

РОССИЙСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМ. Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА

На правах рукописи

**КУЗНЕЦОВ  
АЛЕКСАНДР ЕВГЕНЬЕВИЧ**

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ  
СОВМЕЩЕННЫЕ СИСТЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА  
И ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД С ОКСИДАТИВНЫМ СТРЕССОВЫМ  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Москва  
2021

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	8
Глава 1. Расширение возможностей совершенствования и экологизации процессов ферментации и биологической очистки с учетом особенностей функционирования устойчивых природных экосистем	16
1.1. Экологически чистые методы в совершенствовании процессов ферментации и биологической очистки	16
1.1.1. Совершенствование процессов ферментации	16
1.1.2. Совершенствование процессов биологической очистки сточных вод	17
1.2. Совмещенные системы в процессах ферментации и биологической очистки	25
1.2.1. Системы с селективным извлечением продуктов биосинтеза	26
1.2.2. Мембранный биореактор	27
1.2.3. Совмещение химических, фотохимических и биологических реакций	38
1.2.4. Абиотические природные процессы самоочищения и их использование в совмещенных системах биосинтеза и биологической очистки	43
Глава 2. Стресс и системы ответа на стресс у микроорганизмов	51
2.1. Понятие стресса, уровни ответа на стресс и его виды	51
2.2. Адаптивные реакции у микроорганизмов на популяционном уровне при стрессовых воздействиях	53
2.3. Ответ на стресс на клеточном уровне	59
2.3.1. Поддержание гомеостаза и системы ответа на стресс-факторы	60
2.3.2. Общий ответ на стресс и система строгого контроля	60
2.3.3. Осмотический стресс	62
2.3.4. Ответ на кислотный стресс	64
2.3.5. Тепловой шок	65
2.3.6. Холодовый шок	70
2.3.7. Ответ на действие токсичных веществ	72
2.4. Оксидативный стресс	74
2.4.1. Ответ на оксидативный стресс у микроорганизмов на клеточном уровне	76

	3
2.4.1.1. Вещества-антиоксиданты	77
2.4.1.2. Энзиматическая защита при оксидативном стрессе	80
2.4.2. Ответ на генетическом уровне у прокариотических микроорганизмов	85
2.4.3. Ответ на генетическом уровне у эукариотических микроорганизмов	88
2.4.4. Адаптация микроорганизмов к оксидативному стрессу	90
2.4.5. Перекрестные ответы при оксидативном стрессе	92
2.4.6. Регуляторные функции пероксида водорода и других АФК	105
2.5. Системы репарации при повреждении ДНК	106
2.6. Перекрестные реакции между системами ответа на оксидативный стресс и репарацией	115
2.7. Проявление светочувствительности при культивировании изначально нефоточувствительных микроорганизмов	116
2.8. Управляемый стресс и его практическое использование	120
Глава 3. Объекты исследования и их особенности	132
3.1. Получение продуктов микробиологического синтеза	132
3.1.1. Высокоплотностное культивирование как вариант малоотходного процесса для получения кормовых продуктов	133
3.1.2. Получение этанола	136
3.1.3. Получение молочной кислоты из углеводного сырья	140
3.1.3.1. Основные сферы применения молочной кислоты	140
3.1.3.2. Молочная кислота, основные особенности ее получения микробиологическим синтезом, выделения и очистки	141
3.1.3.3. Виды и штаммы микроорганизмов для получения молочной кислоты	143
3.1.3.4. Особенности молочнокислых бактерий как объектов исследования и основные условия культивирования при биосинтезе молочной кислоты	146
3.1.3.5. Способы интенсификации процесса культивирования молочнокислых бактерий и биосинтеза молочной кислоты	148
3.1.4. Галобактерии и бактериородопсин как объекты исследования и практического применения	154
3.1.4.1. Бактериородопсин и пурпурные мембраны галобактерий	154
3.1.4.2. Практическая значимость бактериородопсина и галобактерий	158
3.1.4.3. Особенности галобактерий как объектов исследования и культивирования	164

3.1.5. Культивирование рекомбинантных штаммов – трансформантов по рибофлавиновому оперону	179
3.1.5.1. Свойства рибофлавина как фотосенсибилизатора и вещества с антиоксидантной и прооксидантной активностью	179
3.1.5.2. Биохимические и генетические особенности синтеза рибофлавина у рекомбинантного продуцента <i>Bacillus subtilis</i>	181
3.1.5.3. Совершенствование ферментации при микробиологическом синтезе рибофлавина	184
3.2. Биологическая очистка сточных вод	186
3.2.1. Концентрированные стоки	189
3.2.2. Модельные и реальные фенолсодержащие стоки	194
3.2.3. Сточные воды пивоваренной промышленности	197
3.2.4. Образование гранул ила в аэробных условиях и SB-реакторы	199
3.2.5. Биопленки как объект исследований	207
3.2.5.1. Особенности биопленок как гетерогенных систем	207
3.2.5.2. Регуляция физиологической активности в микробных биопленках	210
3.2.6. Удаление биогенных элементов	212
3.2.6.1. Биологическое удаление соединений азота	213
3.2.6.2. Биологическое удаление соединений фосфора	223
3.2.7. Альгобактериальные и цианобактериальные сообщества как объекты исследований при биологической очистке загрязненной воды	226
 Глава 4. Условия проведения экспериментов, материалы и методы анализа	 228
4.1. Описание лабораторных методов и установок для культивирования	228
4.1.1. Методики культивирования в планшетах, пробирках, колбах и лабораторных сосудах	228
4.1.2. Культивирование в лабораторных биореакторах стандартными методами	234
4.1.3. Эксперименты с освещением ферментационной среды видимым светом и облучением мягким ультрафиолетом	236
4.1.4. Культивирование в лабораторных биореакторах модифицированными методами	238
4.2. Получение изолятов (накопительных культур) и процедура адаптации микроорганизмов к удаляемым загрязнениям и воздействию стрессоров	247
4.3. Основные среды культивирования	248

	5
4.3.1. Агаризованные среды	248
4.3.2. Жидкие питательные среды	248
4.4. Методы анализа	250
4.4.1. Физико-химические и химические методы анализа	250
4.4.2. Микробиологические методы анализа	254
4.4.3. Оценка и контроль морфологического, физиолого-биохимического состояния популяций микроорганизмов и их сообществ	255
4.4.4. Биохимические и молекулярно-генетические методы анализа и контроля	258
Глава 5. Совмещенные экологически чистые методы культивирования микроорганизмов при получении продуктов биосинтеза	262
5.1. Культивирование молочнокислых бактерий в МБР с целью получения молочной кислоты	263
5.1.1. Выбор штаммов-продуцентов	265
5.1.2. Влияние условий культивирования на рост штамма-продуцента и синтез молочной кислоты	267
5.1.3. Непрерывное и отъемно-доливное культивирование штамма-продуцента в мембранном биореакторе	272
5.2. Культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий с оксидативным воздействием	290
5.2.1. Высокоплотностное культивирование дрожжей <i>Candida tropicalis</i> в периодических условиях с подпиткой субстратом и использованием оксидативного воздействия	291
5.2.2. Возникновение фоточувствительности у дрожжей в условиях оксидативного стресса	298
5.2.3. Культивирование дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с оксидативным воздействием	308
5.2.4. Культивирование молочнокислых бактерий с оксидативным воздействием	330
5.2.4.1. Адаптация к оксидативному стрессу и изменение показателей культивирования	331
5.2.4.2. Культивирование адаптированной к оксидативному стрессу линии в биореакторе	340
5.3. Культивирование галобактерий с целью получения бактериородопсина	345
5.3.1. Выбор исходных и получение мутантных штаммов	346

5.3.2. Выявление основных факторов, определяющих активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина	351
5.3.3. Исследование эффекта «старения» среды	361
5.3.4. Влияние пероксида водорода и мягкого УФ-излучения	364
5.3.5. Разработка способов культивирования в условиях контролируемого оксидативного воздействия	366
5.3.5.1. Подготовка посевного материала	366
5.3.5.2. Культивирование в доливном режиме	369
5.3.5.3. Культивирование с внесением антиоксидантов	370
5.3.5.4. Подбор условий освещения	371
5.3.5.5. Культивирование с селективным извлечением ингибиторов сорбентом в процессе роста	372
5.3.6. Оценка технико-экономических показателей получения бактериородопсина по разработанному способу в сравнении с другими вариантами	384
5.4. Культивирование продуцентов рибофлавина и трансформантов по рибофлавиновому оперону	386
5.4.1. Используемые штаммы и процедура анализа генетического ответа	387
5.4.2. Адаптация к контролируемому оксидативному воздействию и ее влияние на устойчивость ростовых показателей популяции и биосинтез рибофлавина	388
5.4.3. Апробация различных приемов снижения неблагоприятных воздействий стрессоров в отношении биосинтетической активности продуцента и реверсии штамма к дикому типу	394
5.4.3.1. Влияние «старения» среды на биосинтез	394
5.4.3.2. Изменение параметров культивирования: аэрации и освещенности	396
5.4.3.3. Вывод рибофлавина из зоны ферментации путем его поглощения адсорбентом	401
5.4.3.4. Внесение химических антиоксидантов в среду культивирования	402
5.4.4. Ферментация в биореакторе с учетом оксидативных воздействий	402
Глава 6. Совмещенные экологически чистые методы биологической очистки сточных вод	408
6.1. Очистка стоков спиртовой и пивоваренной промышленности	408
6.1.1. Биологическая очистка реальных и модельных стоков солодовни	408

6.1.2. Очистка в условиях контролируемого оксидативного воздействия в периодическом режиме	411
6.1.3. Очистка в условиях контролируемого оксидативного воздействия в непрерывном режиме	414
6.2. Биодеструкция фенола	430
6.2.1. Получение изолятов микроорганизмов – деструкторов фенола	431
6.2.2. Биодеструкция фенола в проточных условиях	433
6.2.3. Биодеструкция фенола в проточных условиях с внесением пероксида водорода	434
6.2.4. Биодеструкция фенола при культивировании с подпиткой с внесением пероксида водорода	436
6.3. Биологическая очистка модельных стоков с образованием биопленок и гранул ила в аэробных условиях и с оксидативным воздействием	443
6.3.1. Изменение показателей очистки при оксидативном воздействии на модельные стоки в отъемно-доливном режиме	443
6.3.2. Образование биопленок в аэробных условиях с контролируемым оксидативным воздействием	453
6.3.3. Образование гранул ила в аэробных условиях с контролируемым оксидативным воздействием	458
6.4. Биологическая очистка в мембранном биореакторе с оксидативным воздействием	478
6.5. Исследование роста микроводорослей и цианобактерий применительно к условиям биологической очистки с контролируемым оксидативным воздействием	483
6.6. О возможных причинах позитивных изменений при оптимальных воздействиях пероксида водорода и других АФК	495
6.7. Опытные испытания технологии биологической очистки сточных вод с использованием регулируемого оксидативного воздействия	500
6.7.1. Опытные испытания РОВ-технологии на поселковых очистных сооружениях	500
6.7.2. Опытные испытания РОВ-технологии на городских очистных сооружениях	503
6.7.3. Оценка затрат при использовании РОВ-технологии	506
Заключение	513
Выводы	522
Список литературы	527
Приложения	679

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Культивирование микроорганизмов является хорошо изученной и освоенной стадией, ставшей уже рутинной в технологиях биосинтеза, биопереработки, биологической очистки. Вместе с тем, как ключевая стадия, на которую приходится 10–90% затрат в себестоимости продукции, она по-прежнему остается основным объектом исследований и совершенствования в биотехнологии и биоинженерии.

С точки зрения все возрастающих эколого-экономических требований традиционные представления об экологичности технологии связаны с минимизацией отходов и загрязнений, поступающих в окружающую среду. В таких технологиях широко используются процессы очистки и переработки побочных потоков «на конце трубы» (end-of-pipe processes). Это требует больших капиталовложений в очистные сооружения, в установки переработки отходов.

С другой стороны, наиболее передовая зарубежная практика, не отвергая традиционные варианты совершенствования методов ферментации и технологических решений, демонстрирует, что экологические требования к технологиям и биотехнологиям в современных условиях должны формироваться с учетом методологии **экологически чистых производств**, использования **превентивных методов** устранения загрязнений и отходов, оценки риска их воздействия на окружающую среду и человека, затрат на снижение риска, а также с анализом жизненного цикла внедряемых технологий и продуктов [1]. При этом, следуя таким приоритетам в решении вопросов охраны окружающей среды, как «Предотвращение образования отходов и загрязнений» и «Уменьшение образования отходов и загрязнений», повышенные экологические требования должны предъявляться и к природоохранным технологиям: очистке сточных вод и газовоздушных выбросов, переработке вторичных отходов, ремедиационным мероприятиям. В этой связи возникает задача оптимального сочетания требований невысокой цены, высокого качества и соблюдения экологических стандартов. Решение этой задачи обусловлено наличием рациональных инструментов стимулирования природоохранной деятельности, экологически и экономически эффективных технологий и производств.

Надо отметить, что в настоящее время не существует согласованного единого определения экологически чистого производства (чистого производства). Программой защиты окружающей среды ООН (ЮНЕП) и Организацией объединенных наций по промышленному развитию (ЮНИДО) чистое производство (Cleaner Production) было определено как непрерывное использование совокупной превентивной стратегии защиты окружающей среды для процессов и изделий с целью снижения

как ближайших, так и отдаленных рисков для человека и окружающей среды [1]. В развернутом понимании под чистым производством чаще всего подразумевают более глобальный превентивный подход к защите окружающей среды, который бы адресовался ко всем фазам производства или жизненного цикла продукции.

Основные принципы, особенности и подходы методологии экологически чистых производств, ряд примеров ее использования для совершенствования методов переработки органических отходов и биологической очистки сточных вод были рассмотрены подробно нами ранее [2]<sup>1</sup>.

В соответствии с пониманием чистого производства приоритеты в мероприятиях по снижению количества загрязнений в результате производственной деятельности располагаются следующим образом (в порядке убывания) [1]:

- предотвращение образования отходов и загрязнений,
- уменьшение образования отходов и загрязнений,
- повторное и циклическое использование отходов,
- обработка с восстановлением энергии и материалов,
- обезвреживание и нейтрализация отходов и загрязнений,
- удаление на конечном этапе («на конце трубы»).

Накопленный опыт показывает, что предотвращение загрязнения, в отличие от очистки «на конце трубы», является более выгодным с экономической точки зрения и лучше соответствует задачам устойчивого и экологически безопасного развития. Устранение загрязняющих агентов на месте или вблизи их источника обычно обходится дешевле, чем сбор, обработка и удаление отходов.

На сегодня многие российские приоритеты в охране окружающей среды не отвечают подходам чистого производства. Например, большинство из мероприятий, указанных в «Перечне превентивных природоохранных мероприятий» [3], разработанном в соответствии с инструктивно-методическими указаниями Минэкономки, Минфина, Минприроды, ориентировано на обработку отходов и обезвреживание загрязнений на конце технологической цепочки, т.е. не являются «превентивными». Предпочтение отдается решениям по удалению загрязняющих веществ в конце технологического процесса, что административно легче проконтролировать.

Анализ вариантов применения методологии экологически чистого производства в отношении микробиологического синтеза, биодеструкции и биологической очистки позволил акцентировать внимание на таких решениях, которые воспроизводят или моделируют процессы, протекающие в природных средах. Подробно наибо-

---

<sup>1</sup>Кузнецов А.Е. и др. Прикладная экобиотехнология : в 2 тт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – т. 1 – 629 с., т. 2 – 485 с. Переиздание 2012, 2015 гг.

лее важные особенности природных процессов, с акцентом на участие микроорганизмов, были рассмотрены нами ранее [4]<sup>1</sup>. Их характерные черты:

- **сочетание по месту и времени абиотических и биотических процессов** трансформации веществ в единой экологической нише;
- протекание процессов **самоочищения**, особенно важных для устойчивого функционирования замкнутых экосистем;
- отсутствие одновременно оптимальных, комфортных условий для всех организмов популяции или их сообществ, нахождение большей их части в неоптимальных условиях, в состоянии, характеризуемом как **стресс**;
- множественность устойчивых состояний сообществ.

В природных условиях биологические процессы протекают во взаимодействии с абиотическими: физическими, физико-химическими, химическими, фотохимическими. В наиболее яркой форме это наблюдается в тонком поверхностном слое почвы или воды, где одновременно бурно развивается жизнь, протекают химическая и фотохимическая трансформация и деградация различных веществ [4-9].

В традиционных методах культивирования обычно мало обращается внимания на такие природные факторы, как микрогетерогенности, градиенты субстратов и продуктов, стрессовые воздействия (дефицит питания, неоптимальные температура, рН, Eh, соленость, воздействие токсичных веществ, недостаток или избыток солнечного света, УФ-излучения, кислорода и его активных форм: перекисей, радикалов и т.д.), для противодействия которым микроорганизмы эволюционно выработали и используют различные антистрессорные системы ответа. Важна также структурная и пространственно-временная организация сообществ организмов, распределение их по экологическим нишам, функциональная роль отдельных групп микроорганизмов в единой системе. Не учитываются множественность устойчивых состояний сообществ [10, 11], чувствительность к слабым воздействиям [12, 13], наличие естественных периодичностей и биоритмов [14-17], распределение по экологическим нишам, возможное протекание абиотических реакций: каталитических, фотохимических, химических гидролитических, окислительно-восстановительных [4-7], их участие в процессах самоочищения [5, 8]. Такие экологические факторы «второго плана» могут не оказывать решающего влияния на живые организмы, но тем не менее в определенной мере воздействовать на ход биологических процессов. Целенаправленная и контролируемая реализация комплекса этих условий и процессов в единой биотехнологической системе создает основу для совершенствования методов управляемого культивирования микроорганизмов и означает переход от методов управля-

---

<sup>1</sup>Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.

емого культивирования к методам **управляемой экологической ниши**, в которой для микроорганизмов воспроизводится естественная среда обитания, моделируются природные экосистемы, круговороты веществ и их перенос по трофическим цепям. Такой подход может привести к созданию основ для разработки экологически дружелюбных биотехнологий нового поколения, в которых протекают целевые процессы и в то же время образуются минимальные количества отходов, загрязненных стоков, более рационально используются субстраты.

**Самоочищение природных сред** – это процесс совместного, во многом одновременного действия биоты, химически-активных частиц, активных форм кислорода – АФК ( $H_2O_2$  и др.), ионов железа, марганца и др. Очевидно, за долгое время эволюции живые организмы адаптировались к одновременному протеканию биотических и абиотических процессов. Изолированные и помещенные в искусственную среду обитания они лишаются привычных условий, даже при поддержании оптимальных значений таких традиционно контролируемых факторов как температура, рН, Eh, концентрации субстратов, доноров и акцепторов электронов.

Из рассмотрения микробных экосистем как единой, целостной совокупности абиотических и биотических процессов вытекает следующее положение: в биореакторах и биосистемах нового поколения должны поддерживаться не только оптимальные значения абиотических экологических факторов, но и воспроизводиться **совмещенные по месту и времени абиотические и биотические процессы**, благоприятно воздействующие на жизнедеятельность, физиологическое состояние и биологическую активность используемых организмов.

**Совмещенные процессы** повсеместно наблюдаются в природе. Например, одновременно и в одном и том же месте протекают процессы химического гидролиза и биодеструкции соединений, химического и биологического выщелачивания, окисления в водных и почвенных средах, включения остатков соединений в природные полимеры в результате химического и биологического катализа [4-7]. Биотехнологические системы, в которых целенаправленно реализуются с совмещением по месту и времени биотические и абиотические процессы в одной и той же системе культивирования, можно назвать **совмещенными**. При соответствующем инженерно-техническом оформлении такие **совмещенные (сопряженные, гибридные) системы** могут оказаться не только технологически и экономически эффективными, но и малоотходными, соответствующими критериям экологически чистых технологий.

К совмещенным процессам или системам могут быть отнесены:

– биологические и механические (рост микроорганизмов, микробиологический или ферментативный катализ или деструкция с одновременным разделением компо-

нентов ферментационной среды, с фракционированием клеток и внеклеточных продуктов биосинтеза мембранными методами, седиментацией, сепарацией);

- биологические и физические (синхронизация эндогенных биоритмов с экзогенными ритмами);

- биологические и физико-химические (рост микроорганизмов, биосинтез или биодеструкция с одновременным фракционированием и извлечением продуктов реакций физико-химическими методами: адсорбцией, экстракцией, осаждением, отгонкой и т.п.);

- биологические и химические (биологический и химический катализ на поверхности минералов в природных средах, биодеструкция органических соединений микроорганизмами и химическая деструкция активными формами кислорода, прооксидантное и антиоксидантное воздействие и др.);

- биологические и электрохимические (выщелачивание сульфидных минералов тиобактериями, культивирование железобактерий в биореакторе с электрохимическим регенерированием ионов  $Fe^{2+}$ );

- биологические и фотохимические (например, деструкция органических соединений при одновременном воздействии микроорганизмов и мягкого ультрафиолетового излучения УФА и УФБ- диапазонов);

- биологические и биологические (примеры – анаэробные и аэробные, нитрификация и денитрификация, биосинтез и биодеструкция).

В той или иной форме совмещенные процессы наблюдаются в различных системах культивирования микроорганизмов: при сочетании биологического процесса с отводом части продуктов из зоны реакции, если микробные клетки удерживаются в зоне реакции (при иммобилизации, фиксации, механическом удерживании, биобрастаниях), при одновременном протекании анаэробных и аэробных процессов в биопленках, гранулах, микроагрегатах, различных зонах биореакторов.

Не всегда можно вычленить совмещенные процессы как методы управляемого биосинтеза и биодеструкции из других, традиционных вариантов.

Возможные отличительные признаки совмещенных процессов:

- в традиционных биотехнологиях биообъект изолируют от окружающей среды, в совмещенных процессах – встраивают в условия, приближенные к природным;

- управляемый биологический процесс протекает в условиях, имитирующих естественные, в отличие от традиционного подхода с поддержанием лишь наиболее важных параметров среды при проведении процесса в биореакторах или других системах культивирования микроорганизмов;

- контроль и использование для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов таких факторов окружающей среды, как микрогетерогенность сред, наличие

градиентов концентраций субстратов и продуктов реакций, реакционно активных частиц (каталитически активных, радикальных, перекисных и т.п.), естественных ритмов [17], которые возникают и существуют в переходных, динамически меняющихся условиях и в природных средах могут регулировать протекание тех или иных биологических реакций;

– использование абиотических процессов, протекающих вне клетки, а также инженерно-технологических средств (систем макроуровня) для смещения равновесия реакций в реакторах и увеличения выхода целевого продукта, повышения биодоступности субстратов, целенаправленного изменения хода внутриклеточных и внеклеточных процессов биосинтеза и биокатализа;

– в отличие от систем с иммобилизованными микроорганизмами, ферментами, органеллами возможность селективного вывода из зоны реакции или возврата в систему определенных продуктов биосинтеза, отдельного управления группами микроорганизмов в смешанных или симбиотических культурах;

– целенаправленное изменение хода внутриклеточных и внеклеточных процессов биосинтеза традиционными инженерно-технологическими средствами (на макроуровне), в отличие от генно-инженерных методов;

– наличие кооперативных эффектов при одновременном протекании процессов различной природы в едином реакционном объеме;

– возможность использования микроэволюции, автоселекции для отбора стабильных микроэкосистем с желаемыми свойствами при сочетании небиологических и биологических процессов.

В то же время разработка совмещенных систем связана и с поисками ответов на такие вопросы как:

– пределы возможностей живых организмов;

– направленность микроэволюции при взаимодействии абиотических и биотических процессов;

– какие регуляторные механизмы, механизмы поддержания внутриклеточного гомеостаза, задействованные в отклике живых систем на абиотические воздействия, можно использовать для управления ростом, биосинтезом, биокатализом, биоструктурой.

Не исключено, что как направление прикладных работ со смещенные процессы могут представлять интерес не только для разработки новых биометодов, но и получения новых биомодифицированных материалов, наночастиц металлов или их химических соединений, для получения препаративных форм иммобилизованных препаратов в условиях управляемой иммобилизации при совместном протекании,

например биоадгезии, образования коллоидов и формирования полимерных агрегатов в микроэволюционном процессе и т.п.

С научной точки зрения интересна эволюция популяций микроорганизмов и их свойств в условиях протекания совмещенных процессов. Фундаментальное значение исследований может быть связано с изучением проблем старения популяций и индивидуальных организмов.

Таким образом, совмещенные процессы можно рассматривать как одно из направлений разработки биотехнологических систем, моделирующих природные экосистемы и целенаправленно воспроизводящих в них абиотические и биотические реакции в контролируемых условиях.

В качестве совмещенных биокаталитических систем интересны системы, использующие гетеротрофные микроорганизмы и окислительные свойства перекисей и ионов переходных металлов, участвующих в природных процессах самоочищения. В отношении деструкции стойких ксенобиотиков такие системы могут оказаться эффективнее из-за большой окислительной способности химических реагентов [5-7] и быть более экологически дружественными вследствие образования меньшего количества вторичных отходов в экосистеме с биореактором. Как самостоятельные реакционноспособные агенты, перекиси и ионы переходных металлов довольно широко апробируются и используются в различных системах химической и физико-химической очистки. Однако анализ литературы показал отсутствие системных исследований в разработке совмещенных абиотических и биотических процессов, в том числе с участием АФК. Имеются лишь единичные и косвенные указания на возможные положительные эффекты.

**Цель и задачи исследований.** Основная цель настоящей работы заключалась в обосновании и разработке научных основ совершенствования микробиологических процессов культивирования, с учетом приоритетов экологически чистого производства и воспроизведения совмещенных процессов при построении биотехногенных экосистем по принципам функционирования природных экосистем.

В соответствии с поставленной целью в исследованиях и при выполнении экспериментов решались следующие **задачи**:

– научно-методологическое обоснование совершенствования микробиологических процессов культивирования с учетом приоритетов экологически чистого производства;

– исследование способов минимизации вторичных отходов при проведении процессов биосинтеза и биодеструкции, в частности, в периодическом режиме без подпитки и с подпиткой высоконцентрированным субстратом, непрерывном хемостатном, режиме с полным рециклом активного ила, в мембранном биореакторе;

– исследование процессов автоселекции микроорганизмов при одновременном протекании химических и фотохимических окислительных процессов, подбор условий совместимости химических, фотохимических и биологических процессов в едином пространстве и во времени;

– совершенствование микробиологических систем культивирования на основе воспроизведения процессов самоочищения, сочетания абиотических и биотических реакций в едином объеме и времени, как это наблюдается в природных средах, экспериментальная оценка возможностей предложенных систем, выбор наиболее перспективных вариантов;

– исследование гибридных химических и микробиологических, фотохимических и микробиологических систем культивирования и биологической очистки, сочетающих в едином пространстве и во времени физико-химические, химические, фотохимические и биологические процессы;

– исследование процессов ферментации и биологической очистки в условиях стресса, в первую очередь оксидативного.

# ГЛАВА 1. РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ И ЭКОЛОГИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

## 1.1. Экологически чистые методы в совершенствовании процессов ферментации и биологической очистки

### 1.1.1. Совершенствование процессов ферментации

Традиционная идеология управляемой ферментации направлена, как правило, на поддержание стабильных и наиболее комфортных условий, при которых потенциал микробных культур и популяций может быть реализован в наибольшей степени. Вместе с тем очевидно несовершенство большинства методов, применяемых на стадии культивирования микроорганизмов: зачастую низкие выход и содержание целевых продуктов в постферментационных средах, большое количество побочных продуктов, сточных вод в виде остатков культуральных жидкостей с большим количеством органических загрязнений, стоков в процессе фракционирования и очистки, отходов в виде отработанной и избыточной биомассы, шламов; высокие затраты энергии и топлива и т.д. Однако с точки зрения экологически чистого производства из критериев эффективности ферментации: максимальная производительность или продуктивность, высокий уровень накопления продукта, высокий коэффициент конверсии основного субстрата в продукт чистому производству соответствует лишь высокий коэффициент конверсии и отчасти высокий уровень накопления целевого продукта (за счет снижения количества стоков, уменьшения энергозатрат на стадии выделения продукта).

К типичным решениям по экологизации относят создание замкнутого малоотходного по сточной воде производства. В биотехнологическом производстве возвращают на стадию ферментации отработанную культуральную жидкость (основной поток сточных вод) [18], что приводит к уменьшению объема сточных вод, но одновременно к существенному повышению количества накапливаемых не утилизируемых примесей, побочных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и, кроме того, ухудшает качество целевого продукта, увеличивает содержание в нем тяжелых металлов и других вредных примесей.

