **2020**, *302*, 122806. [CrossRef] [PubMed]
119. Ummalyma, S.B.; Mathew, A.K.; Pandey, A.; Sukumaran, R.K. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 216–221. [CrossRef]
120. Salim, S.; Vermuë, M.H.; Wijffels, R.H. Ratio between autoflocculating and target microalgae affects the energy-efficient harvesting by bio-flocculation. *Bioresour. Technol.* **2012**, *118*, 49–55. [CrossRef]
121. Li, Y.; Xu, Y.; Liu, L.; Jiang, X.; Zhang, K.; Zheng, T.; Wang, H. First evidence of bioflocculant from *Shinella albus* with flocculation activity on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresour. Technol.* **2016**, *218*, 807–815. [CrossRef]
122. Li, Y.; Xu, Y.; Liu, L.; Li, P.; Yan, Y.; Chen, T.; Zheng, T.; Wang, H. Flocculation mechanism of *Aspergillus niger* on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass. *Algal Res.* **2017**, *25*, 402–412. [CrossRef]
123. Zhou, W.; Min, M.; Hu, B.; Ma, X.; Liu, Y.; Wang, Q.; Shi, J.; Chen, P.; Ruan, R. Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *107*, 158–165. [CrossRef]
124. Shahadat, M.; Teng, T.T.; Rafatullah, M.; Shaikh, A.A.; Sreekrishnan, T.R. Bacterial bioflocculants: A review of recent advances and perspectives. *Chem. Eng. J.* **2017**, *328*, 1139–1152. [CrossRef]
125. Ndikumbwimana, T.; Zheng, X.; Liu, Y.; Chang, J.S.; Lu, Y. Harvesting of microalgae *Desmodesmus* sp. F51 by bioflocculation with bacterial bioflocculant. *Algal Res.* **2014**, *6*, 186–193. [CrossRef]
126. González-Fernández, C.; Ballesteros, M. Microalgae autoflocculation: An alternative to high-energy consuming harvesting methods. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 991–999. [CrossRef]
127. Molina Grima, E.; Belarbi, E.-H.; Acien Fernandez, F.G.; Robles Medina, A.; Chisti, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.* **2003**, *20*, 491–515. [CrossRef]
128. Zhang, W.; Cao, B.; Wang, D.; Ma, T.; Xia, T.; Yu, D. Influence of wastewater sludge treatment using combined peroxyacetic acid oxidation and inorganic coagulants re-flocculation on characteristics of extracellular polymeric substances (EPS). *Water Res.* **2016**, *88*, 728–739. [CrossRef] [PubMed]
129. Freire-Nordi, C.S.; Vieira, A.A.H.; Nascimento, O.R. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: An EPR study. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2215–2224. [CrossRef]
130. Lombardi, A.T.; Hidalgo, T.M.R.; Vieira, A.A.H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* **2005**, *60*, 453–459. [CrossRef]
131. Kaplan, D.; Christiaen, D.; Arad, S. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 2953–2956. [CrossRef]
132. Lombardi, A.T.; Vieira, A.A.H. Lead- and copper-complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Phycologia* **1999**, *38*, 283–288. [CrossRef]

133. Zheng, S.; Zhou, Q.; Chen, C.; Yang, F.; Cai, Z.; Li, D.; Geng, Q.; Feng, Y.; Wang, H. Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris*. *Sci. Total Environ.* **2019**, *660*, 1182–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zhang, J.; Zhou, F.; Liu, Y.; Huang, F.; Zhang, C. Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Sci. Total Environ.* **2020**, *704*, 135368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Xie, Q.; Liu, N.; Lin, D.; Qu, R.; Zhou, Q.; Ge, F. The complexation with proteins in extracellular polymeric substances alleviates the toxicity of Cd (II) to *Chlorella vulgaris*. *Environ. Pollut.* **2020**, *263*, 114102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Soluble Extracellular Polymeric Substances Produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical Characterization and Assessment of Their Cadmium and Lead Sorption Abilities

Wioleta Ciempiel ¹, Magdalena Czemińska ², Monika Szymańska-Chargot ¹, Artur Zdunek ¹, Dariusz Wiącek ¹, Anna Jarosz-Wilkolazka ² and Izabela Krzemińska ^{1,*}

¹ Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

² Department of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

* Correspondence: i.krzeminska@ipan.lublin.pl; Tel: +48-(81)-744-50-61

Abstract: In the present study, the potential of lead and cadmium removal by the extracellular polymeric substances (EPS) produced from *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris* were investigated. Carbohydrates were the dominant components of EPS from both analyzed species. The contents of reducing sugars, uronic acids, and amino acids were higher in EPS synthesized by *C. vulgaris* than in EPS from *P. kessleri*. The analysis of the monosaccharide composition showed the presence of rhamnose, mannose and galactose in the EPS obtained from both species. The ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) analyses demonstrated that *C. vulgaris* EPS showed higher sorption capacity in comparison to *P. kessleri* EPS. The sorption capacity of *C. vulgaris* EPS increased with the increase in the amount of metal ions. *P. kessleri* EPS had a maximum sorption capacity in the presence of 100 mg/L of metal ions. The FTIR analysis demonstrated that the carboxyl, hydroxyl, and carbonyl groups of EPS play a key role in the interactions with metal ions. The present study showed *C. vulgaris* EPS can be used as a biosorbent in bioremediation processes due to its biochemical composition, the presence of significant amounts of negatively charged uronic acids, and higher sorption capacity.

Keywords: metal removal; heavy metals; ICP-OES; microalgae



Citation: Ciempiel, W.; Czemińska, M.; Szymańska-Chargot, M.; Zdunek, A.; Wiącek, D.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Krzemińska, I. Soluble Extracellular Polymeric Substances Produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical Characterization and Assessment of Their Cadmium and Lead Sorption Abilities. *Molecules* **2022**, *27*, 7153. <https://doi.org/10.3390/molecules27217153>

Academic Editor: M. Gilles Mailhot

Received: 21 September 2022

Accepted: 20 October 2022

Published: 22 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Environmental pollution is an effect of progressive industrialization and urbanization. Heavy metals constitute one of the most serious threats among pollutants. Most of the physicochemical methods used for the removal of heavy metals from water environments are characterized by such disadvantages as low efficiency or the generation of sludge [1]. Therefore, the possibility of using microorganisms and their properties in the processes of the removal of harmful substances from polluted environments has been arousing increasing interest. These processes can take place via extracellular biosorption, i.e., binding heavy metal ions by extracellular polysaccharides.

Given their ability to produce extracellular polymeric substances (EPS), microalgae can be used for the biosorption-based purification of aquatic environments. EPS are one of the metabolites synthesized by unicellular algae and secreted by the cell into the surrounding environment. They play an important role in the protection of algal cells against heavy metal toxicity. EPS are complex molecules consisting of carbohydrates, proteins, uronic acids, nucleic acids, and other substances [2].

Lead is a heavy metal and is particularly dangerous to the nervous system, as it penetrates through the blood–brain barrier and competes with Ca and Zn binding sites [3].

Pb accumulated by plants affects their morphology and physiology, e.g., seed germination, seedling growth, cell reproduction, chlorophyll production, and transpiration [4]. Lead, as well as cadmium, has no function in living organisms. Environmental Cd pollution is caused by its industrial application and the use of phosphate fertilizers. Cadmium poisoning may result in multi-organ damage, including the liver, kidneys, adrenal glands, and the hemopoetic system. The toxicity of Cd is related to its affinity to the S-S and -SH groups of proteins and therefore for enzymes and transporter systems. Exposure to this metal leads to the activation of oxidative stress, which results in damage to DNA, protein, and lipids [5].

Chlorella vulgaris and *Parachlorella kessleri* are unicellular freshwater green algae representing the family Chlorellaceae from the class Trebouxiophyceae [6,7]. Due to their high growth rate, high lipid productivity, and low tendency to aggregate, these species are considered as a suitable candidate for industrial application [7]. The properties of EPS depend largely on their chemical composition. Lombardi et al. (2005) indicated that the carboxyl groups of EPS are mostly involved in copper complexation [8,9]. Additionally, proteins were found to be important in metal sorption by EPS produced by *C. vulgaris* (Cd and Ag sorption) and *Chlorella pyrenoidosa* (As sorption) [10–12]. However, these studies did not determine the content of uronic acids, amino acids, and amino sugars, which also have functional groups that can interact with metal ions. The exopolysaccharide synthesized by *P. kessleri* has not been studied to date in terms of its sorption properties. The knowledge of the sorption properties of EPS from microalgae is important, as the process of heavy metal binding by EPS reduces their toxicity to organisms in the environment. The conventional methods employed in the bioremediation of heavy metals, e.g., chemical precipitation, floatation, or electrochemical methods, often result in secondary pollution [13]. Due to the presence of many functional groups, environmentally friendly microalgal exopolysaccharides are able to bind heavy metals [2].

