

1
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2018

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Н.В. Немцева, 2018

УДК: 579.678+628.19

Н.В. Немцева

САНИТАРНЫЕ АСПЕКТЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Проанализировать некоторые источники микробного загрязнения при культивировании микроводорослей и оценить возможные способы контроля.

Материалы и методы. В работе использована вода, поступающая по городской распределительной сети из Уральского открытого водозабора, а также из артезианской скважины с глубины 120 м. Оценку качества воды производили бактериологическим методом в соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01.

Результаты. Представлены данные, свидетельствующие о присутствии в водопроводной и артезианской воде автохтонной микрофлоры, представленной бактериями, микроводорослями и протистами, способными вызвать контаминацию выращиваемой культуры микроводорослей. Сравнительная оценка качества воды позволяет сделать выбор в пользу закрытого водоисточника. Для контроля санитарного качества в масштабах предприятия следует предусмотреть этап санитарного контроля используемой воды, а также выращенной биомассы.

Заключение. В целях эпидемиологической безопасности необходим контроль за санитарным качеством микроводорослевой биомассы. Микробиологические подходы с использованием новых технологий, основанных на применении готовых пластифицированных питательных сред, позволяют эффективно следить за качеством используемой воды, а также произведенной продукции.

Ключевые слова: микроорганизмы, вода, бактериальное загрязнение, биотехнология, санитарно-микробиологическая оценка.

N. V. Nemtseva

HEALTH ASPECTS OF MICROALGAE CULTIVATION

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

The aim is to analyze some sources of microbial contamination in the cultivation of microalgae and to evaluate possible ways of monitoring.

Materials and methods. The water used by the city distribution network from the Urals open water intake, as well as from the artesian well from a depth of 120 m, was used in the work. The water quality was evaluated by the bacteriological method in accordance with Sanitary and Epidemiological Station 2.1.4.1074-01.

Results. Data are presented showing the presence of autochthonous microflora in water and artesian water, represented by bacteria, microalgae and protista, capable of causing the cultivated microalgae culture contamination. A comparative assessment of water quality makes us opt for a closed water source. To monitor sanitary quality throughout the enterprise, the sanitary control of the water used and the biomass grown should be included.

Conclusion. For the purposes of epidemiological safety, it is necessary to monitor the sanitary quality of microalgae biomass. Microbiological approaches with technologies based on the use of ready plasticized nutrient media, can effectively monitor the quality of the water used, as well as the products produced.

Key words microorganisms, water, bacterial pollution, biotechnology, sanitary and microbiological evaluation.

Введение

В современном обществе высокими темпами расширяется применение микроводорослей для производства биотоплива, пищевых продуктов, а также получения ценных биомолекул, применяемых в косметологии, фармакологии и медицине [2, 10, 12, 16]. Мировой рынок микроальгальной биомассы в 2016 г. оценивался в 0,7 миллиардов долларов США [19]. В ответ на формирование высокого коммерческого спроса развивается производство микроводорослевой биомассы в том числе за счет создания мелких частных предприятий. Это побуждает к поиску новых подходов, обеспечивающих безопасное культивирование микроводорослей.

Для выращивания микроводорослевой биомассы в настоящее время используются открытые (пруды, резервуары) и разнообразные по конструкции закрытые системы культивирования [15, 21]. Основные требования, предъявляемые к воспроизведенной для пищевой, фармацевтической и медицинской отраслей биомассе, кроме достаточного содержания в ней питательных веществ или конкретного субстрата, обязательным является ее высокое санитарное качество.

Цель работы – проанализировать некоторые источники микробного загрязнения при культивировании микроводорослей и оценить возможные способы контроля.

