

Supplementary materials for:

Cyanoremediation of Heavy Metals (As (V), Cd (II), Cr (VI), Pb (II)) by Live Cyanobacteria (*Anabaena variabilis*, and *Synechocystis* sp.): An Eco-Sustainable Technology

Hossain Md Sabbir, Tatsufumi Okino*

Email address of the corresponding author: okino@ees.hokudai.ac.jp

Supporting information:

- Tables S1-S3
- Figures: S1-S8

Table S1. Experimental design of this study.

Experiments	Experimental conditions	
Effects of HMs on cyanobacterial growth and pigment production	HMs concentration:	
	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Anabaena variabilis</i>
	Cd: 1 mg L ⁻¹	Cd: 1 mg L ⁻¹
	As: 1 mg L ⁻¹	As: 4 mg L ⁻¹
	Pb: 4 mg L ⁻¹	Pb: 1 mg L ⁻¹
	Cr: 2 mg L ⁻¹	Cr: 1 mg L ⁻¹
	pH: 7.5	pH: 8.0
	Culture time: 12 days	Culture time: 14 days
Analysis of surface morphology change	Scanning electron microscope (SEM), Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR): lyophilized cell sample.	
	HMs concentration:	
	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Anabaena variabilis</i>
	Cd: 1 mg L ⁻¹	Cd: 1 mg L ⁻¹
	As: 1 mg L ⁻¹	As: 4 mg L ⁻¹
	Pb: 4 mg L ⁻¹	Pb: 1 mg L ⁻¹
Cr: 2 mg L ⁻¹	Cr: 1 mg L ⁻¹	
	pH: 7.5	pH: 8.0

	Culture time: 48 h	Culture time: 48 h
Surface negativity change: Zeta potential	HMs concentration:	
	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Anabaena variabilis</i>
	Cd: 1 mg L ⁻¹	Cd: 1 mg L ⁻¹
	As: 1 mg L ⁻¹	As: 4 mg L ⁻¹
	Pb: 4 mg L ⁻¹	Pb: 1 mg L ⁻¹
	Cr: 2 mg L ⁻¹	Cr: 1 mg L ⁻¹
	pH: 7.5	pH: 8.0
	Culture time: 48 h	Culture time: 48 h

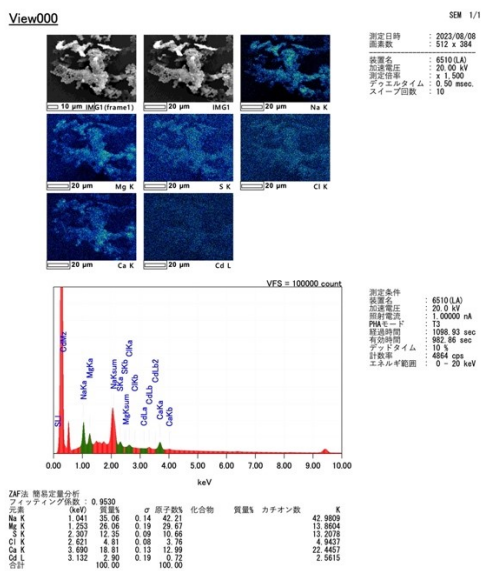
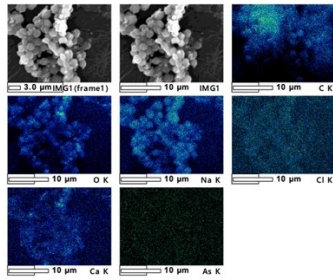


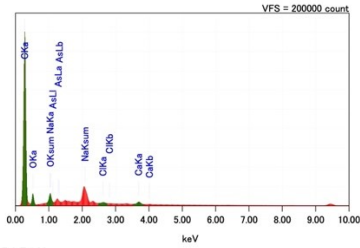
Figure S1. EDS mapping of *Synechocystis* sp. (NIES-3758) under Cd contamination.