The aim of this study was to determine the biochemical characteristics of the soluble fraction of extracellular polymeric substances synthesized by unicellular microalgae, *P. kessleri* and *C. vulgaris*. Additionally, the cadmium and lead sorption ability of the obtained EPS was studied. For this purpose, the amount of metal ions bound to the EPS was determined using ICP-OES. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to identify functional groups involved in the EPS–metal interactions.

2. Results and Discussion

2.1. EPS Production

The results of the biomass yield as well as the yield and specific productivity of soluble EPS are shown in Table 1. There were no statistically significant differences in the biomass yield between *P. kessleri* and *C. vulgaris*. *P. kessleri* was found to be a more effective EPS producer than *C. vulgaris*. The EPS yield and EPS specific productivity in the case of *P. kessleri* were 16.6% and 21.3%, respectively, higher in comparison to *C. vulgaris*. This allows the formulation of a hypothesis that *P. kessleri* cells are more efficient in EPS synthesis than *C. vulgaris* cells. The results of the present study show that the EPS yield was lower than that reported in the literature [14]. The low productivity determined in the present study may be associated with the separation of the soluble fraction of total EPS. Additionally, the EPS synthesis was analyzed in optimal conditions for cell growth without the application of stress factors, which increase EPS production. The level of EPS production depends on the species and cultivation conditions [2]. The yield of extracellular polymeric substances is also influenced by the extraction and purification methods. In the case of alcohol precipitation, the EPS yield is influenced by the temperature and polarity of alcohol [15]. Since different methods for EPS isolation are used, it is difficult to compare the EPS yields obtained in different studies.

Table 1. The biomass yield and the productivity and biochemical composition of EPS synthesized by *P. kessleri* and *C. vulgaris*. The superscript letters (a, b) in the table indicate statistical significance of the presented results analyzed by ANOVA Tukey's test ($p \geq 0.05$) (EPS = 1 mg/mL; $n = 3$; \pm SD).

	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>
Biomass yield [g/L]	0.77 \pm 0.08 ^a	0.86 \pm 0.09 ^a
EPS yield [mg/L]	12.49 \pm 1.21 ^b	10.42 \pm 1.20 ^a
EPS specific productivity [mg/g DW]	16.18 \pm 1.09 ^b	12.73 \pm 2.09 ^a
Compound [μ g/mg EPS]		
Carbohydrates ¹	635.0 \pm 15.3 ^a	577.3 \pm 19.34 ^b
Proteins ¹	5.5 \pm 0.41 ^b	7.5 \pm 0.15 ^a
Reducing sugars ²	158.2 \pm 7.30 ^a	206.4 \pm 4.17 ^b
Uronic acids ²	123.0 \pm 2.46 ^a	134.1 \pm 5.02 ^b
Amino acids ²	14.4 \pm 0.84 ^a	35.4 \pm 1.32 ^b
Amino sugars ²	4.2 \pm 0.20 ^a	4.4 \pm 0.32 ^a

¹ Non-hydrolyzed EPS; ² Hydrolyzed EPS.

2.2. Chemical Composition of EPS

The chemical composition of EPS (Table 1) shows that both studied EPS consist mainly of carbohydrates, which accounted for 57% and 63% of the samples derived from *C. vulgaris* and *P. kessleri*, respectively. The total carbohydrate content was higher in the polymer synthesized by *P. kessleri* (635 μ g/mg) compared to EPS produced by *C. vulgaris* (577.3 μ g/mg), which indicate that the isolated EPS are extracellular polysaccharides. These results are comparable to those obtained by Capek (2019) for *C. vulgaris* EPS, where the sugar content in EPS was 67% [6]. In this study, the amount of protein in the examined exopolysaccharides was 0.55% and 0.75%, which is lower than the values reported by the literature data [14]. The results showed statistically significant differences in the content of reducing sugars, uronic acids, and amino acids between the EPS of *C. vulgaris* and *P. kessleri*. The hydrolyzed EPS of both analyzed species consisted mainly of reducing sugars and uronic acids. The analysis showed higher content of reducing sugars, uronic acids and amino acids in the EPS synthesized by *C. vulgaris*. The same levels of amino sugars were detected in both samples (Table 1).

The content of uronic acids in this study are in agreement with the results obtained for *C. vulgaris* EPS by Ogawa (1999), who reported the level of 14% of glucuronic acid [16]. In turn, El-Naggar (2020) found that the content of uronic acid in polysaccharides extracted from *C. vulgaris* was 17% [17]. Other investigations have demonstrated that the content of uronic acids in microalgal EPS may vary. Differences in the uronic acid content in EPS, ranging from 6.0% to 14% were observed for microalgal strains from the family *Dictyosphaerium* [18]. It has been reported that the content of uronic acids is one of crucial factors for the ability of EPS to bind metal ions [8]. As suggested by Lombardi et al. (2005), the carboxylic groups of uronic acids are primarily responsible for binding copper by EPS derived from *Scenedesmus acuminatus* [8]. In the present study, a small amount of amino sugars was detected (0.42 and 0.38% in *P. kessleri* and *C. vulgaris* EPS, respectively). Although amino sugars are present mostly in cyanobacterial EPS [19], glucosamine has been detected also in EPS from *Dictyosphaerium chlorelloides* and *D. tetrachlorum* (0.8–1.6% wt.) [18].

The monosaccharide composition determined using TLC analysis showed the presence of rhamnose, xylose, mannose and galactose in EPS synthesized by *P. kessleri*, while rhamnose, mannose and galactose were detected in the EPS of *C. vulgaris* (Table 2).

The analysis of TLC plates showed that rhamnose was the dominant sugar in the studied EPS synthesized by *P. kessleri* and *C. vulgaris*. The results correspond to those reported by Ogawa (1999) and Capek et al. (2020) [6,16]. As demonstrated by El-Naggar et al. (2020), *C. vulgaris* polysaccharides are composed of glucose and rhamnose as the dominant EPS components with lower contents of fructose, maltose, lactose, and arabinose [17].

The differences in the sugar composition of exopolysaccharides, even those derived from the same species, indicate that a number of factors, e.g., culture conditions or the type of nutrition, can influence the structure of EPS. The composition of the EPS monosaccharide is important for elucidation of the EPS functions and application potential [15].

Table 2. Monosaccharide composition of EPS synthesized by *P. kessleri* and *C. vulgaris*. Retention factor (Rf) is the distance travelled by an individual component divided by the total distance travelled by the solvent.

R _f	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>
Rha	0.77	0.80
Xyl	0.68	-
Man	0.56	0.56
Gal	0.43	0.41

The ICP-OES analysis was performed to determine the content of essential elements in the EPS of the two analyzed microalgal species (control samples); its results are presented in Table 3. The obtained data indicate that the content of the elements in the EPS differed between the algal species. The Ca content was nearly 2-fold higher in the *C. vulgaris* EPS than in the *P. kessleri* EPS. Additionally, the EPS from *C. vulgaris* had higher contents of P and S. Higher Mg levels were observed in the EPS synthesized by *P. kessleri*. Other elements, including Na and K, did not incorporate into the EPS structure at amounts higher than 4 µg mL⁻¹.

Table 3. Elemental composition of *P. kessleri* and *C. vulgaris* EPS (µg/mg) (±SD; n = 3).

Element	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>
Ca	45.30 ± 0.55	86.73 ± 0.09
Mg	34.12 ± 0.17	20.02 ± 0.10
Mn	3.49 ± 0.02	0.76 ± 0.00
P	4.85 ± 0.58	18.00 ± 0.91
S	27.16 ± 0.11	44.61 ± 0.14
Zn	2.34 ± 0.01	0.54 ± 0.01

The studied EPS are characterized by high contents of Ca, Mg, S, and lower amounts of Fe, K, Na, Mn, and Zn in the EPS from both species. Jiao et al. (2010), who studied the metal composition in EPS extracted from biofilm growing on acidic mine drainage solutions, observed that the EPS metal composition was closely associated with the growth medium composition. The acidic mine drainage solutions contained mainly Fe and Al, and so did the extracted EPS [20]. In the BG-11 medium used in the current study, Ca and Mg are present in the highest concentration, which corresponds with the content of these metals in EPS. The presence of divalent ions, such as Ca (II) and Mg (II), was also detected in, for example, EPS produced by diatoms. These cations are involved in cross-linkages between the sugar molecules of EPS [21]. The analyzed EPS contained high amounts of sulfur. This element may incorporate into EPS in the form of sulfate groups [22]. It was reported that *C. vulgaris* synthesizes sulfated EPS. The content of SO₄²⁻ residues in *C. vulgaris* EPS was determined by El-Naggar et al. (2020), who reported a sulfate content of 210.654 mg/g [17].