Материалы и методы

В работе использована вода, поступающая по городской распределительной сети г. Оренбурга из Уральского открытого водозабора, а также из артезианской скважины с глубины 120 м. Оценку качества воды производили бактериологическим методом в соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01 [6]. Использована лабораторная культура штамма зелёной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. Chl. 2, имеющаяся в коллекции ИКВС УрО РАН. Водорослевую культуру выращивали на жидкой питательной среде Тамия: в разведении безбактериальной природной водой в соотношении 1:1, при температуре +25⁰С, в условиях периодического перемешивания (16 ч с перерывом 8 ч) на перемешивающем устройстве ЛАБ-ПУ-01 «ЛОИР» (Россия) с частотой колебаний платформы 50 об./мин. Среда Тамия (г/л): KNO₃ – 5,0; MgSO₄*7H₂O – 2,5; KH₂PO₄ – 1,25; FeSO₄*7H₂O – 0,003; ЭДТА – 0,037; раствор микроэлементов H₃BO₃ – 2,86 г/л; MnCl₂*4H₂O – 1,81 г/л; ZnSO₄*7H₂O – 0,222 г/л; MoO₃ – 176,4 мг/10 л; NH₄VO₃ – 229,6 мг/10 л. pH в начале культивирова-

ния: 6,25. Фоторегистрацию осуществляли с использованием цифровой фотокамеры Cannon PowerShot G5, соединенной с микроскопом. Результаты измерений обрабатывали статистически, с использованием программного продукта Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Микроводоросли представляют собой разнообразную группу одноклеточных фотосинтезирующих микроорганизмов, происходящих из различных сред обитания. По оценкам различных специалистов в природе существуют от 200 000 до нескольких миллионов видов, однако к настоящему времени из них изучена лишь ограниченная часть [13]. Наиболее важными с точки зрения биотехнологии являются диатомовые, зеленые, золотистые водоросли, а также цианобактерии. Одними из распространенных, пригодных для массового культивирования, являются одноклеточные зеленые водоросли (отдел Chlorophyta), и в частности культура *Chlorella vulgaris* Beyerinck, 1890, известная уже более 125 лет [17]. Размножение этих микроводорослей довольно простое. Рост культуры идет за счет формирования в материнской клетке дочерних автоспор, которых в зависимости от штамма и условий культивирования может быть 2, 4, 8, 16 и т.д. (рис. 1). После окончания деления автоспоры выходят из клетки путем разрыва оболочки. В свою очередь, молодые клетки, растут до стадии созревания, и весь цикл повторяется сначала [3].

На рисунке 1 приведены микрофотографии клеточного цикла культуры *C. vulgaris* штамм Ch-2 ИКВС УрО РАН.

Производство биомассы микроводорослей основано на простой схеме: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{питательные вещества} + \text{световая энергия} \rightarrow \text{биомасса} + \text{O}_2$. Общие требования к успешному культивированию этих микроорганизмов включают выбор соответствующих условий (фотосинтетические или миксотрофные), присутствие в среде культивирования сбалансированного содержания углерода, азота, макроэлементов, таких как фосфор, магний, силикаты, а также некоторых микроэлементов, витаминов и т.п., в зависимости от потребности вида микроорганизмов в процессе их роста [22]. Успешному культивированию способствуют правильно подобранные режимы освещенности и температура [20].

На всех этапах производства биомассы существует риск контаминации аксенической культуры микроводорослей другими видами микроводорослей, простейшими, грибами, а также бактериями, включая условно-патогенных и

патогенных представителей.