View000

SEM 1/1



測定日時 : 2023/09/21
 画素数 : 512 x 384
 装置名 : 6510(LA)
 加速電圧 : 20.00 kV
 測定倍率 : x 5,000
 ドライブタイム : 0.50 msec.
 スweep回数 : 10



測定条件 : 6510(LA)
 装置名 : 20.0 kV
 加速電圧 : 1.00000 nA
 照射電流 : 13
 PHAモード : 1014.95 sec
 測定時間 : 982.91 sec
 ドライブタイム : 3
 計数率 : 3570 cps
 エネルギー範囲 : 0 - 20 keV

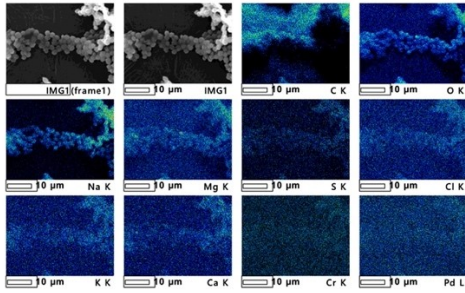
ZAF法 簡易定量分析
 フィッティング係数 : 0.1099

元素	(ppm)	質量%	σ	原子%	化合物	質量%	カチオン数	K
C K	0.277	77.16	0.03	82.43				86.9122
O K	0.525	20.10	0.06	18.08				10.0096
Na K	1.041	1.74	0.01	0.97				1.8850
Cl K	2.621	0.12	0.00	0.05				0.2228
Ca K	3.890	0.39	0.00	0.16				0.8151
As K	10.530	0.48	0.02	0.31				0.0953
合計		100.00		100.00				

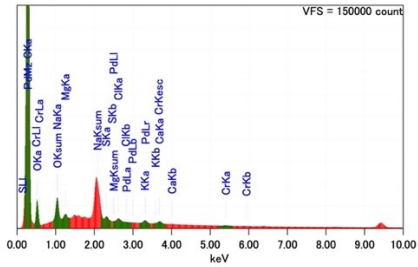
Figure S2. EDS mapping of *Synechocystis* sp. (NIES-3758) under As contamination.

View001

SEM 1/1



測定日時 : 2023/08/22
 画像数 : 512 x 384
 装置名 : 6510 (LA)
 加速電圧 : 20.00 kV
 測定倍率 : x 3,000
 デウエルタイム : 0.50 msec.
 スイープ回数 : 10



測定条件 : 6510 (LA)
 装置名 : 20.0 kV
 加速電圧 : 1.00000 nA
 照射電流 : 13
 PHAモード : T3
 経過時間 : 1124.57 sec
 有効時間 : 982.81 sec
 テットタイム : 12 s
 計数率 : 5515 cps
 エネルギー範囲 : 0 - 20 keV

ZAF法 簡易定量分析
 フィッティング係数 : 0.1389

元素	(keV)	質量%	σ	原子数%	化合物	質量%	カチオン数	K
C K	0.277	79.15	0.03	84.21				87.6615
O K	0.525	18.11	0.05	14.23				8.8298
Na K	1.041	1.35	0.01	0.88				1.7658
Mg K	1.253	0.26	0.00	0.13				0.2505
S K	2.307	0.32	0.00	0.13				0.5427
Cl K	2.621	0.16	0.00	0.08				0.2731
K K	3.312	0.14	0.00	0.05				0.2095
Ca K	2.690	0.21	0.00	0.07				0.3550
Cr K	5.411	0.08	0.00	0.02				0.1110
Pd L	2.838	0.23	0.01	0.23				0.0010
合計		100.00		100.00				

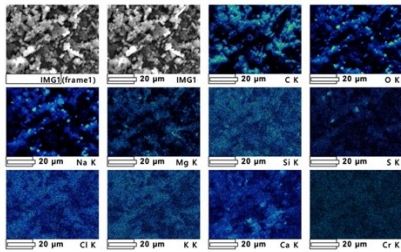
JED-2300 AnalysisStation

JEOL

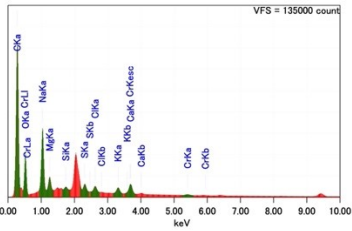
Figure S3. EDS mapping of *Synechocystis* sp. (NIES-3758) under Pb contamination.