2.3. Metal Sorption

2.3.1. ICP-OES Analysis

The ICP-OES analysis showed metal concentration-dependent differences in the cadmium and lead-binding capacity between the EPS from *P. kessleri* and *C. vulgaris*. Greater differences in this parameter of EPS synthesized by *P. kessleri* and *C. vulgaris* were found in the case of lead ion removal (Figure 1). The Pb ion removal potential of the *P. kessleri* EPS decreased with the increase in the metal concentration from 47% at 10 mg/L to 25.5%

at 150 mg/L Pb (II). In the case of the EPS synthesized by *C. vulgaris* cells, the highest value of lead ion removal (49.3%) was achieved at 100 mg/L Pb, whereas the lowest removal was observed in the presence of 50 mg/L Pb (II). In the case of Cd (II) ions, the statistical analysis showed that both studied EPS removed cadmium at the same level at the metal concentration of 10–50 mg/L, and significant differences were observed only in the presence of Cd (II) at the concentration of 150 mg/L.

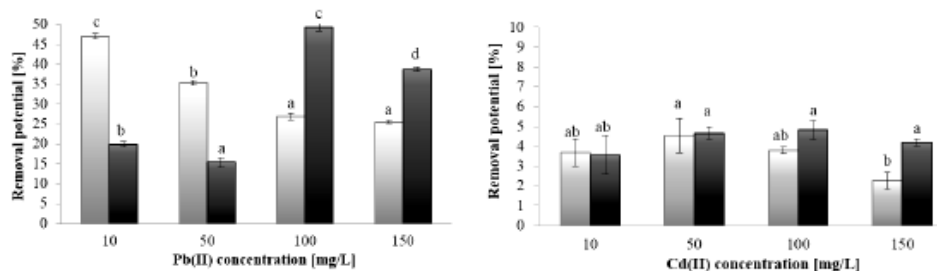


Figure 1. Removal potential of EPS from *P. kessleri* (light grey bars) and *C. vulgaris* (dark grey bars) towards Pb (II) and Cd (II). The letters (a, ab, b, c, d) on the graphs indicate statistical significance of the presented results analyzed by Tukey test ($p \geq 0.05$).

The calculation of the amount of adsorbed metal ions on the EPS in both species showed several times higher affinity of lead than cadmium for the studied EPS (Table 4). The highest cadmium accumulation levels were 35.35 and 48.67 mg/g, and the maximum lead sorption values were 264.1 mg/g and 573.6 mg/g for the EPS from *P. kessleri* and *C. vulgaris*, respectively. The EPS of *P. kessleri* showed a sorption maximum in the presence of both Cd (II) and Pb (II) at the concentration of 100 mg/L. The sorption capacity of EPS from *C. vulgaris* increased with the increasing metal ion concentration in the presence of both cadmium and lead ions. This may be related to the fact that this polymer has a greater number of binding sites that have not been saturated. EPS from *C. vulgaris* contain higher amounts of uronic acids and amino acids, which have carboxyl and amine groups, involved in the metal–EPS interaction [8].

Table 4. Sorption capacity of EPS synthesized by *P. kessleri* and *C. vulgaris* toward Cd (II) and Pb (II). The superscript letters (a, ab, b, c, and d) in the table indicate statistical significance of the presented results ($C_{\text{EPS}} = 100$ mg/g; ANOVA, Tukey’s test, $p \geq 0.05$) (\pm SD).

Metal Ion Concentration [mg/L]	Sorption Capacity [mg/g]			
	Cd (II)		Pb (II)	
	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>
10	3.85 \pm 1.06 ^c	3.73 \pm 1.07 ^a	50.96 \pm 1.55 ^a	20.74 \pm 0.85 ^a
50	15.37 \pm 2.34 ^a	22.73 \pm 1.33 ^b	157.27 \pm 1.59 ^b	79.43 \pm 2.38 ^b
100	35.35 \pm 3.18 ^b	41.1 \pm 4.15 ^c	264.1 \pm 10.32 ^c	490.85 \pm 1.06 ^c
150	26.33 \pm 4.93 ^{ab}	48.67 \pm 2.08 ^d	263.0 \pm 20.0 ^c	573.6 \pm 10.61 ^d

The sorption capacity of the studied EPS toward Pb (II) was approximately 10-fold higher than in the case of Cd (II). The sorption results are in agreement with those obtained for EPS derived from bacteria *Paenibacillus jamilae*. The authors observed that EPS adsorbed 189.53 mg/L Pb (II) and 21.93 mg/L Cd (II) in the one-metal system containing 0.1 mM of metal ions [23]. Similar results were obtained for EPS synthesized by *Rhodococcus rhodococcus*, which adsorbed approx. 200 mg/g Pb (II) and approx. 50 mg/g Cd (II) [24]. The EPS sorption capacity depends not only on different environmental parameters, but also on the properties of heavy metals. The preference of EPS for lead ions may be correlated with differences in the hydration energy and the hydrated ionic radius of lead and cadmium

ions. Due to their lower hydration energy than cadmium ions ($(Pb(II) < Cd(II))$, lead ions are more easily adsorbed, which contributes to quicker and more efficient adsorption) [25]. Reddad et al. (2003) suggested that cadmium ions have lower affinity to polysaccharide than lead [26].

The ICP-OES data indicated species-specific differences in the concentrations of elements released from EPS in the presence of cadmium and lead ions in comparison with the control samples (Table 5). Ca, Mg, and S were the main elements present in the control sample. A high concentration of these elements was also detected in the EPS composition. Therefore, the presence of the studied elements in the solution was the result of release from EPS. The presence of Cd and Pb ions resulted in a decrease in the amount of elements released by EPS from *P. kessleri*, in comparison to the control. An approximately two-fold reduction in the Ca ion content in the solution was observed after cadmium sorption. In turn, in the presence of lead at concentrations of 10 mg/L and 50 mg/L, the release increased, and the reduction was observed only at the Pb(II) concentration of 150 mg/L. Increased Zn release was also noticed after the lead treatment at a concentration of 100 mg/L of *P. kessleri* EPS, compared to the control. In turn, the elemental analysis of the solution after metal sorption by *C. vulgaris* EPS showed a decrease in the release of Ca, Mg, and S ions (except Pb(II) at 50 mg/L), while the amount of P and Zn in the solution increased in the presence of both cadmium and lead ions.

Table 5. The concentration of elements released from EPS to solution after cadmium and lead sorption in comparison to control sample (EPS dissolved in demineralized water) (\pm SD).

Element [mg/mL]	Cd (II) [mg/L]				Pb (II) [mg/L]				Control
	10	50	100	150	10	50	100	150	
	EPS <i>P. kessleri</i>								
Ca	3.06 \pm 0.02	2.65 \pm 0.03	3.74 \pm 0.02	2.85 \pm 0.02	7.98 \pm 0.04	7.47 \pm 0.02	7.05 \pm 0.05	5.36 \pm 0.04	7.12 \pm 0.13
Mg	2.53 \pm 0.01	2.54 \pm 0.02	3.56 \pm 0.02	2.92 \pm 0.01	3.50 \pm 0.01	3.13 \pm 0.01	3.18 \pm 0.01	3.39 \pm 0.02	3.83 \pm 0.04
Mn	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	<0.01	0.55 \pm 0.01
P	0.91 \pm 0.03	0.70 \pm 0.01	0.73 \pm 0.04	0.57 \pm 0.07	0.29 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08	0.18 \pm 0.10	0.02 \pm 0.01	1.94 \pm 0.08
S	1.65 \pm 0.01	1.39 \pm 0.01	2.16 \pm 0.02	1.81 \pm 0.02	2.45 \pm 0.01	1.96 \pm 0.01	1.31 \pm 0.01	2.20 \pm 0.01	3.21 \pm 0.06
Zn	0.58 \pm 0.00	0.49 \pm 0.01	0.34 \pm 0.00	0.36 \pm 0.00	0.22 \pm 0.00	0.65 \pm 0.00	0.93 \pm 0.00	0.13 \pm 0.00	0.69 \pm 0.06
	EPS <i>C. vulgaris</i>								
Ca	6.58 \pm 0.01	5.86 \pm 0.05	6.47 \pm 0.02	6.42 \pm 0.01	4.05 \pm 0.03	8.39 \pm 0.04	5.49 \pm 0.08	5.63 \pm 0.07	7.94 \pm 0.02
Mg	1.53 \pm 0.00	1.45 \pm 0.01	1.63 \pm 0.01	1.60 \pm 0.00	1.01 \pm 0.01	2.20 \pm 0.01	1.29 \pm 0.10	1.16 \pm 0.02	1.96 \pm 0.03
Mn	0.06 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	<0.01
P	1.05 \pm 0.06	0.90 \pm 0.05	0.93 \pm 0.12	0.81 \pm 0.09	0.60 \pm 0.03	0.73 \pm 0.16	0.61 \pm 0.09	0.65 \pm 0.04	0.01 \pm 0.00
S	3.08 \pm 0.01	2.69 \pm 0.02	2.85 \pm 0.02	2.96 \pm 0.01	1.94 \pm 0.01	3.92 \pm 0.05	2.25 \pm 0.05	1.50 \pm 0.07	3.17 \pm 0.02
Zn	0.70 \pm 0.00	0.86 \pm 0.00	0.56 \pm 0.01	1.04 \pm 0.01	0.84 \pm 0.00	1.09 \pm 0.00	1.51 \pm 0.05	0.55 \pm 0.01	0.20 \pm 0.00

It was observed that, in a multi-metal system, only Pb interacted with EPS at a similar level as in a one-metal system, whereas Cd was susceptible to the effects of the presence of other metal ions [23]. In the current study, EPS contained high amounts of Ca and Mg, which were released to the solution (Table 5); this may affect cadmium affinity to the exopolysaccharide.