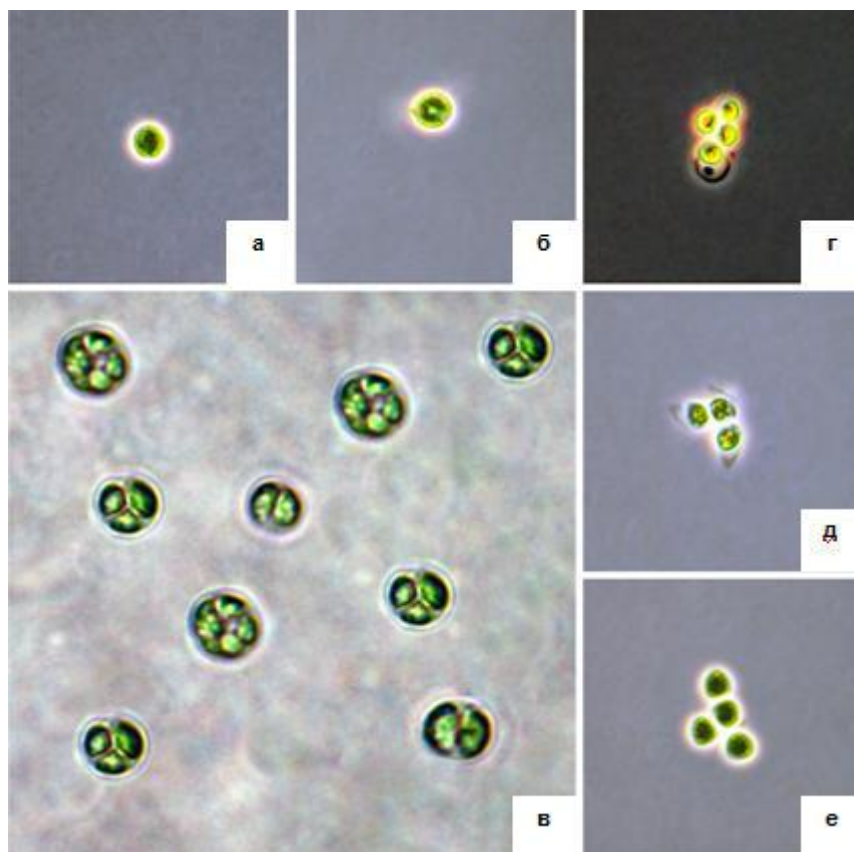


Рис. 1. *Chlorella vulgaris* Beijer. Клеточный цикл: а) молодая клетка; б) делящаяся клетка; в) клетки с 2, 4, 8 автоспорами; г) освобождение автоспор из спорангия; д) оболочка материнской клетки с автоспорами; е) расхождение автоспор.

Существует много различных конструкций установок для культивирования водорослей под открытым небом. Принципиальной схемой подобного культивирования является выращивание культуры в жидких питательных средах в бассейнах, лотках или других емкостях с различными способами перемешивания, подачей углекислоты и использованием естественного солнечного освещения. Производительность установок составляет в среднем 15-20 г/м² сухой биомассы в сутки, достигая в отдельных случаях до 40 г/м². При массовом культивировании плотность самой культуры может варьировать от 25 до 400 млн. клеток на 1 мл в зависимости от типа установки.

В данных условиях выращивания культура микроводорослей легко загрязняется извне посторонней микрофлорой (рис. 2). Кроме бактериофлоры здесь появляются микроводоросли других видов-антагонистов, грибы, протисты (жгутиковые, инфузории), коловратки, рачки и т.п., которые снижают урожайность культуры, а также компрометируют качество биомассы для

дальнейшего практического использования в пищевых и косметологических целях.

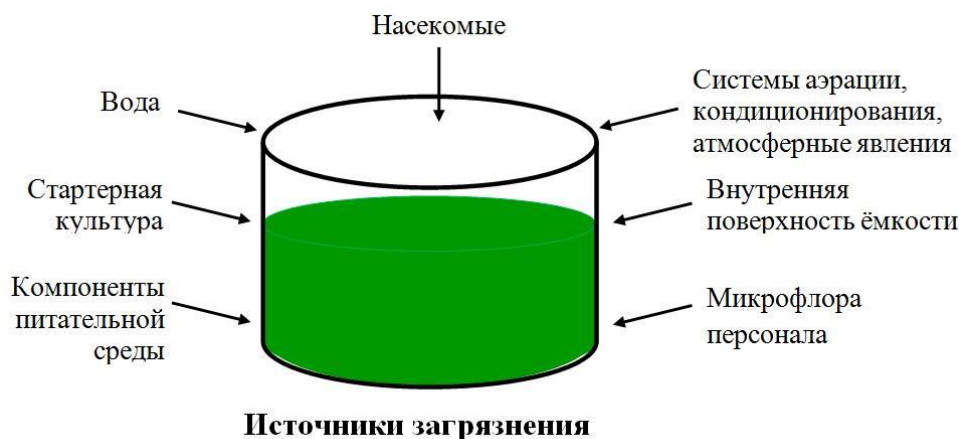


Рис. 2. Возможные источники загрязнения [9].