Более перспективен, на наш взгляд, вариант рецикла культуральной жидкости после ее дополнительной обработки и разделения на отдельные компоненты, как это было показано нами на примере получения кормовых дрожжей р. *Candida* и при биосинтезе лизина [19-23].

В метаболически замкнутом производстве бесклеточная жидкость, получаемая после культивирования и отделения клеток одного типа микроорганизмов, служит основной питательной среды в каком-либо другом процессе, продуцент которого не ингибируется, и, возможно, даже активируется метаболитами предыдущей стадии.

С целью экономии сырья, электроэнергии, тепла, охлаждающей воды может оказаться целесообразным целенаправленное ведение ферментационного процесса в режиме лимитирования по граничным значениям параметров. Например:

- использование режима лимитирования роста подачей кислорода, который в ряде случаев не приводит к существенному изменению в выходе биомассы и содержании в ней белка, но позволяет экономить электроэнергию на аэрацию [24, 25];

- саморазогрев и саморегулирование температуры ферментера при росте биомассы вследствие выделения тепла биосинтеза – процесс авторегулируемый и иногда позволяет снизить расход охлаждающей воды без ухудшения технологических показателей и качества продукта;

- культивирование в режиме с подпиткой субстратом при лимите по субстрату, повышающее выход целевого продукта, что обусловлено устранением репрессии роста и биосинтеза избытком субстрата [24, 25];

- использование анаэробно-аэробных методов конверсии органического сырья;

- снижение количества азота, вносимого в исходную питательную среду с минеральными солями, до уровня в 2–3 раза ниже количества, требуемого исходя из материального баланса. Остальное количество азота можно добавлять в ферментационную среду с аммиачной водой, используемой как титрующий агент. Такой режим позволяет снизить общий расход азота на ферментацию и может даже привести к некоторому увеличению суммарного выхода биомассы. Это обусловлено устранением азотной репрессии, наблюдаемой у многих микроорганизмов-продуцентов при избытке азота, при которой действует менее экономичная система транспорта азота в клетку.

### **1.1.2. Совершенствование процессов биологической очистки сточных вод**

Биологическая очистка сточных вод, как важный элемент техногенных экосистем, весьма несовершенна с точки зрения методологии управляемого культивирования микроорганизмов. Очевидно, это объясняется огромными потоками стоков, поступающих на очистку, что не позволяет их изолировать от окружающей среды и перерабатывать методами асептической ферментации. Несмотря на эти особенности, рациональное применение решений, найденных для совершенствования методов ферментации, здесь может иметь наибольшее практическое значение. В этой связи в

нашей работе биологической очистке сточных вод, как объекту исследований, уделялось большое внимание.

В настоящее время отечественные нормативы к очистке воды по сравнению со странами Европы намного более строгие. Например, по российским стандартам годной для сброса в водоемы рыбохозяйственного назначения считается вода с уровнем ХПК 15 мг/л (в Западной Европе 125 мг/л), уровнем БПК<sub>5</sub> 6 мг/л (в Западной Европе 20 мг/л),  $\text{NH}_4^+$  0,5 мг/л (в Западной Европе 10 мг/л),  $\text{PO}_4^{3-}$  0,2 мг/л (в Западной Европе 1 мг/л). Поддержание таких стандартов требует постройки высокоэффективных многоступенчатых очистных сооружений, следовательно – высоких затрат на очистку стоков, поэтому если имеется возможность снизить требования к качеству очищенной воды, выбирают оптимальную степень очистки. По российским же нормам одновременно обеспечивать высокие стандарты очистки и внедрять ресурсосберегающие недорогие технологии очистки тем более сложно. Требуется существенная модернизация существующих методов или внедрение принципиально новых решений.

В России с 1 января 2016 года вступило в действие постановление Министерства природных ресурсов и экологии РФ, вынуждающее налоговыми мерами переход действующих предприятий к наилучшим доступным технологиям [26а, 26б, 26в].

С экологической точки зрения традиционные системы биологической очистки имеют недостатки по нескольким причинам, среди которых:

- необходимость разбавления загрязненных стоков с повышенными концентрациями токсичных соединений для предотвращения отрицательных воздействий токсикантов на биологические агенты систем очистки; это приводит к повышению объемов перекачиваемых и обрабатываемых загрязненных потоков и, соответственно, затрат на очистку;

- невысокие концентрации активных илов и активно функционирующих биопленок в традиционных анаэробных и аэробных реакторах (метантенках, септиченках, аэротенках, биофильтрах), что снижает скорости биодеструкции загрязнений и ведет к увеличению рабочего объема очистных сооружений;

- сложности с обеспечением массообменных условий и повышенные энергозатраты для снабжения микроорганизмов кислородом в аэробных системах биологической очистки;

- необходимость организации стадии доочистки сточных вод в случае повышенных требований к качеству очистки выходных потоков;

- образование вторичных загрязнений – активного ила, шламов; дополнительные затраты на концентрирование активного ила; его хранение в районах складирования приводит к отчуждению и загрязнению почв и грунтовых вод;

- необходимость внесения минеральных компонентов питания – источников азота, фосфора, органических ко-субстратов для обеспечения требуемого уровня активности биоценозов очистных систем; неконтролируемое использование этих добавок в загрязненные среды может приводить к эвтрофикации природных водоемов, накоплению нитратов в грунтовых водах и другим нежелательным последствиям;

- неоптимальный тепловой баланс, что ведет к замедлению скорости биологической очистки;

- трудности адаптации активного ила к широкому спектру ксенобиотиков при их разложении в составе общих промстоков;

- необходимость регенерации активного ила после пребывания во вторичном отстойнике и, соответственно, регенератора в аэротенках для восстановления окислительной активности микроорганизмов, что приводит к потере полезного объема аэротенка, снижению его производительности и, как следствие, потребности в больших площадях под очистные сооружения.

С точки зрения экологически чистого производства биоочистные установки должны быть компактными, ресурсосберегающими, обеспечивать необходимое качество очищенной сточной воды, биологические агенты должны выдерживать высокие концентрации токсикантов и других загрязнений, их разложение в биореакторах до безопасных продуктов должно быть близко к 100%, количество вторичных отходов и загрязнений, образующихся в очистных сооружениях, должно быть незначительным [27].

Надо отметить, что в настоящее время в отечественной практике при уровне ХПК в воде на входе в очистные сооружения не выше 1000–2000 мг/л используются, как правило, одноступенчатые или многоступенчатые системы биологической очистки на основе аэротенков классического типа или их модификаций. При этом в одностадийном аэробном процессе удается снизить содержание загрязнений на выходе лишь до 60–100 мг/л (по ХПК), что в 3–5 раз выше российских природоохранных требований. Поэтому сточную воду приходится разгружать в городскую канализацию на общегородские очистные сооружения либо в естественные или искусственные системы доочистки по установленным региональным нормам и лимитам сброса. Использование же дополнительных систем доочистки сточных вод или увеличение объемов сооружений ведет к росту капитальных и эксплуатационных затрат, территории, занятой под водоочистку. При повышении степени очистки с 85 до

95% расходы возрастают в 2–3 раза, а свыше 95% – примерно в 10 раз на каждый дополнительный процент повышения степени очистки [26а, 26б].

Традиционные подходы совершенствования систем биологической очистки, которые в некоторой степени могут быть отнесены к экологически чистым решениям, нацелены на интенсификацию работы аэротенков: повышением концентрации ила в сооружении, выравниванием нагрузки на ил и исключением шоковых перегрузок, созданием оптимальных условий по рН и температуре, созданием определенной гидродинамической структуры в сооружении, улучшенным снабжением кислородом, использованием схем очистки с анаэробными, аноксичными и аэробными зонами и т.п.

Один из путей совершенствования аэробной биологической очистки сточных вод связан с управлением качеством активного ила с целью поддержания его высокой окислительной способности, уменьшения вспухаемости и пенообразования в аэротенках [28, 29], улучшения седиментационных свойств во вторичном отстойнике, адгезии ила при очистке на биофильтрах и в биотенках и, напротив [30-33], снижения адгезионных, адсорбционных свойств при очистке, например, в мембранных биореакторах, для которых проблема загрязнения активным илом и, как следствие, снижение проницаемости мембран является приоритетной [34-45].

Для уменьшения затрат на аэрацию в аэротенке более тщательно контролируется и оптимизируется содержание растворенного кислорода в различных зонах аэротенка, используются аэрирующие устройства с регуляторами расхода воздуха или мощности привода, совершенствуется конструкция вторичных отстойников [28, 30]. Ухудшение работы аэрационной системы в аэротенках вследствие зарастания илом нарушает режим аэрации, снижает их окислительную мощность, вызывает осаждение ила, ведет к перерасходу электроэнергии на аэрирование.

В последнее время широкое распространение получила интенсификация химическими и биохимическими способами. Многие из этих методов используются в процессах культивирования микроорганизмов и биосинтеза и апробированы в технологиях биологической очистки сточных вод. Среди них:

– Внесение экзоферментов для интенсификации процесса биоокисления. Метод малоэффективен и требует большого расхода ферментов, поскольку в проточных системах биоочистки рецикл их в очистные сооружения затруднен.

– Внесение различных биологически активных добавок (например, стероидов), факторов роста (витаминов, аминокислот, гидролизатов ила и т.п.), защитных и других веществ, стимулирующих развитие микроорганизмов ценозов очистных сооружений и их окислительную активность.

– Внесение добавок – субстратов (косубстратов), которые индуцируют необходимую биохимическую активность микробных деструкторов и вовлекают биологически стойкие загрязнения в процессы кометаболизма.

– Использование методов, повышающих биодоступность загрязнений: добавление ПАВ, специальных сорбентов, обработка ультразвуком, предобработка химическими окислителями:  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $H_2O_2$ , ультрафиолетом, ионизирующей радиацией, электролизом, фотокаталитическое, кавитационное воздействие, а также методов, обеспечивающих транспорт кислорода в системе, например, при обработке почвы пероксидом водорода.

– Искусственное воздействие мутагенных факторов [46]. Установлено, что обработка химическими мутагенами приводит к изменению деструктивной активности популяции, прироста ила в сторону его увеличения и повышает интенсивность окисления загрязнений в промышленных сточных водах.

– Проведение биологической очистки в режиме разобщения процессов роста и окисления субстратов, например, путем ограничения содержания микроэлементов в очищаемой среде или с перерывами в подаче сточной воды. Такой режим позволяет уменьшить количество избыточного активного ила.

– Использование специально селекционированных культур микроорганизмов, адаптированных к потреблению конкретной группы загрязнений с целью повышения скорости и степени деструкции загрязнений.

Очистка сточных вод с помощью специальных культур микроорганизмов получила название микробного метода [47]. Ряд таких микроорганизмов выпускается в виде специализированных биопрепаратов. Однако, как правило, биопрепараты эффективны только в пусковой период работы очистных сооружений, поскольку со временем специально внесенные микроорганизмы вытесняются микрофлорой естественно складывающегося биоценоза очистных сооружений.

Определенный положительный эффект может быть достигнут при пространственном разделении компонентов очистных биоценозов по экологическим нишам, в частности, применяя ступенчатую схему очистки [48, 49]. В этом случае используют активные илы или биопленки, приспособленные к окислению отдельных групп органических загрязнений, разлагаемых в двух- или многоступенчатом процессе. Применение ступенчатой схемы очистки тем эффективнее, чем больше разница в скоростях биохимического окисления отдельных компонентов сточных вод.

Одним из возможных решений с точки зрения экологически чистого производства может быть внедрение локальных очистных сооружений (ЛОС) на предприятиях для обработки стоков с достаточно узким набором специфических загрязнений [50]. На ЛОС происходит удаление основной массы загрязнений, что позволяет за-

тем направить стоки на общепроизводственные очистные сооружения, представляющие обычно сооружения биологической очистки. Внедрение ЛОС целесообразно, когда отработанный локальный технологический поток содержит ценные побочные продукты или, наоборот, – особо токсичные трудноразлагаемые загрязнения. В этом случае локальные промстоки можно очищать с помощью культур микроорганизмов-деструкторов, селекционированных для каждого конкретного производства, используя высокоинтенсивные специализированные реакторы (с иммобилизованными микроорганизмами, мембранные реакторы, биосорберы и другие системы). Для некоторых производств, например антибиотиков, из сточных вод в окружающую среду могут попадать штаммы микроорганизмов, в том числе и условно-патогенные формы, приобретшие устойчивость к антибиотикам в результате процессов автоселекции на антибиотикорезистентность в экосистемах очистных сооружений. В таких случаях может быть организована локальная биологическая очистка стоков с использованием, в частности, закрытого ферментационного и вспомогательного оборудования.

Раздельная очистка технологических потоков с использованием ЛОС уменьшает затраты на совокупную очистку, более полно утилизируются побочные продукты или более эффективно обезвреживаются опасные стоки без ухудшения работы основных очистных сооружений. После ЛОС проще получать избыточный активный ил с лучшими для переработки и утилизации технологическими свойствами.

С биологической точки зрения развитие систем для ЛОС сопряжено с решением следующих задач:

- создание консорциумов микроорганизмов, адаптированных к потреблению и трансформации спектра токсикантов локальных стоков до их усреднения и подачи на общепроизводственные или общегородские очистные сооружения;
- использование микроорганизмов, способных обезвреживать загрязнения при высоком содержании последних в среде.

Как вариант интенсификации биологической очистки высококонцентрированных сточных вод может быть использовано стандартное ферментационное оборудование. Организация процесса локальной биоочистки в биореакторе позволяет вести окисление активным илом как и в аэротенках очистных сооружений, но при более управляемых и контролируемых условиях. Можно более рационально подойти к вопросу создания наиболее активного, с точки зрения полноты и скорости потребления загрязнения, биоценоза микроорганизмов. Однако при очистке больших потоков сточных вод и воды с небольшим содержанием органических загрязнений использование специализированного биотехнологического оборудования неоправдано из-за высоких энергозатрат и его стоимости.

С позиций экологически чистого производства для стоков с высоким уровнем загрязнений с ХПК > 2000–3000 мг/л целесообразна организация ЛОС с анаэробной очисткой. Анаэробная очистка может проводиться в две стадии: стоки с высокой концентрацией загрязнений направляются без разбавления в анаэробный биореактор, где подвергаются биоконверсии методом метанового брожения, который не требует затрат на аэрацию и сопряжен с образованием ценного энергоносителя – метана. После анаэробного разложения остатки загрязнений, содержащиеся в иловой воде, окисляются аэробно в аэротенке или на биофильтре.

Комбинирование биологической очистки, сочетающей анаэробные высокоинтенсивные реакторы нового поколения и аэробные реакторы различных модификаций, способствует существенной экономии эксплуатационных затрат по сравнению с только аэробной очисткой без превышения согласованных норм сброса. Как показывают данные литературы [51-53] и наши собственные исследования, проведенные на примере анаэробно-аэробной очистки сточных вод пивоваренной компании «Балтика» [54], при анаэробном метаногенном сбраживании затраты электроэнергии на 1 кг удаленных загрязнений составляют 0,2-0,4 кВт.ч/кг ХПК, что в несколько раз ниже показателей, типичных для аэробных процессов. Кроме того, образуется вторичный ресурс – биогаз, снижается количество избыточного ила [27] и требуется в несколько раз меньше вносить дополнительных количеств биогенных элементов (азота, фосфора), либо, в зависимости от состава стоков, обойтись без их внесения. По основным показателям ХПК и БПК анаэробно-аэробная очистка позволяет уменьшить загрязненность сточных вод более чем на 99%.

Промышленное применение систем анаэробного разложения неуклонно расширяется в связи с появлением высокоэффективных анаэробных реакторов нового поколения. Такие реакторы обеспечивают высокую производительность и стабильность работы очистных сооружений, меньшую чувствительность к залповым выбросам, повышают качество очистки сточной воды. Взвешенные вещества, содержащие жиры, белки, углеводы могут быть направлены, без отделения в отстойнике, в анаэробный реактор и подвергнуты биоконверсии для получения максимального количества биогаза.

В большинстве разработанных анаэробных реакторов используется принцип удержания биомассы. Из них выделяют [55, 56]:

1. Реакторы с гранулированным слоем ила и восходящим потоком жидкости.
2. Реакторы с биопленкой.
3. Реакторы с псевдооживленным слоем ила. Бактериальная масса иммобилизована на мелких инертных частицах, которые сильным потоком подающейся в реактор жидкости удерживаются во взвешенном состоянии.

#### 4. Фильтротенки и мембранные реакторы.

Производительность современных конструкций анаэробных биореакторов достигает 15–30 кг ХПК/м<sup>3</sup> сут, что в 10–15 раз выше производительности аэротенков (не более 2–3 кг ХПК/м<sup>3</sup>·сут).

Среди зарубежных исследователей наибольшую известность в области создания высокоэффективных систем анаэробной очистки получили работы Леттинги с сотрудниками [57-64]. Среди отечественных исследователей изучению современных анаэробных систем очистки много внимания уделил Калюжный с сотрудниками [65]. Анаэробно-аэробный двухстадийный метод очистки активно внедряется в последние десятилетия в различных отраслях промышленности, где стоки содержат большое количество органических загрязнений [66-70].

Многоступенчатую очистку в широких масштабах применяют при необходимости удаления из воды азота [26, 29, 36, 66]. Современные решения предусматривают различные схемы ступенчатой очистки. В качестве первой ступени могут быть использованы как аэробные, так и анаэробные биоокислители, а в качестве второй ступени чаще применяют аэробные или факультативно-анаэробные системы.

Также в зарубежной литературе уделяется большое внимание решению проблем вспухания ила, в частности, поискам путей получения и использования гранулированного ила вместо хлопьеобразующего для улучшения его седиментационных свойств, разработке новых методов снижения остаточного количества биогенных элементов и ХПК при доочистке сточных вод, а также удалению биогенных элементов с одновременным получением соединений последних как товарных продуктов [26].

Современное состояние в развитии, использовании и дальнейшем внедрении анаэробных реакторов в промышленности подробно рассматривается в ряде обзоров [63, 65, 69, 71] и было обобщено нами ранее [2].

Надо отметить, что ни один из существующих вариантов биологической очистки не лишен недостатков. Традиционные методы биологической очистки экстенсивны, требуют больших площадей из-за низкой интенсивности процесса очистки. Недостатки систем с аэротенками – лимитирование процесса окисления загрязнений аэрацией, невысокое содержание биомассы активного ила в аэротенке, длительное пребывание его во вторичном отстойнике, что ведет к падению физиологической активности микроорганизмов активного ила.

Недостатки обычных систем с иммобилизацией – неудовлетворительные массообменные характеристики и производительность (окислительная мощность).

Недостатки систем с фильтрацией, таких как мембранный биореактор – массообменные ограничения. То же самое можно отнести и к системам с использо-

ванием кислорода или воздуха, обогащенного кислородом для интенсификации массообмена. Высокая концентрация биомассы оправдана, когда нет естественных или вынужденных массообменных ограничений, в частности по кислороду.

Для всех этих систем требуется разбавление концентрированных токсичных стоков, что, в свою очередь, увеличивает объемы сточных вод и затрудняет внедрение наиболее интенсивных и прогрессивных методов биологической очистки.

Системы с подпиткой хотя и позволяют, теоретически, перерабатывать концентрированные стоки без их разбавления, однако, требуют решения проблемы накопления токсичных продуктов метаболизма.

Для совершенствования стадии биологической очистки перспективно использование технологий, обеспечивающих переработку стоков с высоким содержанием органических загрязнений, нормативы очистки без стадии доочистки, устойчивость к перегрузкам (отсутствие вспухания и вымывания ила) и высокую производительность на единицу площади.

## **1.2. Совмещенные системы в процессах ферментации и биологической очистки**

В природной микрогетерогенной среде наблюдается локальное пространственное разделение микробиотического сообщества, транспортируются субстраты, выводятся из одних зон и доставляются в другие продукты биосинтеза, одновременно и совмещенно протекают биотические и абиотические физические, физико-химические, химические, фотохимические процессы [5, 7, 72].

По отношению к системам культивирования микроорганизмов и биологической очистки можно выделить два направления их развития с целенаправленным воспроизведением совмещенных условий:

– с селективным регулированием содержания внеклеточных продуктов в ферментационной среде с целью интенсификации микробиологического процесса и изменения метаболизма в благоприятном для биосинтеза целевого продукта направлении;

– с совмещением последовательно или по месту и времени химических, фотохимических и биологических процессов. Сочетая абиотические и биотические процессы в одном месте и времени, можно попытаться усовершенствовать, в частности, процессы биологической деструкции различных органических веществ [6, 7, 72].

### 1.2.1. Системы с селективным извлечением продуктов биосинтеза

Селективное извлечение, как способ управляемого культивирования микроорганизмов и вариант совмещенных биологических процессов с механическим или физико-химическим фракционированием продуктов реакций, к настоящему времени нашло наибольшее практическое воплощение.

Такое совмещение изменяет динамическое соотношение биохимических и микробиологических реакций, позволяет удалять продукты, угнетающие биосинтез, либо повышать содержание в среде культивирования стимуляторов биосинтеза [19-23], повысить скорость образования и выход целевого продукта.

Селективное удаление используется в таких ферментационных системах, как мембранный биореактор [34, 42, 43, 73-78], биореактор с жидкостной экстракцией [79-84], с вакуумным удалением летучих продуктов [85, 86], с адсорбцией [87-93]. Процессы с селективным удалением из зоны реакции целевых продуктов, позволяют одновременно проводить очистку продукта [34, 74, 75, 94-96].

Культивирование с добавлением адсорбентов или ионообменных материалов, способных поглощать продукт, приводило к резкому увеличению его выхода [89, 97]. Добавление активированного угля при культивировании растительной суспензионной культуры клеток лекарственной ромашки устраняло ингибирующее влияние кониферилового альдегида и повышало его выход в 60 раз [88]. Активированный уголь использовали также для удаления продуктов из культуральной жидкости при сбраживании глюкозы иммобилизованными в  $\chi$ -каррагинане дрожжевыми клетками [87]. Добавление адсорбента к культуре клеток *S. cerevisiae* во время инкубации в 6 раз увеличило выход  $\alpha$ -фактора по сравнению с режимом культивирования без добавления адсорбента [98]. В работе [99] наблюдали увеличение активности эндо-1,4- $\beta$ -D-глюканазы и  $\beta$ -D-глюкозидазы, продуцируемых *Aspergillus fumigatus*, при добавлении диоксида титана, кизельгура или оксида алюминия, которые, как предполагается, связывали ингибитор белковой природы.

Поскольку емкость адсорбентов ограничена, требуется их периодическая регенерация, связанная с дополнительными расходами. Многие адсорбенты не выносят термической стерилизации, а их химическая стерилизация затруднена. Клетки микроорганизмов могут иммобилизоваться на частицах адсорбента, что может оказаться нежелательным и потребовать дополнительных мер к его промывке. Предварительное отделение культуральной жидкости от микробных клеток с последующим ее пропусканием через адсорбент [100] усложняет процесс.

В наибольшей степени совмещенные системы культивирования с использованием микроорганизмов и адсорбентов получили практическое воплощение в биологической очистке сточных вод – в биосорберах, аэротенках с сорбентами и т.п. [101-103].

В двухфазной системе жидкостной экстракции используются два полимера, один из которых – полиэтиленгликоль, другой – декстран, растворенные в воде в соответствующих концентрациях, не смешивающиеся между собой, инертные к клеткам микроорганизмов и селективно разделяющие низкомолекулярные вещества, биополимеры и клетки. Систему полиэтиленгликоль – декстран использовали для получения этанола [97],  $\alpha$ -амилазы с помощью *Bacillus subtilis* [79], эндо-1,4- $\beta$ -D-глюканазы с помощью *Trichoderma reesei* [104] и в ходе трансформации гидрокортизона в преднизолон под действием *Arthrobacter simplex* [83]. Описана экстрактивная ферментация этанола [80], бутанола [81] с использованием алифатических спиртов в качестве экстрагентов, а также молочной кислоты с использованием ионообменных смол [91-93]. Возможности экстрактивной ферментации ограничены по тем же причинам, что и адсорбционной. Кроме того, многие экстрагенты могут отрицательно влиять на жизнедеятельность микроорганизмов. При разделении фаз и реэкстракции возможны потери экстрагентов.

Для получения молочной кислоты описан метод ферментации, совмещенной с электродиализом [82, 105-112].

В промышленных условиях процессы совмещенного культивирования и разделения в наибольшей степени пригодны для производств с низкими требованиями к асептике, например, для получения этанола и других продуктов брожения [113].

### 1.2.2. Мембранный биореактор

Наибольшее воплощение идея совмещения биохимического процесса с одновременным разделением и удалением компонентов из реакционной среды нашла в концепции мембранного биореактора [34, 42, 43, 73-78]. Эти системы позволяют резко увеличить продуктивность ферментации за счет повышения концентрации биомассы, отвода из среды внеклеточных продуктов и метаболитов-ингибиторов, смещения общего биохимического равновесия в сторону образования внеклеточного продукта и в настоящее время используются для получения этанола, *n*-бутанола и других продуктов брожения. Однако такие системы не могут быть отнесены к экологически чистым решениям поскольку они лишь отчасти снижают объемы отходов в виде избыточной биомассы и обычно не ведут к сокращению объема сточных вод.

Мембранный реактор (МБР) – ферментный реактор или ферментер, снабженный полупроницаемой мембраной для отвода продуктов биохимических превращения из

зоны реакции или подпитки среды исходными компонентами реакций. Режим работы МБР определяется типом используемой мембраны. В мембранных реакторах продуктивность биореактора повышается путем рецикла биомассы с помощью микрофильтра или полупроницаемой мембраны другого типа [42, 114-116], при этом достигается высокая концентрация клеток, как в высокоплотностной культуре, что приводит к уменьшению доли субстрата, расходуемого на биосинтез клеточного материала. Разработка таких систем началась с начала 1980-х гг. [117-124].

В России исследования в этой области впервые начались на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева с начала 1980-х гг. [125-127]. С конца 1990-х гг. исследования по использованию МБР стали интенсивно развиваться и их результаты широко внедряются в биологической очистке сточных вод во всех развитых странах, в том числе и в России [73, 74, 77, 128].

Современное состояние в разработке мембранных биореакторов рассмотрено в многочисленных обзорах и отдельных изданиях [42, 74-78].

Достаточно широко освещено диализное культивирование микроорганизмов («диализная культура»), при котором перенос веществ через мембрану осуществляется за счет пассивной диффузии [114, 129]. В диализной культуре может быть достигнута концентрация клеток практически до плотности упаковки 170-190 г/л по сухой массе клеток [114, 130-132], а с этим значительно повышена продуктивность с единицы объема биореактора по получаемым веществам. Параллельно с этим повышается число жизнеспособных клеток, выход биомассы с единицы субстрата [130, 133] за счет снижения затрат на поддержание энергетического метаболизма [134]. Использование метода диализа ограничено из-за низких скоростей массопереноса через мембраны и возможностей самих диализных мембран в отношении разделения веществ [135].

Наиболее эффективно селективные свойства мембранного разделения могут быть реализованы при использовании ультрафильтрационных и обратноосмотических мембран и в том случае, если разделяемые метаболиты существенно различаются по химическим свойствам, размеру, заряду, коэффициентам диффузии их молекул.

Все конструкции МБР можно разделить на 2 группы: аппараты с внутренним или погружным мембранным модулем (пМБР или в зарубежной литературе «immersed», сокращенно iMBR) и аппараты с выносным мембранным модулем (вМБР или в зарубежной литературе «sidestream», сокращенно sMBR). Преимущества реакторов первой группы: более простая конструкция, одинаковые во времени условия развития всех клеток. Преимущества аппаратов второй группы: возможность любого требуемого увеличения поверхности мембран, отключения циркуля-

ционного контура в любой момент времени, индивидуальной стерилизации мембранного устройства. Циркуляция в контуре может быть как естественная, так и принудительная с помощью насоса.

Большинство МБР модульны, и это является одной из положительных особенностей организации мембранных процессов.

Материалы, из которых изготавливаются мембраны, геометрия мембранного модуля, ориентация относительно потока воды – все это оказывает существенное значение на производительность мембранного модуля.

Мембранный модуль должен иметь:

- 1) большую площадь по отношению к занимаемому объему (или плотность упаковки);
- 2) развитую турбулентность на стороне подачи для увеличения массообмена;
- 3) низкий расход энергии на единицу объема обрабатываемой жидкости;
- 4) минимальную стоимость единицы площади мембран;
- 5) исполнение, которое позволяет легко проводить механическую чистку;
- 6) конструкцию, которая позволяет делать модульность установок.

