Статья поступила в редакцию 27.02.12. Ред. рег. № 1251 The article has entered in publishing office 27.02.12. Ed. reg. No. 1251

УДК 577.121.2::[579:581.132.1/.2]:628.336.6

ТРАНСФОРМАЦИЯ БИОМАССЫ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕТАН

О.В. Сенько, М.А. Гладченко, И.В. Лягин, А.Б. Никольская, О.В. Маслова, Н.И. Чернова, С.В. Киселева, Т.П. Коробкова, Е.Н. Ефременко, С.Д. Варфоломеев

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4
Тел.: +7(495)9393170, факс: +7(495)9395417, e-mail: elena_efremenko@list.ru

Заключение совета рецензентов: 11.03.12 Заключение совета экспертов: 15.03.12 Принято к публикации: 20.03.12

В работе показана возможность трансформации термолизованной биомассы различных фототрофных микроорганизмов в метан под действием анаэробного активного ила с эффективностью метаногенеза до 70%. Установлено, что оптимальной концентрацией термолизованной биомассы, вводимой в реактор для метаногенеза, является 3 г ХПК/л. Продуктивность процесса по отдельным образцам биомассы (*Nannochloropsis sp.* и *Arthrospira platensis*) 15,95 и 12,59 мл CH_4/г сух. в./сут, соответственно, достигнута за непродолжительный временной интервал (17 сут) при 10%-й загрузке реактора по активному илу, сопоставима с достижениями мирового уровня или превосходит их.

Ключевые слова: фототрофные микроорганизмы, микроводоросли, цианобактерии, биомасса, биотопливо, метан.

BIOMASS TRANSFORMATION OF PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS TO METHANE

O.V. Senko, M.A. Gladchenko, I.V. Lyagin, A.B. Nikolskaya, O.V. Maslova, N.I. Chernova, S.V. Kiseleva, T.P. Korobkova, E.N. Efremenko, S.D. Varfolomeyev

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS
4 Kosygin str., Moscow, 119334, Russia
Phone: +7 (495) 939-3170, Fax: +7 (495) 939-5417, e-mail: elena_efremenko@list.ru

Referred: 11.03.12 Expertise: 15.03.12 Accepted: 20.03.12

The transformation of thermally treated biomass of different phototrophic microorganisms to methane under the action of anaerobic activated sludge with methanogenesis efficiency up to 70% was shown in the work. Optimal concentration of thermally treated biomass introduced into methanogenesis reactor was 3 g COD/L. The productivities achieved with biomass samples of *Nannochloropsis sp.* and *Arthrospira platensis* were 15.95 and 12.59 mL CH_4/g d.w./d, respectively, and were obtained during short time (17 d) at 10% reactor workload by activated sludge, that exceeds all known analogues.

Keywords: phototrophic microorganisms, microalgae, cyanobacteria, biomass, biofuel, methane.

Елена Николаевна Ефременко

Сведения об авторе: д-р биол. наук, профессор, старший научный сотрудник ИБХФ РАН.

Образование: Технологический институт пищевой промышленности, Москва.

Область научных интересов: биофизика, биотехнология.

Публикации: более 100.

Сергей Дмитриевич Варфоломеев

Сведения об авторе: член-корр. РАН, д-р хим. наук, профессор, директор ИБХФ РАН.

Образование: химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова.

Область научных интересов: физическая химия, биофизика.

Публикации: более 200.

Введение

Сегодня в мире разрабатывается значительное количество различных технологий использования биомассы в качестве энергетических или сырьевых источников [1]. Поиски новых нетрадиционных источников сырья для возобновляемой энергетики выдвигают в разряд перспективных источников биомассу микроводорослей и цианобактерий, которая может быть переработана с получением различных видов биотоплив, в том числе метана [2]. Для получения метана можно использовать не только биомассу микроводорослей, но и отходы ее переработки, получаемые после выделения из клеток липидной части при производстве биодизеля или ценных биологически активных веществ (каротиноидов, антиоксидантов и др.) [2-3]. Полученный метан может быть использован как в виде топлива, так и в виде сырья для получения метанола, формальдегида, ацетилена в химической промышленности [4].