2.3.2. FTIR Analysis

The FTIR spectra of EPS produced by *P. kessleri* and *C. vulgaris* are presented in Figure 2. The EPS derived from *P. kessleri* and *C. vulgaris* produced similar FTIR spectra, although the *P. kessleri* EPS had a more heterogeneous 950–700 cm^{-1} region. Both EPS had bands at 2938 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} and 1416 cm^{-1} . The EPS isolated from *P. kessleri* showed the presence of bands at 3317 cm^{-1} , 1608 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1249 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} , 906 cm^{-1} , 860 cm^{-1} , 815 cm^{-1} , 776 cm^{-1} , and 707 cm^{-1} . In turn, the spectrum of EPS derived from *C. vulgaris* had bands at 3306 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 1247 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 834 cm^{-1} , and 791 cm^{-1} (Figure 2, Table 6).

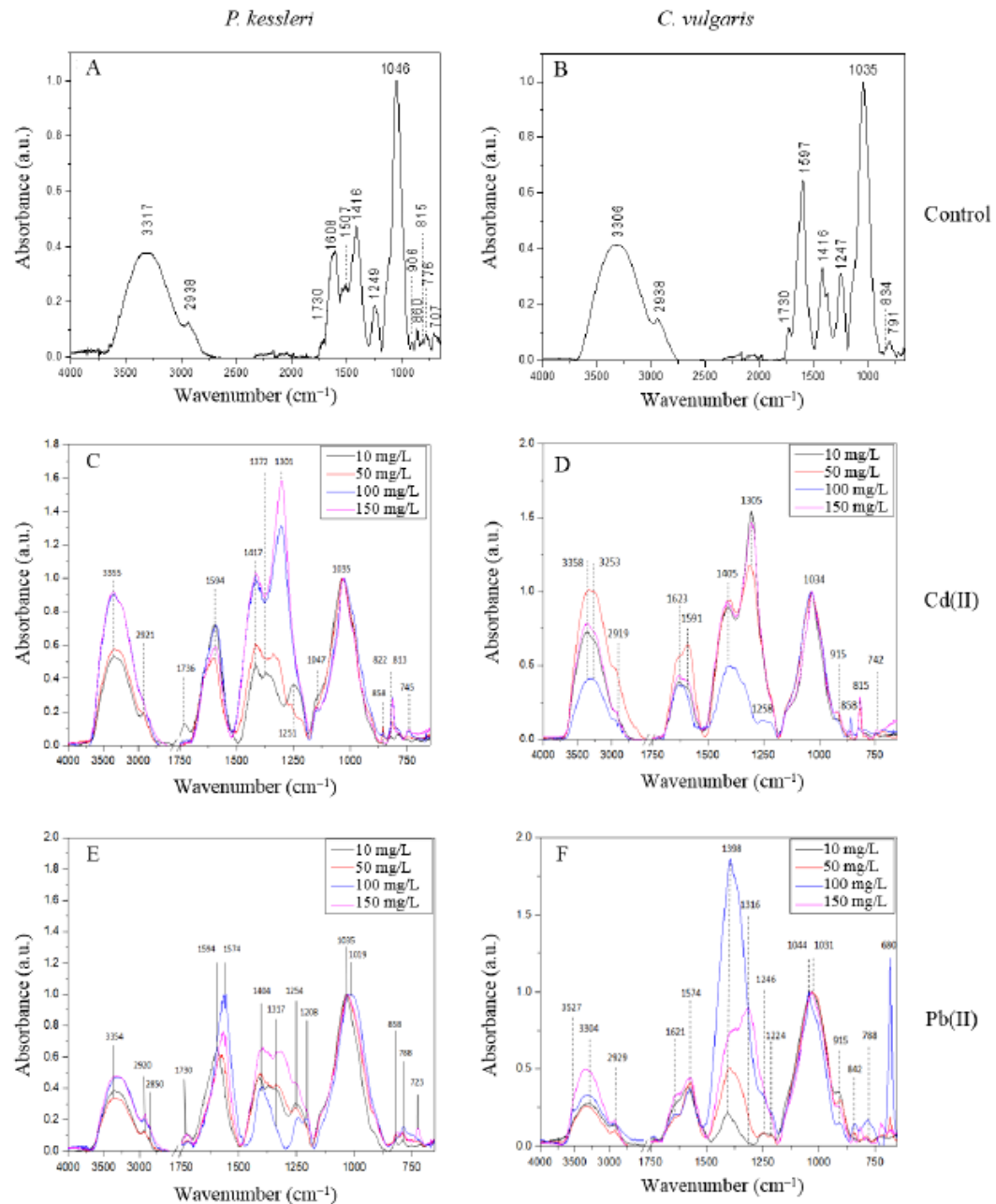


Figure 2. FTIR spectra of EPS from *P. kessleri* (A,C,E) and EPS from *C. vulgaris* (B,D,F) before (A,B) after additions of cadmium (C,D) and lead (E,F) in the range of 3750–650 cm^{-1} (the region 2750–1750 cm^{-1} was removed due to the lack of spectral features).

The analysis of the FTIR results showed that the spectra of both EPS contain bands typical for polysaccharides. The bands at approximately 3310 cm^{-1} and 2938 cm^{-1} are characteristic for stretching vibrations of -OH groups and -CH groups, respectively [27]. The $1750\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ region is characteristic for functional groups, such as esters, and the region below 1100 cm^{-1} is typical of ring and α and β linkage vibrations. The spectra of both samples show bands typical for esterified carboxyl groups (1730 cm^{-1}) and asymmetric and symmetric vibrations of carboxylic ions COO^- (1608 cm^{-1} for *P. kessleri* and 1597 cm^{-1} for *C. vulgaris*, and 1416 cm^{-1} , respectively). These carboxyl groups may originate from uronic acids [28]. The bands at 1249 and 1247 cm^{-1} in *P. kessleri* and *C. vulgaris*, respectively, may indicate the presence of phosphate groups [29] or sulfate groups [30]. The FTIR spectra of both EPS show the presence of stretching C-O and bending C-OH vibrations (1035 cm^{-1} and 1046 cm^{-1}) [27,31]. The bands with lower wavenumbers ($950\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) are characteristic for pyranose and furanose rings as well as α - and β -glycosidic bonds [31,32]. The bands at 815 cm^{-1} and 906 cm^{-1} observed in the *P. kessleri* EPS may indicate the presence of mannose or mannuronic acid [30,33]. Mannan is also observed at 1147 cm^{-1} [30]. The band at 776 cm^{-1} was characterized as typical for guluronic acid [33] as well as the 791 cm^{-1} band in *C. vulgaris* EPS [34]. The band at 834 cm^{-1} found in the *C. vulgaris* EPS was assigned to a sulfated galactose unit [30]. The monosaccharides identified based on the FTIR spectra correspond to the results obtained from the TLC analysis, which also indicated the presence of mannose and galactose. In turn, the analysis of the elemental composition of EPS showed a higher concentration of sulfur than phosphorus; hence, the bands at 1247 and 1249 cm^{-1} may rather indicate sulfate groups.

Table 6. FTIR band assignment for the EPS of *P. kessleri* and *C. vulgaris*.

Species		Assignment	Interpretation	References
<i>P. kessleri</i>	<i>C. vulgaris</i>			
Wavenumber (cm^{-1})				
776, 815, 860	791, 834	(CO), $\delta(\text{CH})$	furanose and pyranose rings of saccharides α - and β -glycosidic bonds	[32] [31]
1046	1035	$\nu(\text{CO})$, $\delta(\text{COH})$	$\beta(1,4)$ glycosidic bond	[31]
1249	1247	$\nu_{\text{as}}(\text{PO})$, $\nu_{\text{as}}(\text{SO})$	phosphate group, sulfate group	[29] [30]
1416	1416	$\nu_{\text{s}}(\text{COO})$	carboxymethyl groups	[31]
1608	1597	$\nu_{\text{as}}(\text{COO})$	carboxymethyl groups	[31]
1730	1730	$\nu(\text{C=O})$	esterified carboxyl groups, uronic acid	[28] [31]
2919	2938	$\nu_{\text{as}}(\text{CH})$	hydrocarbon bond	[27]
3358	3306	$\nu(\text{OH})$	hydroxyl groups	[27]

In the presence of Cd (II) ions, the band of O-H groups in the *C. vulgaris* and *P. kessleri* EPS shifted from approximately 3310 cm^{-1} to 3355 cm^{-1} and 3358 cm^{-1} , respectively (Figure 2). The band at 2938 cm^{-1} shifted to a lower value of approximately 2920 cm^{-1} . There was a band at 1623 cm^{-1} , which was not observed in the control sample. Under the influence of Cd (II), the bands at around 1600 cm^{-1} and 1416 cm^{-1} were shifted to lower wavenumbers in the *P. kessleri* EPS but did not change in the case of the *C. vulgaris* EPS. The new band that appeared in the region $1400\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ for the *C. vulgaris* EPS was shifted from 1372 cm^{-1} (Cd 10 mg/L) toward 1301 cm^{-1} (Cd 50 mg/L , Cd 100 mg/L , and Cd 150 mg/L). Moreover, bands at 858 cm^{-1} , 815 cm^{-1} , and 742 cm^{-1} were observed in the anomeric region.