Наиболее безопасной с точки зрения контаминации культуры является система закрытого культивирования. Примером является система стеклянных трубок, куда помещают среду культивирования и исходную культуру водорослей. Используемая при этом артезианская вода производителем априори считается чистой, хотя имеются факты обнаружения микрофлоры в артезианских водах [1]. Исследователями показано присутствие отдельных представителей *Curvibacter*, *Aquabacterium*, а также *Polaromonas* (Comamonadaceae), составляющих ядро мезофильной гетеротрофной аэробной микрофлоры питьевой воды и сохраняющихся в процессе водоподготовки и бутилирования. Экологической особенностью микрофлоры этих вод является так называемая «микробная уникальность», обеспечиваемая микропейзажем флоры, а также композицией микроэлементов [18].

При любом используемом способе культивирования в качестве основы для питательной среды применяется вода, что делает ее ключевым звеном в достижении получения высококачественного водорослевого продукта.

Обычно при лабораторном культивировании микроводорослей используются стерильные питательные среды, созданные на базе безбактериальной природной воды. При массовом культивировании при любом выбранном способе обычно применяется либо вода из артезианской скважины, либо водопроводная вода, полученная из поверхностного водоемисточника [14].

В нашей работе проанализирован уровень бактериальной контаминации воды из городской разводящей сети, поступающей из открытого водозабора, а также воды из артезианской скважины (рис. 3). В серии исследований

оценивали нормированные показатели микробиологического качества воды ОМЧ (общее микробное число), а также содержание ОКБ (общие колиформные бактерии) и ТКБ (термотолерантные колиформные бактерии) [4].

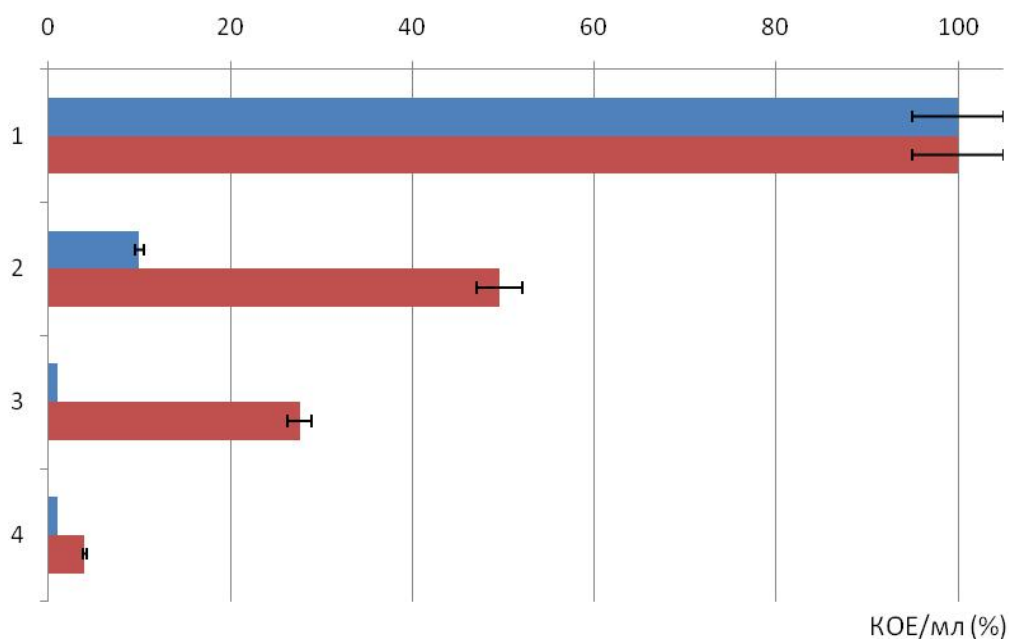


Рис. 3. Динамика ОМЧ воды в % на технологических этапах водоподготовки и накопления

Обозначения: ■ - вода из артезианской скважины; ■ - вода из открытого водозабора; 1 - водоисточник; 2 – вода после песчано-гравийного фильтра; 3 – вода после обработки ультрафиолетом; 4 - вода, дошедшая до потребителя.