Применение биомассы фототрофных микроорганизмов для получения метана является весьма перспективным по ряду причин:

– при выращивании фототрофных микроорганизмов происходит утилизация углекислого газа, накапливающегося в окружающей среде и создающего парниковый эффект;

– биомассу фототрофных микроорганизмов можно получать, выращивая их на сточных водах, содержащих органические вещества (органические кислоты, спирты и др.) [5-6];

– отсутствие, в отличие от растений, в клетках микроводорослей и цианобактерий лигнина делает их переработку в метан более простой и эффективной, чем переработка биомассы целлюлозосодержащего сырья [7].

Известно, что химический состав исходного сырья влияет на выход CH_4, поскольку в зависимости от того, какой класс веществ (липиды, углеводы, белки) преобладает в органических отходах, меняется состав биогаза и доля метана в нем [2]. Микроводоросли и цианобактерии имеют, как известно, различный биохимический состав, зависящий не только от природы фототрофных микроорганизмов, но и от условий их культивирования [8]. В этой связи тип микроорганизмов с различным биохимическим составом должен влиять на выход метана при переработке их биомассы.

Целью настоящей работы являлось получение максимальной степени конверсии биомассы различных фототрофных микроорганизмов в метан за минимально возможное время при использовании анаэробного ила в процессе метаногенеза и выбор источника биомассы, обеспечивающего максимальную продуктивность процесса.

Методика эксперимента

В работе использовались фототрофные микроорганизмы, выделенные в результате экспедиционных исследований, а также полученные в результате селекционной работы, проведенной авторами данной статьи: *Dunaliella salina Teod*. штамм *rsemsu-D-1*, *Dunaliella tertiolecta Butch.* штамм *rsemsu-D-3, Nannochloropsis sp*. штамм *rsemsu-N-1, Arthrospira/Spirulina platensis (NORDST.) GEITL.* штамм 1/02-П.

Клетки *Nannochloropsis sp*. штамм *rsemsu-N-1* выращивались на среде BG-11 без добавки и с добавкой 30 г/л NaCl; *Dunaliella tertiolecta* штамм *rsemsu-D-3* и *Dunaliella salina* штамм *rsemsu-D*-1 – на среде Семененко-Абдуллаева; *Arthrospira/Spirulina platensis* штамм 1/02-П – на среде Заррука [9]. Культивирование микроводорослей и цианобактерий проводилось при 24±2 °С при барботаже смесью углекислого газа и воздуха (2 об.% CO_2) и освещении в течение 16 ч из 24 ч лампами ДРЛФ-400 (45-60 мкЕ/($м^2$·с)).

Кроме того, получение биомассы *A. platensis* шт. 1/02-П и *Dunaliella tertiolecta* штамм *rsemsu–D-3* осуществлялось в лабораторной установке для культивирования микроводорослей открытым способом [10] в условиях физиологического стресса, сочетающего повышенную инсоляцию до 250 мкЕ/($м^2$·с) и отсутствие в питательной среде источников азота и фосфора. Выращенную обычным способом в стерильных условиях биомассу клеток *A. platensis* и *D. tertiolecta* отделяли от культуральной жидкости: *A. platensis* – фильтрацией до пастообразного состояния на ситах из нержавеющей и низкоуглеродистой проволоки с размером ячеек 150–200 мкм (ТУ 14-4-507-99, Россия), а *D.tertiolecta* – центрифугированием (3000 об/мин, 5 мин). Полученную биомассу помещали в плоскостные открытые культиваторы лабораторной установки [10] с использованием CO_2 в качестве источника углерода, заполненные 20 л питательной среды без азота и фосфора. Система освещения включала в себя светильники с белыми светодиодами фирмы Edison Opto. Для получения максимальной и равномерной освещенности всей водной поверхности культиватора использовались рассеивающие линзы. Была создана освещенность, равная 250 мкЕ/($м^2$·с) (измерения проводились с помощью прибора Flux Apogee MQ-200). Осуществлялось регулярное механическое перемешивание среды со скоростью 0,1 м/с. Голодание клеток по азоту/фосфору и высокая освещенность создавали для культур физиологический стресс, при котором дальнейший рост и развитие клеток тормозились, но стимулировалась аккумуляция в них липидов. В условиях физиологического стресса культуры микроводорослей выдерживались в течение 3 суток, за это время контаминации посторонней микрофлорой не было выявлено. Чистота культур фототрофных микроорганизмов контролировалась с использованием микроскопа БИОМЕД (Россия).

Биомассу фототрофных микроорганизмов после их выращивания осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 5 мин). Навеску влажной биомассы ресуспендировали в воде до концентрации 10-20 г СВ/л и помещали в реактор для термообработки, которую проводили при 108 °С и 0,5 ати в течение 0,5 ч.