Существуют несколько основных конфигураций (исполнений) мембран, используемых в настоящее время, которые имеют различные преимущества и недостатки. Конфигурация модулей базируется либо на плоскостной, либо на цилиндрической геометрии. Модули могут быть: рамные (plate-and-frame, PF) или плоские (flat sheet, FS); полволоконные (hollow fibre, HF); (многоканальные трубчатые (multitubular, MT); капиллярные (capillary tube, CT); гофрированные (pleated filter cartridge, FC); рулонные (spiral-wound, SW) мембраны. В МБР для биосинтеза используются мембранные модули с плоскопараллельными элементами, с трубчатыми элементами, полволоконные [42, 74, 75, 78].

МБР является удобной системой для иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов, изучения закономерностей роста и биосинтеза, моделирования рецикла по каким-либо компонентам при периодическом и непрерывном ведении процесса.

При культивировании в МБР особенно большие эффекты могут наблюдаться в случае извлечения из ферментационной среды продукта, ингибирующего свой биосинтез. При ферментации этанола наблюдается увеличение продуктивности в десятки раз [118, 119, 121, 122, 124]. Аналогичные эффекты возможны при получении молочной кислоты [117, 120, 136-143], других продуктов брожения [144-146], уксусной кислоты [123, 147] и прочих метаболитов [95, 148-150].

Одним из факторов, снижающих эффективность мембранного реактора, является существенное ухудшение проницаемости мембран при фильтрации нативных растворов и суспензий [35-37, 40, 43-45, 151-155] вследствие загрязнения межмем-

бренных каналов и поверхности мембран и такого явления как концентрационная поляризация (КП) [135, 156, 157]. Молекулы белков и других высокомолекулярных соединений всегда в той или иной степени адсорбируются на поверхности различных материалов, в том числе на поверхности и в порах мембраны [135, 156-161] с образованием дополнительной, так называемой динамической мембраны [156]. КП более значима для обратноосмотических процессов; для ультраfiltrации и микроfiltrации роль КП незначительна, а снижение проницаемости мембран определяется адсорбцией или адгезией частиц клеток и белков на поверхности мембран и заиливанием надмембранного пространства. Материал мембраны, гидрофобность частиц, их поверхностный заряд играют существенную роль в загрязнении поверхности мембран [135, 156, 159, 160, 162-165]. С повышением турбулизации фильтруемого раствора влияние КП и загрязнения на процесс разделения снижается [135, 156, 157, 159, 166, 167]. Однако существует предел, выше которого увеличение турбулизации раствора не приводит к существенному повышению проницаемости мембран (обычно при скорости течения раствора над мембраной выше 1,5–2 м/с [135, 152, 168, 169]. При этом проницаемость по раствору остается существенно ниже по сравнению с исходной проницаемостью по чистому растворителю (воде). Эксплуатация мембран при потоке ниже критического уровня может привести к резкому возрастанию засорения мембран и падения их проницаемости, поэтому при эксплуатации МБР показатели критического потока и трансмембранного давления, а также качественно-количественный состав растворимых и взвешенных веществ являются важными параметрами [37, 170].

Среди других факторов наиболее важными являются: режим работы МБР, конструктивные решения как самого биореактора, так и мембранного узла разделения, аэрация – особенности и интенсивность подачи воздуха в МБР, влияние давления и скорости отбора пермеата, способы очистки и их влияние на работу всей системы в целом, состояние активного ила, морфология, размер его частиц и агрегатов. Также большое значение имеют правильный выбор материала мембраны и ее характеристик для конкретной задачи, выбор оптимальных значений производительности по пермеату, частоты обратных промывок и химических чисток мембраны [171, 172].

Вследствие загрязнения мембранного модуля его работу необходимо организовывать циклически, с периодической очисткой [43]. В большинстве случаев перед проведением мембранного разделения также необходима предварительная обработка растворов от загрязнений. Однако применительно к МБР и проблеме концентрационной поляризации такая обработка может оказаться невозможной или нецелесообразной. Присутствие клеток микроорганизмов в подаваемой на разделение среде может существенно изменить показатели процесса.

Важным аспектом применения полупроницаемых мембран является проблема ресурса мембран, т.е. сохранения первоначальных показателей их удельной проницаемости и задерживающей способности в течение длительного времени эксплуатации. Многие из разработанных мембран отличаются химической и термической стойкостью, биологической инертностью, высокими технологическими показателями. Срок службы мембран зависит от способа их использования и может составлять от двух до восьми лет.

Таким образом, только комплексный учет всех внешних факторов позволяет эффективно функционировать такому сложному комплексу, как МБР.

В настоящее время наиболее интенсивное развитие и масштабное применение мембранные реакторы находят в технологии аэробной биологической очистки сточных вод, в частности путем совмещения аэротенка с мембранным разделительным модулем, через который откачивается бесклеточная осветленная вода [34, 41, 128, 153, 173-185]. В таких сооружениях мембранный блок заменяет вторичный отстойник [186]. Основным преимуществом МБР является то, что он может работать при значительно более высокой концентрации биомассы в очищаемой среде, чем у типичных систем биологической очистки сточных вод с аэротенками [51]. В МБР концентрация взвешенных веществ (биомассы) обычно находится в диапазоне 10–17 г/л, однако может достигать при определенных условиях 40 г/л. Более высокая концентрация активного ила позволяет эффективно удалять не только органические загрязнения, поступающие со сточной водой, но и осуществлять различные процессы глубокой доочистки.

МБР начали использоваться и для анаэробной очистки [187, 188], примерами которых являются CUMAR-системы (crossflow ultrafiltration membrane anaerobic reactor), реакторы с подачей водорода через полупроницаемую мембрану для восстановления нитратов, сульфатов [187] и другие системы [189].

Применительно к биологической очистке сточных вод по принципу действия МБР аналогичны фильтротенкам, в которых активный ил удерживается в рабочем пространстве сооружения фильтрацией [30, 51]. В фильтротенках в качестве фильтрующих элементов используют сетчатые насадки, синтетические ткани, другие крупнопористые материалы. Вода фильтруется в приемные камеры под действием давления столба жидкости аэрационной зоны фильтротенка. В них достигается высокая окислительная мощность 400–600 г БПК/м<sup>3</sup>.ч. Однако такие фильтры быстро забиваются массой ила, требуется регенерация фильтра каждые 0,5–1 мин. обратной продувкой воздухом или отфильтрованной водой. Поэтому эти конструкции не получили существенного распространения.

Общими техническими преимуществами всех систем МБР над другими методами очистки сточных вод являются [190]:

- высокая окислительная мощность вследствие повышенной концентрации биомассы активного ила, позволяющая экономить пространство и проводить модернизацию производства без расширения площадей;
- получение высококачественных потоков, идеально подходящих для последующей мембранной обработки (т.е. ультрафильтрацией и микрофильтрацией), а также дезинфекции ультрафиолетом;
- медленно растущие микроорганизмы, в частности, нитрификаторы не вымываются из рабочего пространства;
- более короткий стартовый период по сравнению с остальными системами;
- меньшее образование избыточной биомассы активного ила.

С момента начала исследований (с начала 1970-х гг.) в области технологии биологической очистки сточных вод в МБР произошла смена нескольких поколений систем МБР, однако до настоящего времени они используются, в основном, для очистки промышленных и бытовых стоков, специфических и муниципальных жидких отходов, в которых требуются установки малые по размеру, обеспечивающие высокое качество воды для ее повторного использования, перерабатывая при этом довольно большие объемы сточных вод.

Полномасштабные внедрения установок МБР для обработки промышленных стоков относятся к 1991 году [42]. В 2000-е гг. количество установок с МБР, вводимых в эксплуатацию, ежегодно увеличивалось в среднем на 10% [75], а удельные затраты за период с 1990 по 2004 уменьшились до 30 раз [42, 191]. В 2006 году началась эксплуатация очистных сооружений с МБР с производительностью 60000 м<sup>3</sup>/сут в Катаре, а в США – 118000 м<sup>3</sup>/сут. [192]. Наибольший опыт эксплуатации мембранных реакторов в настоящее время накоплен в США и Японии. Например, в Японии мембранные реакторы вследствие компактности применяют в качестве очистных сооружений при очистке сточных вод крупных общественно-бытовых комплексов, при гостиницах. Сточные воды подвергают предварительной очистке. Производительность установок 100–500 м<sup>3</sup>/сут. Установки компактны и удобны в обслуживании.

Также существует потребность в системах для биоочистки СВ, имеющих мобильное (компактное) исполнение [193]. Установки МБР с ультрафильтрационным модулем успешно эксплуатируются в сельской местности, для очистки дренажных вод при проведении биоремедиационных работ [194]. Сбрасываемые в природные водоемы сточные воды полностью удовлетворяют природоохранным требованиям [195].

Разработаны системы очистки сточных вод с МБР, которые могут быть использованы на транспортных и круизных судах, на яхтах, а также системы для воинских подразделений армии в местах временной дислокации, где отсутствуют централизованные системы канализации и очистки сточных вод. [196]. Также разработаны системы с МБР для подготовки питьевой воды, в частности, с реализацией денитрификации для удаления нитратных ионов [197, 198-200].

В МБР современных конструкций, предназначенных для очистки сточных вод, используются трубчатые, плоскопараллельные, полволоконные модули, при этом трубчатые элементы – в установках внешней конфигурации, полволоконные – внутренней, а мембранные элементы плоскопараллельного типа могут использоваться в аппаратах обоих типов конфигураций.

Трубчатые мембранные элементы при фильтрации внутрь трубок обладают малым гидравлическим сопротивлением, но и низкой плотностью упаковки – не более  $600 \text{ м}^2/\text{м}^3$ .

Основное достоинство полволоконных мембранных элементов – высокая плотность упаковки, которая может достигать  $30000 \text{ м}^2/\text{м}^3$ . К недостаткам можно отнести худшую устойчивость к загрязняющим агентам и высокое гидравлическое сопротивление.

Плоские мембранные элементы используются в случае небольших производительностей. Имеют малое гидравлическое сопротивление и хорошую устойчивость к загрязнениям. К числу недостатков можно также отнести низкую плотность упаковки рабочей мембранной поверхности  $100\text{--}400 \text{ м}^2/\text{м}^3$ .

В основном, применяются погружные системы для обработки производственных и муниципальных стоков. Рынок МБР представлен 4-мя основными производителями: Zenon, Mitsubishi-Rayon, Kubota, US Filter. Кроме плоских мембран, поставляемых компанией Kubota, остальные производители используют полволоконные мембраны [75]. Из систем с полволоконными элементами наиболее известны установки с погружными мембранными блоками компании Zenon. Высокая поверхность фильтрации в этих элементах позволяет работать при пониженных скоростях потоков в межмембранном пространстве, что резко снижает энергетические затраты на очистку. Установки компактны, позволяют резко повысить содержание активного ила в очищаемой воде (с 2–5 г/л до 10–20 г/л и выше), а с этим производительность и окислительную мощность очистной системы, удалить взвешенные вещества и большую часть высокомолекулярных загрязнений из сточных вод, снизить капитальные затраты на их сооружение, затраты на обезвоживание и компактизацию избыточного ила. Благодаря компактности, мембранные реакторы имеют преимущество при

очистке сточных вод в городских условиях, при дефиците земельных площадей, с удалением 90–99,4% ХПК.

При биологической очистке в мембранных биореакторах рост активного ила лимитирован подводимой энергией (растворенный кислород, загрязнения сточных вод) и скоростью отмирания клеток. Поэтому в МБР могут возникнуть условия, при которых концентрация активного ила достигает такого значения, когда вся доступная энергия используется лишь для поддержания жизнедеятельности клеток. Высокая концентрация активного ила по сравнению с поступающим субстратом приводит к недостатку субстрата для клеток, и биомасса клеток перестает накапливаться [27]. Из-за высокого содержания биомассы лимитирование кислородом в МБР более выражено [38, 178, 185, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, 202]. При этом даже если концентрация клеток не увеличивается, то постоянно наблюдается прирост новых бактерий, уравниваемый потреблением избыточного количества микроорганизмов простейшими и лизисом клеток.

МБР может быть ориентирован на рост специфичной функциональной группы микроорганизмов с большим периодом генерации, например, нитрификаторов [198, 203-205] и бактерий, способных окислять биостойкие загрязнения [180, 194]. Нитрификаторы, растущие с меньшей скоростью роста, чем типичные гетеротрофы, удерживаются в реакторе, что важно для биологического удаления избытка азота из сточных вод и позволяет вести процесс в режиме полной нитрификации. Применение МБР позволяет достигать требуемого качества очистки, в том числе по азоту и фосфору, за счет эффективного протекания процессов нитри-денитрификации и биологического удаления фосфора при объемах МБР в 3 раза меньше объемов аэротенков, где также реализуются процессы удаления этих биогенных элементов [26]. При этом при реконструкции существующих аэротенков и вторичных отстойников с использованием МБР не требуется увеличения объемов очистного сооружения.

Вариантом технологии мембранных биореакторов является ее совмещение с отъемно-доливными реакторами (SBR), работающими в циклическом аэробно-анаэробном режиме очистки, в том числе с использованием гранулированного ила [206-209]. Характерной чертой таких реакторов является большая способность быстро перестраивать процесс биологической очистки из-за циклического режима работы. Время аэробной и анаэробной стадии очистки может быть быстро изменено с учетом изменений в поступающих стоках для эффективного удаления загрязнений [186, 208, 209].

Комбинация мембранных технологий с SBR обеспечивает преимущества обоих процессов и устойчивость активного ила к неблагоприятным внешним факторам. Такие установки получили название MSBR. Однако в системе MSBR очень важно,

но трудно выбрать наиболее подходящий режим отъема-долива и промежуток времени для проведения мембранной фильтрации. Режимы функционирования могут быть: постоянно втекающий сток, не постоянно втекающий сток, прерывистые циклы откачки и другие модификации. В целом же эффективность работы мембранного модуля зависит от биологических и физико-химических особенностей каждой фазы отъема-долива [206, 207, 209], и для обеспечения оптимальных условий эксплуатации MSBR должно быть учтено обрастание мембран и содержание твердых частиц различного размера в стоке, которые приводят к уменьшению скорости потока жидкости через мембраны и снижению качества очищенного стока [186].

Размер частиц ила влияет на заиливание и проницаемость мембран. Обычно он намного больше размера пор мембран и варьируется в интервале 10–300 мкм [210–212], поэтому засорение пор частицами невелико, однако микроорганизмы, находящиеся в агломератах, могут продуцировать большое количество экзополисахаридов, а также растворимые продукты жизнедеятельности, которые могут непосредственно влиять на проницаемость мембран [154, 213–217].

Интенсивное перемешивание в МБР, необходимое для снабжения кислородом активного ила, приводит к уменьшению размера агломератов [151, 200, 212].

На степень и скорость загрязнения поверхности и обрастания мембран биопленками влияет гидрофобность частиц ила и материала мембран [167], структура микробного сообщества [151, 218], а также возраст ила [219–224]. Содержание экзополисахаридов и количество нитчатых микроорганизмов непосредственно влияют на величину частиц активного ила, их гидрофобность и дзета-потенциал [154, 213–217, 225, 226]. Избыточное развитие нитевидных бактерий приводит к большей концентрации экзополисахаридов, к низкому значению дзета-потенциала, более неправильной форме частиц и высокой гидрофобности. Активный ил со склонностью к пенообразованию из-за гидрофобности флокул в среднем снижает проницаемость мембран намного больше по сравнению с активным илом, не склонным к вспениванию. Увеличение времени пребывания сточной воды в МБР приводит к повышению скорости обрастания мембран [220–224, 226].

Снижение загрязнения мембран может быть достигнуто как путем улучшения характеристик активного ила, так и регулированием параметров разделяемой смеси: концентрации активного ила, температуры, рН и т.д. [219, 227–229]. Так, в работе [154] исследовалась динамика загрязнения мембран дефлокулированным илом, нормальным, флокулированным и илом, имеющим разветвленную структуру (вспушшим), а также влияние содержания нитчатых бактерий на производительность установки. Было показано, что при дефлокуляции ила уменьшается средний размер его частиц, увеличиваются мутность суспензии и вклад растворенных веществ в блоки-

рование мембранной микрофильтрационной поверхности. При большом содержании дефлокулированного и вспухшего ила в среде начинают преобладать растворенные вещества и коллоиды, частицы с небольшим размером, существенно снижающие проницаемость мембран.

Основные методы, предлагаемые для контроля загрязнений мембран в МБР, включают следующие варианты:

1) Периодическая механическая очистка поверхности мембран и мембранных модулей, например, установленными механическими скребками или другими устройствами, добавляемыми взвешенными частицами, ультразвуком [230, 231].

2) Модификация конструкции мембранного модуля путем оптимизации плотности упаковки полых волокон или плоских пластин, размещения аэраторов, ориентации волокон в пространстве [230, 232].

3) Уменьшение гелеобразования на поверхности мембран при контроле фильтрационного процесса, при барботаже вблизи мембраны [201] и при работе в пульсирующем режиме [233]. В разделительных процессах загрязнение мембран увеличивается при росте производительности, поэтому рабочий поток должен быть меньше критического, для того чтобы накопление частиц у поверхности мембраны можно было бы предотвратить. С этой целью фильтрование проводят при невысоких трансмембранных давлениях [234].

4) Удаление загрязняющих материалов после их оседания обратным водным потоком [235] или обратным пульсирующим потоком [236]. Эти способы очистки необходимы для восстановления проницаемости мембраны, поскольку частички, клетки бактерий, коллоиды вымываются из пор мембраны в общий поток, при этом происходит довольно качественная очистка поверхности мембран от загрязнений. Для реализации этого метода необходимо использование мембран довольно высокой прочности.

5) Добавление порошкообразного активированного угля (ПАУ) для улучшения характеристик смешанного потока [237]. Улучшение в этом случае происходит за счет снижения сопротивления биомассы на поверхности мембраны и изменения распределения частиц до уровня больших размеров.

6) Химическая чистка. Используется достаточно широко как для восстановления проницаемости мембран, так и для снижения частоты восстановительной чистки. Выбор химических реагентов зависит от природы загрязняющих веществ в различных системах МБР.

Типовым решением, используемым при кольматации мембран, является аэрирование мембранного модуля. Улучшение условий аэрации возможно, например, путем оптимизации геометрии и расположения точек аэрации [238]. Общеизвестен

факт, что в варианте МБР с мембраной погружного типа интенсивность аэрации увеличивает линейную скорость пузырей воздуха, создающих тангенциальный турбулизирующий поток вдоль мембраны за счет поднимающихся воздушных пузырей, при этом удаляется образовавшийся слой на поверхности мембраны до его уплотнения. Однако увеличение интенсивности подачи воздуха имеет определенный предел, после которого эффект турбулизации сводится к минимуму и ведет к неоправданным энергетическим затратам. Поскольку газосодержание оказывает значительное влияние на параметры всего процесса, то важное значение имеет тип аэрационных устройств, устанавливаемых в МБР.

Существует опыт применения МРЕ технологии (Membrane Performance Enhancer), в которой в разделяемую смесь дозируется вещество, создающее пористый слой на поверхности мембраны, что повышает проницаемость мембраны. В этом случае в биореактор дополнительно вносятся такие вещества как активный уголь и др., которые образуют на поверхности мембран динамический слой (динамическую мембрану). Такая система была испытана на промышленной установке в Налько [239] с объемом биореактора 125 м<sup>3</sup>. МБР в Налько был предназначен для очистки сточных вод сыроваренного производства. Отличительной особенностью этих сточных вод было непостоянство состава. Как следствие, МБР работал в нестационарном режиме и нестабильно. Введение мембранообразующего компонента в биореактор привело к агрегации активного ила во флоккулы, сокращению трансмембранного давления на 70%, повышению проницаемости мембран на 300%, повышению качества пермеата за счет снижения ХПК сточной воды, снижению частоты химических моек, устранению вспенивания реактора, увеличению прогнозируемой жизни мембран на 40%. Вместе с тем, использование МРЕ-технологии имеет пока еще весьма малый опыт применения.

Наибольший эффект при борьбе с обрастанием может быть обеспечен при комбинации различных методов. Но все эти меры недостаточно эффективны. Требуется более сложное инженерно-техническое обеспечение, в ряде случаев установка префильтров для отделения крупных взвешенных частиц, поддержание целостности мембран, дополнительные энергозатраты на прокачку очищаемой среды через мембранные модули, очистка мембран химическими реагентами, поэтому эксплуатационные расходы при использовании мембранных реакторов высокие, в частности, удельный расход электроэнергии составляет – 3–4 кВт·ч/м<sup>3</sup> по сравнению с 0,2–0,5 кВт·ч/м<sup>3</sup> при традиционной биологической очистке. Капитальные затраты на мембраны также велики. Поэтому в настоящее время МБР находят применение, в основном, для обработки низкоконцентрированных сточных вод, когда лимитирование кислородом не критично, а также при удалении из них азота.

Опыт компании GE по эксплуатации полуволоконных погружных модулей показывает, что энергопотребление на обдувку мембран и откачку фильтрата может быть снижено до  $0,1 \text{ кВтч/м}^3$ . Этот показатель сопоставим с энергозатратами на перекачивание возвратного активного ила из вторичного отстойника в аэротенк и на работу сооружений доочистки.

Для дальнейшего сокращения расходов, как полагают, есть несколько направлений. Первое направление – снижение затрат на выпуск мембран. Однако здесь возможно снижение лишь при стандартизации мембранных технологий. Второе направление – это управление качеством активного ила. Данное направление незаслуженно обходится стороной [74]. Третьим направлением является оптимизация энергозатрат в процессе эксплуатации МБР.

В целом, установки на основе МБР обеспечивают высокую степень очистки сточных вод. Требуемое качество сточных вод по микробиологическим показателям после прохождения очистки в МБР позволяет повторно использовать воду, несмотря на обилие вторичных источников микробиологического загрязнения вне МБР.

### **1.2.3. Совмещение химических, фотохимических и биологических реакций**

Совмещение химических, фотохимических и биологических реакций в едином технологическом процессе может осуществляться либо по последовательной схеме с проведением каждого из отмеченных процессов в отдельном реакторе [240-245], либо путем одновременного использования анаэробных, аноксигенных и аэробных реакций, химического и биологического или фотохимического (фотокаталитического) и биологического агентов в едином реакторе [246-250].

В единой реакторной системе в локальном масштабе компоненты могут быть пространственно разделены. Примеры: распределение по зонам микроорганизмов различных физиологических групп в микроагрегатах, гранулах, флокулах, биопленках, при иммобилизации на носителях, в микрокапсулах, липосомах, коацерватных каплях и т.п.

Воздействие окислительных абиотических агентов может активировать соединения, трудно поддающиеся биологической деградации, повысить их биодоступность [249-254]. Образующиеся продукты окисления и фрагменты молекул микроорганизмы могут затем использовать как источник питания и энергии, завершая таким образом минерализацию загрязнений. С другой стороны, биологическая стадия деструкции может снизить затраты на разложение опасного поллютанта.

При последовательной химической или фотохимической обработке загрязненных стоков – на первой ступени и биологической – на второй часто на первой стадии

используются сильные окислители, например пероксид водорода, реактив Фентона ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ) [255, 256], озон, кислород в синглетном состоянии, мягкое ультрафиолетовое излучение,  $\text{TiO}_2$  и УФ-излучение, фотокаталитическое воздействие солнечного излучения, ионизирующая радиация [257-265]. Обработка озоном, пероксидом водорода, мягким ультрафиолетом, ультразвуком, электролизом на стадии подготовки воды к биологической очистке улучшает биодоступность трудноокисляемых загрязнений и, соответственно, показатели биоочистки [72, 243, 266-271].

Последовательные процессы химической и биологической деструкции стойких органических соединений с использованием пероксида водорода и реактива Фентона были объектом многих исследований [240, 242, 243, 267, 272-279], в том числе при очистке сточных вод [240-242, 266, 278, 280-285]. Пероксид водорода и окислительный реактив Фентона были испытаны для предобработки хлорированных алифатических и ароматических соединений [241-243, 246, 247, 273, 286-290], тринитротолуола [291], формальдегида [292], дизельного топлива [293].

В наших исследованиях проводили последовательную обработку чрезвычайно биостойких катионита КУ-2-8 и анионита АВ-17 пероксидом водорода в комбинации с добавками ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (реактив Фентона) или только окисленными формами ионов переходных металлов с целью оценки возможности биотехнологического разложения отработанных ионообменных смол как отходов атомных электростанций [244, 245]. Матрица обоих ионитов представляет собой пространственно сшитый сополимер стирола и дивинилбензола, несущего сульфогруппу  $-\text{SO}_3^-$  (катионит КУ-2-8) или четвертичную аминогруппу  $-\text{N}(\text{CH}_3)^+$  (анионит АВ-17). Ее сетчатая трехмерная структура затрудняет доступ биологического агента (ферментов, микроорганизмов) в центр гранулы ионита.

Обработка катионита КУ-2-8 реактивом Фентона приводила к образованию жидкой смеси олигомеров с различной степенью деструкции, которая была способна в дальнейшем расщепляться селекционированными консорциумами гетеротрофных микроорганизмов на 50% и более. Добавки полученной жидкой фракции в питательную среду с микроорганизмами и катионитом также способствовали биологической эрозии необработанного катионита.

Также апробировались варианты, в которых ионит окисляется ионами  $\text{Fe}^{3+}$  или  $\text{Mn}^{4+}$  ( $\text{Mn}^{3+}$ ), а последние – кислородом воздуха с участием железooksисляющих или марганецooksисляющих микроорганизмов. Было показано, что катионит КУ-2-8 принципиально доступен этим хемолитотрофам без предобработки химическими реагентами, причем наиболее явно деструкция протекала в присутствии в среде ионов марганца и, соответственно, марганецooksисляющих бактерий. Возможность биодеструк-

ции непредобработанного катионита КУ-2-8 и гетеротрофными, и хемолитотрофными микроорганизмами была показана нами впервые.

При предобработке воды ультразвуком, импульсным монополярным либо bipolarным электрическим током проявляются новые эффекты, обусловленные генерированием окислителей, что используется на стадиях предподготовки стоков к биологическому окислению [294, 295] или с целью активирования реакций кондиционирования воды и ликвидации нежелательных последствий побочных процессов.

Зачастую ввод дополнительной энергии в загрязненную экосистему перед биологической очисткой может приводить к увеличению в несколько раз количества разрушенного органического вещества по сравнению с обычным процессом [72, 243, 271, 293, 296-298].

Активные формы кислорода и другие сильные окислители токсичны по отношению к микроорганизмам и обладают мутагенной активностью [289, 290, 299, 300]. Поэтому для реализации совмещенных процессов с одновременным протеканием химических, фотохимических и биологических реакций деструкции в едином реакторном пространстве необходима разработка решений, допускающих одновременное присутствие в одном и том же объеме (в одном и том же реакторе) биологических и химических или фотохимических агентов, агрессивных к разлагаемому субстрату и неагрессивных к биологическим агентам. Микроорганизмы должны быть до некоторой степени устойчивы к повышенным концентрациям активных реагентов.

С другой стороны, имеются примеры благоприятного влияния активных реагентов, в частности  $H_2O_2$  или мягкого ультрафиолета (УФА-поддиапазона спектра с длиной волны 320–400 нм), на микроорганизмы-деструкторы, активный ил очистных сооружений и качество очистки сточных вод [247, 271, 289, 301-304].

Обработка активного ила аэробной очистки сточных вод небольшими дозами озона или пероксида водорода [266, 284, 305], кавитацией [306] может привести к укрупнению его флокул и повышению осаждаемости. Положительным моментом такой обработки может быть снижение количества образуемого избыточного ила [269, 307-310], подобно тому, как это наблюдается при аэробной обработке активного ила в режиме голодания [311, 312].

Примеров одновременной обработки загрязненного материала реактивом Фентона или его аналогами и живыми микроорганизмами известно немного.

В работах Vüyükşönmez et al. [246, 247, 290] в связи с разработкой гибридной биокаталитической системы с использованием микробного деструктора ксенобиотиков *Xanthobacter flavus* и реактива Фентона, были исследованы токсический эффект этого реактива и деградация перхлорэтилена (ПХЭ) в модельной системе с одновременным химическим окислением реактивом Фентона и микробиологическим. Ис-

пользовался штамм, утилизирующий дихлоруксусную кислоту в качестве единственного источника углерода и энергии и изолированный из активного ила очистных сооружений. Клетки, предварительно адаптированные к  $H_2O_2$ , показали высокий % выживаемости (до 80%), в то время как неадаптированные были чувствительны (выживало 10%). Результаты показали, что защитный механизм был связан с индукцией каталазной активности. Степень минерализации в присутствии микроорганизмов в оптимальных условиях (концентрация  $Fe^{2+}$  около 8–15 мг/л, концентрация  $H_2O_2$  – 50–75 мг/л, ПХЭ 3–5 мг/л, клеток  $10^6$ /мл ) увеличивалась на 20%.