В результате проведенного сравнительного анализа выявлена изначально более высокая контаминация водопроводной воды в сравнении с артезианской. Этот факт вполне объясним, поскольку, как известно, состав аллохтонной микрофлоры разнообразнее и богаче в поверхностной воде, чем в артезианской [8, 15]. В воде, прошедшей все этапы водоподготовки, зарегистрировано присутствие определенного количества автохтонной микрофлоры, составившей от первоначального уровня 1 и 4%, соответственно. При этом присутствие ОКБ и ТКБ не зарегистрировано.

На следующем этапе исследования изучен спектр контаминантов водопроводной воды. Установлено, что в составе микрофлоры питьевой воды, полученной из открытого водоисточника, обнаруживались не только бактерии, но также представители зоо- и фитопланктона (рис. 4).

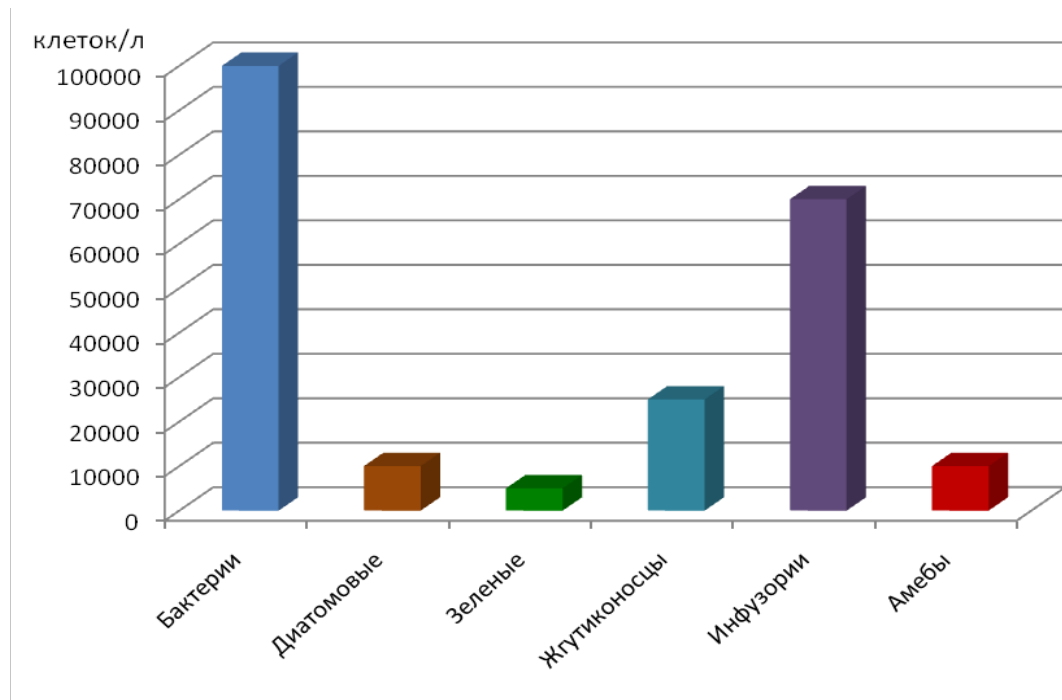


Рис. 4. Показатели контаминации водопроводной воды, дошедшей до потребителя

В итоге следует подчеркнуть, что уровень контаминации питьевой воды зависит от источника водозабора. Процесс водоподготовки не дает полной гарантии отсутствия микрофлоры в питьевой воде. В случае использования воды из открытого водоемисточника в процессе культивирования микроводорослей может происходить загрязнение посторонней микрофлорой, что существенно ухудшит санитарные характеристики полученной биомассы.

Поскольку от санитарного качества используемой микроводорослевой биомассы зависит здоровье населения, то производитель заинтересован в организации контроля за санитарным состоянием произведенной продукции.