© Scientific Technical Centre «TATA», 2012

Определение содержания белков, липидов и углеводов в исследуемых образцах биомассы фототрофных микрооргнизмов проводилось согласно известным методикам [11-13].

Концентрация органических веществ, подлежащих окислению (ХПК, г/л), определялась известным методом [14], в котором в качестве окислителя использовался бихромат калия, а в качестве контрольного окисляемого субстрата – глюкоза. Концентрацию продукта восстановления $Cr_2O_7^{2-}$ детектировали спектрофотометрически при 600 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (Япония).

В качестве биокатализатора метаногенеза использовался анаэробный ил, взятый с очистных сооружений завода по изготовлению чипсов ФритоЛей (г. Кашира) из действующего анаэробного реактора. Анаэробный ил имел следующие характеристики, определение которых было проведено в соответствии с известной методикой [15]: беззольное вещество биомассы (БВБ) – 35,5 г/л; метаногенная активность – 252,3 мг ХПК/г БВБ/сут; сухой вес – 57,2 г/л; зольность – 38,0%.

Для всех исследованных образцов биомассы фототрофных микроорганизмов было определено содержание органических веществ в расчете на 1 г сухих веществ (г ХПК/г СВ) (табл. 1) согласно известным методикам [14, 16].

Таблица 1

Характеристика термообработанных образцов биомассы фототрофных микроорганизмов, использованных для получения метана

Table 1

Characteristics of samples thermotreated biomass of phototrophic microorganisms used for methane production

№	Штамм	Условия культивирования	Содержание, г углерода/г СВ				ХПК, г/г СВ
			липиды	белки	углеводы	общее	
1	*Arthrospira platensis*	Среда Заррука + CO_2	0,148±0,007	0,216±0,008	0,181±0,007	0,545±0,007	1,68±0,04
2		Среда Заррука + +физиологический стресс* + + CO_2	0,239±0,009	0,212±0,008	0,108±0,006	0,559±0,007	1,73±0,05
3	*Dunaliella salina*	Среда Семененко-Абдуллаева + + CO_2	0,139±0,006	0,166±0,007	0,207±0,008	0,512±0,007	1,58±0,04
4	*Nannochloropsis sp.*	Среда BG-11 + CO_2	0,194±0,008	0,037±0,002	0,244±0,008	0,475±0,006	1,47±0,03
5		Среда BG-11 + + 30г/л NaCl + CO_2	0,124±0,006	0,094±0,004	0,211±0,008	0,429±0,006	1,34±0,02
6	*Dunaliella tertiolecta*	Среда Семененко-Абдуллаева + + CO_2	0,071±0,003	0,029±0,001	0,309±0,011	0,409±0,006	1,28±0,02
7		Среда Семененко-Абдуллаева + + физиологический стресс* + + CO_2	0,182±0,007	0,044±0,003	0,225±0,008	0,451±0,007	1,40±0,02

* – физиологический стресс создавали, как описано в Экспериментальной части.

Для определения биоконверсии в метан термообработанной биомассы фототрофных микроорганизмов в анаэробные реакторы объемом 120 мл вносили по 45 мл исследуемого образца, разбавленного минеральной средой до концентраций по органическим веществам 3-6 г ХПК/л. Для приготовления 1 л минеральной среды использовали 10 мл раствора А и 1,4 мл раствора Б. pH полученных образцов доводили до 7,5 раствором 60,4 г/л Na_2HPO_4, при этом растворы А и Б имели следующий состав: раствор А (г/л): NH_4Cl – 100; KH_2PO_4 – 37; $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ – 8; $MgSO_4{\cdot}4H_2O$ – 9; раствор Б (мг/л): $FeCl_3{\cdot}4H_2O$ – 2000; $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ – 2000; $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ – 500; $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ – 30; $ZnCl_2$ – 50; H_3BO_3 – 50; $(NH_4)_6Mo_7O_2{\cdot}4H_2O$ – 90; $Na_2SeO_3{\cdot}5H_2O$ – 100; $NiCl_2{\cdot}6H_2O$ – 50. Величина pH контролировалась потенциометрически (pH-метр Corning Pinnacle 530, Швейцария).

Процесс метаногенеза проводили при термостатировании реакторов с образцами биомассы фототрофных микроорганизмов при 35 °C.