View000

xps1ab1 1/1



測定日時 : 2023/08/09
 測高数 : 512 x 384
 検量器 : 6510 (LA)
 加速電圧 : 50.00 kV
 測定倍率 : x 2,000
 デアキュムタイム : 0.50 sec.
 スープ回数 : 10



測定条件 : 6510 (LA)
 検量器 : 20.0 kV
 加速電圧 : 1.00000 nA
 照射電流 : 13
 経過時間 : 1072.01 sec
 有効時間 : 862.81 sec
 デアキュムタイム : 8.5
 計数率 : 4376 cps
 エネルギー範囲 : 0 ~ 20 keV

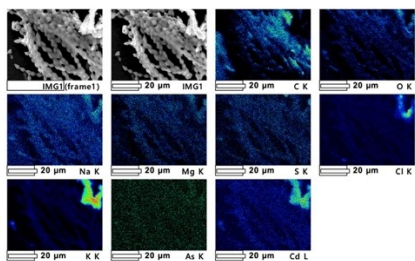
ZAF法 簡易定量分析
 フィッティング係数 : 0.1510

元素	(keV)	質量%	σ	原子数%	化合物	質量%	カチオン数	K
C K	0.277	57.40	0.03	98.98				54.8193
O K	0.525	31.12	0.06	27.14				27.5714
Na K	1.041	6.87	0.01	4.17				9.5376
Mg K	1.253	1.30	0.01	0.75				1.4350
Si K	1.739	0.24	0.00	0.12				0.3990
S K	2.307	0.75	0.00	0.33				1.5964
Cl K	2.621	0.50	0.00	0.20				1.0583
K K	3.312	0.43	0.00	0.15				0.8270
Ca K	3.690	1.18	0.01	0.41				2.5799
Cr K	5.411	0.21	0.00	0.06				0.3771
合計		100.00		100.00				

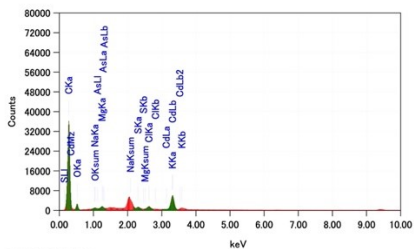
Figure S4. EDS mapping of *Synechocystis* sp. (NIES-3758) under Cr contamination.

View002

SEM 1/1



測定日時 : 2023/08/22
 画素数 : 512 x 384
 装置名 : 6510(LA)
 加速電圧 : 20.00 kV
 測定倍率 : x 2,000
 デジタルタイム : 0.50 msec.
 スリーブ回数 : 10



測定条件 : 6510(LA)
 装置名 : 6510(LA)
 加速電圧 : 20.0 kV
 照射電流 : 1.00000 nA
 PMモード : 13
 経過時間 : 164.12 sec
 有効時間 : 144.06 sec
 ガットタイム : 12 µs
 計数率 : 5584 cps
 エネルギー範囲 : 0 - 20 keV

ZAF法 簡易定量分析
 フィッティング係数 : 0.1310

元素	(keV)	質量%	σ	原子数%	化合物	質量%	カチオン数	K
C K	0.277	75.24	0.07	82.03				81.7890
O K	0.525	19.69	0.14	16.04				10.1353
Na K	1.041	0.28	0.01	0.16				0.3266
Mg K	1.253	0.39	0.01	0.27				0.3253
S K	2.307	0.49	0.01	0.20				0.8972
Cl K	2.621	0.62	0.01	0.23				1.1250
K K	3.912	2.39	0.02	0.64				5.0831
As K	10.530	0.10	0.04	0.02				0.1185
Cd L		0.38		0.42				
合計		100.00		100.00				