Классические микробиологические методы (выделение чистых культур микроорганизмов с их полной идентификацией), рекомендуемые нормативными документами, являются достаточно трудоемкими. Они также требуют контроля качества питательных сред, а также необходимой подготовки персонала. Эти методы, оставаясь золотым стандартом санитарной микробиологии, характеризуются не только высокой трудоемкостью, но и продолжительностью исполнения. Так, рутинный бактериологический анализ по определению ОКБ, ТКБ и *E. coli* занимает, по меньшей мере, 48-72 ч. Особенно значим этот аспект для контроля качества водоподготовки, при котором традиционные методы бактериологического контроля имеют фактически ретроспективный характер, что затрудняет принятие эффективных управленческих

решений. К этому следует добавить, что в условиях производства микродорослей осуществление бактериологического контроля классическими методами довольно затруднительно.

В последнее время в лабораторной практике все чаще находят применение тестовые пластины в виде пластифицированных питательных сред для ускоренного микробиологического контроля. Множество тестов, предложенных различными производителями, нацелено на массовое использование и предусматривает легкость учета результата. В основе принципа действия лежит количественный учет определенных групп микроорганизмов, выросших на тест пластинах с питательной средой на подложке. Данный тип тестов имеет мультислойную структуру и состоит из подложки определенной формы со средой и специального покрытия, сохраняющего стерильность. Тест-пластины не активны без увлажнения. Доступ к питательной среде осуществляется только после нанесения испытуемого образца. В результате на подложке образуется гель, в котором прорастают микроорганизмы.

Для ускорения процедуры анализа в состав среды, помимо селективных добавок, подавляющих рост нецелевой микрофлоры (антибиотики, 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорид, дезоксихолат натрия, желчь и другие вещества), вносят специальные хромогенные субстраты. Например, в состав питательной среды подложек для выделения колиформных бактерий входит субстрат, который расщепляется под воздействием фермента β -галактозы, выделяемого этими микроорганизмами с формированием голубых или голубовато-зеленых колоний. С помощью хромогенных добавок определяются маркеры, высокоспецифичные для целевой группы микроорганизмов, что облегчает выполнение исследований. Культивирование посевов осуществляется по принятым температурным режимам и экспозициям для исследуемого микроорганизма. Для количественного учета используются различные типы устройств автоматического подсчета выросших колоний.

Новым форматом готовых пластифицированных питательных сред являются петрифилмы (ЗМ™ Petrifilm™) [9]. Петрифилмы рекомендованы Роспотребнадзором РФ для применения в производственных лабораториях, контролирующих продовольственное сырье и пищевые продукты, а также в испытательных лабораториях Роспотребнадзора и Россельхознадзора, сертификационных центрах и других организациях, аккредитованных в установленном порядке на право проведения микробиологических исследований [5].

Их использование обеспечивает существенное (в 1,5-2 раза) снижение прямых затрат на проведение анализов, а также позволяет не только сократить продолжительность исследования, но и исключить обязательный контроль качества питательных сред [7]. Соответствие результатов при сравнительном исследовании классических и инновационных методов демонстрирует аналогичность результатов [23], что позволяет рекомендовать использование готовых пластифицированных питательных сред для микробиологического анализа качества используемой воды и выращенной микроальгальной массы.

Заключение

Таким образом, в связи широким применением микроводорослей для производства пищевых продуктов, а также получения ценных биомолекул, применимых в косметологии, фармакологии и медицине, ставится вопрос о безопасности выращенной продукции. Одним из ключевых звеньев решения данной проблемы является санитарное качество используемой воды. При этом в производстве микроводорослевой биомассы вода должна быть питьевого качества. В результате проведенных исследований установлено, что микрофлора питьевой воды может контаминировать произведенную биомассу, снижая ценность произведенного продукта. Показано, что в производстве микроводорослевой биомассы необходимо использовать преимущественно артезианскую воду. Микробиологические подходы с использованием новых технологий, основанных на применении готовых пластифицированных питательных сред, позволяют эффективно следить за качеством используемой воды, а также произведенной продукции.