Для учета выделения метана за счет возможного лизиса клеток микроорганизмов, входящих в состав анаэробного ила, параллельно проводился контрольный опыт, аналогичный описанному выше, в котором вместо 45 мл образца предобработанной биомассы вносили такой же объем минеральной среды.

Через определенные промежутки времени измерялись в каждом реакторе общее давление и концентрация метана в газовой фазе. Эти измерения проводили до установления постоянного содержания метана в газовой фазе реактора.

Анализ содержания газов в реакторе для метаногенеза проводился с использованием газовой хроматографии (ЛХМ 8 МД – модель 3 с катарометром), газ-

носитель – аргон, скорость газа-носителя – 20 мл/мин. Колонки длиной 2 м заполнены порапаком QS. При температуре термостата колонок 50 °С время удержания метана составляло 112 с [17].

Эффективность метаногенеза рассчитывали по уравнению: Э = ($CH_{4\ практ}$/Max $CH_{4\ теор}$)·100, %; где $CH_{4\ практ}$ – объем метана, образующийся в реакторе с исследуемым образцом биомассы фототрофных микроорганизмов, мл:

$$CH_{4\ прак} = \left(\frac{P_{CH_4} P_{общ} T_0 V_{г.ф.}}{T_1 P_0}\right)_{проба} - \left(\frac{P_{CH_4} P_{общ} T_0 V_{г.ф.}}{T_1 P_0}\right)_{конт.},$$

где P_{CH_4} – содержание метана в газовой фазе, %; $V_{г.ф.}$ – объем газовой фазы в реакторе, л; T_0 – температура при нормальных условиях, 273 К; T_1 – рабочая температура в реакторе, К; P_0 – давление при нормальных условиях, 1 атм; $P_{общ}$ – общее давление в реакторе, атм; Max $CH_{4\ теор}$ – теоретический максимально возможный объем CH_4, мл; Max $CH_{4\ теор}$ = = ($C_Н$·$V_{ж.ф.}$)·0,35·1000, где $V_{ж.ф.}$ – объем жидкой фазы в реакторе, л; $C_Н$ – начальная концентрация органических веществ в образце биомассы фототрофных микроорганизмов, г $ХПК_{общ}$/л; 0,35 – объем метана, образующийся из 1 г ХПК при 273 К, л.

Под удельной продуктивностью метаногенеза подразумевается количество метана, образовавшегося из 1 г сухих веществ (СВ) субстрата за 1 сутки под действием анаэробного ила, внесенного в реактор (л/л).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы были охарактеризованы все исследованные образцы биомассы фототрофных микроорганизмов с точки зрения содержания в них органических веществ в расчете на 1 г сухих веществ (г ХПК/г СВ) (табл. 1). Было установлено, что, несмотря на варьирование соотношения белков, липидов и углеводов в составе образцов биомассы клеток фототрофных микроорганизмов, обусловленных не только природными характеристиками культур, но и изменением условий их культивирования, значение ХПК во всех образцах практически не отличалось и в среднем составляло 1,52 ± 0,03 г/г СВ.

Для выбора условий проведения метаногенеза при минимальной загрузке реактора по анаэробному илу была определена оптимальная исходная концентрация субстрата на примере биомассы клеток цианобактерий *A. platensis* (табл. 1). Проведение мониторинга образования метана – основного продукта метаногенеза (табл. 2) позволило сделать вывод о том, что концентрация 3 г ХПК/л уже является насыщающей для использованной концентрации активного ила (10%-я загрузка реактора), так как увеличение нагрузки реактора по субстрату не приводило к изменению скорости накопления метана и повышению его выхода. Вследствие этого далее в экспериментах использовали именно эту концентрацию ХПК.

Таблица 2

Накопление метана в процессе анаэробного биоразложения биомассы клеток *A. platensis*

Table 2

Methane accumulation within anaerobic biodestruction of biomass of *A. platensis*

Внесенная биомасса, г ХПК/л	Характеристики процесса	Время, сут			Max CH_4 теор., мл
		3	10	17	
3	CH_4 практ, мл	1,5±0,07	17,9±0,7	28,9±1,34	52,5
	Эффективность метаногенеза, %	2,8±0,1	34,0±1,7	55,0±2,7	
4,5	CH_4 практ, мл	2,2±0,09	25,0±1,2	40,0±1,9	78,8
	Эффективность метаногенеза, %	2,8±0,1	31,8±1,5	50,8±2,0	
6	CH_4 практ, мл	2,4±0,09	28,6±1,3	43,9±2,2	105,0
	Эффективность метаногенеза, %	2,3±0,09	27,3±1,3	41,8±2,0	

Далее все образцы термообработанной биомассы фототрофных микроорганизмов с исходной концентрацией от 1,2 до 1,7 г ХПК/г СВ (табл. 1) использовались для приготовления сред, содержащих по 3 г ХПК/л, которые были подвергнуты прямому анаэробному сбраживанию при мезофильных условиях (35 °С).