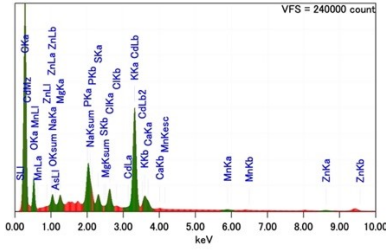
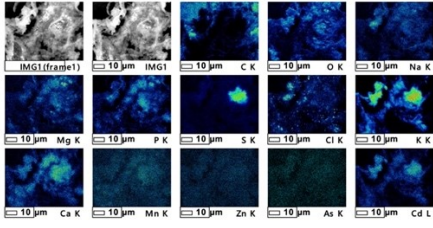
Figure S5. EDS mapping of *Anabaena variabilis* (NIES-2095) under Cd contamination.

View000

SEM 1/1

測定日時 : 2023/08/22
画素数 : 512 x 384

装置名 : 6510 (LA)
加速電圧 : 20.00 kV
測定倍率 : x 1,500
デューティタイム : 0.50 msec.
スイープ回数 : 10



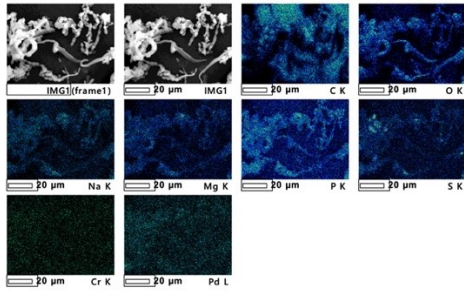
測定条件 : 6510 (LA)
装置名 : 6510 (LA)
加速電圧 : 20.0 kV
測定電流 : 1.00000 nA
PHモード : T3
検出器 : 1110.61 sec
有効時間 : 882.65 sec
デットタイム : 11 μs
計数率 : 6383 cps
エネルギー範囲 : 0 - 20 keV

元素	Count	質量%	原子%	化合物	質量%	カチオン数	K
C	0.277	64.19	0.02				61.0529
O	0.525	23.69	0.04				16.1444
Na	1.041	0.76	0.00				1.1715
Mg	1.253	0.50	0.00				0.7293
P	2.013	1.63	0.00				9.5342
S	2.307	0.74	0.00				1.7369
Cl	2.621	1.13	0.00				2.4143
K	3.312	5.98	0.01				11.2397
Ca	3.690	0.62	0.00				1.3064
Mn	5.894	0.14	0.00				0.2359
Zn	8.630	0.18	0.00				0.2988
As	10.530	0.35	0.01				0.1356
Cd	ND	ND	ND				ND
合計		100.00	100.00				

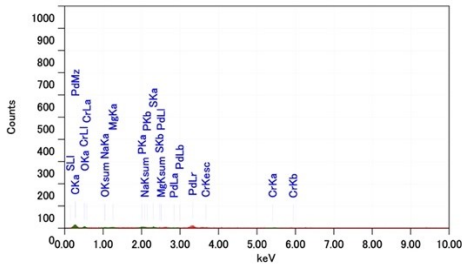
Figure S6. EDS mapping of *Anabaena variabilis* (NIES-2095) under As contamination.

View000

SEM 1/1



測定日時 : 2023/08/29
 画素数 : 512 x 384
 装置名 : 6510 (LA)
 加速電圧 : 20.00 kV
 測定倍率 : x 1,500
 デュエルタイム : 0.50 msec.
 スイープ回数 : 10



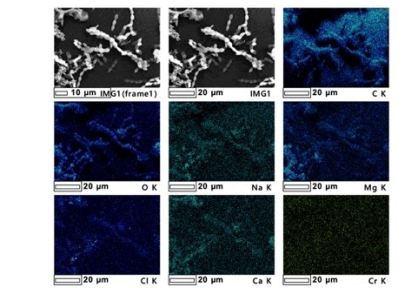
測定条件 : 6510 (LA)
 装置名 : 20.0 kV
 加速電圧 : 1.00000 nA
 照射電流 : 13
 PHAモード : 1020.97 sec
 経過時間 : 982.89 sec
 有効時間 : 3 %
 デットタイム : 1835 cps
 計数率 : 0 - 20 keV