(Работа выполнена по теме НИР в рамках выполнения государственного задания ИКВС УрО РАН; гос. регистрация № 116021510074)

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабоедова А.Е., Непорожня И.А. Микробная оценка вод общественных колодцев деревень Шулма, Панфилка, Солманское Череповецкого района Вологодской области. Успехи современного естествознания. 2015. 9 (2): 283-286.
2. Мещерякова Ю.В., Нагорнов С.А. Культивирование микроводоросли хлорелла с целью получения биотоплива. Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. 2012. 43: 33-36.
3. Митишев А. В., Преснякова Е. В., Семенова Е. Ф., Гурина М. А. Сравнительный анализ штаммов продуцента и инновационного продукта как основных элементов биотехнологии резиноида хлореллы. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2014. 8(4):19-28.
4. МУК 4.2.2884-11. Методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.
5. Петрифильмы – инновационные тесты для микробиологии / Инновации в микробио-

- логии. М.: Медицинская продукция ЗМ., 2011.
6. СанПин 2.1.4.1074-01. "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения". М.: Роспотребнадзор, 2006. 103 с.
 7. Соколов Д.М., Соколов М.С., Кашинцев И.В. Петрифилмы - современные тесты для микробиологического контроля пищевых продуктов, сырья и объектов среды обитания. Вопросы питания. 2011. 80 (1): 34-38.
 8. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. Пенза, 2002. 232 с.
 9. 3M Food Safety. 3M™ Petrifilm™ Aqua Plates for Water Testing. USA. 3M. 2011.
 10. Algal Green Chemistry. 1st Edition/ Ed.by R. Rastogi, D. Madamwar, A. Pandey. Elsevier, 2017. 336 p. (URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.01001-8>)
 11. Creswell L.R. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. SRAC. 2010. Publication No. 5004: 1-13
 12. Cuellar-Bermudez S.P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D.L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M.A., Parra-Saldivar R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microb Biotechnol. 2015. 8(2):190-209.
 13. Gagnot S., Niggemann J., Dittmar Th., Singer G. A., Loy A. Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters. Lesaulnier et al. Microbiome. 2017. (5): 126.
 14. ISO 6222:1999. Water Quality – Enumeration of culturable microorganisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
 15. Jerney J., Spilling K. Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. Methods in Molecular Biology. 2018. (DOI 10.1007/7651_2018_130)
 16. Koller M., Muhr A., Braunegg G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. Algal Research 2014. (6): 52–63
 17. Krienitz L., Huss, Bock C. Chlorella: 125 years of the green survivalist. Trends in Plant Science, V. A.R. 2015. 20(2): 67-69.
 18. Lesaulnier C. C., Herbold C. W., Pelikan C., Berry D., Gérard C., Coz X. L., Liu G., Bakker G.L., Li S., Vreeburg J.H., Verberk J.Q., Medema G.J., Liu W.T., Van Dijk J.C. Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. Environ Sci. Technol. 2014. 48: 5467-76.
 19. Oilgae.com: Algae Business Opportunities Consulting. (URL: www.oilgae.com).
 20. Singhn S.P., Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015. 50: 431-444.
 21. Walker T.L., Purton S., Becker D.K., Collet C. Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep., 2005. 24(11): 629-641.
 22. Zhan J., Rong J., Wang Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. International journal of hydrogen energy. 2017. 42: 8505-8517.
 23. Wang H, Zhang W, Chen L, Wang J, Liu T (2013) The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. Bioresour Technol. 2013. 128: 745-750.