В работе Steinle et al. [313] микробная популяция *Ralstonia sp.* росла и полностью минерализовала 2,6-дихлорфенол в реакторе с биопленкой, сформированной на поверхности стеклянных бус, с подачей  $H_2O_2$  в качестве источника кислорода. Недостаток пероксида полностью останавливал дальнейшую деградацию 2,6-ДХФ, которая возобновлялась при повторной подаче  $H_2O_2$ .

В работе [289] был изучен микробный ответ к  $H_2O_2$  как источнику кислорода в лабораторных системах в колонках при окислении бензола, толуола, этилбензола, *o*-ксилола и *m*-ксилола и добавлении  $H_2O_2$  в увеличивающихся концентрациях. При адаптации к  $H_2O_2$  увеличивались активности каталазы и супероксиддисмутазы. Отношение потребления кислорода к углероду было около 0,3 до добавления  $H_2O_2$  и 0,7 – при добавлении 10 мг  $H_2O_2$ /л.

Положительные эффекты наблюдали при использовании озона вместо  $H_2O_2$ . При обработке озоном сточных вод в количестве 6,0–60,0 мг/л перед первичным отстаиванием [270] значительно увеличивалась удельная скорость окисления загрязнений микроорганизмами активного ила. В результате деструктивной обработки (механической, озоном, ультрафиолетом) части активного ила [310] в отдельном реакторе с временем пребывания активного ила в узле деструкции около 2 ч с последующим рециклом обработанного ила в аэротенк ферментативная активность системы биологической очистки возрастала в 5–8 раз, величина ХПК очищенных сточных вод составляла менее 18 мг/л, БПК – менее 5 мг/л.

В совмещенных биомембранных процессах иногда используют непосредственное введение озона (воздействие жесткого УФ) в зону биоочистки [314]. При прямом дозировании озона в иловую смесь в количестве 2,5 мг/л часть клеток микроорганизмов разрушается, вследствие чего общий объем прироста сокращается на 30% [315].

Другое положительное действие АФК при очистке в мембранном реакторе может быть обусловлено повышением проницаемости мембран. Согласно [316] воду обрабатывают в биореакторе с мембранной сепарацией воды и активного ила и осуществляют периодическую регенерацию сепаратора. Мембрана содержит в своем составе катализаторы окисления в виде соединений металлов переменной валентно-

сти, например оксидов марганца или кобальта. Результирующий эффект – интенсификация процессов биологической очистки воды, увеличение продолжительности фильтроцикла мембранного сепаратора и повышение надежности его работы.

Практическое воплощение также нашли попытки использования пероксида водорода в процессах культивирования микроорганизмов, в частности, в системах высокоплотностного культивирования генноинженерных штаммов [317]. В этом случае  $H_2O_2$  используется как дополнительный источник кислорода. Использование  $H_2O_2$  в технологии культивирования микроорганизмов при получении продуктов биосинтеза дает определенные преимущества и для получения посевного материала с высокой засевной плотностью дрожжевых клеток, экономии субстрата, интенсификации процессов биосинтеза [318].

Трактовка положительных эффектов в отношении биоочистки повышением биодоступности потенциальных субстратов в подобных работах составляет лишь одно из возможных объяснений. Другое объяснение положительного совместного абиотического и микробиологического действия на улучшение показателей биологической очистки связывают с возрастанием скорости мутирования под действием АФК и селективного сдвига, адаптивной эволюции в сторону более полного использования микроорганизмами потребляемых субстратов [319-321].

С технологической точки зрения не представляет особых сложностей реализация совмещенных процессов с внесением пероксида водорода в очищаемую среду. Использование пероксида водорода в промышленных масштабах – хорошо отработанная технология прежде всего в процессах очистки сточных вод [243, 322-324]. Для промышленности преимуществами пероксида водорода по сравнению с другими окислителями (хлорноватистая кислота, озон, перманганат калия) является его относительная стабильность при хранении в виде пергидроля (30–50%  $H_2O_2$ ), отсутствие вторичных продуктов при деструкции и окислении органических загрязнений, возможность обработки, в частности, воды в широком диапазоне температур и pH, сравнительная простота аппаратного оформления процесса введения в воду [325].

В силу своих технологических преимуществ пероксид водорода получил широкое распространение в зарубежной практике очистки промышленных сточных вод. Однако эти преимущества послужили основанием для практического применения пероксида водорода прежде всего при дезинфекции сточных вод, прошедших полную биологическую очистку, поскольку при обработке больших масс воды и неочищенных стоков требуются слишком большие количества дезинфектанта [325]. В технологии очистки необработанных сточных вод  $H_2O_2$  используется для окисления формальдегида, ПАВ, соединений серы, красителей, сероводорода и растворимых сульфидов, цианидов, нитритов, нитрилов и ряда других соединений азота, для

очистки сточных вод процессов вулканизации резины, нитрования, тепловой обработки металлов от нитритов, для очистки от соединений серебра и других тяжелых металлов [5].

В России широкому применению  $\text{H}_2\text{O}_2$  в технологии очистки промышленных сточных вод препятствуют сравнительно высокая его стоимость и дефицитность [322].

Из рассмотренного материала следует, что одним из вариантов повышения эффективности биологической очистки может быть использование совмещенного процесса биологического окисления с внесением пероксида водорода (или реактива Фентона  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ). Такая система, с одной стороны, может увеличить биодоступность загрязнений, трудно поддающихся биологическому окислению, с другой, следуя аналогии с природными механизмами самоочищения, способствовать уменьшению количества вторичных отходов и остаточных загрязнений.

Наряду с повышением биодоступности субстратов, скорости адаптивного эволюционирования под действием АФК и других активных реагентов объяснение положительных комбинированных влияний на микробные популяции может проистекать из представлений о том, что при воздействии АФК (УФ облучения, обработки озоном, пероксидом водорода, механической дезинтеграцией биомассы, голодании и др.) протекают комплексные процессы на фоне стресс- и антистресс-факторов, перекрестных стрессов, регуляторных функций АФК. На эти особенности в инженерно-технологической литературе обращается мало внимания. В этой связи особенности биологического и физиологического отклика микробных популяций на стрессовые воздействия, в частности, активных форм кислорода и подобных им реагентов более подробно рассмотрены в главе 2.

#### **1.2.4. Абиотические природные процессы самоочищения и их использование в совмещенных системах биосинтеза и биологической очистки**

Природные среды могут рассматриваться как каталитические системы, содержащие комплекс биотических и абиотических компонентов. Два или более из этих компонентов могут быть одновременно вовлечены в одни и те же реакции, так что трансформация соединений протекает как комплексный процесс [4-8]. Одновременное протекание абиотических и биотических процессов, наблюдаемое, в частности, на освещенных солнечным светом поверхностях, сопровождается фотохимическим воздействием ультрафиолета, образованием  $\text{H}_2\text{O}_2$  и других активных форм кислорода (АФК), частиц радикалов [7, 9], локальных зон с повышенной температурой, ин-

дуцирующих у различных организмов реакции ответа на оксидативный стресс и тепловой шок. Одновременно видимый свет участвует в нейтрализации негативных изменений через механизмы фоторепарации и перекрестные реакции. Химические вещества, находящиеся в среде, могут одновременно оказывать прооксидантное и антиоксидантное действие. Удивительно, но до настоящего времени в литературе по культивированию микроорганизмов такому комбинированному действию как методу управления биосинтезом, не уделялось внимания, не учитывались экологические особенности таких поверхностных ниш.

Активные формы кислорода относятся к числу наиболее экологически и биологически важных радикалов. Хотя не все образующиеся формы кислорода являются радикалами, этот термин употребляется в отношении всех кислородсодержащих частиц, более реакционно-способных, чем молекула кислорода в триплетном состоянии ( $^3\text{O}_2$ ) [326-328]. К реакционно-активным окислительным агентам принято относить и мягкое ультрафиолетовое излучение УФА и УФБ диапазонов спектра, воздействие которого на водные среды и химические соединения приводит к накоплению кислородсодержащих активных частиц ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{O}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ), а также органические свободные радикалы: алкильные  $\text{R}\cdot$ , алкилпероксидные  $\text{RO}_2\cdot$ , алкоксильные  $\text{RO}\cdot$ , анион-радикалы восстановительной природы  $\text{D}^{\bullet-}$  и некоторые другие. Важную роль в процессах окисления играют озон  $\text{O}_3$ , атомарный кислород  $\text{O}$ , оксид азота  $\text{NO}$  (в атмосфере) и особенно пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в водных средах) [5, 6, 327, 329-333].

АФК постоянно присутствуют в воде и образуются в результате реакций каталитического инициирования, растворения активных газов из атмосферы, радиационно-химического инициирования, кавитационных эффектов, фотохимического инициирования, биологической эмиссии. Ведущая роль в этих процессах принадлежит каталитическому и фотохимическому инициированию, а также генерированию радикалов за счет биологической эмиссии [5, 6].

К образованию свободных радикалов приводят реакции каталитического инициирования в результате одноэлектронного восстановления кислорода, пероксида водорода, катализируемого ионами меди, железа, никеля, кобальта (II) и некоторых других химических элементов (As, Be, Cd, Hg, Pb). Ионы железа (II) катализируют распад пероксида водорода, и от концентрации этих ионов зависит механизм его распада [5, 6, 72].

При  $[\text{Fe}^{2+}] < 10^{-2}$  моль/л взаимодействие протекает в соответствии с уравнением:

$$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot,$$

а сама пара  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  выступает как реактив, генерирующий радикалы  $\text{OH}^\bullet$  (реактив Фентона). В случае  $[\text{Fe}^{2+}] > 10^{-2}$  М процесс протекает по уравнениям, исключающим образование радикалов.

Гидроксильный радикал является неспецифическим сильным окислителем, реагирующим с большинством органических и биологических молекул со скоростью, контролируемой диффузией ( $> 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [334].

В водной среде такие радикалы, как  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , а также  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{O}_2$  образуются за счет растворения озона, монооксида азота и других активных газов из атмосферы. Стационарная концентрация  $\text{O}_3$  в приповерхностных слоях воды достигает  $10^{-8}$  М [335]. К образованию  $\text{H}_2\text{O}_2$  может приводить поступление легкоокисляемых органических соединений в водоем. Об этом свидетельствуют факты, когда в зоне сброса неочищенных городских сточных вод наблюдается увеличение содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в воде [5, 336, 337]. Однако в обычных условиях, без принудительного увеличения потока  $\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2$  или органических загрязнений в водную среду, скорость инициирования радикалов за счет растворения активных газов относительно мала.

Реакции фотохимического инициирования свободных радикалов протекают под действием солнечного УФ-излучения [338]. Фотохимические процессы, инициированные видимым и ультрафиолетовым солнечным излучением, наиболее активно протекают на поверхности воды и почвы и могут вносить существенный вклад в общий баланс процессов окислительной трансформации веществ [339, 340].

Гуминовые кислоты, хлорофиллы, рибофлавин и некоторые другие природные соединения могут выступать в качестве фотосенсибилизаторов, ускоряющих процессы трансформации веществ под действием солнечного излучения [334, 341]. Среди органических ксенобиотиков фотосенсибилизирующими свойствами обладают нафтолы, полициклические ароматические углеводороды, многие синтетические и природные красители. Сенсибилизаторами являются соли трехвалентного железа, оксид цинка, комплексные соединения кобальта, металлический йод и др. Железо, присутствующее на поверхности, может генерировать образование гидроксильных радикалов и других активных частиц кислорода, что способствует фотодegradации. Фотокаталитические процессы, протекающие на поверхности минералов с полупроводниковыми свойствами, таких как оксид титана, отличаются чрезвычайной эффективностью минерализации устойчивых поллютантов в мягких условиях. Это возможно благодаря тому, что  $\text{TiO}_2$  имеет ширину поглощения в энергетическом спектре, соответствующую длине волны от 380 до 410 нм. Эффект глинистых минералов также приписывают образованию гидроксильного или гидропероксильного радикалов, генерируемых при освещении частиц глин ультрафиолетовым светом в присутствии молекулярного кислорода и воды [7, 72].

Образование радикалов в результате биогенной эмиссии происходит, главным образом, опосредованно – как побочных продуктов в ходе переноса электронов по электрон-транспортной цепи в процессах дыхания и фотосинтеза, при окислении жирорастворимых соединений, в пероксисомах [342]. Доля электронов, вовлеченных в образование АФК (супероксид-аниона,  $H_2O_2$ ) составляет 1–5% от общего количества электронов, прошедших через ЭТЦ [342-347]. Концентрация  $H_2O_2$  в митохондриях составляет  $10^{-7} - 10^{-9}$  М, а супероксид-аниона – около  $10^{-11}$  М [335, 343, 344, 347]. Образованию гидроксильного радикала внутри клеток способствует также реакция  $H_2O_2$  с ионами  $Fe^{2+}$  при содержании последних в клеточном матриксе  $<10^{-2}$  М.

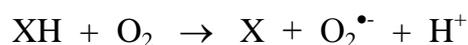
Биотическое происхождение  $H_2O_2$  в водных средах связывают прежде всего с жизнедеятельностью микроводорослей. Известны многие виды водорослей, выделяющие  $H_2O_2$  во внешнюю среду в процессе фотосинтеза. Практически все микроводоросли продуцируют  $H_2O_2$  при действии УФ-составляющей солнечного излучения.

Помимо микроводорослей известны некоторые бактерии, выделяющие  $H_2O_2$  во внешнюю среду в процессе жизнедеятельности. Некоторые почвенные бактерии (*Nitrosomonas*) выделяют радикал NO в ходе окисления  $NH_3$ . К образованию  $H_2O_2$  приводит ряд биохимических реакций окисления с участием оксидаз.

Важная роль в образовании  $H_2O_2$  принадлежит глюкозооксидазе (глюкозо-2-оксидазе), превращающей глюкозу в глюконолактон, в результате чего генерируется  $H_2O_2$ , которая запускает реакции окислительной деструкции внутри клеток.

В реакциях, катализируемых ксантинооксидазой, альдегидоксидазой, NADPH-оксидазой, переносится один электрон и образуется супероксид-ион  $O_2^-$ , который вызывает образование в клетке высокорекреакционных соединений [342, 348]. Реакции с участием мембраносвязанной NADPH-оксидазы являются одним из основных источников АФК в клетках различных организмов [348].

Оксигеназы катализируют перенос  $e^-$  на  $O_2$  с образованием супероксид-аниона:



Гидроксилирование многих органических ксенобиотиков с участием цитохром Р-450 монооксигеназ также сопровождается образованием супероксид-аниона [342].

Аутоокисление восстановленных флавопротеинов с участием NADPH-дегидрогеназы, ксантиндегидрогеназы, триптофандегидрогеназы, индоламинодиоксигеназы и других дегидрогеназ – еще один важный источник супероксида-аниона [342].

Пероксид водорода среди всех реакционно-активных кислородсодержащих частиц естественного биотического и абиотического происхождения играет особенно важную роль в абиотической трансформации органических соединений в водных средах, в самоочищении природных водоемов [5, 6, 8, 335, 349-351]. В круговороте

кислорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  занимает промежуточное положение между молекулярным кислородом и водой и является неотъемлемым компонентом природной водной среды [8, 296]. Концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяет, окислительный или восстановительный характер имеет среда данного водоема.

Стационарное содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  в природных средах определяется многими факторами и обычно колеблется в пределах  $10^{-6} - 10^{-5}$  моль/л и достигает  $10^{-4}$  моль/л. Атмосферная влага также содержит значительные концентрации пероксида водорода. Так, в дожде содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среднем около  $10^{-5}$  моль/л, в грозовом дожде концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  может достичь  $10^{-4}$  моль/л, в снеге содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  несколько меньше –  $10^{-5}$  моль/л [5, 335, 351].  $\text{H}_2\text{O}_2$  присутствует даже в пробах воздуха, содержащегося в полярных снежниках и льдах в образцах, возраст которых равен нескольким тысячам лет.

Действующие в России предельно допустимые концентрации для пероксида водорода составляют: в водоемах культурно-бытового назначения – 0,1 мг/л ( $3 \cdot 10^{-6}$  моль/л), в водоемах рыбохозяйственного назначения – 0,01 мг/л ( $3 \cdot 10^{-7}$  моль/л).

К уменьшению содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  и смещению окислительно-восстановительного баланса среды водоема в сторону восстановительного состояния ведет интенсивное выделение микроводорослями веществ с ярко выраженными восстановительными свойствами. Особенно активными продуцентами таких веществ являются цианобактерии, развитие которых угнетается в присутствии  $10^{-6} - 10^{-5}$  М  $\text{H}_2\text{O}_2$  [352]. Выделение ими активных веществ-восстановителей, эффективно взаимодействующих с пероксидом водорода, нейтрализует токсичное для них действие  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Абиогенный процесс распада пероксида водорода катализируется микроколичествами ионов металлов переменной валентности (ионами и комплексами меди и железа и др.).

Окислительные абиотические процессы с участием пероксида водорода могут выполнять важную роль в трансформации органических веществ, в процессах полимеризации остатков этих соединений [5-7]. В искусственных системах очистки они могут быть использованы для разложения некоторых органических ксенобиотиков и дезинфекции воды. Так,  $\text{H}_2\text{O}_2$  в естественных концентрациях окисляет многие амины и фенолы. Окисление этих веществ протекает более эффективно в присутствии катализаторов – солей железа (II) или железа (III), марганца, меди. Деструкция некоторых других органических веществ, например, полимерных материалов, протекает в результате автокаталитических реакций с кислородом, инициируемыми присутствием катализаторов.

Пероксид водорода участвует в деструкции многих природных биополимеров, осуществляемой, главным образом, грибами. Наибольшей активностью в разложе-

нии таких устойчивых полимеров, как лигноцеллюлоза и лигнин, обладают грибы – возбудители белой гнили. Среди промежуточных продуктов распада целлюлозы и лигнина обнаружены  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}^{\bullet-}$ , целлобиоза, глюкоза, целлобионовая кислота, феноксильные радикалы [353].

Соединения переходных металлов участвуют наряду с агрессивными кислородными радикалами и частицами в регулировании окислительно-восстановительного баланса водной среды, отвечают за ее биологическую полноценность и сбалансированность химико-биологических процессов в системе водная среда – организмы гидробионтов – донные отложения.

В окислительной трансформации веществ в водных средах важную роль играет цикл марганца [5, 6]. В аэробных условиях марганец существует в виде нерастворимых оксидов марганца (III, IV), находящихся в воде либо в виде метастабильных микроколлоидных частиц, либо крупных коллоидов. В анаэробных условиях, например, на дне водоема оксид марганца восстанавливается до  $\text{Mn}^{2+}$ , поступает в толщу воды, где вновь окисляется. Аналогичный круговорот совершают ионы железа.

Окисление ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в воде до Mn (III, IV) осуществляется марганцеоксилирующими бактериями и абиотически при воздействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и свободных радикалов. В условиях достаточного обеспечения кислородом марганцеоксилирующие бактерии окисляют растворимые соединения марганца, образующиеся в результате деятельности факультативно-анаэробных микроорганизмов в болотах, илах и в почвах. Образующиеся оксиды марганца устойчивы в аэробных условиях и нерастворимы в воде.

Восстановление металлов с участием микроорганизмов может быть использовано для биоокисления органических и неорганических отходов [354]. Окисление моноароматических соединений до диоксида углерода в присутствии Fe(III) как единственного акцептора электронов является возможным механизмом биоокисления органических загрязнений, например, при нефтяном загрязнении водоносного слоя или при загрязнении почв фенолами.

Функционирование цикла окисления-восстановления марганца может быть взято за основу при разработке, в частности, методов деструкции особо токсичных труднодеградируемых органических соединений: ароматических соединений, полимерных материалов и др. По сравнению с известными попытками использовать железобактерии для целей биодеструкции органических веществ, данная система может оказаться гораздо эффективнее из-за большей окислительной способности ионов  $\text{Mn}^{3+}$  и  $\text{Mn}^{4+}$  по сравнению с ионами  $\text{Fe}^{3+}$ . Такая система окисления-восстановления была апробирована нами для биодеструкции отработанных ионообменных смол – отходов атомных электростанций [244, 245].

В почвенных средах определенную роль в окислительной абиотической трансформации загрязнений могут выполнять глинистые минералы и оксиды металлов, в первую очередь железа и марганца по причине их большего содержания в почве [7, 72].

Глины способны катализировать реакции электронного переноса [7, 72]. Один из наиболее простых случаев – окисление ароматических молекул до радикал-катиона на филлосиликатах, содержащих катионы переходных металлов. Другой хорошо изученной системой являются Fe(III) и Cu(II) смектиты. Смектитовые глины могут переносить электроны между структурными  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  центрами и органическими молекулами, адсорбированными на внешней или внутренней поверхности. В некоторых случаях окисление адсорбированных на поверхностях глин органических молекул осуществляется непосредственно кислородом, а не ионами металлов. Адсорбированные  $Fe^{3+}$  и  $Cu^{2+}$  могут также катализировать похожие окислительные процессы.

Многие замещенные ароматические соединения могут подвергаться катализируемому глинами свободно-радикальному окислению. При реакции бензола или фенола с  $Fe^{3+}$ - или  $Cu^{2+}$ -замещенными смектитами образуется высокомолекулярный полимер. В этом процессе участвуют радикал-катионы ароматических молекул, образуемые на поверхности глин [7, 72].

Абиотические процессы трансформации с участием оксидов Mn(III/IV) и Fe(III) играют важную роль в окислении природных и техногенных фенолов в почвенных средах. Фенольные кислоты – продукты деградации лигнина, составляющие большую долю эксудатов, высвобождаемых растениями в стрессовых условиях. Для растений они важны как соединения, способные мобилизовать необходимые микроэлементы, и как фитотоксины. Оксиды Mn(III/IV) и Fe(III) достаточно сильные окислители для очень быстрого окисления фенольных соединений.

Совокупный результат процессов, протекающих с участием агрессивных кислородных радикалов и частиц, прежде всего  $H_2O_2$ , и металлов переменной валентности, отражает состояние трофности природного биотопа, окислительно-восстановительный баланс среды, эффективность процессов самоочищения природных сред, таких, например, как непроточные водоемы. Самоочищение природных сред – это процесс совместного действия биоты, химически-активных частиц, активных форм кислорода ( $H_2O_2$  и др.), ионов железа, марганца и др. При самоочищении биологические процессы протекают одновременно и во взаимодействии с абиотическими процессами: физическими, физико-химическими, химическими, фотохимическими. В этих процессах пероксид водорода и другие АФК могут являться межпопуляционными регуляторами в биоценозе.

Применительно к решению прикладных задач контроль и регулирование концентрации пероксида водорода, окисленных и восстановленных форм переходных металлов (Mn, Fe) в среде может служить одним из средств повышения эффективности биологической очистки загрязненных вод, уменьшения вторичных отходов, повышения качества очистки и снижения затрат на разложение загрязнений. Апробация этого подхода целесообразна, в частности, в системах аэробной очистки сточных вод с полным рециклом активного ила с одновременным обеспечением высокого качества очищенной воды. В таких системах избыточный ил должен образовываться в небольших количествах, что важно для снижения затрат на его утилизацию. Режим с полным рециклом активного ила, иначе называемый режимом с полным самоокислением ила, давно апробирован специалистами в области биологической очистки сточных вод, однако он не позволяет обеспечить высокое качество очищенной воды.

## ГЛАВА 2. СТРЕСС И СИСТЕМЫ ОТВЕТА НА СТРЕСС У МИКРООРГАНИЗМОВ

### 2.1. Понятие стресса, уровни ответа на стресс и его виды

В природных условиях воздействия различных факторов изменчивы, обычно не бывают оптимальными для жизнедеятельности и предопределяют регулярное пребывание организма в условиях стрессов различной степени выраженности. Выживание под действием стресса, определяемого многими факторами, скорее является правилом, чем исключением, поэтому способность выдерживать неблагоприятные условия, а также возможность усиления синтеза определенных метаболитов в этих условиях имеют чрезвычайно важное значение для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов.

Применительно к культивированию микроорганизмов используются следующие определения стресса:

- состояние микроорганизма, при котором происходит нарушение гомеостаза клеток под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды, сопровождающееся формированием клетками адаптивного ответа за счет вынужденной мобилизации собственных физиологических и генетических резервов [355];
- воздействия за пределами нормального диапазона контроля гомеостаза;
- физиологические изменения, обусловленные модификацией окружения (физические, химические, условия питания), которые могут иметь множество последствий для микроорганизмов, таких как задержка роста и гибель клеток [356-358];
- совокупность ответных реакций, которые направлены на преодоление неблагоприятных изменений условий культивирования, вызванных воздействием стрессовых факторов.

Состояние стресса у микроорганизмов может быть связано или не связано с нарушениями клеточных структур, т. е. клетки могут быть или не быть травмированы. Под влиянием сублетальных воздействий неблагоприятных факторов происходят перестройки в процессах обмена веществ в клетке, имеющие очевидное адаптивное значение. При стрессорном воздействии у микроорганизмов активируются различные системы адаптивного ответа [348, 359, 360].

**Стрессовые факторы** – это факторы абиогенного и биогенного происхождения, способные вызывать у микроорганизмов состояние стресса. Воздействие стрессовых факторов может быть направлено на сами клетки, на их субстраты и метаболиты. В литературе применительно к стрессовым факторам, воздействующим на живые объекты, принято использовать термин «**стрессоры**» [361].

К стрессовым факторам относят изменение условий освещения и температуры, изменение газового состава среды, осмотический и рН-шок, голодание, вызванное недостатком или отсутствием какого-либо источника питания, ультрафиолетовое излучение, ионизирующую радиацию, действие различных окислителей (окислительный или оксидативный стресс), токсичных веществ, замораживание, высушивание, механическое повреждение и т.д. [348, 360, 362]. Часто наблюдается совместное и раздельное действие этих факторов на живые организмы.

В микробиологических системах культивирования важна устойчивость микроорганизмов к воздействию стресса, которая в широком смысле характеризует их способность удовлетворять необходимым предопределенным требованиям.

Принято считать, что любой стресс оказывает **негативное влияние** на живые клетки. Если воздействие стрессоров не выходит за пределы зоны толерантности, то речь может идти о подпороговых (сублетальных) стрессах, к которым микроорганизмы могут адаптироваться и изменять свой метаболизм в ту или иную сторону при освоении экологических ниш или поддержании внутриклеточного и внутрипопуляционного гомеостаза. В пределах диапазона толерантности воздействие стрессоров запускает разнообразные адаптивные механизмы ответа у микроорганизмов, которые во многом аналогичны ответам в клетках и организмах высших животных – от стимуляции физиологических процессов до их ингибирования [348, 359, 360, 363, 364]. Их размножение замедляется и прекращается. Метаболизм перестраивается на синтез белков, необходимых для выживания [365, 366]. При культивировании микроорганизмов отклонение совокупного микробиологического процесса от оптимальной траектории переводит часть или всю популяцию клеток в состояние стресса и обычно снижает их целевую физиологическую активность и ухудшает выходные показатели биосинтеза (за исключением особых случаев, когда наблюдается направленная индукция целевого продукта в стрессированной культуре). Учитывая нелинейность процессов регуляции метаболизма и множественность устойчивых состояний нелинейных биологических систем, при критических стрессорных отклонениях от оптимального состояния возврат стрессированных микробных популяций в прежнее состояние часто затруднен [10, 11].

Факторы и процессы, которые помогают микроорганизмам преодолевать неблагоприятные изменения, можно определить как антистрессорные (**антистрессоры**).

Надо иметь в виду, что в природных условиях часто наблюдаются **совместные воздействия стрессоров и антистрессоров**, примером которого является одновременное **прооксидантное** и **антиоксидантное** действие химических веществ, находящихся в среде [367-375].

Можно выделить следующие **уровни ответа на стресс** у микроорганизмов:

- адаптивные реакции и ответ, адаптивная эволюция на популяционном уровне;
- адаптивные реакции и ответ на уровне фенотипа и внутривидовой динамики;
- модификационная изменчивость и эпигенетические изменения;
- ответ и регуляция на клеточном уровне;
- физиологические реакции, физиологическая регуляция;
- ответ и регуляция метаболизма на биохимическом уровне;
- ответ и регуляция метаболизма на генетическом уровне.