ZAF法 簡易定量分析
 フィットリング係数 : 0.7608

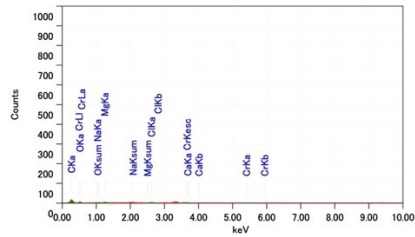
元素	(keV)	質量%	σ	原子数%	化合物	質量%	カチオン数	K
C K	0.277	52.27	3.14	61.72				42,3377
O K	0.525	35.24	6.62	33.90				39,7006
Na K	1.041	1.55	1.08	0.95				2,1023
Mg K	1.253	1.35	0.94	0.79				1,6532
P K	2.013	1.74	0.80	0.79				3,8924
S K	2.307	3.32	0.74	1.47				7,4331
Cr K	5.411	1.25	1.29	0.34				2,3424
Pd L	2.838	0.30	1.50	0.34				0,5382
合計		100.00		100.00				

Figure S7. EDS mapping of *Anabaena variabilis* (NIES-2095) under Pb contamination.

View002



SEM 1/1
 測定日時 : 2023/08/29
 画素数 : 512 x 384
 装置名 : 6510(LA)
 加速電圧 : 20.00 kV
 測定倍率 : x 1,500
 デラエルトタイム : 0.50 msec.
 スイープ回数 : 10



測定条件 : 6510(LA)
 装置名 : 6510(LA)
 加速電圧 : 20.0 kV
 照射電流 : 1.00000 nA
 PNAモード : 13
 経過時間 : 1053.11 sec
 有効時間 : 983.03 sec
 デットタイム : 6 %
 計数率 : 1555 cps
 エネルギ範囲 : 0 - 20 keV

ZAF法 簡易定量分析
 フィッティング係数 : 0.7293

元素	(keV)	質量%	σ	原子数%	化合物	質量%	カチオン数	K
O K	0.277	58.82	3.01	67.11				58.1020
Cl K	0.505	34.82	7.16	28.89				31.3462
Na K		ND		ND				
Mg K	1.253	3.49	1.09	1.97				4.3867
Cl K	2.821	1.64	0.89	0.74				4.2383
Cr K	3.690	0.89	0.91	0.24				1.7828
合計		100.00		100.00				

JED-2300 AnalysisStation

JEOL

Figure S8. EDS mapping of *Anabaena variabilis* (NIES-2095) under Cr contamination.

Table S2. Zeta potential of *Anabaena variabilis*

Heavy metals	Excperiment-1 (mV)	Experiment-2 (mV)	Experiment-3 (mV)	Mean (mV)	Standard deviation
Control	-29.31	-29.51	-31.99	-30.27	1.49
Pb	-17.97	-19.22	-20.50	-19.23	1.27
As	-15.60	-15.90	-18.75	-16.75	1.74
Cr	-11.07	-16.55	-14.17	-13.93	2.75
Cd	-13.35	-11.99	-12.56	-12.63	0.68

Table S3. Zeta potential of *Synechocystis* sp.

Heavy metals	Excperiment-1 (mV)	Experiment-2 (mV)	Experiment-3 (mV)	Mean (mV)	Standard deviation
Control	-31.67	-28.79	-31.57	-31.57	1.63
Cr	-15.04	-16.91	-17.90	-16.91	1.45
As	-20.58	-18.03	-12.21	-18.03	4.29
Pb	-19.47	-22.30	-21.56	-21.56	1.47
Cd	-21.13	-24.35	-25.38	-24.35	2.21