Как следует из результатов мониторинга накопления метана (табл. 3), наиболее высокие концентрации целевого продукта метаногенеза были получены при трансформации биомассы клеток *Nannochloropsis* sp. (образцы №4 и №5) и *A. platensis* (образец №1). Следует отметить, что в этой статье впервые показана не только возможность, но и высокая эффективность трансформации в метан биомассы клеток *Nannochloropsis* sp., культивируемых в промышленных масштабах, в частности, компанией Seambiotic (Израиль).

© Scientific Technical Centre «TATA», 2012

Следует отметить, что традиционно в исследованиях при получении метана из биомассы фототрофных микроорганизмов анаэробный ил вводится в реактор в концентрации 10-25% (табл. 4). При этом проведение метаногенеза наиболее предпочтительно, с практической точки зрения, при использовании минимальной (10%) концентрации анаэробного ила, поскольку он характеризуется низкими скоростями роста и увеличение его концентрации в реакторе требует дополнительных существенных временных затрат для его накопления в больших количествах перед началом основного процесса.

Таблица 3

Накопление метана в процессе анаэробного биоразложения биомассы различных фототрофных микроорганизмов

Table 3

Methane accumulation within anaerobic biodestruction of biomass of different phototrophic microorganisms

№ образца*	Характеристики процесса	Время, сут		
		3	10	17
1	CH_4 практ, мл	1,5±0,07	17,9±0,7	28,9±1,34
	**Эффективность метаногенеза, %	2,8±0,1	34,0±1,7	55,0±2,7
2	CH_4 практ, мл	0,5±0,02	11,6±0,5	15,7±0,6
	Эффективность метаногенеза, %	0,9±0,03	22,1±1,0	30,0±1,5
3	CH_4 практ, мл	0,1±0,00	5,5±0,2	8,6±0,4
	Эффективность метаногенеза, %	0,2±0,01	10,4±0,4	16,4±0,6
4	CH_4 практ, мл	1,6±0,07	17,2±0,7	28,9±1,4
	Эффективность метаногенеза, %	3,0±0,1	32,8±1,6	55,0±2,7
5	CH_4 практ, мл	3,3±0,1	25,3±1,1	36,6±1,7
	Эффективность метаногенеза, %	6,2±0,2	48,2±2,4	69,7±3,4
6	CH_4 практ, мл	0	0,4±0,02	0,7±0,02
	Эффективность метаногенеза, %	0	0,7±0,02	1,3±0,05
7	CH_4 практ, мл	1,9±0,08	13,8±0,6	18,0±0,7
	Эффективность метаногенеза, %	3,6±0,2	26,3±1,2	34,3±1,6

* – номер образца соответствует тому, что указан в табл. 1.

** – расчет произведен исходя из того, что теоретический максимально возможный объем CH_4 составил 52,5 мл.

Таблица 4

Характеристики метаногенеза, реализуемого с использованием биомассы различных фототрофных микроорганизмов

Table 4

Characteristics of methanogenesis realized by the use of biomass of various phototrophic microorganisms

Субстрат	Удельная продуктивность процесса, мл CH_4/г СВ/сут	Загрузка реактора по анаэробному илу, %	Источник
Chlorella vulgaris	58,4	10,0	[18]
Chlorella sp.	157,6	12,5	[19]
Arthrospira platensis	38,2	24,0	[20]
Dunaliella salina	42,1		
Arthrospira platensis	125,9	10,0	Данная работа
Nannochloropsis sp.	159,5		

Анализ литературных данных показал, что в сравнении с другими исследованиями по конверсии биомассы фототрофных микроорганизмов в метан (табл. 4) получаемая за довольно короткий временной интервал удельная продуктивность процесса сопоставима или большей частью превосходит известные аналоги при том, что процесс в данной работе был реализован с минимальной загрузкой реактора по анаэробному илу (10%), принятой к использованию на практике.