## **2.2. Адаптивные реакции у микроорганизмов на популяционном уровне при стрессовых воздействиях**

Адаптация характеризует способность особей и популяций видоизменяться в направлении, увеличивающим шансы на сохранение жизненной активности, и способность к размножению в данных условиях окружающей среды [376]. В микробиологии традиционно понимание адаптации как процесса выработки приспособлений организмов к условиям данной среды существования.

Процесс приспособления к среде определяется регуляторными механизмами биологической клетки, генетическими особенностями популяции, составом биологического сообщества. Изменение условий среды или существовавших групп приводит к появлению свободных экологических ниш, заселяемых в силу естественного отбора наиболее приспособленными формами, у которых признаки организмов способствуют выживанию и воспроизведению вида (то, что называют адаптивной радиацией). Освоение видом новой среды возможно лишь при наличии у него свойств, возникших в прежней среде обитания, т.е. наличии **преадаптации** [377].

Изменения, наблюдаемые в ходе адаптации, представляют собой не что иное, как адаптивный клеточный ответ на стрессовое воздействие, стабилизирующий вид в экстремальных условиях. Микроорганизмы имеют многочисленные стратегии развития для того, чтобы справиться с изменениями [365, 366, 377-384].

Многие механизмы адаптации у организмов направлены на поддержание гомеостаза, т.е. относительного постоянства состава и свойств внутренней среды целостного организма (у высших животных) или отдельных клеток (у микроорганизмов и других одноклеточных организмов). Физиологическое равновесие и гомеостаз поддерживаются тогда, когда время адаптации к изменениям не превышает время самих изменений.

Практически все признаки организмов в той или иной мере служат выживанию и воспроизведению вида. Применительно к микроорганизмам их можно сгруппировать следующим образом:

- 1) адаптация к абиотическим факторам;
- 2) адаптация к питанию;
- 3) адаптации к биотическим воздействиям.

На фенотипическом уровне у микроорганизмов наиболее характерными проявлениями адаптации к действию стресс-факторов являются клеточная дифференцировка, морфологическая диссоциация, проявляющаяся в виде различных морфоформ колоний на твердых питательных средах, образование специализированных клеток – гетероцист, покоящихся форм (персистентных клеток), криптических клеток, спор, накопление резервных веществ, образование ультрамикрочелюток, предназначенных для выживания и распространения вида при наступлении неблагоприятных условий. В покоящихся формах микроорганизмов резко снижен обмен веществ и энергии, в силу чего они могут быть более устойчивы к различным повреждающим факторам внешней среды [365, 385-387].

Ещё в 1894 году Н.Ф. Гамалеем было обнаружено, что бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, сохраняют способность к развитию. Позднее в 1935 году подобные морфологические единицы были выделены и названы L-формами – (*Lister Institute in London*). Было показано, что L-формы могут возникать в ответ на разбалансировку в метаболизме «нормальных бактериальных форм» при воздействии бактериостатических антибиотиков, УФ-облучения, радиации или иных стрессорных факторов. Морфологически L-формы представляют собой шаровидные, нитевидные или бесструктурные клетки размером 0,2–50 мкм. Они обладают малой механической прочностью и низкой метаболической активностью. Пролиферация происходит путём неорганизованного отпочкования от поверхности клетки или от мембраны вакуоли с образованием элементарных тел различных размеров. Культивирование L-форм можно осуществлять на твердой среде, при этом колонии частично погружены в агар [365, 385]. L-формы способны превращаться в «нормальные» бактериальные клетки после исключения действия фактора, вызвавшего их конверсию, что выражает обратимость фенотипической изменчивости [388]. Однако известны и стабильные L-формы, способные развиваться в различных условиях среды, не возвращаясь в нормальные бактериальные формы. Обычно это касается сапрофитных и патогенных организмов [389]. Весьма распространено образование L-форм у *Bacillus subtilis* [390].

Известная у *Streptococcus pneumoniae* фенотипическая конверсия двух типов клеток – S-тип (*smooth*) и R-тип (*rough*) – обладает термовариабельностью, то есть

при нагревании клеточной суспензии клетки S-типа способны переходить в R-тип. Для *Bacillus subtilis* было показано наличие R и S форм по аналогии с *Streptococcus pneumoniae* и дополнительно Р (*phantom*) фенотипа, представляющего собой нечто промежуточное между вегетативной и споровой формой.

Для галобактерий *Halobacterium salinarum* морфологическая дифференцировка проявляется в наличии колоний с белой, оранжевой и сиреневой окраской.

Молочнокислые бактерии при углеводном голодании теряют способность образовывать колонии и переходят в покоящееся состояние по крайней мере в течение 2 недель. У молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* при расसेве длительно хранящихся (срок до 1 года) голодных (культивирование на среде, не содержащей глюкозу) клеточных суспензий наблюдается развитие отличных от доминанта вариантов, которые имеют различные и морфологические (размер колоний), и биохимические характеристики [391]. Минорные диссоцианты обладают повышенной терморезистентностью, а также устойчивостью к оксидативному стрессу. Кроме этого, имеются отличия на уровне хромосомальной ДНК, свидетельствующие об изменении регуляции экспрессии генов утилизации лактозы, мальтозы и рибозы, а также некоторых стрессорных генов. Также получены данные о фенотипических и генотипических различиях внутривидовых вариантов (клонов) молочнокислых бактерий для *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus delbreuckii subsp. lactis*. Было выяснено, что минорные и доминантные фенотипы различаются рядом биохимических характеристик, в том числе протеолитической активностью и устойчивостью к действию антибиотиков, а также плазмидными профилями [392]. Цистоподобные покоящиеся клетки в ходе голодания или при высокой плотности клеточной популяции образуются и у *L. plantarum* [393, 394].

Расшифровка механизмов фенотипической изменчивости показала участие каскадных клеточных ответов от первичного сигнала из окружающей среды, многоконтурного регулирования и регулонов генетической компетентности при переходном процессе смены фенотипа [395].

При клеточной и морфологической дифференцировке изменения происходят в рамках постоянства генотипа [396]. Это имеет приспособительное значение, выраженное в большой фенотипической вариабельности и конкурентоспособности вида и популяции в изменившихся условиях существования.

Фенотипическая изменчивость и вариабельность популяции может сопровождаться обратимыми внутригеномными генетическими перестройками [397]. Такая изменчивость может проявляться как фазовые и антигенные вариации, конверсия фенотипа, R-, S-, M – диссоциация. Механизмы подобной генетической вариабельности – адаптивные мутации, транспозиция мобильных генетических элементов,

профагов, дрейф плазмид [393]. Все они протекают с частотой порядка  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  на одно клеточное деление и проявляются на уровне фенотипа и морфологии. Одновременно изменяется и целый ряд других свойств клеток: степень вирулентности патогенных бактерий, интенсивность биосинтеза и т.п. [398]. Популяционная изменчивость фенотипа является широко распространенным механизмом, известным для большого числа бактерий кишечной группы, псевдомонад [399], бацилл [400], молочнокислых бактерий (выщепление минорных изолятов) [386, 401] и многих других микроорганизмов. Такую изменчивость относят к модификационной. **Модификационная изменчивость** носит приспособительный (адаптационный) характер. Изменчивость популяции происходит внутри (в пределах) нормы реакции генотипа и фенотипически проявляется только в период воздействия фактора, при этом не происходит изменений генотипа. Отличие модификационной изменчивости от обычных мутаций или классического генного регулирования заключается в том, что она обусловлена генетическими и эпигенетическими механизмами, не сопровождающимися наследованием признаков, поэтому модификационная изменчивость обратима, характеризуется высокой частотой реверсий к исходному фенотипу, и за две-три генерации можно воспроизвести гетерогенную популяцию, способную противостоять неблагоприятным внешним условиям [396]. Такая ненаследственная изменчивость, сопровождаемая обратимой перестройкой генома, особенно выражена при стрессовых воздействиях на популяцию бактерий и проявляется как адаптивный клеточный ответ на стресс.

С точки зрения управляемого культивирования микроорганизмов их модификационная изменчивость и способность адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, а также выявление закономерностей, контролирующих регуляцию диссоциативных переходов, представляют значительный практический интерес. Применительно к задачам диссертационной работы модификационная изменчивость может иметь значение при обработке микробной популяции низкими дозами стрессоров с целью ее преадаптации к более высоким дозам стрессовых воздействий [402, 403].

При адаптации к стрессу наряду с ненаследуемыми изменениями также могут наблюдаться стресс-индуцированные мутации [300, 404]. Генетическая перестройка популяции с появлением наследуемых признаков наблюдается, например, при автоселекции в условиях непрерывного культивирования микроорганизмов. Скорость и направление автоселекции зависят от природы организма и условий окружающей среды. В зарубежной литературе применительно к изменчивости, целенаправленно вызываемой условиями отбора, используется термин «адаптивная эволюция» [405, 406].

В качестве примера целенаправленной адаптивной эволюции можно упомянуть широко известный долговременный эксперимент по изучению эволюции 12 изолированных популяций *E. coli* в лабораторных условиях при росте на среде с глюкозой, проводимый научной группой под руководством Ричарда Ленски [407, 408], в ходе которого удалось получить и закрепить в популяции мутанты со способностью усваивать цитрат, входящий в состав питательной среды.

На практике методы адаптивной эволюции широко используются для повышения устойчивости к стрессу, выхода продукта и снижения затрат на его получение [406, 409-414]. Такая преадаптация означает постепенное улучшение стрессоустойчивости, когда микроорганизмы были в первый раз подвержены сублетальному аналогичному стрессу [402, 415].

В качестве примера практического применения метода адаптивной эволюции приведем работу Zhang et al. [416], в которой был изолирован кислотоустойчивый штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* Ib-2 по результатам эксперимента, проводившегося в течение 70 дней. Был выделен мутант с повышенным выходом биомассы и выживаемостью при кислотном стрессе. Этот мутант имел более высокий внутриклеточный pH и содержание  $\text{NH}_4^+$  в кислотных условиях. Внутриклеточное содержание аргинина и аспартата было выше на 40% и 23,9% соответственно по сравнению с исходным штаммом. Протеомный анализ показал, что наблюдалась повышенная экспрессия многих белков, включающая шаперонин (GroEL), белок репарации ДНК (RecO).

Большое практическое значение имели работы, направленные на автоселекцию штаммов с полезными признаками в непрерывных условиях культивирования.

Печуркин [379] выделял следующие типы мутантов, отбираемые при проточном культивировании:

- мутанты, способные более полно утилизировать лимитирующий субстрат;
- «экономичные» мутанты;
- более резистентные мутанты;
- более жизнеспособные мутанты;
- мутанты с пониженными скоростями отмирания;
- менее «мутабельные» мутанты;
- быстро растущие и быстро отмирающие мутанты;
- мутанты с увеличенной максимальной скоростью роста;
- мутанты, выделяющиеся в неоднородных по пространству средах.

Скорость увеличения мутации в природной или техногенной популяции будет зависеть от состояния развития биоценоза, численности мутантного штамма и степени его адаптационного преимущества. В микробной популяции с равновесной

устоявшейся численностью в достаточно замкнутой экологической нише, т.е. когда все экологические ниши заполнены и численность популяций стационарна, например, в почве или в проточной системе без отвода биомассы (в биореакторах с иммобилизованными клетками, в мембранном биореакторе) она может быть оценена следующим образом.

Пусть имеем 2 штамма микроорганизмов: нормальный  $n$  и мутантный  $m$ .

Пусть  $m$  имеет определенное адаптивное преимущество перед  $n$ . Можно принять, что суммарная средняя численность популяции  $m + n$  стабилизирована в экосистеме, т.е.  $X_m + X_n = X_{m0} + X_{n0} = \text{const}$ .

Мутация возникает с частотой  $q_0 = X_{m0}/X_{n0} \ll 1$  в момент времени  $t_0$  и далее накапливается в ходе отбора, увеличивая свою численность за одно поколение в  $1 + \alpha = k$  раз. В данном случае  $\alpha$  характеризует адаптивное преимущество мутантного штамма. В ходе смены поколения (за одну генерацию) доля  $q$  (частота мутации) штамма  $m$  возрастает в  $1 + \alpha = k$  раз, т.е. частота мутации в первом поколении будет  $q_1 = q_0 k$  (это справедливо до тех пор, пока  $q \ll p$ ). За второй цикл смены поколений – на величину  $q_2 = q_1 k = q_0 k^2$ ; за  $i$ -ый – на  $q_i = q_0 k^i$ , причем  $q_i + p_i = q_0 + p_0 = 1$ , где  $p_i$  – доля штамма  $n$ .

Необходимое число циклов смены поколений для достижения определенной величины  $q_i$ ,

$$i \approx \frac{\lg q_i / q_0}{\lg k}$$

Например, если  $q_0 = 10^{-7}$ ,  $\alpha = 10^{-3}$ ,  $k = 1 + 10^{-3}$ , то для достижения доли  $m \approx 1\%$  понадобится

$$i = \frac{\lg 0,01/10^{-7}}{\lg(1+10^{-3})} = \frac{2,3 \cdot 5}{\ln(1+10^{-3})} \approx \frac{2,3 \cdot 5}{10^{-3}} = 11,5 \cdot 10^3$$

циклов смены поколений.

Если время генерации 1 час, то понадобится  $\sim 1,3$  года для достижения доли мутанта  $m \sim 1\%$  в природной популяции.

Из этого примера видно, что на темпы эволюции прежде всего влияет  $\alpha$ , т.е. степень адаптивного преимущества мутантного штамма в популяции, а не его численность. При этом адаптивное преимущество может быть крайне мало.

Действие таких стресс-факторов, как УФ-излучение, реакционно-активные гидроксильные радикалы и другие АФК, приводит к повышению частоты мутаций, что дает возможность микробной популяции быстрее адаптироваться к стрессовым условиям за счет большего генетического разнообразия [300, 414, 417-418].

В случае модификационной изменчивости при действии стрессоров речь может идти о селективном преимуществе клонов, образовавшихся за счет внутригеномной

перестройки. Поскольку частота появления модифицированных клонов составляет  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  на одно клеточное деление, то, например, при содержании клона в исходной популяции 1% (т.е.  $10^{-2}$ ), в конечной популяции 90%, адаптационном преимуществе клона 10% (вполне реально для клонов с активно функционирующими системами ответа на стресс) необходимое число циклов смены поколений составит:

$$i \approx \frac{\lg q_i / q_0}{\lg k} = \frac{\lg 90 / 10}{\lg(1 + 10^{-1})} = 23$$

Т.е. понадобится всего 23 генерации клеток микроорганизмов для получения линии, адаптированной к стрессу. Если популяцию адаптировать к стрессу методом пассирования, в частности, пересевами из колб в колбу на фоне действия стрессора, то при 1% инокулята понадобится всего 3–4 пассажа.

Таким образом, применительно к воздействию стрессоров ответ микробных популяций может проявляться в виде фенотипической, модификационной (эпигенетической) и мутационной изменчивости. Действие ряда стресс-факторов не только создает селективное давление на популяцию, но и может ускорять ее адаптацию к стрессу.

### 2.3. Ответ на стресс на клеточном уровне

При сублетальных воздействиях клетки не погибают сразу, но оказываются травмированными, т.е. находятся в состоянии стресса. Их дальнейшая судьба в значительной степени зависит от условий, в которых они окажутся. У травмированных клеток во многих случаях нарушаются барьерные функции мембран, наблюдается выход в среду некоторых метаболитов, нарушается синтез белка, структура ДНК. Некоторые условия, вполне благоприятные для развития нормальных микроорганизмов, могут быть губительными для травмированных клеток.

Переход микроорганизмов в состояние стресса индуцирует и стимулирует у них ответные реакции, системы, направленные на преодоление неблагоприятных изменений. Эти ответы включают аспекты чувствительности клеток (к стрессовым факторам), передачу сигнала, транскрипционный и посттрансляционный контроль, накопление защитных веществ и активизацию репарирующих функций; метаболизм перестраивается на активизацию защитных функций в ущерб системам, связанным с ростом и размножением.

### 2.3.1. Поддержание гомеостаза и системы ответа на стресс-факторы

На клеточном уровне выявлен широкий спектр механизмов, генетических и биохимических систем, поддерживающих метаболический гомеостаз и повышающих выживаемость клеток в условиях стресса. В стресс-ответе могут участвовать осмопротекторы (при осмотическом стрессе), химические шапероны (при тепловом шоке), видимый свет (при фоторепарации), антиоксидантные системы (при оксидативном стрессе) и другие факторы, которые можно отнести к антистрессорным.

De Angelis et al. [419] выделяет 3 группы механизмов повышения устойчивости к стрессу, включающие:

- 1) ответ на стресс, ассоциированный со стационарной фазой, который связан с индукцией многих регулонов, помогающих преодолеть стрессовые условия;
- 2) специфический ответ, вовлекающий сверхсинтез белков, предназначенных для защиты клетки от специфических условий стресса;
- 3) перекрестный ответ, который индуцируется специфическим стрессом, но обеспечивает защиту также против других стрессов.

Часто эти механизмы функционируют комплексно, взаимно дополняют друг друга, пересекаются, вовлекают общие определенные гены и, таким образом, не полностью независимы друг от друга. В поддержании гомеостаза и перестройке метаболизма на клеточном уровне участвуют регуляторные белки, низкомолекулярные факторы, гормоны, обеспечивающие координацию процессов транскрипции и трансляции и получившие название алармонов (фр. *alarme* – тревога). Системы ответа на стресс и репарации находятся под контролем соответствующих генов. Время ответа с момента действия стрессора варьируется от нескольких секунд до нескольких часов [420, 421]. Например, молочнокислые бактерии отвечают на тепловой шок [422] и осмотический шок [423] в течение минут по сравнению с ответом на холод [424] в течение часов.

Подробнее рассмотрим основные особенности систем ответа на стресс у микроорганизмов с точки зрения расширения возможностей управляемого культивирования.

### 2.3.2. Общий ответ на стресс и система строгого контроля

В *общем ответе* на стресс и в системе строгого контроля участвуют более 100 белков [355, 425-429]. Они позволяют микроорганизмам переключаться на новые источники питания, стимулируют экспрессию белков, вовлеченных в подвижность и хемотаксис, и необходимы для адаптации к стрессу, каковой может быть вызван не

только голоданием, но и другими сигналами, такими как изменения в скорости роста, тепловой шок [430-432], гиперосмотический шок [421]. Кроме того, общий ответ на стресс важен для перекрестной защиты клетки от различных стрессов [421, 433].

Универсальными регуляторами, участвующими в общем ответе на стресс и в системе строгого контроля, являются низкомолекулярные факторы типа гуанозин-5',3'-дифосфата (ppGpp), циклический аденозинмонофосфат (сАМР), белковый регулятор общего ответа – субъединица РНК-полимеразы  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ , RpoS) у *E. coli*, DnaK супрессорный белок (DksA) [425, 429, 431, 434-437], циклический дигауинмонофосфат (di-GMP), ацетилфосфат (AcP). Эти регуляторы, наряду с QS-факторами, участвуют в образовании биопленок [438-441], в ответе на голодание, в переходе клеток в стационарную фазу, при осмотическом стрессе, кислотном шоке, тепловом и холодном шоке [428, 429, 442, 443]. Контроль их внутриклеточного содержания имеет важное значение для поддержания сверхэкспрессии целевых белков при культивировании рекомбинантных микробных продуцентов [420, 444].

*Система строгого контроля* включается в ответ на исключение из среды необходимых клетке аминокислот, источника углерода, солевой шок, инактивацию аминоацил-тРНК-синтетаз, падение температуры, при дефиците энергии (в виде АТФ). В регуляции ответа участвуют гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ppGpp) и гуанозин-5'-трифосфат-3'-дифосфат (pppGpp), координирующие процессы транскрипции и трансляции [436, 437, 445-448]. У *E. coli* накопление ppGpp, сАМР и  $\sigma^S$  в клетках наблюдается в условиях дефицита углеродного субстрата (глюкозы) [420, 449], как, например, в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом, и приводит к резкому торможению образования стабильных форм РНК (тРНК и рРНК) и, соответственно, к торможению формирования аппарата трансляции, избыточное количество которого в условиях голодания становится излишним и даже вредным. Это и есть так называемый строгий контроль. В накоплении самого ppGpp у *E. coli* участвует бифункциональный белок SpoT [450]. В условиях голода по компонентам питания или иным факторам SpoT работает как ppGpp-синтаза, а в случае избытка питания как ppGpp-аза. PpGpp активирует синтез  $\sigma^S$ -субъединица (RpoS) РНК-полимеразы, которая в свою очередь стимулирует экспрессию многих генов стрессоустойчивости. То есть в условиях умеренного голодания клетка более стрессоустойчива. С накоплением ppGpp одновременно подавляется транскрипция локусов рибосомных белков и факторов элонгации трансляции, наблюдается снижение общего уровня метаболизма, но активируются некоторые аминокислотные регулоны (триптофановый, гистидиновый), регулоны азотного метаболизма, протеолитические системы клетки, ускоряющие внутриклеточный протеолиз, регулируется ак-

тивность ряда ключевых ферментов метаболизма, участвующих в образовании нуклеотидов, фосфолипидов, пептидогликана, в транспорте азотистых оснований, изменяется чувствительность к свету [450]. Строгий ответ индуцирует масштабные физиологические транскрипционные изменения, которые ведут к переходу клеток в нерастущее состояние. Все это способствует выживанию клетки в стрессовых условиях. Гуанозинполифосфаты аналогичного или иного строения обнаружены в клетках многих про- и эукариот, где они, наряду с аденозинполифосфатами, выполняют различные регуляторные функции.

Тесная координация процессов транскрипции и трансляции важна для приспособления клетки к условиям голодания, например, при переносе на бедную среду (так называемый *shift-down*).

При обратной ситуации – переносе клеток на богатую среду (*shift-up*) процессы сопряженной транскрипции-трансляции (особенно на этапе биосинтеза и сборки аппарата трансляции) являются наиболее «узким» местом метаболизма, лимитирующим общую скорость роста популяции.

После обогащения среды происходит «вспышка» синтеза белка за счет мобилизации внутренних ресурсов, в частности, пула рибосомных субчастиц, тРНК переходит в «заряженное» состояние, в результате резко снижается образование рРgp и запускается быстрый синтез стабильных форм РНК (тРНК и рРНК), чему способствует множественная репрессия ранее функционировавших оперонов (в связи с наличием в богатой среде готовых конечных продуктов: аминокислот, азотистых оснований и др.). В итоге синтез белка и скорость роста увеличиваются до той величины, которую допускает сопряженное функционирование процессов транскрипции-трансляции.

### 2.3.3. Осмотический стресс

Важным фактором, влияющим на культивирование микроорганизмов, является начальное содержание субстрата в ферментационной среде, с повышением концентрации которого растет осмотическое давление и снижается активность воды. В растворе глюкозы с концентрацией 100 г/л осмотическое давление составляет примерно 1,5 МПа, при концентрации 200 г/л – 3,1 МПа, при 250 г/л – 4,1 МПа, а при 300 г/л глюкозы – уже 5,3 МПа [114].

При высоком содержании солей общий механизм, направленный на противостояние микроорганизмов экстремальной солености, связан с выбросом клеткой стрессового солевого агента и аккумуляцией соединений – осмолитов (осмопротекторов), совместимых с клеточным содержимым и структурами и противостоящих

внешнему осмотическому давлению. За синтез этих соединений ответственны *osm*-гены, которые включаются в клетках при повышении осмолярности среды [451].

Микроорганизмы накапливают такие водорастворимые осмопротекторы, как бетаин (N,N,N-триметилглицерин) [452-455], глицинбетаин и карнитин [456, 457], трегалоза [458, 459] и другие соединения. Присутствие в среде осмопротекторов (глицинбетаина, карнитина, пролина) существенно повышает устойчивость клеток к гиперосмотическому стрессу [423, 460].

У дрожжей-сахаромицетов осмотический стресс изменяет экспрессию более 100 белков. В осмоадаптацию вовлечены протеинкиназа А (сАМР-зависимая протеинкиназа), участвующая в общем ответе на стресс, а также универсальный для эукариот каскадный механизм передачи сигнала с участием митоген-активируемых протеинкиназ (МАР-киназ) [421, 461-469], транскрипционные факторы Msn2, Msn4, Hot1p, Sko1p и др. [470-473]. Большинство из них вовлечены в регуляцию ответа не только на осмотический стресс, но и на тепловой шок, окислительный стресс, голодание [421, 470, 474, 475].

У молочнокислых бактерий и ряда других микроорганизмов при повышенной концентрации углеводов в среде последние поступают в клетку по механизму облегченной диффузии, их внеклеточные и внутриклеточные концентрации уравниваются и поэтому оказывают менее существенное воздействие на клетки [423]. Такие МКБ как *L. plantarum* способны потреблять осмопротекторы из питательной среды, в отличие от *B. subtilis*, синтезирующих эти вещества [423, 456, 457, 460, 476-478]. В накоплении осмопротекторов участвует система транспорта четвертичных аммонийных соединений (QacT), принадлежащая к семейству ABC транспортных систем [460].

Другой общий механизм, направленный на противостояние микроорганизмов экстремальной солености, связан с выбросом клеткой стрессового солевого агента [479]. При гиперосмотическом стрессе предэкспонирование клеток МКБ к умеренным концентрациям NaCl повышает их устойчивость к более высоким концентрациям NaCl, а также устойчивость к желчным кислотам [391].

Третий механизм связан с защитой клеточной оболочки. Он обусловлен изменением жирнокислотного состава, соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембранах и текучести клеточных мембран [453]. Также возможна регуляция механочувствительных каналов, которые служат клапанами для транспорта осмолитов и воды. Эти каналы впервые были обнаружены у *E. coli*. Было найдено 2 канала – MscS (small conductance) и MscL (large conductance) [448].

Другие механизмы повышения устойчивости к осмотическому давлению: избирательное накопление ионов  $K^+$  при повышении осмолярности среды и синтез

внутри клетки полисахаридов с анионными группами. Они удерживают в периплазматическом пространстве катионы. В результате осмотический градиент создается на уровне внешней, а не цитоплазматической мембраны.

Стрессорные белки могут участвовать в ответе на осмотический стресс и способствовать правильной укладке частично развернутых полипептидов.

В гиперосмотических условиях наблюдается индукция транскрипции оперонов *dnaK* и *htrA* [480].

### 2.3.4. Ответ на кислотный стресс

Механизмы устойчивости к кислотному стрессу у микроорганизмов включают поддержание гомеостаза внутриклеточного pH с  $F_1F_0$ -АТФазной протонной помпой, функционирование системы строгого ответа с одновременным снижением активности аппарата трансляции, индукцию шаперонов и других белков ответа на стресс [448, 481-488], действие глутаматдекарбоксилаз и аргининдезаминаз, репарацию ДНК и белков, поддержание функциональной целостности мембран, изменения в составе жирных кислот мембран и в клеточной стенке [485] и в метаболизме [409, 419, 479, 481, 486, 489-495]. В ответ вовлечены регуляторные механизмы, включающие двухкомпонентную систему передачи сигнала (TCS) [489, 490, 493].

Такие микроорганизмы, как молочнокислые бактерии, не могут поддерживать внутриклеточный pH за счет активного транспорта при слишком низком снижении pH внеклеточной среды, однако у них функционирует другой, аргининдезаминазный (ADI) путь ответа на кислотный стресс, при котором в результате катаболизма аргинина образуется внутриклеточный  $\text{NH}_3$ , что приводит к защелачиванию внутриклеточной среды и повышению устойчивости к кислотному стрессу [496]. Кроме того, генерируется энергия в виде АТФ. Функционирование уреазной системы у МКБ с гидролизом мочевины также повышает их выживаемость при кислотном стрессе.

Преадаптация к пониженному pH повышает выживаемость клеток к еще более низкому pH [497]. Broadbent et al. [485] повысили выживаемость *Lactobacillus casei* ATCC 334 к сильнокислотным условиям (pH 2,0) предварительным экспонированием клеток при pH 4,5 в течение 20 мин. Аналогичное повышение наблюдалось для *L. plantarum* и *L. lactis* subsp. *lactis* [498]. Повышение выживаемости МКБ при преадаптации к кислотному стрессу связано с функционированием в клетках механизма стресс-ответа, известного как кислототолерантный ответ (acid-tolerance response, ATR), в котором участвуют белки ответа на кислотный шок. Broadbent et al. [485] показали, что кислотный стресс ведет к накоплению гистидина в *L. casei*. Преадап-

тация к низким рН или внесение в питательную среду добавок гистидина существенно повышала выживаемость клеток при кислотном стрессе [483, 485].

Состав клеточной оболочки также изменяется при экспонировании к кислотным условиям для увеличения жесткости цитоплазматической мембраны и снижения ее проницаемости по отношению к протонам. Изменения у МКБ регулируются с помощью универсальных белковых шаперонов, таких как GroEL и sHSPs [448].