Поступила 29.03.2018

(Контактная информация: Немцева Наталия Вячеславовна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией водной микробиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: Россия, 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; моб. тел. 8-903-398-78-11; e-mail: nvnemtseva@gmail.com)

LITERATURA

1. Baboedova A.E., Neporozhnaja I.A. Mikrobnaja ocenka vod obshhestvennyh kolodcev de-reven' Shulma, Panfilka, Solmanskoe Cherepoveckogo rajona Vologodskoj oblasti. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015. 9 (2): 283-286.
2. Meshherjakova Ju.V., Nagornov S.A. Kul'tivirovanie mikrovdorosli hlorella s cel'ju poluchenija biotopliva. *Voprosy sovremennoj nauki i praktiki*. Universitet im. V.I. Vernadskogo. 2012. 43: 33-36.
3. Mitishev A. V., Presnjakova E. V., Semenova E. F., Gurina M. A. Sravnitel'nyj analiz shtammov producenta i innovacionnogo produkta kak osnovnyh jelementov biotehnologii rezinoida hlorelly. *Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region. Estestvennye nauki*. 2014. 8(4):19-28.
4. MUK 4.2.2884-11. Metody mikrobiologicheskogo kontrolja ob#ektov okruzhajushhej sredy i pishhevyyh produktov s ispol'zovaniem petrifil'mov. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2011.
5. Petrifil'my – innovacionnye testy dlja mikrobiologii / Innovacii v mikrobiologii. M.: Medicinskaja produkcija 3M., 2011.
6. SanPin 2.1.4.1074-01. "Pit'evaja voda. Gigienicheskie trebovanija k kachestvu centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzhenija. Kontrol' kachestva. Gigienicheskie trebovanija k obespecheniju bezopasnosti sistem gorjachego vodosnabzhenija". M.: Rospotrebnadzor, 2006. 103 s.
7. Sokolov D.M., Sokolov M.S., Kashincev I.V. Petrifil'my - sovremennye testy dlja mikrobiologicheskogo kontrolja pishhevyyh produktov, syr'ja i ob#ektov sredy obitanija. *Voprosy pitaniya*. 2011. 80 (1): 34-38.
8. Hot'ko N.I., Dmitriev A.P. Vodnyj faktor v peredache infekcii. Penza, 2002. 232 s.
9. 3M Food Safety. 3M™ Petrifilm™ Aqua Plates for Water Testing. USA. 3M. 2011.
10. Algal Green Chemistry. 1st Edition/ Ed.by R. Rastogi, D. Madamwar, A. Pandey. Elsevier, 2017. 336 p. (URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.01001-8>)
11. Creswell L.R. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. SRAC. 2010. Publication No. 5004: 1-13
12. Cuellar-Bermudez S.P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D.L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M.A., Parra-Saldivar R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb Biotechnol*. 2015. 8(2): 190-209.
13. Gagnot S., Niggemann J., Dittmar Th., Singer G. A., Loy A. Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters. Lesaulnier et al. *Microbiome*. 2017. (5): 126.
14. ISO 6222:1999. Water Quality – Enumeration of culturable microorganisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
15. Jerney J., Spilling K. Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. *Methods in Molecular Biology*. 2018. (DOI 10.1007/7651_2018_130)
16. Koller M., Muhr A., Braunegg G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 2014. (6): 52–63
17. Krienitz L., Huss, Bock C. Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, V. A.R. 2015. 20(2): 67-69.
18. Lesaulnier C. C., Herbold C. W., Pelikan C., Berry D., Gérard C., Coz X. L., Liu G., Bakker G.L., Li S., Vreeburg J.H., Verberk J.Q., Medema G.J., Liu W.T., Van Dijk J.C. Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. *Environ Sci. Technol*. 2014. 48: 5467-76.
19. Oilgae.com: Algae Business Opportunities Consulting. (URL: www.oilgae.com).
20. Singhn S.P., Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015. 50: 431-444.

21. Walker T.L., Purton S., Becker D.K., Collet C. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep.*, 2005. 24(11): 629-641.
22. Zhan J., Rong J., Wang Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International journal of hydrogen energy*. 2017. 42: 8505-8517.
23. Wang H, Zhang W, Chen L, Wang J, Liu T (2013) The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresour Technol.* 2013. 128: 745-750.

Образец ссылки на статью:

Немцева Н.В. Санитарные аспекты культивирования микроводорослей. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2018. 1: 10с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-1/Articles/NVN-2018-1.pdf>). **DOI:** 10.24411/2304-9081-2018-11007.