The analysis of the FTIR spectra after Pb (II) sorption showed a shift of OH groups from 3306 cm^{-1} to 3354 cm^{-1} in the *C. vulgaris* EPS, while this band in the *P. kessleri* EPS did

not change. The band of CH groups shifted from 2938 cm^{-1} to 2920 cm^{-1} and 2929 cm^{-1} in the EPS from *C. vulgaris* and *P. kessleri*, respectively. A band of esterified carboxylic groups (1730 cm^{-1}) was observed only in the *C. vulgaris* EPS. In turn, a 1621 cm^{-1} band appeared in the *P. kessleri* EPS. In both samples, the bands of COO^- groups shifted from 1600 cm^{-1} and 1416 cm^{-1} to lower values, as in the presence of Cd (II) (Figure 2). In the anomeric region, bands at around 850 cm^{-1} , and 788 cm^{-1} were observed. Additionally, a sharp band at 680 cm^{-1} was observed in *P. kessleri* EPS treated with Pb ions at a concentration of 50 mg/L and 100 mg/L.

The FTIR analysis of EPS after metal sorption showed the interaction of OH groups with Cd (II) ions in both samples and with Pb (II) in the case of the *P. kessleri* EPS. The shift in the OH band was also observed after Cd (II) treatment of *Bacillus cereus* EPS [35]. After the metal treatment in this study, the band at 1730 cm^{-1} disappeared, except for the *P. kessleri* EPS in the presence of Pb (II). This indicates the involvement of carboxylic esters in the binding of metal ions [28]. Moreover, the bands around 1600 cm^{-1} and 1416 cm^{-1} characteristic for COO^- observed in all tested samples shifted to lower wavenumbers, which indicates that carboxylic ions can also take part in ion binding [36]. Due to the use of cadmium and lead nitrates in the experiment, the bands in the region of $1372\text{--}1301\text{ cm}^{-1}$ may indicate antisymmetric stretching vibrations of N-O [37]. The anomeric region ($900\text{--}750\text{ cm}^{-1}$) of the studied EPS was also affected by the addition of the heavy metal ions, and the bands identified for mannose, mannuronic acid, and guluronic acid were shifted or their intensity increased, which also evidenced that the ions were attached to the sugar unit. The band at 680 cm^{-1} observed in the EPS from *P. kessleri* in the presence of Pb (II) may indicate formation of lead oxide [38]. The metal–oxide interaction may be another explanation [39].

The FTIR spectroscopy results obtained in this study confirmed the presence of major functional carboxyl, carbonyl, and hydroxyl groups in the EPS of both analyzed species. The FTIR spectra of EPS produced by *C. vulgaris* and *P. kessleri* before and after the sorption indicate involvement of mainly the $-\text{COO}^-$, $-\text{COH}$, and $-\text{OH}$ groups in this process. Mota et al. (2013) reported that the carboxyl and hydroxyl groups played a more important role in the binding of metal to polysaccharides released by *Cyanotheca* sp. CCY 0110 than other functional groups [40]. Based on results obtained after 2D-FTIR-COS analysis, Xie et al. (2020) reported that Cd (II) ions affect EPS in the following order: CO (carboxylic acid), COO^- (amino acids), C-OH (proteins), C-O-C, and C-OH (polysaccharides) [10].

The data obtained in the present study indicate that the higher sorption capacity of EPS synthesized by *C. vulgaris* in comparison to EPS from *P. kessleri* is related to the differences in the biochemical composition of both materials. EPS from *C. vulgaris* contain higher amounts of protein, amino acids, and uronic acids. The presence of e.g., uronic acids in EPS is responsible for their overall negative charge [8]. EPS containing negatively charged components such as uronic acids are characterized by a high metal-complexing capacity and are considered promising for the removal of toxic metals from contaminated environments [10].

The TLC results confirmed the presence of mannose in the EPS from both species analyzed in the present study. The shift of bands characteristic for the skeletal vibration region of pyranose and furanose of the main skeleton and sugar residues after the addition of heavy metal ions was also confirmed by the FTIR analyses performed in the current study. Allard and Casadevall (1990) reported that mannose is one of the sugars responsible for the formation of complexes with heavy metals, e.g., with lead [41].

3. Materials and Methods

3.1. Culture Strains and Pre-Cultivation

Parachlorella kessleri 250 and *Chlorella vulgaris* 898 was obtained from the Culture Collection of Autotrophic Organisms (Treboň, Czech Republic). The inoculated algal cultures were grown in shaken Erlenmeyer flasks in sterilized liquid BG-11 medium at

60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ light intensity and continuous light (24 h light/0 h dark) and aerated with sterile air.

3.2. Experimental Set-Up

The strains were grown in triplicate in 5000 mL glass bottles with a working volume of 2500 mL of sterilized BG 11. The batch cultures were maintained at the continuous light intensity of 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ at 21 ± 1 °C in a temperature-controlled room. The cultures were continuously aerated with sterile air and shaken at 90 rpm.

3.3. Isolation of EPS

After 22 days of cultivation, the cells and culture medium were separated by centrifugation at 9000 rpm for 30 min at 4 °C. Next, the cell-free supernatant was filtered under reduced pressure and concentrated using a rotary evaporator (20 mBar, 38 °C, Heidolph, Germany). An alcohol precipitation method was used for EPS isolation. EPS was precipitated from the supernatant by adding two volumes of ethanol (2:1 *v/v*), stirred, and left for 72 h at 4 °C. Next, the solutions were centrifuged at 9000 rpm for 30 min, dissolved in demineralized water, and dialyzed for 72 h at 4 °C. The EPS obtained was freeze-dried, redissolved in demineralized water, and left for 24 h at 4 °C. To obtain water-soluble EPS, the samples were dissolved in demineralized water and centrifuged, and the supernatant was lyophilized. Next, the samples were dissolved in demineralized water to a final concentration of 1 mg/mL and stored at 4 °C until analysis [42].

3.4. EPS Production

To determine the efficiency of EPS synthesis, the EPS yield and specific productivity were calculated. The total dry weight of biomass was calculated by the following formula:

$$DW_t = DW \cdot V \quad (1)$$

where DW_t is the total dry weight of the cultured biomass [g]; DW is the biomass concentration [g/L]; and V is the culture volume [L].

Then, specific EPS productivity was calculated by

$$\text{Specific EPS productivity [mg/g]} = W_{\text{EPS}}/DW_t \quad (2)$$

where W_{EPS} is the weight of lyophilized EPS [mg], and DW_t is the total dry weight of cultured biomass [g].

The EPS yield was calculated per culture volume:

$$\text{EPS yield [mg/L]} = W_{\text{EPS}}/V \quad (3)$$

where W_{EPS} is the weight of lyophilized EPS [mg], and V is the culture volume [L].

3.5. Analysis of Chemical Composition of EPS

3.5.1. Biochemical Composition

The total sugar content was determined with the phenol-sulfuric method using glucose (POCH, Poland) as a standard [43]. The protein concentration was estimated with the Bradford method using bovine serum albumin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a standard [44].

To determine the content of uronic acids, amino sugars, reducing sugars, and amino acids, samples of EPS were hydrolyzed. Water solutions of EPS were hydrolyzed using 4 M trifluoroacetic acid (TFA). The process was carried out at 100 °C for 4 h in a thermoblock (Macherey-Nagel, Duren, Germany) [42]. The samples were evaporated in a vacuum centrifuge, dissolved in demineralized water, and evaporated three times to remove TFA. After that, the hydrolyzed samples were dissolved to a final concentration of 1 mg/mL and stored at 4 °C until analysis. The content of reducing sugars, uronic acids, and

amino sugars was determined using the Somogyi–Nelson [45], carbazole–sulfuric [46], and modified Elson–Morgan methods [47], respectively, with glucose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), galacturonic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and D-glucosamine (Glentham Life Science, Corsham, UK) as standards, respectively. The concentration of amino acids was measured with the ninhydrin method [48] using glycine (POCH, Gliwice, Poland) as a standard.