В условиях кислотного стресса *L. casei* заметно увеличивает количество фосфоенолпируват-глюкозофосфотрансферазной системы (PEP-PTS), которая является первичной системой транспорта углеводов у лактобацилл [448]. У некоторых штаммов при кислотном стрессе увеличивается количество пируватоксидазы (POX) и фосфатацетилтрансферазы для синтеза ацетил-КоА вместо молочной кислоты. Также индуцируются ферменты, конвертирующие ацетил-КоА до жирных кислот для повышения мембранной текучести. При кислотном стрессе многие штаммы увеличивают количество факторов элонгации (TU, EF-TU, G), которые играют двойственную роль в синтезе шапероноподобных функций [419].

### 2.3.5. Тепловой шок

Тепловой шок вызывается воздействием на живые клетки сублетальных температур (для *E. coli* – 42°), при которых физиологическая активность клетки репрессируется, но клетка при этом остается жизнеспособной. Главная опасность, связанная с воздействием на организм нагревания – денатурация белков.

Устойчивость к повышенным температурам связана со следующими возможностями [378]:

1) Изменение состава липидов мембран. Чем выше температура, при которой растет бактерия, тем выше температура плавления липидов, входящих в состав мембран. Это так называемая гомеовязкостная адаптация.

2) Повышенная устойчивость белков к нагреванию у термофилов.

3) Присутствие в клетках специфических веществ, стабилизирующих белки, нуклеиновые кислоты и другие жизненно важные молекулы (полиамины – спермины, спермидин и путресцин), стабилизирующие ДНК.

4) Образование изоформ ферментов с повышенной термоустойчивостью.

Ответ на тепловой шок (HSR – heat shock response) является одной из наиболее изученных антистрессорных систем ответа [499-505]. В ответ на увеличение температуры все живые организмы синтезируют белки теплового шока (БТШ, HSPs), причем отдельные участки БТШ у человека и бактерий сохраняют 90% гомологии [506-

508], что говорит о том, что стрессовые белки как особо важные, имеют консервативный характер [509].

БТШ распределены в 5 групп в зависимости от молекулярного размера. Две основные группы БТШ – белки-шапероны с молекулярной массой 70 кДа – DnaK (Hsp70) семейство и с молекулярной массой 60 кДа – GroE (Hsp60) семейство [510]. DnaK (Hsp70) – система состоит из DnaK, его кошаперона DnaJ и нуклеотидного обменного фактора GrpE [511-513]. Факторы DnaK, DnaJ, DnaE участвуют в сборке и стабилизации аппарата репликации и регулировании внутриклеточного редокс-баланса [435, 514, 515]. Другая система рефолдинга, хорошо охарактеризованная в модельных бактериях – GroEL/GroES (Hsp60) шаперонин, включающий 14-mer GroEL белок и его гептамерный кофактор GroES [511, 516-519]. Образующийся GroEL-GroES комплекс способствует формированию корректного фолдинга белков при нормальных условиях роста и в условиях клеточного стресса [510, 520, 521]. GroES – наиболее обильный белок у *B. subtilis* с 500000 молекул на клетку после 30 мин экспозиции к тепловому шоку. Образование крайне консервативных DnaK, GroEL и GroES белков у МКБ активируется при различных стрессовых условиях [522, 523]. У *E. coli* с шапероном GroEL может взаимодействовать до 50% растворимых белков, когда они находятся в ненативном состоянии, и в GroEL-дефицитных штаммах до 30% белков остаются неправильно сформированными [524].

К третьей и четвертой группе БТШ принадлежат Hsp90 с молекулярной массой около 90 кДа и Hsp104 с молекулярной массой около 100 кДа. К HSP100 семейству белков теплового шока принадлежит бактериальное семейство белков Clp [525-527] и их дрожжевых гомологов Hsp104 и митохондриальной Pim1 протеазы [528]. Фенотипические исследования мутантных штаммов с отсутствием функциональных Clp выявили центральную роль этих белков в стрессовых условиях, а для патогенных МКБ – в вирулентности [448]. У *B. subtilis* Clp-белки также участвуют в клеточной дифференцировке, в воздействии патогенов на клетки, в кворум-сенсинг регуляции [529, 530].

Семейство sHsp включает небольшие HSPs с молекулярной массой от 12 до 43 кДа. Члены семейства sHSP функционируют как фолдинг-шапероны, помогающие фолдингу белка путем стабилизации несформированных или частично сформированных белков [531]. Они также способствуют поддержанию целостности мембран, особенно в стрессовых условиях [532].

Hsp60 с молекулярной массой 60 кДа и Hsp70 с молекулярной массой 70 кДа наиболее распространены среди прокариот и эукариот. Hsp90 имеет массу 90 кДа, Hsp104 – 100 кДа. При росте *E. coli* при 46 °C 15% клеточной массы составляют белки Hsp60 и sHsp [533].

Главная функция БТШ состоит в правильной укладке вновь синтезированных полипептидов и в реукладке неверно уложенных и поврежденных полипептидных цепей вследствие низкой скорости укладки, химических и термальных стрессов, внутрискрутурной нестабильности и ошибок в процессе транскрипции и трансляции [534-538]. Только правильно уложенные полипептидные цепи, т.е. цепи, имеющие нативную конформацию, могут выполнять свою функцию. При накоплении частично денатурированных белков оголяются их гидрофобные области, с которыми связываются белки-шапероны. Установлено, что шапероны не только участвуют в системе клеточного ответа на тепловой шок, но и ответственны за правильность укладки вновь синтезированных полипептидов и восстановление поврежденных участков, обеспечивают сортировку белковых структур по их биофункциональности, участвуют в синтезе белков для репликации ДНК, реактивации РНК-полимеразы, процессинге экспортируемых белков, сборке белковых комплексов и транслокации белков, в репарации ДНК, поврежденной мутагенами, деградации поврежденных белков [506-509, 534, 535, 538].

Существует еще одно очень важное условие для создания правильной нативной укладки белка. Показано, что аномальные белки, возникающие в результате стрессов, могут агрегировать, образовывать осадки, становиться токсичными для клетки, вызывать серьезные негативные физиологические изменения. Чтобы избежать негативных последствий, аномальные белки должны быть превращены либо в нативные белки, либо быть элиминированы. Превращение белков в нормально функционирующее состояние осуществляют именно молекулярные шапероны, а элиминированием занимаются белки с протеолитической активностью (их называют шаронины) [537]. Образующиеся аминокислоты возвращаются обратно в циклы метаболизма для синтеза новых белков. При восстановлении нативной конформации денатурированных белков происходит совместное действие шаперонов и протеаз, субстратами которых служат неправильно или частично уложенные белки.

У эукариот ключевая протеолитическая система включает убиквитин и протеосому [537]. Белок или его фрагменты, которые должны быть расщеплены, узнаются и метятся убиквитином, а затем перевариваются протеосомой.

БТШ участвуют и в сигнальных путях регуляции метаболизма. Например, показано, что присутствие Hsp70 необходимо для активации фосфатазы, которая путем дефосфорилирования ингибирует протеинкиназу JNK, компонент сигнала стресс-индуцированного апоптоза, вызванного высокой температурой, т.е. Hsp70 является частью антиапоптозного сигнального пути [535, 539, 540].

Гены, вовлеченные в ответ на стресс – гены теплового шока *groEL*, *dnaK* и другие [451, 480, 541, 542].

У *B. subtilis* выявлена экспрессия более 200 генов в ответ на тепловой шок по меньшей мере в 3 раза выше контрольного уровня [543]. Многие из этих генов являются членами общего стрессового ответа, контролируемого вторичным сигма-фактором, сигма (B), в то время как другие находятся под контролем регуляторов HrcA или CtsR теплового шока [533, 544, 545].

В обзоре Prasad et al. [451] ответ на тепловой шок у *B. subtilis* классифицирован на 4 категории, в зависимости от регуляторов генов. Класс I генов теплового шока состоит из *dnaK* и *groESL* оперонов, кодирующих белки, принадлежащие двум шаперонным комплексам DnaK-GrpE-DnaJ и GroES-GroEL соответственно. Гены класса I регулируются с помощью HrcA репрессора, который в нестрессорных условиях связывается с палиндромной последовательностью оператора CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression – контролируемые инвертные повторы экспрессии шаперонов) до тех пор, пока он поддерживается в активной конформации комплексом GroESL [518, 546]. Предположительно HrcA белок нуждается в GroE шаперонинной системе для того, чтобы стать активным и связаться с CIRCE элементом. При увеличении температуры GroE шаперонин титруется ненативными белками, количество которых возрастает при тепловом шоке. При насыщении комплекса GroESL неправильно сформированными белками HrcA становится неактивным и наблюдается транскрипция генов, находящихся под его контролем.

Гены класса II регулируются сигма фактором  $\sigma^B$  [547]. Он индуцируется при различных условиях стресса, особенно при голодании по глюкозе [548, 549].

Гены класса III контролируются фактором CtrR – репрессором генов стресса класса III, который связывается со специфическими повторами, называемыми как CtsR бокс [550-552].

Гены, регулируемые по неизвестным механизмам, группируются в класс IV.

В работе Castaldo et al. [553] гены ответа на тепловой шок у *B. subtilis* классифицированы на 6 классов в зависимости от различных типов транскрипционной регуляции, которой они подвергаются [543, 545].

У ряда бактерий ответ на тепловой шок опосредуется альтернативными  $\sigma$ -факторами [544, 545, 554, 555]. У *E. coli* выявлено 17 основных БТШ, индуцируемых в течение первых 5 мин экспозиции к сублетальной температуре. Вместе с тем, при тепловом шоке наблюдается быстрое изменение скорости синтеза большинства из 1000 белков, выявляемых в клетках *E. coli* при помощи двухмерного электрофореза. Синтез некоторых белков прекращается, тогда как синтез БТШ усиливается более чем в 20 раз. Индукция БТШ происходит при посредстве минорного фактора  $\sigma^{32}$  (продукта гена *rpoH*), скорость синтеза и стабильность которого быстро повышается по мере увеличения сдвига в температуре.

Rossi et al. [555] было проанализировано 13 полных геномов *Lactobacillus*. По результатам анализа было установлено, что в HSR вовлечены 25 генов, кодирующие белки GroES, ClpE., ClpL, GrpE и малые белки теплового шока (Hsp1 и Hsp3), тиоредоксин и тиоредоксинредуктазы (TrxB1), системы репарации, HSR-репрессоры, HrcA и CtsR, позитивные регуляторы HSR, альтернативные  $\sigma$  факторы  $\sigma^{32}$  и  $\sigma^{34}$ . Последний контролирует катаболизм и биосинтез аминокислот при ответе на тепловой шок.

Большая часть БТШ синтезируется в низких количествах в нестрессовых ситуациях, но их синтез быстро индуцируется при нагревании и других стрессовых воздействиях. Например, при экспозиции молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* при 42 °C дополнительно появляются от 12 до 17 белков, количество белка GroEL возрастает в 45 раз [496, 514].

Сверхэкспрессия БТШ в бактериях повышает их устойчивость к стрессу. Так, у *L. plantarum* сверхэкспрессия улучшила бактериальный рост при повышенных (37 °C и 40 °C) и пониженных (12 °C) температурах инкубации [556]. Сверхэкспрессия CspL, CspP или CspC повысила выживаемость данного штамма при сдвиге температуры [557].

В структурном и функциональном отношении БТШ архей сходны с эубактериальными шаперонами, но в отношении последовательности аминокислот сильно от них отличаются и проявляют большое сходство с эукариотным белком TCP1s [558], повсеместно распространенным у эукариот.

В случае гипертермофильной археи *Pyrodictium occultum* повышение температуры на 3 °C выше оптимальной (108 °C) приводит к тому, что 80% всех цитоплазматических белков оказываются представленными шаперонами, которые называют термосомой. В присутствии термосомы клетки могут выживать при автоклавировании при 121°C [514, 559]. Представители нескольких видов галобактерий (мезофильных архей) при нагревании до 60°C образуют дополнительно 4–6 белков с молекулярной массой от 75 до 104, 44–45 и 21–28 кДа [560]. Но в силу активного синтеза БТШ многие другие белки, необходимые для нормальной жизни, образуются в меньших количествах, а потому и соответствующие метаболические реакции протекают с низкой скоростью. Но включение стрессовой программы сохраняет жизнь организма.

У дрожжей помимо БТШ в регуляции ответа на сублетальное воздействие температуры, как и при ответах на другие виды стресса, участвует каскадный механизм с MAP-киназой [561], факторы Msn2p, Msn4p и др. [421, 562, 563].

Функцию стабилизаторов белков могут выполнять и низкомолекулярные соединения – химические шапероны (глицерин, некоторые аминокислоты). Химиче-

ские шапероны предложено использовать для стабилизации белковых молекул *in vitro* с обеспечением сохранения функциональной активности белков в денатурирующих условиях. При этом, в отличие от молекулярных шаперонов, химические шапероны стабилизируют белки неспецифически в их совместных комплексах, образующихся за счет слабых физико-химических взаимодействий (гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых, водородных связей). Химическими шаперонами являются алкилбензолы (АОБ, так называемые факторы  $d_1$ ), составляющие активное начало микробных ауторегуляторов широкого спектра действия, которые синтезируются как смесь изомеров, гомологов и производных, различающихся гидрофобностью и полярностью [564, 565], и широко распространены среди микроорганизмов и растений. АОБ участвуют в морфологической конверсии и дифференцировке, способны интенсифицировать транспорт ионов за счёт повышения проницаемости мембран, регулируют активность каталитических систем, делая их устойчивыми к стрессовому воздействию, участвуют в регуляции процессинга РНК и фолдинга белков. Замечено участие АОБ в рекомбинации ДНК, что объясняет их регулирование бактериальной диссоциации, причем регуляторные свойства АОБ коррелируют с длиной и гидрофобностью углеводородного заместителя в ароматическом кольце, что делает возможным экзогенное управление внутренними процессами в клетке на основе вариации структуры АОБ [393, 564-567]. Неспецифичность действия АОБ, их свойства как шаперонов и антиоксидантная активность делают их универсальными адаптогенами, повышающими устойчивость микроорганизмов к широкому спектру повреждающих факторов среды обитания [566, 567]. Подобная универсальность делает возможным применение АОБ в биотехнологии в качестве химических шаперонов для стабилизации и длительного хранения ферментных и бактериальных препаратов, а также направленного изменения их функциональной активности.

### **2.3.6. Холодовый шок**

Понижение температуры ниже допустимого значения вызывает холодовой шок. Устойчивость к холодовому шоку важна в практическом отношении для повышения жизнеспособности клеток в препаратах живых микроорганизмов, получаемых замораживанием, сублимацией на холоду, при хранении и т.п. [568, 569]. С этой целью часто используются различные добавки к питательным средам, препараты, содержащие криопротекторы [570].

Клеточный эффект на холодовой шок включает следующие изменения: 1) снижение текучести мембран; 2) уменьшение эффективности мРНК трансляции и тран-

скрипции из-за стабилизации вторичной структуры ДНК и РНК; 3) неэффективный или медленный фолдинг белков; 4) препятствие функционированию рибосом [448].

Важными факторами, определяющими выживаемость микроорганизмов после замораживания-размораживания, являются целостность клеточных мембран и устойчивость макромолекул к денатурации [571]. Криоадаптация сопровождается увеличением доли ненасыщенных жирных кислот и *сис*-C19:0 жирной кислоты, что снижает температуру перехода из твердого в жидкое состояние и поддерживает текучесть мембран в течение холодового стресса [572, 573]. Психрофилы, живущие при температурных пределах от -5 до +20°C, имеют мембраны, текучесть которых увеличена за счет повышенного количества короткоцепочечных и ненасыщенных жирных кислот. Ферменты психрофилов отличаются структурной и функциональной пластичностью (адаптивностью), и они синтезируют антифризные белки, которые предотвращают рост кристаллов льда. Например, предварительное выдерживание клеток молочнокислых бактерий несколько часов при температурах 10–15 °C повышает их устойчивость к замораживанию в 10–100 раз [479]. Присутствие криопротекторов, осмолитов, таких как бетаин и карнитин, и предэкспонирование к другим видам стресса (1,25% NaCl, кислоты, желчь) также способствует повышению выживаемости клеток МКБ после замораживания, лиофилизации и размораживания [401].

В отличие от теплового шока, понижения или увеличения значений pH, солёности и других стрессов, холодовой шок не вызывает денатурацию белков, но вызывает изменение молекул и биохимических реакций по сравнению с теми, что имеют мезофильные или гипертермофильные организмы. При холодовом стрессе происходит стабилизация вторичной структуры нуклеиновых кислот и как следствие – ингибирование ДНК-репликации, генной транскрипции и трансляции. Снижается активность многих ферментов и общего метаболизма, а также текучесть мембран, что затрудняет транспорт веществ в клетку. Кроме этого, в клетке образуются кристаллы льда, повреждающие многие клеточные структуры и вызывающие гибель организма [514].

В ответ на низкие температуры микроорганизмы синтезируют белки холодового шока (БХШ, CSP – cold shock proteins, CIP – cold-induced proteins), которые вовлекаются в синтез белков и укладку мРНК [514, 574, 575]. Все БХШ принадлежат к семейству тесно связанных низкомолекулярных белков. Они участвуют в поддержании текучести мембран, суперспиральной структуры ДНК, эффективности транскрипции и трансляции и других важных функций в клетках, адаптированных к низким температурам [479, 574].

У молочнокислых бактерий *L. acidophilus* RD758 одновременно наблюдался рост синтеза 4 белков, включающих стрессорный белок – АТФ-зависимую CIP протеазу P и 2 холод-индуцируемых белка, пируваткиназу и гликопротеинэндопептида-

зу [573]. Синтезируемые белки холодового шока связываются с РНК в кооперативной манере и некоторые из них функционируют как РНК-шапероны, облегчая процесс трансляции при пониженных температурах [576]. У МКБ наблюдается перекрестная связь между БТШ и БХШ [577]. У *S. thermophilus* холодовый шок сопровождается увеличенной продукцией GroEL и ClpL, у *Lb. plantarum* повышается синтез sHSPs. У *Lc. lactis* повышение криоустойчивости наблюдается после теплового воздействия, что объясняется индукцией *clpX* при тепловом и холодовом шоке [578].

Холодовой шок так изменяет физиологию бактерий, что они приобретают высокую степень выживаемости в замороженных пищевых продуктах [579]. Более того, бактерии, адаптированные к низким температурам, имеют более короткую лаг-фазу и более высокую скорость роста в зависимости от качества продукта и степени его защищенности.

У дрожжей-сахаромицетов в ответ на холодовый шок вовлечены около 25% генов генома [580], включая белки теплового и холодового шока, накапливаются глицерин и трегалоза [581]. Идентифицированы БХШ – продукты гена *TIP1* (temperature-inducible protein), его гомологи *TIR1* и *TIR2* [582, 583], участвующие в регуляции гликолиза и синтезе глицерина, ген *IMH1*, кодирующий белок-транспортер, *ERG10*, кодирующий ацетоацетил-СоА-тиолазу. БХШ экспрессируются не только в ответ на холод, но и на голодание по углероду, осмотический стресс, при росте на этаноле, что свидетельствует об участии общего механизма ответа на стресс, сАМР-протеинкиназного пути, транскрипционных факторов Msn2p и Msn4p и др. [580, 583].

### 2.3.7. Ответ на действие токсичных веществ

Проникая в клетку, токсиканты вступают во взаимодействие с клеточными компонентами, изменяют проницаемость и дезорганизуют клеточные мембраны (при действии органических растворителей, низкомолекулярных углеводов, фенола), инактивируют ферменты, нарушают синтез белков, АТФ, воспроизводство нуклеиновых кислот, образование клеточной стенки [377, 378]. В ответ на эти воздействия микроорганизмы могут ограничить скорость поступления субстрата-яда в клетку вследствие изменения проницаемости и состава клеточных мембран, увеличения скорости синтеза фосфолипидов, использования активной системы транспорта для удаления соединений из клетки. Токсиканты могут обезвреживаться связыванием активными биологическими соединениями клетки в нетоксичные производные, изменением или утратой чувствительного звена обмена, потерей ферментов, катализирующих превращение исходного соединения или промежуточных продуктов подготовительного метаболизма в стойкие токсические соединения, индукцией фермен-

тов, нечувствительных или менее чувствительных к данному соединению, и ферментов, инактивирующих токсичное вещество, амплификацией генов, определяющих устойчивость. Гены, определяющие механизмы устойчивости, находятся иногда в хромосоме, но чаще в плазмидах, в 70% случаев они сцеплены с генами устойчивости к антибиотикам.

Различные изменения, вызванные в дрожжах *S. cerevisiae* воздействием сублетальных количеств этанола (приблизительно в 4–10% об.), сходны с таковыми при тепловом шоке. Они включают стимулирование белков теплового шока, включающих группу белков Hsp70, Hsp30, ингибирование брожения, уменьшение уровня и интенсивности АТФ-азной активности плазматической мембраны [584].

Токсичность тяжелых металлов зависит от концентрации биомассы, рН, присутствия органических веществ, формы и концентрации тяжелых металлов и других факторов. Их действие микроорганизмы нейтрализуют различными путями [377, 378]:

1) Выброс ионов тяжелых металлов из клетки системами транспорта – неспецифическими, например, системой транспорта  $Mg^{2+}$  и специфическими. Устойчивые к  $Cd^{2+}$  штаммы *Staphylococcus aureus* содержат гены устойчивости в плазмиде. Устойчивые клетки обладают системой вывода  $Cd^{2+}$  путем антипорта с протонами –  $Cd^{2+}/2H^+$ . Поступление в клетку  $As^{3+}$  и  $As^{5+}$  регулируется генами, находящимися как в хромосоме, так и в плазмидах. Хромосомно обусловленный и плазмидо-обусловленный механизмы устойчивости различны. Так, при плазмидо-обусловленной устойчивости наблюдается синтез высокоспецифичных арсенат выводящих систем транспорта, которые выводят арсенаты из клетки по мере их аккумуляции. Специфичные системы транспорта токсичных катионов или анионов из клетки позволяют избежать выноса жизненно важных для клетки веществ.

2) Формирование клеточного барьера, препятствующего поступлению металлов. Капсулированные штаммы *Klebsiella aerogenes* синтезируют внеклеточные полисахариды, плохо проницаемые для ионов металлов и удерживающие их на поверхности клеток. Их внеклеточные полисахариды удерживают на поверхности клеток до 54 и 90% соответственно Cu и Cd при их концентрации 10 мг/л в среде. Водоросли р. *Mesothaenium* синтезируют водорастворимый полимер, состоящий на 40% из остатков уроновой кислоты и способный связывать медь.

3) Связывание индуцируемыми белками, богатыми сульфгидрильными группами – металлотионеинами [585], низкомолекулярными у цианобактерий и высокомолекулярными у кишечной палочки. Синтез этих белков регулируется на уровне транскрипции и индуцируется ионами тяжелых металлов, например  $Cd^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ . У цианобактерий *Synechococcus sp.* гены синтеза металлотионеинов находятся в плазмиде.

4) Восстановление ионов металлов редуктазами с последующей диффузией металлов из клетки в окружающую среду (для Hg), восстановлением Se селенредуктазой. Синтез ртутьредуктазы индуцируется сублетальными концентрациями ртути. Гены, определяющие синтез редуктаз ртути и устойчивость микроорганизмов к ртути, как правило, локализованы в плаزمиде или транспозонах и составляют *mer*-оперон. Селенредуктаза – адаптивный индуцибельный фермент. У микроорганизмов, обитающих в средах, богатых селеном, фермент селенредуктазы конститутивный.

5) Перевод токсичных соединений металлов в менее токсичные. Детоксификация соединений мышьяка происходит в результате окисления в клетках микроорганизмов арсенитов в арсенаты. Поскольку  $As^{3+}$  значительно токсичнее, чем  $As^{5+}$ , то окисление бактериями  $As^{3+} \rightarrow As^{5+}$  приводит к детоксификации мышьяка. При окислении  $As^{3+} \rightarrow As^{5+}$  кислород участвует как акцептор электронов.

6) Взаимодействие с  $H_2S$  и фосфатами. Так, у бактерий *Klebsiella aerogenes* обнаружено обезвреживание  $Cd^{2+}$  при его взаимодействии с образующимся клеткой  $H_2S$ .  $CdS$  аккумулируется на поверхности клетки, не проникая в цитоплазму. Устойчивость у бактерии к  $Cd^{2+}$  исчезает при отсутствии металла, т.е. имеет место индуцибельный физиологический процесс.

## 2.4. Оксидативный стресс

Из различных видов стрессов один из наиболее физиологически значимых – окислительный (оксидативный) стресс, возникающий при нарушении баланса между образованием реакционно активных частиц и механизмов антиоксидантной защиты [332]. Оксидативный стресс опосредует в клетках другие виды стрессов и индуцируется у одноклеточных и многоклеточных организмов действием активных форм кислорода, которые могут накапливаться в клетках и негативно влиять на них [342, 348, 586-590]. Облучение, голодание, осмотический стресс косвенно приводят к повышению содержания АФК. Оксидативный стресс могут вызывать и различные соединения, в том числе образующийся этанол [591].

У аэробных организмов АФК образуются как побочные продукты дыхания или как нормальные промежуточные продукты клеточного метаболизма [592-594]. В частности,  $H_2O_2$  может образовываться как результат активности NADH-оксидазы [595].

При оксидативном стрессе интенсифицируются реакции перекисного и радикального окисления, наблюдается повреждение биологических молекул и клеточных структур, возможны разрывы нуклеиновых кислот, разрывы и сшивки белковых молекул, блокада реакционных центров ферментов, что неблагоприятно влияет на

клетки и клеточные популяции [597-602]. Супероксид-анион,  $\text{H}_2\text{O}_2$  могут инактивировать белки путем окисления остатков цистеина.  $\text{H}_2\text{O}_2$  может реагировать с катионами, такими как  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , образуя гидроксильные радикалы в реакции Фентона [356, 357, 603-607]. Опасность, обусловленная воздействием гидроксильных радикалов, связана с разрывом нитей ДНК и химической модификацией ДНК [356, 607].

Одновременно индуцируются различные системы клеточного ответа на стресс [332, 348, 360, 364, 587, 608-618].

Вместе с тем сам факт образования АФК никоим образом не свидетельствует о том, что клетка находится в состоянии оксидативного стресса. АФК образуются как нормальные промежуточные продукты клеточного метаболизма, а потенциальные повреждения, вызываемые ими, предотвращаются защитными механизмами клетки. В сбалансированных условиях содержание АФК и продуктов их восстановления находится на уровне оптимальном для конкретной фазы развития клетки и определяется внутренними регуляторными механизмами. При этом нет изменения клеточного гомеостаза и метаболизма [327, 372, 373], реакции перекисного или радикального окисления тормозятся антиоксидантными системами клетки, благодаря наличию которых скорость реакции образования агрессивных частиц находится в пределах физиологической нормы [348, 619, 620].

Оксидативный стресс развивается при резком усилении окислительных процессов, возрастании содержания веществ с прооксидантной активностью и недостаточности системы антиоксидантной защиты [343, 368], при этом нарушается окислительно-восстановительный статус клетки ввиду того, что количество образующихся АФК превышает способности клетки к их нейтрализации, размножение микроорганизмов замедляется и прекращается. Метаболизм перестраивается на синтез белков, необходимых для выживания. Это может иметь место, например, при увеличении диффузии кислорода в клетку или при нарушении функционирования дыхательной цепи, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации АФК в 100–1000 раз, до  $10^{-5}$  М и более [335, 343, 347, 621].

Активные формы кислорода могут образовываться непосредственно в среде культивирования, провоцируя образование пероксидных соединений с прооксидантной активностью [368, 622]. Исследования показывают [623], что среды с органическими компонентами и факторами роста очень сильно подвержены этому явлению. Примером такого компонента питательной среды является рибофлавин, способствующий генерации свободных радикалов в составе многих сред [371, 624]. В условиях освещения и достаточной аэрации рибофлавин сам по себе или в комплексе с такими веществами, как триптофан, может обладать прооксидантными свойствами, генерируя синглетный кислород. Последний, окисляя различные ростовые факторы

питательной среды (гистидин, метионин, тирозин и другие компоненты), приводит к образованию их токсичных субпродуктов [624]. Другими источниками АФК могут выступать триптофан, тирозин, фолат, а также процессы, связанные с перекисным окислением липидов [623].