Заключение

В данной работе был реализован процесс метаногенеза с использованием термолизованных клеток пяти различных культур фототрофных микроорганизмов, биомасса которых накапливалась в различных условиях культивирования и характеризовалась разным биохимическим составом. Установлено, что наилучшими из исследованных с точки зрения эффективности метаногенеза являются образцы биомассы клеток *Arthrospira platensis* и *Nannochloropsis sp.* Наиболее эффективным способом метаногенной трансформации биомассы микроводорослей и цианобактерий в метан оказалось введение образцов биомассы в концентрации 3 г ХПК/л в анаэробный реактор при его 10%-й загрузке по анаэробному илу. Эти условия позволили достичь продуктивности процесса метаногенеза, превышающей многие аналоги, известные из литературы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобразования и науки РФ (ГК № 16.512.11.2181).

Список литературы

1. Варфоломеев С.Д., Ефременко Е.Н., Крылова Л.П. Биотоплива // Успехи химии. 2010. Т. 79, № 6. С. 544–564.

2. Sialve B., Bernet N., Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable // Biotechnol. Adv. 2009. Vol. 27, No. 4. P. 409–416.

3. Чернова Н.И., Киселева С.В., Коробкова Т.П., Зайцев С.И. Микроводоросли в качестве сырья для получения биотоплива // Альтернативная энергетика и экология – ISJAEE. 2008. № 9. С. 68–74.

4. Ельчанинов Е.А., Ельчанинова Е.А. Промышленное использование метана угольных пластов для создания и развития малой химии // Горный информационно-аналитический бюлл. 2007. Т. 6. С. 143–149.

5. Kong Q., Li L., Martinez B., Chen P., Ruan R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 160, No. 1. P. 9–18.

6. Woertz I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock // J. Environ. Eng. 2009. Vol. 135, No. 11. P. 1115–1122.

7. Моисеев И., Тарасов В., Трусов Л. Эволюция биоэнергетики – время водорослей // The Chemical Journal. 2009. Т. 12. С. 24–29.

8. Никольская А.Б., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Трансформация биомассы фототрофных микроорганизмов в биотоплива // Сб. тр. межд. науч.-практ. конф. «Рациональное использование ресурсного потенциала регионов России и сопредельных государств». Брянск, Россия. 2011. С. 118–125.

9. Algae. Consolidated catalogue of microbial cultures held in russian non-medical collections. M.: Всеросс. коллекция микроорганизмов, 2001.

10. А. с. 1834292 СССР МКИ3 A1 C12M 1/00, A01G 31/02. Установка для культивирования микроводорослей / Алексеев В.В., Лямин М.Я., Чекарев К.В., Соловьев А.А. // Открытия. Изобретения. 1992. № 11.

11. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research (Third Edition). Oxford: Oxford Science Publications, 1986.

12. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, No. 1. P. 497–509.

13. 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. Vol. 28, No. 3. P. 350–356.

14. Dubber D., Gray N.F. Replacement of chemical oxygen demand (COD) with total organic carbon (TOC) for monitoring wastewater treatment performance to minimize disposal of toxic analytical waste // J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2010. Vol. 45, No. 12. P. 1595–1600.

15. Hooijmans C.M., Veenstra S., Lubberding H.J. (Ed. G. Lettinga) Laboratory course process parameters and microbiology. International course in anaerobic wastewater treatment. Wageningen (Netherlands): Delft. Agricultural University, 1990.

16. Gnaiger E., Bittcrlich G. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept // Oecologia. 1984. Vol. 62. P. 289–298.

17. Kalyuzhnyi S., Gladchenko M., Starostina E., Shcherbakov S., Versprille B. Integrated biological (anaerobic-aerobic) and physico-chemical treatment of baker's yeast wastewater // Water Sci. Technol. 2005. Vol. 52, No. 10–11. P. 273–280.

18. Lakaniemi A.-M., Hulatt C.J., Thomas D.N., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass // Biotechnol. Biofuels. 2011. Vol. 4. P. 34–46.

19. Mussgnug J.H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept // J. Biotechnol. 2010. Vol. 150. P. 51–56.

20. Ehimen E.A., Sun Z.F., Carrington C.G., Birch E.J., Eaton-Rye J.J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process // Appl. Energ. 2011. Vol. 88, No. 10. P. 3454–3463.

© Scientific Technical Centre «TATA», 2012