3.5.2. Monosaccharide Composition

The sugar composition was analyzed by thin layer chromatography (TLC) using silica gel-coated TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Glucose, galactose, mannose, fructose, xylose and rhamnose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 1 mg/mL were used as standards. Then, 30 μ L of hydrolyzed EPS and standard solutions were transferred on TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) and dried. The plates were placed in a chromatographic chamber, which was first saturated by the developing phase containing 1-propanol:ethyl acetate:water 4:0.5:0.5 *v/v* for 2 h. Chromatograms were developed for 4 h; then, the plates were dried and sprinkled with 10% H₂SO₄ in ethanol and heated at 100 °C for 15 min to visualize separated compounds [49].

3.5.3. Elemental Composition

Additionally, the elemental composition of EPS was examined to evaluate the sorption capacity toward ions contained in the growth medium. For this purpose, lyophilized samples were dissolved in 5% HNO₃ to a final EPS concentration of 100 mg/L. The measurements were performed using the ICP-OES method.

3.6. Metal Sorption

3.6.1. Preparation of Solutions and Sorption Experiment

For the experiment, the following concentrations of Pb(NO₃)₂ and Cd(NO₃)₂·4H₂O were used: 10, 50, 100, and 150 mg/L. Samples for the sorption process were prepared by dissolving EPS in lead and cadmium nitrate solutions to a final EPS concentration of 100 mg/L. The procedure preparing sorption experiment was according to Dobrowolski et al. (2017) with some modifications [24]. The pH value of the solutions was adjusted to 5. The samples were agitated at 120 rpm for 30 min at 25 °C. Then, the supernatant was centrifuged at 9500 rpm for 12 min (Rotanta 460 RS, Hettich, Kirchleggern, Germany). The supernatant was filtered using a hydrophilic 0.22 μ m PES filter (Chemland, Krakow, Poland). The control samples were prepared according to the same procedure, but the EPS were dissolved in water instead of metal solutions. After the sorption experiment, the filtrates were used for measurement of metal ion concentrations with inductively coupled plasma iCAP 6500 Duo (ICP-OES, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The pellet was freeze-dried for FTIR analysis. The sorption experiments were performed in triplicate.

3.6.2. ICP-OES

To evaluate the ability of EPS to bind metals, the optical emission spectrometry with inductively coupled plasma analysis was employed in this study. The samples were measured with the use of ICP-OES iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a charge injection device (CID) detector and TEVA software. CCS-6 obtained from Inorganic Ventures (Christiansburg, VA, USA) was used as a standard solution for the determination of elements (100 μ g/mL in 7% HNO₃, Inorganic Ventures, Christiansburg, VA, USA). The device worked at the following parameters: RF generator power 1150 W, RF generator frequency 27.12 MHz, carrier gas flow rate 0.65 dm³/min, coolant gas flow rate 16 dm³/min, and auxiliary gas 0.4 dm³/min. The wavelength was 220.353 nm for the determination of the lead content and 214.438 nm for cadmium [50]. The following formula was used for the calculation of the percentage removal potential:

$$\text{Removal potential [\%]} = (c_i - c)/c_i \cdot 100 \% \quad (4)$$

The sorption capacity was calculated as follows:

$$\text{Sorption capacity [mg/g]} = ((c_i - c) \cdot V) / W \quad (5)$$

where c_i is the initial concentration of metal ions [mg/L]; c is the concentration of metal ions after incubation with EPS [mg/L]; V is the sample volume [L]; and W is the weight of EPS in the sample [g] [51].

The content of Ca, Mg, Mn, P, S and Zn in the solution after the sorption process was determined as well.

3.6.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra were collected via a Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The Smart iTR attenuated total reflection (ATR) sampling accessory was used. Freeze-dried samples were placed directly on the ATR crystal and measured. The spectra were collected over the range of 4000–650 cm^{-1} . For each sample, 200 scans at a spectral resolution of 4 cm^{-1} were averaged. These spectra were normalized to 1.0 at 1030–1046 cm^{-1} . All spectral manipulations were carried out using Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3.7. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate, and the mean value of the data was reported.

The significance of the differences in the measured parameters was determined using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test at $p < 0.05$, STATISTICA 12 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

4. Conclusions

In order to determine the potential of the extracellular polymeric substances produced by *P. kessleri* and *C. vulgaris* to be used as biosorbents for heavy metal removal, their biochemical characteristics and the Pb (II) and Cd (II) sorption capacity were investigated. The productivity of EPS achieved 16.18 and 12.73 mg/L, respectively for *P. kessleri* and *C. vulgaris*. The analysis of the biochemical composition of the obtained EPS showed that the main component of both polymers are carbohydrates. EPS synthesized by *C. vulgaris*, although containing fewer carbohydrates, has a higher content of reducing sugars and uronic acids, as well as proteins, amino acids and amino sugars by 23.4%, 8.3%, 26.7%, 59.3% and 4.5%, respectively. Rhamnose, mannose and galactose were identified in the studied EPS, and xylose was also found in the EPS produced by *P. kessleri*. The presence of mannose and galactose was confirmed also by the FTIR spectrum.

The ICP-OES analysis of the elemental composition showed high contents of calcium, magnesium, and sulfur in the EPS from *P. kessleri* and *C. vulgaris*. The polymer produced by *C. vulgaris* showed higher sorption capacity than EPS from *P. kessleri*. For cadmium, the sorption capacity was 45.9% higher, and for lead, 54.1%, in the presence of metal ions of 150 mg/L. The results of the FTIR analysis indicate the involvement of the carboxyl, hydroxyl, and carbonyl groups as binding sites for divalent cations of the analyzed heavy metals on the surface of EPS. The results obtained in this study indicate that, due to the significant amount of negatively charged uronic acids and amino acids, the EPS produced by *C. vulgaris* have potential as biosorbents in water and wastewater bioremediation.

Author Contributions: W.C.: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing—original draft; M.C.: Methodology, Investigation, Review and Editing; M.S.-C.: FT-Raman measurements, Formal analysis, Writing—review and editing; A.Z.: Review and Editing; D.W.: ICP-OES measurements; A.J.-W.: Review and Editing; I.K.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Supervision, Writing—original draft, Writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not available.

References

- Mota, R.; Rossi, F.; Andrenelli, L.; Pereira, S.B.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. Released Polysaccharides (RPS) from *Cyanothece* sp. CCY 0110 as Biosorbent for Heavy Metals Bioremediation: Interactions between Metals and RPS Binding Sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 7765–7775. [CrossRef] [PubMed]
- Babiak, W.; Krzemińska, I. Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. *Energies* **2021**, *14*, 4007. [CrossRef]
- Katti, S.; Her, B.; Srivastava, A.K.; Taylor, A.B.; Lockless, S.W.; Igumenova, T.I. High Affinity Interactions of Pb²⁺ with Synaptotagmin I. *Metalomics* **2018**, *10*, 1211–1222. [CrossRef] [PubMed]
- Amin, H.; Arain, B.A.; Jahangir, T.M.; Abbasi, M.S.; Amin, F. Accumulation and Distribution of Lead (Pb) in Plant Tissues of Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and Sesame (*Sesamum indicum* L.): Profitable Phytoremediation with Biofuel Crops. *Geol. Ecol. Landsc.* **2018**, *2*, 51–60. [CrossRef]
- Genchi, G.; Sinicropi, M.S.; Lauria, G.; Carocci, A.; Catalano, A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3782. [CrossRef]
- Capek, P.; Matulová, M.; Šutovská, M.; Barboriková, J.; Molitorisová, M.; Kazimierová, I. *Chlorella vulgaris* α -L-Arabinono- α -L-Rhamno- α , β -D-Galactan Structure and Mechanisms of Its Anti-Inflammatory and Anti-Remodelling Effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *162*, 188–198. [CrossRef]
- Magierek, E.; Krzemińska, I.; Tys, J. Stimulatory Effect of Indole-3-Acetic Acid and Continuous Illumination on the Growth of *Parachlorella kessleri*. *Int. Agrophysics* **2017**, *31*, 483–489. [CrossRef]
- Lombardi, A.T.; Hidalgo, T.M.R.; Vieira, A.A.H. Copper Complexing Properties of Dissolved Organic Materials Exuded by the Freshwater Microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* **2005**, *60*, 453–459. [CrossRef]
- Lombardi, A.T.; Vieira, A.A.H. Lead- and Copper-Complexing Extracellular Ligands Released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Phycologia* **1999**, *38*, 283–288. [CrossRef]
- Xie, Q.; Liu, N.; Lin, D.; Qu, R.; Zhou, Q.; Ge, F. The Complexation with Proteins in Extracellular Polymeric Substances Alleviates the Toxicity of Cd (II) to *Chlorella vulgaris*. *Environ. Pollut.* **2020**, *263*, 114102. [CrossRef]
- Zhang, J.; Zhou, F.; Liu, Y.; Huang, E.; Zhang, C. Effect of Extracellular Polymeric Substances on Arsenic Accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Sci. Total Environ.* **2020**, *704*, 135368. [CrossRef]
- Zheng, S.; Zhou, Q.; Chen, C.; Yang, F.; Cai, Z.; Li, D.; Geng, Q.; Feng, Y.; Wang, H. Role of Extracellular Polymeric Substances on the Behavior and Toxicity of Silver Nanoparticles and Ions to Green Algae *Chlorella vulgaris*. *Sci. Total Environ.* **2019**, *660*, 1182–1190. [CrossRef] [PubMed]
- Leong, Y.K.; Chang, J.-S. Bioremediation of Heavy Metals Using Microalgae: Recent Advances and Mechanisms. *Bioresour. Technol.* **2020**, *303*, 122886. [CrossRef] [PubMed]
- Halaj, M.; Chválová, B.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Searching for Microalgal Species Producing Extracellular Biopolymers. *Chem. Pap.* **2018**, *72*, 2673–2678. [CrossRef]
- Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Michaud, P. Production, Extraction and Characterization of Microalgal and Cyanobacterial Exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 1159–1179. [CrossRef]
- Ogawa, K.; Ikeda, Y.; Kondo, S. A New Trisaccharide, α -D-Glucopyranuronosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhamnopyranose From *Chlorella Vulgaris*. *Carbohydr. Res.* **1999**, *321*, 128–131. [CrossRef]
- El-Naggar, N.E.-A.; Hussein, M.H.; Shaaban-Dessuqi, S.A.; Dalal, S.R. Production, Extraction and Characterization of *Chlorella vulgaris* Soluble Polysaccharides and Their Applications in AgNPs Biosynthesis and Biostimulation of Plant Growth. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3011. [CrossRef]
- Halaj, M.; Paulovičová, E.; Paulovičová, L.; Jantová, S.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Extracellular Biopolymers Produced by *Dictyosphaerium* Family—Chemical and Immunomodulative Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 1254–1263. [CrossRef]
- Rossi, F.; De Philippis, R. Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats. *Life* **2015**, *5*, 1218–1238. [CrossRef]
- Jiao, Y.; Cody, G.D.; Harding, A.K.; Wilmes, P.; Schrenk, M.; Wheeler, K.E.; Banfield, J.F.; Thelen, M.P. Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2916–2922. [CrossRef]
- Kehr, J.-C.; Dittmann, E. Biosynthesis and Function of Extracellular Glycans in Cyanobacteria. *Life* **2015**, *5*, 164–180. [CrossRef] [PubMed]