УФ-свет и видимый свет совместно с эндогенными и экзогенными сенсibiliзирующими агентами могут ускорять образование АФК за счет инициирования фотодинамических реакций [625-629]. Светозависимо перекисное окисление липидов, имеющее характер свободнорадикальной цепной реакции. К фотогенерированию супероксидного радикала способен NADH [630]. Порфириновая фотосенсибилизация под действием видимого света (400–650 нм) сопровождается образованием синглетного кислорода. Связанный с плазматической мембраной порфирин может индуцировать фотоперекисное окисление липидов [631, 632]. Имеются сообщения о генерации АФК и гемсодержащими ферментами, в частности, каталазой [633].

#### **2.4.1. Ответ на оксидативный стресс у микроорганизмов на клеточном уровне**

На уровне клетки в ответе на оксидативный стресс у микроорганизмов участвуют:

- химические вещества-протекторы (антиоксиданты), являющиеся компонентами ферментативных антиоксидантных систем, которые нейтрализуют АФК и свободные радикалы [348, 373-375, 586, 619, 632, 634-641]. Антиоксиданты обрывают цепную реакцию, в результате чего образуется гидропероксид субстрата и обладающий низкой реакционной способностью свободный радикал ингибитора;
- ферменты, нейтрализующие негативное действие АФК;
- системы репарации;
- структурные и регуляторные гены, ответственные за синтез веществ и протекание реакций в условиях стресса.

Косвенное защитное действие части из веществ-антиоксидантов обусловлено связыванием ионов железа, которые способствуют образованию гидроксильного радикала в реакции с  $H_2O_2$ . Некоторые микроорганизмы используют ионы  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , а также  $H_2S$  и другие восстановители для нейтрализации  $O_2^{\bullet-}$  и защиты чувствительных тиольных групп ионами металлов [642]. Следует также отметить косвенный механизм защиты через повышение активности путей потребления кислорода [643].

### 2.4.1.1. Вещества-антиоксиданты

Природные антиоксиданты могут быть подразделены на 3 основные группы [327, 372-375, 644-647, 648]:

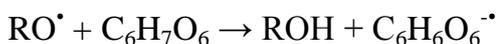
1. Водорастворимые антиоксиданты: аскорбиновая кислота, цистеин и некоторые другие аминокислоты, пируват, мочевины, мочевины, мочевая кислота, антоцианидины, катехины, эпикатехины, гидрохинон, флавоноиды и другие фенольные гликозиды, тиобарбитуровая кислота и другие серосодержащие соединения [326].

2. Жирорастворимые антиоксиданты: витамины А и Е (токоферол), каротиноиды, включая  $\beta$ -каротин, ликопен, убихиноны, стероиды, хиноиды, эйкозаноиды. Многие из этих соединений содержат длинноцепочечные углеводородные остатки с сопряженными двойными связями и  $\beta$ -иононными кольцами.

3. Металлы с антиоксидантными свойствами, такие как Se.

**Мочевая кислота** образуется в результате ферментативного окисления ксантина под действием ксантиноксидазы [367, 649]. Ее роль как антиоксиданта особенно важна для человека, в организме которого среди органических антиоксидантов на нее приходится более половины фонда антиоксидантов.

**Аскорбиновая кислота** обнаружена у животных и растений. Она является коферментом оксидоредуктаз, способна нейтрализовать АФК, в частности пероксиды [650]:



Может являться специфическим субстратом для пероксидазы аскорбиновой кислоты (АРХ), играя роль в стрессоустойчивости растений [326, 651, 652], легко подвергается окислению в водных растворах с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. Последняя легко восстанавливается в аскорбиновую кислоту цистеином, глутатионом, сероводородом.  $\alpha$ -Токоферол в присутствии аскорбиновой кислоты может восстанавливать перекиси липидов до их исходной формы.

К числу природных антиоксидантов, способных уничтожить избыточную концентрацию перекисных радикалов, относятся **каротиноиды** [343, 369, 635-637, 653, 654], значительные количества которых могут синтезировать отдельные микроорганизмы, в том числе галобактерии и некоторые виды дрожжей в ответ на действие АФК, ультрафиолета, синего света [359, 654, 655, 656]. Каротиноиды, содержащие более 9-ти сопряженных двойных связей, эффективно гасят АФК.

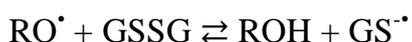
Каротиноиды галобактерий, обладающие антиоксидантными свойствами и придающие им красную или оранжевую окраску, представлены прежде всего  $\alpha$ -бактериоруберином – основным пигментом галофилов. Бактериоруберины пред-

ставляют собой  $C_{50}$ -каротиноиды, содержащие две, три или четыре гидроксильные группы, расположенные на терминальных концах алициклической полиеновой цепи.

Имеются сообщения [333, 657], что каротиноиды в определенных условиях приобретают прооксидантные свойства. При взаимодействии их как антиоксидантов с активными формами кислорода в реакциях окисления – дезактивации могут образовываться токсичные соединения – пероксильные радикалы, запускающие перекисное окисление липидов [343]. Продукты химического и фотохимического окисления, приводящие к образованию перекисных и радикальных частиц, участвуют в регуляции синтеза каротиноидов на внутриклеточном уровне, стимулируя в первую очередь их синтез [359, 654].

**Витамин Е** ( $\alpha$ -токоферол) в высоких концентрациях (выше 50 мкМ) действует как антиоксидант, защищающий клеточные мембраны от перекисного окисления липидов [636, 658-660]. Однако в количествах менее 5 мкМ, напротив, – проявляет прооксидантные свойства. Усиливая действие АФК на липиды клеточных мембран, витамин Е ускоряет их перекисное окисление. В результате изменяется проницаемость мембран и интенсифицируется секреция жирорастворимых веществ во внеклеточное пространство [661].

К биохимически важным внутриклеточным веществам, участвующими в ответе на оксидативный стресс, относятся **глутатион** (GSH) и глутатиондисульфид (GSSG) [662, 663]. Глутатион ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин) – цистеин-содержащий трипептид, функционирующий в большинстве аэробных организмов. Его содержание в клетках (1–10 мМ) намного выше, чем большинства других антиоксидантных органических веществ. Проявляет антиоксидантные свойства благодаря наличию тиоловых фрагментов, способных к обратимым редокс-превращениям.



В ходе этой реакции GSH окисляется до GSSG и восстанавливается обратно глутатионредуктазой.

В клетках функционирует комплекс глутатион-зависимых белков, среди которых глутатионпероксидаза-(1-4), глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза и глутаредоксин (GRX, тиолтрансфераза). Глутатионпероксидаза – селенсодержащий фермент, активный по отношению к  $H_2O_2$  и органическим пероксидам. Он способен снижать интенсивность перекисного окисления липидов в биологических мембранах [664, 665]. Глутатион-S-трансфераза относится к группе селеннезависимых ферментов, активных в отношении органических гидроперекисей [666, 667]. С помощью глутатион-S-трансферазы глутатион способен конъюгировать с различными субстратами (токсинами, ксенобиотиками) и, таким образом, регулировать уровень низкомолекулярных эффекторов, в том числе участвующих в оксидативном стрессе или

ответе на него. Глутаредоксин (Grx) – небольшая (12 кДа) термостабильная оксидоредуктаза, участвующая в фолдинге белков, защите от оксидативного стресса, в метаболизме серы [668]. Глутаредоксины образуют часть глутаредоксиновой системы, включающей NADPH, GSH, глутатионредуктазу, которая переносит электрон от NADPH к глутаредоксину через GSH. Некоторые глутаредоксины обладают пероксидазной активностью и могут напрямую восстанавливать гидропероксиды, включая пероксид водорода и алкилгидропероксиды [669-672].

Изменение соотношения GSH/GSSG часто используется для оценки воздействия оксидативного стресса на клетки [373]. GSH играет важную роль в захвате свободных радикалов и защищает клетки от нескольких окисленных химических частиц. Постоянное обеспечение восстановленным глутатионом необходимо для устранения эффектов спонтанного окисления сульфгидрильных групп, которое приводит к повреждению клеточных мембран. Однако у многих микроорганизмов отсутствуют гены для биосинтеза глутатиона. Некоторые из них могут импортировать глутатион из окружающей среды и использовать его для борьбы с АФК. В этом случае внутриклеточный глутатион участвует в альтернативном механизме устранения радикалов  $O_2^-$ , компенсирующий низкую активность СОД [673, 674].

**Тиоредоксин (TrxA)** – небольшой белок с тиол-восстанавливающей активностью, функционирующий как клеточный антиоксидантный буфер в ответ на оксидативный стресс и играющий важную роль в поддержании клеточных функций. Как компонент тиоредоксинредуктазной (TrxB) системы он играет критическую роль в редокс-регуляции экспрессии генов через прямое или косвенное взаимодействие с различными факторами транскрипции, включающими NF- $\kappa$ B, AP-1, PEBP2 [372, 373, 667, 674-684].

К важнейшим факторам антиоксидантной активности клетки относятся **NADH** и **NADPH** [348, 619, 685]. Концентрация  $H_2O_2$  наряду с потоком восстановительных эквивалентов в виде NADH, NADPH и FADH определяет редокс-состояние внутриклеточной среды [5, 343, 435]. NADPH может непосредственно выступать в качестве антиоксиданта [686]. NADH в определенных условиях может проявлять и прооксидантные свойства, например, при передаче восстановительных эквивалентов флавопротеинам.

**Производные фенола**, полифенолы, катехины, флавоноиды, являясь антиоксидантами, защищают клетки растений от многих стрессовых факторов, таких как ультрафиолет или тяжелые металлы.

Антиоксидантное (мембраностабилизирующее, цитозащитное) действие фенольных соединений определяется их более высокой, чем у других действующих начал, противорадикальной активностью. Благодаря антиоксидантному эффекту фе-

нольные соединения защищают от повреждений (стабилизируют) мембраны клеток, лизосом (препятствуют автолизу), митохондрий, различные структуры ядра, оказывая в целом цитозащитный эффект [687].

Антиоксидантной, антирадикальной активностью обладают аминокислоты (цистеин, триптофан, тирозин, гистидин и др.), пептиды и белки. Их удельная способность нейтрализовать АФК невысока, но при высоком внутриклеточном содержании роль этих соединений в ответе на стресс существенно возрастает [348].

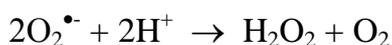
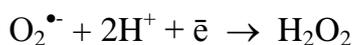
Вместе с тем, многие из перечисленных выше антиоксидантов, аскорбиновая кислота, хинолоны, каротиноиды, рибофлавин, салициловая кислота, серотонин, меланин, витамин В<sub>12</sub>, гидроксикобаламин, тиосоединения обладают прооксидантной активностью и являются как источниками пероксида водорода и других АФК [368, 370, 371, 622, 688-696], так и усиливают прооксидантную активность под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [697]. Проявляют ли эти соединения прооксидантные или антиоксидантные свойства зависит от специфических условий окружения, среди которых концентрация соединения, концентрация кислорода, содержание ионов железа и других переходных металлов, а также от свойств образующихся радикалов [368, 697]. Так, при низком содержании кислорода в среде каротиноиды выступают как антиоксиданты, при высоком – как прооксиданты [369].

В ответе на оксидативный стресс участвуют и вещества, относящиеся к ауторегуляторам физиологического состояния микроорганизмов. Примеры таких веществ – так называемые термостабильные низкомолекулярные RF-белки [698-700] и факторы d<sub>1</sub> (алкилгидроксibenзолы) [566, 567]. Их защитный эффект проявляется в увеличении устойчивости к различным видам стресса, сохранении профилеративной способности микробных клеток.

#### 2.4.1.2. Энзиматическая защита при оксидативном стрессе

На биохимическом уровне регуляции метаболизма в ответе на оксидативный стресс участвуют ферменты супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталазы KatA и KatB [632, 701-707], обеспечивающие защиту жизненно важных биологических структур от действия образующихся перекисей и радикалов.

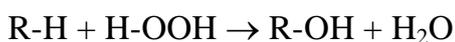
Супероксиддисмутаза (СОД, SOD) катализирует диспропорционирование реакционно активного O<sub>2</sub><sup>•-</sup> с образованием пероксида водорода по реакциям:



Бактерии обладают различными типами СОД, в зависимости от бивалентных металлов как кофакторов, с которыми ферменты связаны: Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, и/или Cu<sup>2+</sup>-

$Zn^{2+}$ . *Photobacterium leioyathi*, *Micrococcus denitrificans* и некоторые другие прокариоты имеют медь- и цинксодержащую СОД [708-712]. Эти ферменты широко распространены среди эукариотических организмов. Марганецзависимая СОД (Mn-SOD) найдена у многих видов прокариот и эукариот, в то время как железосодержащая СОД изолирована, за редким исключением, из прокариот [713-718]. Молочнокислые бактерии имеют  $Mn^{2+}$  СОД [718, 719]. Альтернативная стратегия противодействия супероксидным анион-радикалам – образование повышенного количества внутриклеточного глутатиона.

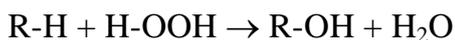
Пероксидазы катализируют реакцию окисления доноров электрона пероксидом водорода:



Окисление наиболее низкомолекулярных доноров (например, формиата, формальдегида) осуществляется двухэлектронно. Присутствие экзогенной  $H_2O_2$  приводит к индукции гена, кодирующего пероксидазу [720, 721]. Пероксидаза обладает широкой субстратной специфичностью, способна окислять различные органические соединения, включая полифенолы, ароматические амины, используя кислород пероксида водорода или органических пероксидов [687, 722-725]. Также показана способность пероксидазы катализировать окисление органических субстратов с участием кислорода, т.е. осуществлять роль оксидазы. При окислении пероксидазой NADH процесс сопровождается образованием супероксид-аниона, пероксида водорода и гидроксильного радикала [596], т.е. фермент имеет прооксидантные функции.

Важную роль пероксидазы и супероксиддисмутазы выполняют в пероксидном окислении липидов (жирных кислот, входящих в состав мембран), имеющим большое значение для жизнедеятельности клетки. Физиологическая значимость пероксидного окисления липидов связана с тем, что последние могут выступать в качестве регуляторов проницаемости клеточных мембран и активности монооксигеназных реакций [726].

Монооксигеназа цитохром Р-450, осуществляющая первичное гидроксирование многих органических соединений, способна также проявлять пероксидазную активность, катализируя процесс с использованием  $H_2O_2$  или других пероксидов:



Таким путем может осуществляться первичное окисление, например, анилина, ненасыщенных жирных кислот (так называемый шунтовый механизм). Но эта реакция отличается по механизму действия от истинной пероксидазы.

Каталаза катализирует распад образующейся  $H_2O_2$  на воду и молекулярный кислород:



Существуют 3 класса бактериальных каталаз: монофункциональные каталазы, каталазы-пероксидазы, марганцевые каталазы (пероксидазы) [727-729]. Монофункциональные каталазы и каталазы-пероксидазы содержат гем в простетической группе.

У *E. coli* функционируют две каталазы: KatA и KatB. KatA является конститутивной, KatB – индуцибельной [702, 705, 706, 730]. Также у многих бактерий имеется бифункциональная гидропероксидаза (KatG) с каталазной и пероксидазной активностями [586, 721].

Комбинированное действие каталазы и СОД превращает  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$  в воду и кислород, предотвращая, таким образом, появление высокореакционных гидроксильных радикалов [731].

В клетках млекопитающих наибольшее содержание пероксида водорода и активность пероксидаз и каталаз наблюдается в пероксисомах [5]. При этом скорость восстановления кислорода в пероксисомах возрастает пропорционально увеличению его концентрации, так что избыток кислорода в клетке ускоряет его восстановление пероксисомами.

Из других компонентов ферментативной антиоксидантной защиты следует упомянуть глутатион-пероксидазу-(1-4), глутатионтрансферазы, фосфолипидгидропероксид-глутатинпероксидазу, NADH-пероксидазу, аскорбат-пероксидазу, алкилгидропероксидредуктазу, алкилгидропероксидпероксидазу [343, 347, 586, 587, 679, 712].

Глутатионпероксидаза (gorA) восстанавливает  $H_2O_2$  и органические гидропероксиды ROOH свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков:



Глутатионтрансферазы (Yfc) восстанавливают только ROOH. Фосфолипидгидропероксид-ГПО восстанавливает ROOH жирных кислот в составе фосфолипидов с участием глутатионредуктазы, регенерирующей GSH из GSSG путем NADPH-зависимого восстановления:



Алкилгидропероксидредуктаза (Ahp) катализирует восстановление органических гидропероксидов и пероксида водорода.

Несколько групп грам-положительных эубактерий (*Bacillus megaterium* и др.) содержат высокий уровень CoA вместо GSH и дисульфидредуктазу, активную с CoA-дисульфидом [666].

Защитным действием в отношении оксидативного стресса обладают ферритин-подобные белки, принадлежащие к Dps-семейству (DNA-binding proteins from starved cells). Они катализируют окисление Fe(II) до Fe(III) пероксидом водорода без

образования ОН-радикалов и, таким образом, нейтрализуют реакцию Фентона [732-735]. Кроме того, как компонент хроматина они физически экранируют ДНК от повреждающего действия АФК. Dps-семейство белков вовлечено в защиту и от других стрессорных воздействий. Dps-белок первоначально был найден у *E. coli*. Он кристаллизуется в голодающих клетках и защищает ДНК от оксидативного стресса. У молочнокислых бактерий аналогичными функциями обладает устойчивый к пероксиду белок Dpr [736].

Защитное действие оказывают специфические низкомолекулярные кислоторастворимые белки (SASP)  $\alpha/\beta$ -типа, накапливаемые при споруляции и защищающие споры от действия ультрафиолета, гидроксильных радикалов, теплового шока [737].

У молочнокислых бактерий в ответе на оксидативный стресс могут принимать участие каталазы, псевдокаталазы, NADH-оксидазы, NADH-пероксидазы, супероксиддисмутазы или неэнзиматические соединения ( $Mn^{2+}$ , аскорбат, токоферолы, глутатион) для нейтрализации и снижения концентрации АФК [684, 738-740].

Для нейтрализации токсичного действия пероксида водорода МКБ используют  $Mn^{2+}$  и ферменты, содержащие Mn, а не Fe [739]. Гены гем-зависимой каталазы присутствуют лишь у отдельных представителей МКБ: в штаммах *L. brevis*, *L. plantarum* [741-743], *L. sakei* [744, 745], *L. casei*, *L. zeae* [674, 684, 746, 747]. У таких штаммов активная каталаза не функционирует при анаэробных условиях при внесении гема, и аэробных – без внесения гема [748, 749].

Внедрение генов каталазы лактобацилл в реципиентные штаммы *L. casei* повысило их выживаемость в условиях оксидативного стресса (внесение 2 mM  $H_2O_2$ , выдерживание 1 ч) в 270 и 300 раз, а при аэрации в 146 и 190 раз после 96 ч инкубации [747]. У некоторых штаммов *L. plantarum*, *L. casei* и других имеется псевдокаталаза, именуемая марганецзависимой каталазой (MnKat), способная обеспечить разложение  $H_2O_2$  [496, 718, 741, 742, 746, 750].

Ионы  $Mn^{2+}$  также могут принимать участие в дисмутации  $H_2O_2$  неферментативным путем. Внесение ионов  $Mn^{2+}$  в питательную среду до определенного предела повышает выход биомассы, устойчивость к кислороду и выживаемость при оксидативном стрессе [751]. Концентрация Fe поддерживается на низком уровне внутри клетки, так что опасность генерирования ОН радикалов, повреждающих ДНК, сводится к минимуму [587].

К другим формам защиты у бактерий в ответ на оксидативный стресс, можно отнести [448, 641]:

- изменение состава клеточных мембран [643], что может быть объяснено повышенной активностью кислород-потребляющей системы десатурации жирных кислот, которая служит для снижения содержания свободных радикалов в клетке;

- повышенную активность кислород-потребляющих путей [643];
- накопление полифосфатов, которое способствует выживаемости бактерий [752, 753]. Полифосфаты действуют как шапероны, предотвращая агрегацию поврежденных белков. Они также улучшают выброс токсичных ионов металлов ( $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ) из клетки;
- неэнзиматическое взаимодействие метаболически синтезируемого пирувата с остаточным  $\text{H}_2\text{O}_2$  с образованием воды [448];
- защиту чувствительных тиольных групп ионами металлов [642];
- репарацию ДНК для преодоления оксидативного повреждения генома [685].

Косвенно в антиоксидантной защите участвуют ферменты, способные обнаруживать и устранять первичные окислительные повреждения. Например, фосфолипазы узнают и избирательно выщепляют окисленные жирные кислоты из мембранных липидов. Некоторые протеолитические ферменты расщепляют белки, имеющие неглубокие повреждения. Гем-содержащие белки ферритин, трансферрин, ксантиноксидаза участвуют в процессах связывания железа, снижая тем самым скорость образования гидроксильных радикалов в реакции Фентона [346, 736].

Другое физиологически значимое проявление ответа на оксидативный стресс наблюдается при образовании биопленок. Биопленки устойчивее к АФК в силу диффузионных ограничений, пространственной гетерогенности в физиологическом статусе микроорганизмов внутри биопленки и более выраженных перекрестных реакций между оксидативным и другими стрессами, такими как голодание и антибиотикорезистентность [706, 754-761]. В ответе на стресс в популяциях микроорганизмов в биопленках участвуют QS-регуляторы – *N*-ацил- и другие гомосеринлактоны (АГЛ у *E. coli*, *Ps. aeruginosa*), прооксидантные хинолоны (PQS у *Ps. aeruginosa*), регуляторы пептидной природы (у *B. subtilis*) и др. [368, 755, 756, 762-764]. Имеются сообщения о способности штаммов *L. reuteri* и *L. rhamnosus* образовывать AI-2 (ацил-гомосерин)-подобные молекулы и их вовлеченность в мультиклеточную коммуникацию, наблюдаемую при образовании биопленок [765]. Оксидативный стресс также влияет на образование адгезинов, среди которых наиболее изучен антиген 43 *E. coli* [439, 764], стимулирующий агрегацию бактериальных клеток и рост биопленок.

В образовании биопленок и агрегатов клеток участвуют внеклеточные полисахариды. Экзополисахариды защищают микробные клетки от стрессов окружающей среды, таких как воздействие низина, голодание, повреждение мембран, низкий pH [766], температурный, световой или осмотический стрессы. Многие штаммы молочнокислых бактерий синтезируют экзополисахариды, образование которых увеличивается при стрессовых воздействиях [767-768]. Так, штамм *L. plantarum* DB200, способный образовывать биопленки, в составе биопленки более устойчив к стрессу. В

этих условиях наблюдается более высокий уровень экспрессии белков ответа на стресс (например, HSP, DnaK, GroEL, ClpP, GroES, фактора элонгации TF и каталазы). Также повышается выход молочной кислоты из глюкозы при одновременном снижении прироста биомассы [419].

#### 2.4.2. Ответ на генетическом уровне у прокариотических микроорганизмов

Ответ на оксидативный стресс наиболее изучен у *E. coli* и *Bacillus subtilis*. У *E. coli* при воздействии пероксида водорода и других АФК индуцируются система адаптивного ответа на окислительный стресс и SOS-система [356, 403, 599, 769, 770, 771]. В процессах регуляции принимают участие клеточные гормоны (алармоны), транскрипционные факторы *red/ox*-состояния OxyR и SoxR, регулоны OhrR (organic hydroperoxide resistance regulator – регуляции экспрессии в ответ на органические пероксиды), PerR (регулятор устойчивости к пероксидам), Spx (глобальный регулятор транскрипции), sigB (система сигнальной трансдукции и фактор общего стресса), sigM (система сигнальной трансдукции), PqrAB (система паракват-резистентности) и другие [403, 587, 632, 772-784].

Фактор OxyR активирует антиокислительные гены в ответ на пероксид водорода, фактор SoxR – в ответ на действие  $O_2^{\cdot-}$ . В результате происходит индукция синтеза антиоксидантных ферментов. OxyR активируется, когда концентрация  $H_2O_2$  в цитоплазме *E. coli* достигает около 0,1–0,2 мкМ, в то время как повреждающее действие  $H_2O_2$  на белки наблюдается уже при 0,3–0,5 мкМ  $H_2O_2$  [785-788].

Регуляторный белок OxyR содержит 6 цистеиновых остатков, взаимодействует с алармоном, в роли которого выступает аденилированный нуклеотид ArrrrrA, и контролирует экспрессию  $H_2O_2$ -индуцируемых протеинов [348, 402, 601, 789-792], среди которых каталаза, глутатионредуктаза (gorA), глутатионсинтаза (grx), алкилгидропероксидредуктаза, некоторые белки теплового шока.

Окисленный и восстановленный фактор OxyR может приобретать различную конформацию, а изменение конформации белка при окислении служит сигналом опасности для клетки [791]. OxyR по принципу обратной связи взаимодействует с промотором своего гена *oxyR*, регулируя свой синтез на уровне инициации транскрипции.

Обработка пероксидом водорода также вызывает индукцию транскрипционного фактора *oxyS* – некодирующей РНК, состоящей из 107 нуклеотидов. Эта небольшая РНК действует как глобальный регулятор, репрессирующий *fhlA* (кодирующий транскрипционный регулятор) и индуцирующий *uhpT* (кодирующий гексозо-6-фосфатный переносчик). Таким образом, бактериальный ответ на пероксид водорода

включает по меньшей мере два различных регуляторных механизма: с белковым активатором OxyR, который переключается с помощью окисления, и 107-нуклеотидную РНК, которая действует и как активатор, и как репрессор генной экспрессии [601].

При избытке  $O_2^{\cdot -}$  сигнал воспринимает *soxR/S* система, контролирующая более 10 генов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, эндонуклеазы IV, фумаразы, ряд регуляторных белков) [793, 794]. Эта же система воспринимает NO в качестве сигнальной молекулы и индуцируется паракватом [795]. В условиях окислительного стресса белковый транскрипционный фактор SoxR переходит в окисленное состояние и активирует транскрипцию гена *soxS*, который и является, в свою очередь, транскрипционным активатором генов, попадающих под контроль *soxR/S* системы. SoxR содержит 4 цистеиновых остатка и молекулы металла в активном центре. По-видимому, изменение редокс-состояния металла и служит сигналом для перехода SoxR в активное состояние, в котором сигнал опасности передается в клетку [348, 777, 794, 796].

Тандем *OxyR* и *SoxR/S* позволяет осуществлять более тонкую регуляцию ответа на окислительный стресс и имеет большое значение в адаптивной устойчивости к агентам ОС [779].

У большинства аэробных организмов системы контроля клеточных ответов на окислительный стресс находятся во взаимодействии друг с другом. Подтверждением этого является факт экспрессии генов разных регулонов стрессоустойчивости в ответ на определённый вид стресса. Так в *Bacillus subtilis* не менее трех регулонов *sigB*, *perR*, и *ohrR* экспрессируются при стрессе, вызванном пероксидами, в каскаде. Имеется информация о функционировании OhrR и PerR тандема при окислительном стрессе, вызванном как органическими, так и неорганическими пероксидами [797, 798].

В системах ответа на уровне генотипа задействованы различные регулоны, модулоны и стимулоны. Так, сигма-факторы влияют на активность РНК-полимеразы, её сродство с промотором, участвуют в системе сигнальной трансдукции. Существует большое количество *sig*-регулонов, их число варьируется у разных видов организмов. В состав регулонов входит большое количество генов с широким разнообразием функциональности (системы репарации, шапероны, система антиоксидантной защиты, вспомогательные белковые факторы, пермеазы и т.д.). Каждый из сигма-факторов работает в конкретной ситуации (на разных стадиях роста и может быть локализован в различных местах) [544, 545, 799].

В ответе на специфические виды окислительного стресса (ответ на хиноны, салицилат, катехин дисульфидный стресс) в *E. coli* и *B. subtilis* задействованы гены *marR*-семейства. Общая особенность генов *marR*-семейства – это репрессия транскрипции

генов, работа которых в условиях стресса неуместна. Гены *marR*-семейства и их протеом контролируют на уровне репрессии генов многие системы клеточных ответов на оксидативный стресс (*ohr*, *perR*, *spx* и др.), поэтому *marR*-модулон можно рассматривать как глобальный регулятор транскрипции [546, 780, 782, 795, 800, 801].