22. Raposo, M.; De Morais, R.; Bernardo de Morais, A. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 233–252. [CrossRef] [PubMed]
23. Perez, J.A.M.; Garcia-Ribera, R.; Quesada, T.; Aguilera, M.; Ramos-Cormenzana, A.; Monteoliva-Sanchez, M. Biosorption of Heavy Metals by the Exopolysaccharide Produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2699–2704. [CrossRef]
24. Dobrowolski, R.; Szcześ, A.; Czemińska, M.; Jarosz-Wikolazka, A. Studies of Cadmium(II), Lead(II), Nickel(II), Cobalt(II) and Chromium(VI) Sorption on Extracellular Polymeric Substances Produced by *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus rhodochrous*. *Bioresour. Technol.* **2017**, *225*, 113–120. [CrossRef]
25. Ouyang, D.; Zhuo, Y.; Hu, L.; Zeng, Q.; Hu, Y.; He, Z. Research on the Adsorption Behavior of Heavy Metal Ions by Porous Material Prepared with Silicate Tailings. *Minerals* **2019**, *9*, 291. [CrossRef]
26. Reddad, Z.; Ge, C.; Cloirec, P.L. Cadmium and Lead Adsorption by a Natural Polysaccharide in MF Membrane Reactor: Experimental Analysis and Modelling. *Water Res.* **2003**, *37*, 3983–3991. [CrossRef]
27. Cybulska, J.; Halaj, M.; Cepák, V.; Lukavský, J.; Capek, P. Nanostructure Features of Microalgae Biopolymer: Nanostructure of Biopolymer. *Starch Stärke* **2016**, *68*, 629–636. [CrossRef]
28. Gawkowska, D.; Cybulska, J.; Zdunek, A. Cross-Linking of Sodium Carbonate-Soluble Pectins from Apple by Zinc Ions. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *196*, 1–7. [CrossRef]
29. Alam, M.D.A.; Wan, C.; Guo, S.-L.; Zhao, X.-Q.; Huang, Z.-Y.; Yang, Y.-L.; Chang, J.-S.; Bai, F.-W. Characterization of the Flocculating Agent from the Spontaneously Flocculating Microalga *Chlorella vulgaris* JSC-7. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *118*, 29–33. [CrossRef]
30. Fernando, I.P.S.; Sanjeeva, K.K.A.; Samarakoon, K.W.; Lee, W.W.; Kim, H.-S.; Kim, E.-A.; Gunasekara, U.K.D.S.S.; Abeytunga, D.T.U.; Nanayakkara, C.; de Silva, E.D.; et al. FTIR Characterization and Antioxidant Activity of Water Soluble Crude Polysaccharides of Sri Lankan Marine Algae. *Algae* **2017**, *32*, 75–86. [CrossRef]
31. Šandula, J.; Kogan, G.; Kačuráková, M.; Machová, E. Microbial (1→3)-β-D-Glucans, Their Preparation, Physico-Chemical Characterization and Immunomodulatory Activity. *Carbohydr. Polym.* **1999**, *38*, 247–253. [CrossRef]
32. Molaei, H.; Jahanbin, K. Structural Features of a New Water-Soluble Polysaccharide from the Gum Exudates of *Amygdalus scoparia* Spach (Zedo Gum). *Carbohydr. Polym.* **2018**, *182*, 98–105. [CrossRef] [PubMed]
33. Leal, D.; Matsuhira, B.; Rossi, M.; Caruso, F. FT-IR Spectra of Alginate Acid Block Fractions in Three Species of Brown Seaweeds. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 308–316. [CrossRef] [PubMed]
34. Pereira, L.; Sousa, A.; Coelho, H.; Amado, A.M.; Ribeiro-Claro, P.J.A. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR Spectroscopy for Identification of Some Seaweed Phycocolloids. *Biomol. Eng.* **2003**, *20*, 223–228. [CrossRef]
35. Mathivanan, K.; Chandrika, J.U.; Mathimani, T.; Rajaram, R.; Annadurai, G.; Yin, H. Production and Functionality of Exopolysaccharides in Bacteria Exposed to a Toxic Metal Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111567. [CrossRef]
36. Zhang, P.; Chen, Y.-P.; Peng, M.-W.; Guo, J.-S.; Shen, Y.; Yan, P.; Zhou, Q.-H.; Jiang, J.; Fang, F. Extracellular Polymeric Substances Dependence of Surface Interactions of *Bacillus subtilis* with Cd²⁺ and Pb²⁺: An Investigation Combined with Surface Plasmon Resonance and Infrared Spectra. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *154*, 357–364. [CrossRef]
37. Trivedi, M.K.; Dahryn Trivedi, A.B. Spectroscopic Characterization of Disodium Hydrogen Orthophosphate and Sodium Nitrate after Biofield Treatment. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **2015**, *06*, 5. [CrossRef]
38. Arulmozhi, K.T.; Mythili, N. Studies on the Chemical Synthesis and Characterization of Lead Oxide Nanoparticles with Different Organic Capping Agents. *AIP Adv.* **2013**, *3*, 122122. [CrossRef]
39. Senvaitiene, J.; Smirnova, J.; Beganskiene, A.; Kareiva, A. XRD and FTIR Characterisation of Lead Oxide-Based Pigments and Glazes. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *54*, 185–193.
40. Mota, R.; Guimarães, R.; Buttel, Z.; Rossi, F.; Colica, G.; Silva, C.; Santos, C.; Gales, L.; Zille, A.; De Philippis, R.; et al. Production and Characterization of Extracellular Carbohydrate Polymer from *Cyanospora* sp. CCY 0110. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1408–1415. [CrossRef]
41. Allard, B.; Casadevall, E. Carbohydrate Composition and Characterization of Sugars from the Green Microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1875–1878. [CrossRef]
42. Czemińska, M.; Szcześ, A.; Hołysz, L.; Wiater, A.; Jarosz-Wikolazka, A. Characterisation of Exopolymer R-202 Isolated from *Rhodococcus rhodochrous* and Its Flocculating Properties. *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 21–33. [CrossRef]
43. DuBois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [CrossRef]
44. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef]
45. Hope, C.F.A.; Burns, R.G. Activity, Origins and Location of Cellulases in a Silt Loam Soil. *Biol. Fertil. Soils* **1987**, *5*, 164–170. [CrossRef]
46. Bitter, T.; Muir, H.M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Anal. Biochem.* **1962**, *4*, 330–334. [CrossRef]
47. Belcher, R.; Nutten, A.J.; Sambrook, C.M. The Determination of Glucosamine. *Analyst* **1954**, *79*, 201–208. [CrossRef]
48. Bailey, J.L. *Techniques in Protein Chemistry*; Elsevier Publishing Company: Amsterdam, The Netherlands, 1967; ISBN 978-0-444-40369-8.

49. Ghebregzabeier, M.; Rufini, S.; Monaldi, B.; Lato, M. Thin-Layer Chromatography of Carbohydrates. *Chromatogr. Rev.* **1976**, *127*, 133–162. [[CrossRef](#)]
50. Proc, K.; Bulak, P.; Wiacek, D.; Bieganski, A. *Hermetia illucens* Exhibits Bioaccumulative Potential for 15 Different Elements—Implications for Feed and Food Production. *Sci. Total Environ.* **2020**, *723*, 138125. [[CrossRef](#)]
51. Biswas, J.K.; Banerjee, A.; Sarkar, B.; Sarkar, D.; Sarkar, S.K.; Rai, M.; Vithanage, M. Exploration of an Extracellular Polymeric Substance from Earthworm Gut Bacterium (*Bacillus Licheniformis*) for Bioflocculation and Heavy Metal Removal Potential. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 349. [[CrossRef](#)]

9. Oświadczenia współautorów



Lublin, 11.17.2023

mgr Wioleta Ciempiel
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym, a mój udział obejmował:

P.1: Babiak, W. (obecnie Ciempiel), Krzezińska, I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes, *Energies*, 14, 4007.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współudział w pisaniu manuskryptu,
- współudział w edycji i korekcie manuskryptu,
- opracowanie problematyki i koncepcji manuskryptu,
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Wioleta Ciempiel

Lublin, 17.11.2023

dr hab. Izabela Krzemińska
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.1: Babiak, W. (obecnie Ciempiel), Krzemińska, I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes, *Energies*, 14, 4007.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współudział w pisaniu manuskryptu,
- współudział w edycji i korekcie manuskryptu,
- nadzór naukowy,
- opracowanie problematyki i koncepcji manuskryptu,
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.

Krzemińska Izabela

Lublin, 11.17.2023

mgr Wioleta Ciempiel
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym, a mój udział obejmował:

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- współudział w opracowaniu metodologii badań,
- przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń (prowadzenie hodowli, izolacja EPS, określenie składu chemicznego, przeprowadzenie doświadczenia sorpcji metali)
- analizę i interpretację uzyskanych wyników,
- przygotowaniu manuskryptów,
- współudział w edycji i korekcie manuskryptu,
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Wioleta Ciempiel

Lublin, 23.08.2023

dr hab. Izabela Krzemińska
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolażka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badań,
- współudział w opracowaniu metodologii badań,
- współudział w analizie wyników,
- nadzorowanie prowadzonych badań,
- współudział w przygotowaniu manuskryptu,
- współudział w edycji i korekcie manuskryptu,
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 17.11.2023

dr Dariusz Wiącek
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

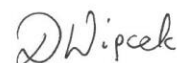
Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- przeprowadzenie oznaczeń stężenia jonów metali za pomocą aparatu ICP-OES.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 17.11.2023

dr hab. Monika Szymańska-Chargot, prof. IA PAN
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- przeprowadzenie pomiarów widm FTIR,
- współudział w opracowywaniu wyników,
- współudział w pisaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 17.11.2023

prof. dr hab. Artur Zdunek
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższego manuskrypcie inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolażka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- udział w korekcie manuskrypcie.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 23.08.2023

dr Magdalena Czemińska
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolażka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współdziałł w opracowaniu metodologii badań,
- współdziałł w prowadzeniu badań,
- udział w edycji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 23.08.2023

prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkolażka
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.2: Ciempiel, W., Czemińska, M., Szymańska-Chargot, M., Zdunek, A., Wiącek, D., Jarosz-Wilkolażka, A., Krzemińska, I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities, *Molecules*, 27, 7153.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- edycję i korektę manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkolażka

Lublin, 22.11.2023

mgr Wioleta Ciempiel
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym, a mój udział obejmował:

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkołazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji badań,
- współdział w opracowaniu metodologii badań,
- przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń (izolacja EPS, określenie składu chemicznego, przeprowadzenie doświadczenia sorpcji metali),
- analizę i interpretację uzyskanych wyników,
- przygotowanie manuskryptu,
- współdział w edycji i korekcie manuskryptu.

Wioleta Ciempiel

Lublin, 22.11.2023

dr hab. Izabela Krzemińska
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższych pracach inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkołazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji badań,
- współdział w opracowaniu metodologii badań,
- współdział w analizie wyników,
- nadzorowanie prowadzonych badań,
- współdział w przygotowaniu manuskryptu,
- współdział w edycji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.

Izabela Krzemińska

Lublin, 22.11.2023

dr Dariusz Wiącek
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

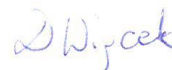
Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- przeprowadzenie oznaczeń stężenia jonów metali za pomocą aparatu ICP-OES.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Lublin, 22.11.2023

mgr Marlena Szymańska
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek, D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współudział w prowadzeniu badań (prowadzenie hodowli glonów, współudział w prowadzeniu doświadczenia sorpcji).

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.

Marlena Szymańska

Lublin, 22.11.2023

dr Magdalena Czemińska
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- współdziałanie w prowadzeniu badań,
- udział w edycji i korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.

Magdalena Czemińska

Lublin, 22.11.2023

prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgr Wiolety Ciempiel.

P.3: Ciempiel, W., Czemińska, M., Wiącek D., Szymańska, M., Jarosz-Wilkołazka, A., Krzemińska, I. Lead biosorption by extracellular polymeric substances isolated from mixotrophic cultures of *Parachlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris* and *Vischeria magna*: biochemical composition and sorption capacity. Praca wysłana do wydawnictwa.

Mój wkład w powyższą pracę obejmował:

- edycję i korektę manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby powyższa publikacja została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Wiolety Ciempiel.



Dyrektor Instytutu
Prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka

10. Życiorys naukowy

Dane personalne

Wioleta Ciempiel (dawniej Babiak)

Wykształcenie

2012-2015 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, biologia– studia licencjackie

Tytuł rozprawy: Charakterystyka wybranych receptorów zaangażowanych w patomechanizm padaczki.

2015-2017 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, biologia, sp. biochemia – studia magisterskie

Tytuł rozprawy: Wpływ metali ciężkich na aktywność oksydazy kwasu szczawiowego w grzybni *Abortiporus biennis*.

2018-2023 Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie – studia doktoranckie

Dorobek naukowy

3 publikacje

21 doniesień konferencyjnych (tym 9 krajowych i 12 międzynarodowych)

Publikacje

1. **Babiak W. (obecnie Ciempiel)**, Krzemińska I. (2021) Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*, 14, 4007.
2. **Ciempiel W.**, Czemińska M., Szymańska-Chargot M., Zdunek A., Wiącek D., Jarosz-Wilkołazka A., Krzemińska I. (2022) Soluble extracellular polymeric substances produced by *Parachlorella kessleri* and *Chlorella vulgaris*: Biochemical characterization and assessment of their cadmium and lead sorption abilities. *Molecules*,
3. Krzemińska I., Szymańska M., **Ciempiel W.**, Piasecka A. (2023) Auxin supplementation under nitrogen limitation enhanced oleic acid and MUFA content in *Eustigmatos calamaris* biomass with potential for biodiesel production. *Scientific Reports*, 594, 13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27778-y>

Wyróżnione doniesienia konferencyjne

Babiak W., Krzemińska I., 2020, Zdolność egzopolisacharydów do wiązania metali ciężkich, Cztery Żywioty - Współczesne problemy w naukach o życiu - III Konferencja Doktorantów, 18.12.2020

Złożone projekty

Preludium 22, Charakterystyka chemiczna zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) syntetyzowanych przez jednokomórkowe zielenice (Chlorophyta) i ich zastosowanie w bioremediacji ołowiu w środowisku zawierającym jony amonowe. Projekt uzyskał finansowanie.

Udział w realizacji projektów bada

wczych

Wykonawca w projekcie: „Zdolność jednokomórkowych glonów *Eustigmatos calaminaris* i *Eustigmatos magnus* (Eustigmatophyceae) do syntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych w zmieniających się warunkach wzrostu”, SONATA 12, nr projektu 2016/23/D/NZ9/02670.

Szkolenia

IV Akademia Chemii Analitycznej, Zaawansowane metody spektrofotometryczne i spektroskopowe: biochemia, farmacja, medycyna, źródła energii, środowisko i inżynieria materiałowa, Shim-Pol, 5-7 października 2020, online

Popularyzacja nauki

XVI Lubelski Festiwal Nauki, projekt pt.: Molekularny kawior, Lublin, 19 wrzesień 2021