Таким образом, в микроорганизмах функционируют тандемы и каскады систем ответа на стресс, в частности в случае оксидативного стресса – *sig*-стимулон или *mar*-модулон, между которыми налажены сложные регуляторные связи. Совместная экспрессия большого числа генов и их белковых продуктов локализуется с образованием цитоплазматических субстанций – **стрессосом** [802]. Число стрессосом может достигать 20–30 в зависимости от вида стресса и интенсивности стрессового воздействия на клетку. Размер стрессосом у *Bacillus subtilis* 1,5–2,5 МДа и диаметр 25–40 нм, их работа приводит к активации 120–160 генов. В стрессосоме белки фосфорилированы, находятся в модифицированном состоянии, их модификация происходит в динамическом режиме, регулируется и координируется управляющими факторами, такими как  $\sigma^B$ , за пределами области локализации самой стрессосомы, что отображает комплексность и многофакторность систем по противодействию стрессу.

Одно из ключевых метаболических изменений, наблюдаемых при разовом оксидативном стрессе, заключается в перенаправлении метаболических потоков с ослаблением гликолиза и активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и активизацией пентозофосфатного пути [435, 795, 803, 804], который является источником восстановительных эквивалентов в виде NADPH [548] и образование которого, в свою очередь, катализируется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (ZwF) – ключевым ферментом пентозофосфатного пути – и 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (Gnd). NADPH необходим для восстановления редокс-кофакторов главных антиоксидантных систем, нейтрализующих АФК. Соотношение NADPH и  $\text{NADP}^+$  определяет редокс-баланс в клетке и устойчивость к АФК [803]. У *Salmonella* это соотношение находится под контролем регулятора системы строгого контроля в ответ на голодание – DnaK супрессорного белка (DksA) совместно с антиоксидантной защитой [435]. Регулируя редокс-состояние внутриклеточной среды, фактор DksA участвует в повышении устойчивости *Salmonella* к пероксиду водорода, образуемого NADPH-оксидазой фагоцитов, т.е. патогенных свойств этой бактерии. Более поздние исследования с *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* показали, что длительное действие оксидативного стресса в виде сублетальных доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  приводит к активизации как пентозофосфатного пути, так и гликолиза [805, 806].

### 2.4.3. Ответ на генетическом уровне у эукариотических микроорганизмов

Как и у прокариотов, для эукариотических микроорганизмов стрессовое воздействие АФК может иметь различные проявления в зависимости от стадии роста и развития, природы стрессора, а также систематического положения организма [807-810].

Среди эукариотических микроорганизмов ответ на оксидативный стресс наиболее изучен у классических объектов исследований – дрожжей-сахаромицетов [589, 590, 807, 809, 811].

Как и у *E. coli*, у *S. cerevisiae* оксидативный стресс сопровождается активизацией пентозофосфатного пути [811-814] и повышением толерантности клеток дрожжей не только к оксидативному, но и другим стрессам: осмотическому, тепловому, тяжелым металлам [814-817]. В эукариотических клетках NADPH-зависимые реакции протекают в цитозоле, причем для восстановления ферментов антиоксидантной защиты необходимо высокое соотношение NADPH/NADP<sup>+</sup>.

С другой стороны, высокое соотношение NADH/NAD<sup>+</sup>, которое наряду с NADPH/NADP<sup>+</sup> определяет окислительно-восстановительные свойства внутри клетки, прежде всего в митохондриях, может привести к восстановительному стрессу, также неблагоприятному для физиологической активности клеток [818]. Такой стресс наблюдается, в частности, при внесении сильного восстановителя – дитиотреитола, который предотвращает образование дисульфидных связей.

Годоном и др. [811] было проведено широкомасштабное изучение геномных процессов, происходящих в эукариотической клетке при разовом воздействии сублетальных доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на *S. cerevisiae*, в ходе которого было оценено направление изменения основных метаболических путей клетки в ответ на оксидативный стресс. Изменения в экспрессии генов, определяющих адаптивный стрессовый ответ дрожжей к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, кинетические и доза-эффект параметры геномного отклика анализировались с помощью двухмерного гель-электрофореза совокупных клеточных белков. Изменения в синтезе белков начинали проявляться уже через 2 мин, для ряда белков достигали максимума через 15 мин и возвращались к исходному уровню через 1 час. Однако уровень некоторых белков не возвращался к базовому и после 1 часа с момента стрессорного воздействия.

Как и ожидалось, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцируемые белки включают некоторые белки теплового шока и белки, вовлеченные в антиоксидантную защиту и в процесс удаления интермедиатов при воздействии АФК. Индуцируются Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, глутатионредуктаза, каталаза, тиоредоксин, тиопероксидаза, TRX-редуктаза, цитохром-с пероксидаза. Метаболизм углеводов начинает меняться уже через минуты после

воздействия  $H_2O_2$ . При этом активизируются гены метаболизма глицерина и пентозофосфатного пути, обеспечивающего клетки строительным материалом, необходимым для синтеза углеводов, нуклеотидов и белков, пути ассимиляции углеводов перенаправляются на регенерацию NADPH вместо гликолиза, который является основным донором восстановительных эквивалентов в ответе клетки на окислительный и другие виды стресса, при котором активизируется синтез белков антистрессорных систем [548]. Также активизируется синтез белков метаболизма глицерина и накопления трегалозы, некоторых регуляторных белков. Напротив, репрессируется синтез многих белков, участвующих в аппарате трансляции и некоторых из белков гликолитического пути и ЦТК, метаболизма серы, синтеза некоторых аминокислот, всех пуринов и пиримидинов, т.е. путей конструктивного обмена.

Переориентация метаболических путей от гликолиза к пентозофосфатному циклу, наблюдавшаяся в этих исследованиях, аналогична таковой для бактерий *Salmonella* и дрожжей *K. lactis*, подтвержденной в работах ряда исследователей [435, 803].

Дрожжи имеют такие же механизмы защиты как и высшие эукариоты, при этом, как и в случае *E. coli*, у дрожжей *S. cerevisiae* при воздействии  $H_2O_2$  и  $O_2^{\cdot -}$  индуцируются два разных стимулона – частично перекрывающихся набора генов стресс-ответа [589, 809, 811, 819].

Ключевым глобальным регулятором ответа на окислительный стресс у *S. cerevisiae* является фактор Yap1p (yeast activator protein), который специфически связывается с AP-1 сайтом эукариотического семейства AP-1 транскрипционных факторов [348, 820-834]. В клетках млекопитающих белки семейства AP-1 вовлечены в пролиферацию, дифференциацию, апоптоз и ответ на стресс и радиацию [835-837].

В ответе на окислительный стресс совместно с Yap1p участвуют супероксиддисмутазы (SOD1, SOD2), каталазы, глутатион (GSH) и глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза (GPX), тиоредоксинпероксидаза (TSA), цитохром с пероксидаза (CCP1), алкилгидроксипероксидредуктазы (Ahp), тиоредоксин (TRX) – продукт гена *TRX2* [838-842], глутаредоксины – продукты генов *GRX1* и *GRX2* [838, 843; 668], белки теплового шока (HSP26, HSP70, HSP104 и др.) [844-848]. Yap1p также активирует синтез SOD, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, алкилгидроксипероксидредуктазы, глутатионпероксидазы, тиолпероксидазы [849]. Активация происходит на транскрипционном и посттрансляционном уровне и вовлекает транслокализацию Yap1p из цитоплазмы в ядро [850, 851], которая также чувствительна к источнику углерода и его содержанию в среде. Yap1p чувствителен к ред/окс состоянию внутриклеточной среды благодаря наличию трех консервативных цистеиновых остатков [852]. Совместно с Yap1p в ответе на окислительный стресс

участвуют транскрипционный фактор Skn7p [825, 831, 853, 854], а также регуляторы YAP4 [855, 856], Msp2p/4p, Gcn4p [472, 827, 857], Sko1p [471], Hsf1p [809, 813]. Участие данных факторов в ответе на оксидативный стресс не исключает их определенной роли в ответе на другие виды стресса. Так, факторы Yap1p, YAP4 и Msn2p/4p вовлечены в ответ на тепловой шок, действие тяжелых металлов, осмотический стресс, в регуляцию ферментов метаболизма углеводов и аминокислот. Фактор Skn7p вместе с Yap1p вовлечен в синтез ферментов, участвующих в нейтрализации АФК, в ответ на осмотический стресс, в регуляцию синтеза клеточной стенки, клеточного цикла [825, 827, 855-858], однако первый не участвует в регуляции метаболических путей, регенерирующих восстановительные эквиваленты в форме глутатиона и NADPH [825].

Регуляция ответа на стресс с участием факторов Yap1p, Skn7p, Msn2p, Mns4p и других происходит по сигналпередающему каскадному механизму – через митоген-активируемый Hog1 MAPK путь, включающий каскад из трех серин/треониновых киназ и Ras-протеинкиназу.

У дрожжей *S. cerevisiae* протеинкиназа С активируется оксидативным стрессором и, в свою очередь, быстро фосфорилирует митоген-активируемую протеинкиназу Mpk1p [859, 860]. Фактор Hog1p – гомолог фактора p38 многоклеточных организмов, активируется в ответ на гиперосмотический стресс и тепловой шок, однако он не активируется пероксидом водорода. MAPK-путь задействован при ответе на широкий диапазон стрессов: голодание, оксидативный, тепловой шок, холодный шок, воздействие тяжелых металлов, повреждение ДНК ультрафиолетом.

Таким образом, система регуляции ответа на оксидативный стресс у дрожжей-сахаромицетов построена на принципах перекрестных каскадов и одновременно функционирует при ответе на воздействие других стрессоров.

#### **2.4.4. Адаптация микроорганизмов к оксидативному стрессу**

Изменения, наблюдаемые в результате кратковременного стресса, имеют адаптивный характер. Его характерными особенностями является временный ответ и проявление уже при воздействии доз стрессора, намного меньших физиологически значимых [402, 587, 838, 861]. Такой «заблаговременный» ответ позволяет повышать устойчивость популяции к воздействию более высоких доз стрессора после предварительного воздействия малых доз – а значит повышать ее жизнеспособность [492, 497]. Так, добавление в среду культивирования  $H_2O_2$  в дозах 10–60 мкМ достаточно, чтобы в клетках возникла устойчивость к 1–10 мМ  $H_2O_2$  [402, 862, 863]. В адаптив-

ном ответе на оксидативный стресс участвуют антиоксиданты, ферменты, транскрипционные и регуляторные факторы, кратко рассмотренные выше.

В работе [863] изучались адаптивные ответы на окислительный стресс, вызванный воздействием  $H_2O_2$  на *S. cerevisiae*. В результате было показано, что у *S. cerevisiae* рост обычных клеток легко тормозится внесением  $H_2O_2$ , а клетки, предварительно предобработанные низкими концентрациями  $H_2O_2$ , способны пережить внесение последующей дозы и продолжать делиться с нормальной скоростью. Наиболее эффективная адаптация наблюдалась при следующих условиях:  $5 \times 10^6$  клеток/мл, предобработка или начальное добавление 0,4 мМ  $H_2O_2$ , интервал между предобработкой и внесением 45 мин., внесение концентрации пероксида 0,8 мМ  $H_2O_2$  за 2 часа. При этих условиях клетки, обработанные пероксидом без предварительной подготовки, показывали 90% гибель на чашках Петри. Напротив, клетки, предобработанные пероксидом, росли и делились со скоростью фактически на 15–30% быстрее, чем такие же непредобработанные клетки, при этом 90–100% таких предобработанных клеток продолжали делиться с нормальной скоростью даже при последующей обработке критической концентрацией  $H_2O_2$ . Усиление устойчивости предобработанных клеток к  $H_2O_2$  временное, полностью прекращается в течение 60–90 минут роста в отсутствие  $H_2O_2$ . Более того, клетки, подвергшиеся деадаптации более чем на 4 часа, снова показывают временный адаптивный ответ при предобработке пероксидом. Эти результаты наряду с высокой выживаемостью (90–100%) предобработанных клеток показывают, что при действии  $H_2O_2$  происходит истинная временная адаптация к этому стрессору, но не селекция любых до этого присутствующих резистентных к  $H_2O_2$  субпопуляций.

Вместе с тем, адаптивные ответы к двум разным оксидантам могут отличаться [861, 864]. Так, обработка клеток дрожжей *S. cerevisiae* малыми концентрациями либо пероксида водорода, либо менадиона (супероксид-генерирующий агент) индуцирует адаптивные ответы, которые защищают клетки от летальных эффектов при последующей обработке более высокими концентрациями этих оксидантов. Предобработка менадионом защищает клетки от гибели под действием  $H_2O_2$ , однако предобработка с помощью пероксида неспособна защитить клетки от последующего воздействия менадиона.

У дрожжей-сахаромицетов повышение устойчивости к  $H_2O_2$  в ходе процедуры адаптации может быть обусловлено не только индукцией антиоксидантных ферментов, но и снижением проницаемости мембран по отношению к  $H_2O_2$  [415, 616, 617, 865].

Адаптированную к агентам оксидативного стресса ( $H_2O_2$ , менадион и др.) популяцию микроорганизмов можно получить путем ее последовательного пересева (пассирования) или при непрерывном длительном культивировании на средах, со-

державших агенты оксидативного стресса [411, 413, 861, 863, 866]. Так, в работе Lee et al. [867] бактерии *Corynebacterium glutamicum* культивировались в хеостатном режиме 1900 ч при постепенном повышении концентрации  $H_2O_2$ , чтобы изучить влияние стресса. После пассирования *C. glutamicum* росла в условиях стресса, тогда как дикий тип не смог адаптироваться. Адаптированный штамм также показал повышенную устойчивость к стрессу диамидом, менадионом, SDS, твин-20, HCl, NaOH и ампициллином.

В другой работе [868] изучалась адаптация фитопатогенных грибов *Fusarium decemcellulare* к оксидативному стрессу перексидом водорода и 5-гидрокси-1,4-нафтохиноном (юглоном). При высоких концентрациях стрессоров рост гриба полностью ингибировался. При 60-минутной предварительной обработке на логарифмической фазе роста клеток перексидом водорода с концентрацией 0,25 мМ появилась устойчивость к высокой концентрации окислителей. На стационарной фазе клетки оказались более устойчивыми к стрессу, чем на логарифмической. Адаптация была связана с увеличением активности клеточной каталазы и супероксиддисмутазы – основных ферментов, участвующих в защите от оксидативного стресса.

Аналогичный адаптивный ответ наблюдали при предобработке культуры плесневых грибов *Penicillium piceum* небольшими (0,5–5,0 мМ) дозами  $H_2O_2$  [869]. Клетки гриба были более устойчивыми к стрессу на стационарной фазе роста, чем на логарифмической фазе, что было обусловлено высокой активностью каталазы. Активность каталазы начинала повышаться спустя 10 мин после внесения 5,0 мМ  $H_2O_2$  и достигала максимума через 180 мин – при внесении пероксида в экспоненциальной фазе роста и 120 мин – при внесении в стационарной фазе роста. Затем активность каталазы постепенно падала до исходного уровня.

В практическом плане процедура адаптации необходима, когда речь идет о получении линий микроорганизмов, устойчивых к оксидативному стрессу, и их использовании в управляемом культивировании, в частности, при внесении  $H_2O_2$  для аэрации вместо кислорода или воздуха [870], при целенаправленной индукции компонентов стресс-ответа, при получении штаммов, устойчивых к другим видам стресса. Преадаптация к различным стрессам (солевому, низкому рН, токсичным веществам, высоким температурам и др.) может быть использована как стратегия для усиления технологических качеств штаммов продуцентов [493, 521, 871, 872].

#### **2.4.5. Перекрестные ответы при оксидативном стрессе**

Выше уже отмечалось, что различные виды стресса могут индуцировать общие компоненты в системах ответа, и часто эти ответы регулируются одними и теми же

внутриклеточными факторами и сигнальными каскадами. Такой общий ответ лежит в основе перекрестной адаптации, когда преадаптация к одному стрессу делает клетки устойчивыми к действию других и множественных стрессов [506].

Клетки могут переключать различные стресс-ответы на оксидативный стресс [448, 685]. *E. coli*, *B. subtilis*, *L. lactis* и другие бактерии обладают общими и специфическими механизмами ответа на стресс [358, 685, 873]. Ключевую роль в регуляции этих механизмов и физиологии бактериальных клеток играют циклические нуклеотиды как вторичные мессенджеры (сАМР) [874, 875]. Среди факторов, контролирующих общий ответ на стресс – сАМР рецепторный белок, регулятор восстановления фумарата и нитрата (FNR) и FNR-подобные белки (Flp) [876]. Они найдены у многих бактерий и обладают структурными свойствами, обеспечивающими клетки разнообразными сенсорными функциями с передачей сигналов внешней и внутренней среды в процессе метаболизма и функционирования ДНК/РНК регуляторных механизмов (узнавание соответствующих мотивов ДНК и взаимодействие с РНК-полимеразой), что переключает общий и специфический ответ к разным физиологическим условиям, таким как стресс. У *L. casei* FNP и Flp играют ключевую роль в предотвращении окислительного повреждения при взаимодействии с 4Fe-4S кислородолабильным кластером [877].

У прокариот распространены однокомпонентные системы ответа на стресс. В них участвуют белки, содержащие сенсорный и сигнальный домены. Было выявлено 20 семейств главных однокомпонентных систем. Некоторые охарактеризованы с точки зрения их роли в ответе на катионные антимикробные пептиды, оксидативный стресс и гомеостаз металлов и устойчивость к ним [448]. Один из наиболее охарактеризованных сенсоров оксидативного стресса – PerR, рецептор ответа на пероксидный стресс, регулятор Fur семейства [779, 781, 798].

Двухкомпонентные регуляторные системы (TCS) ответа на стресс воспринимают и передают внеклеточные сигналы в клетку и, таким образом, модулируют экспрессию генов и физиологические изменения [878, 879]. Они функционируют и в прокариотических, и в эукариотических клетках. Типично эти системы состоят из мембраносвязанного сенсорного белка, гистидинпротеинкиназы (НК), и внутриклеточного регулятора ответа (RR). Все они вовлечены в реакции фосфорилирования. Фосфорилирование RR модулирует его активность, которая в большинстве случаев вовлекает транскрипционную регуляцию [880]. Дефосфорилирование RR выполняется дополнительной фосфатазой, часто родственной НКs. Финальный выходной ответ результируется из баланса между киназой и активностью фосфатазы. Состав и число двухкомпонентных систем переноса сигнала широко варьируются.

Глобальным регулятором транскрипции у *B. subtilis* служит *spx*-система [780, 782, 800]. В *spx*-регулоне *B. subtilis* локализованы 19 генов, протеом которых ответственен за связь с другими регулонами, за *red/ox* и ЭМИ-чувствительность и за регуляцию транскрипции. Работа *spx*-системы способна обеспечивать синергетическое действие различных факторов стресса, в частности, комбинации оксидативного стресса и воздействия света. У *B. subtilis* имеется система LOV (*light, oxygen and voltage*), то есть своеобразный преобразователь световой энергии в потенциал или энергию химической связи по аналогии с фототрофными организмами [882]. Основную роль играет белок *YtvA* – флавопротеин с коферментом FMN – рецептор синего света. *YtvA* является частью *spx*-регулона. Имеются данные, что *YtvA* является позитивным регулятором транскрипции *sigB* – фактора общего стресса, который контролирует экспрессию индуцибельной каталазы, SOD и других систем устойчивости. Через систему *spx*-регулона налажены регуляторные связи между *sig*-регулонами, в частности между *sigM* и *sigB*, так как, возможно, *spx* способен контролировать транскрипцию в *sig*-стимулоне [883, 884].

У *E. coli* сигма фактор  $\sigma^S$  (*groS*) ответственен за общий ответ и устойчивость к стрессу [434, 548, 885]. Экспонирование клеток к слабым органическим кислотам (ацетату, пропионату, бензоату) увеличивает экспрессию  $\sigma^S$  и индуцирует синтез каталаз KatG и KatE [886]. В ответе на тепловой шок и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> задействован один и тот же регулон сигма фактора OxyR [356].

У молочнокислых бактерий гены, отвечающие за регуляцию устойчивости к оксидативному стрессу, находятся в  $\sigma$ -32 регулоне, связанным, в свою очередь с регулированием ответа клетки на тепловой шок [555]. Поэтому умеренное УФ-облучение повышает устойчивость клеток *L. lactis* к тепловому и кислотному шоку, этанолу и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [887, 888].

У дрожжей-сахаромицетов одними и теми же регуляторными факторами для различных видов стресса могут выступать факторы Yap1p, Sco1. В ответе на стрессы опосредованно задействована сАМР-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А), как важный компонент регуляции внутриклеточного метаболизма. Большое число генов контролируется транскрипционными факторами Msn2p, Msn4p, связывающимися с так называемыми элементами стресс ответа STREs (stress response elements) [421, 470, 889, 890].

Перекрестный ответ с повышением устойчивости и адаптацией к стрессу может наблюдаться при тепловом и осмотическом шоке, оксидативном стрессе, защелачивании или закислении среды, голодании, высушивании, воздействии токсичных веществ [430, 433, 481, 498, 514, 515, 887, 891-905], фотоингибировании [906], между

оксидативным стрессом и повышенным давлением [907], повышенным давлением и кислотным, осмотическим, холодовым стрессами [908].

Наиболее часто перекрестный ответ наблюдается при тепловом шоке и оксидативном стрессе [358, 421, 498, 704, 789, 811, 838, 846, 848, 887, 905, 909-915]. Клетки, которые приобрели устойчивость к  $H_2O_2$ , становятся устойчивыми и к тепловому шоку. Синтез БТШ может быть вызван воздействием этанола, гамма- и УФ-облучением,  $H_2O_2$ , вирусной инфекцией. У дрожжей *S. cerevisiae* эффект от воздействия сублетальных количеств этанола аналогичен воздействию сублетального теплового шока. Происходит снижение уровня АТФ-азы и накопление в плазматической мембране белка теплового шока *Hsp30* [584, 916].

В работе Steels и др. [917] клетки *S. cerevisiae*, культивируемые как в аэробных, так и анаэробных условиях, были проверены на устойчивость к кратковременному тепловому шоку (52 °С, 5 минут) и окислительному стрессу (20 мМ  $H_2O_2$ , 15 минут). Устойчивость зависела от фазы роста. В стационарной фазе роста клетки были более устойчивы и к тепловому, и к окислительному стрессу, чем в экспоненциальной. Мягкий тепловой шок (37 °С, 30 минут) вызывал термотолерантность и устойчивость к окислительному стрессу и в аэробных, и в анаэробных условиях. Предварительное воздействие малых концентраций  $H_2O_2$  (0,1 мМ, 60 мин) стимулировало устойчивость к летальным концентрациям  $H_2O_2$ , но не к летальной температуре. Чувствительность к обоим факторам, нагреванию и окислительному стрессу зависела от состава мембранных липидов. В случае наиболее стрессоустойчивых анаэробно выращенных клеток мембраны были обогащены насыщенными жирными кислотами, а также олеиновой и линоленовой кислотами. Мембраны в аэробно выращенных клетках были обогащены пальмитоолеиновой и олеиновой кислотами. Эти клетки были наиболее устойчивы к стрессу в любых условиях.

Тепловой шок часто вызывает ответ к солевому стрессу [421, 918, 919]. Организмы, адаптированные к экстремальной солености и накапливающие осмолиты, более устойчивы к тепловому шоку. У *E. coli* осмолиты активируют шапероны Gro-EL, DnaK, ClpB [920]. Возможно и повышение устойчивости к лекарственным препаратам [921, 922].

После предобработки сублетальной дозой либо окислительного, либо гиперосмотического стресса клетки *S. cerevisiae* могут противостоять последующей более высокой дозе того же самого стрессового воздействия [923]. К этим двум стрессам также возможна перекрестная адаптация. Клетки дикого типа, адаптированные к 1% KCl (агент гиперосмотического стресса) и гиперосмотически устойчивые мутантные клетки могут в большей степени противостоять летальным концентрациям  $H_2O_2$  (10 мМ), что объясняется участием антиоксидантов и ферментов репарации (GSH, CAT, SOD)

в адаптации дрожжей к осмотическому стрессу, а также синтезом других общих ферментов ответа и на окислительный, и на осмотический стрессы. Добавление N-ацетилцистеина (NAC) (30 мг/л) и  $MnSO_4$  (4 мМ) повышало устойчивость к гиперосмотическому стрессу, что указывает на участие антиоксидантов в адаптации дрожжей к гиперосмосу. Обработка двумя стрессовыми сублетальными дозами соли увеличивала уровень GSH, CAT, SOD и антиоксидантный потенциал дрожжевых клеток.

Во время теплового шока и стационарной фазы во многих организмах накапливается дисахарид трегалоза, который улучшает термотолерантность и уменьшает агрегацию денатурированных белков, защищает клетки от АФК и служит основным источником энергии в процессе прорастания спор [924-926]. При воздействии на клетки *S. cerevisiae* мягкого теплового шока (38 °С) или протеасомного ингибитора (MG132) стимулируется накопление трегалозы и заметно увеличивается их устойчивость к реактиву Фентона. После возвращения клеток в нормальные температурные условия (28 °С) или при удалении MG132 из среды содержание трегалозы и устойчивость к кислородным радикалам быстро падают [634]. Аналогичное накопление трегалозы и повышение устойчивости к осмотическому стрессу и тепловому шоку наблюдается для дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [927].

В работе [928] было показано, что при осмотическом шоке начинается иницирование транскрипции генов, вовлеченных в защиту от окислительного стресса, причем осмотический шок не вызывал появления обнаруживаемого количества активных форм кислорода. Транскрипционные профили, следующие за осмотическим шоком в анаэробных и аэробных условиях, были количественно очень похожи. При этом при осмотическом шоке стимулировалась экспрессия генов оксидативного стресса, даже если не было очевидной необходимости в их функционировании. Интересно, что клетки адаптировались намного быстрее в анаэробии, о чем свидетельствовал транскрипционный ответ в этих условиях. Такая быстрая адаптация происходит благодаря усилению синтеза глицерина в анаэробной культуре, который необходим для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки [929].

Льюисом и др. [866] была испытана устойчивость 14 штаммов *S. cerevisiae*, клетки которых выращивались до стационарного состояния, к  $H_2O_2$  (0,3 М, 60 мин) и другим стресс-факторам: к температуре (52°С, 4,5 мин), этанолу (20% об., 30 мин), быстрому замораживанию (-196°С, 20 мин, скорость охлаждения 200°С в мин), медленному замораживанию (-20°С, 24 ч, скорость охлаждения 3°С в мин), соли (рост на 1,5 М NaCl агаре) или уксусной кислоте (рост на агаре с 0,4% уксусной кислоты). Все штаммы были устойчивы к  $H_2O_2$ . Корреляционный анализ показал наличие корреляции между устойчивостью к  $H_2O_2$  и к другим стрессовым факторам за исключением этанола. Был сделан вывод, что окислительный стресс в большой степени свя-

зан с другими стрессовыми реакциями на воздействие различных факторов, а устойчивость к  $H_2O_2$  может быть маркером для общей оценки устойчивости штаммов к стрессовым воздействиям.

Состояние оксидативного стресса развивается и при облучении среды ближним ультрафиолетом (УФА и УФБ диапазонов спектра). Фотокаталитические и фотохимические реакции, вызываемые действием УФ с длиной волны 300–400 нм или ионизирующего излучения, особенно в присутствии эндогенных и экзогенных сенсibilizаторов (флавинов, порфиринов, хинонов, редких т-РНК оснований, гем- и флавинодержащих ферментов, НАДН, аскорбиновой кислоты), вызывают радиолиз молекул воды в клетках, в результате чего образуются активные формы кислорода, свободные радикалы и перекисные соединения, поэтому такие воздействия во многих отношениях подобны действию  $H_2O_2$  [633, 930-935]. Вещества, синтезируемые микроорганизмами и поглощающие УФ-излучение, способствуют тем самым фотозащите от повреждающего действия ультрафиолета. Например, в цианобактериях такое свойство обеспечивается пигментом сцитореминном, адсорбирующим в диапазоне длин волн от 280 до 450 нм, а также фикоэритрином и фикоцианином. Аналогично, некоторые плесневые грибы и водоросли содержат производные микоспорина, которые имеют узкие адсорбционные полосы в УФ-диапазоне спектра 310–334 нм.

Ионы кадмия способны индуцировать оксидативный стресс в клетках бактерий [936, 937]. Бактерии *Klebsiella aerogenes* и *Clostridium thermoaceticum* противостоят токсичному действию ультрафиолета и одновременно ионов кадмия через образование CdS на клеточной поверхности. Внеклеточные кристаллы сульфида кадмия с размером 5–200 нм обладают дискретными электронными состояниями, эффективно поглощающими радиацию в диапазоне 320–400 нм, при этом при поглощении УФ-квантов фотозащитный слой из CdS распадается до металлического Cd и элементарной серы. Период индукции фотозащиты по такому механизму составляет 4–6 ч.

На поверхности клеток микроорганизмов и высших животных существуют одни и те же рецепторы, восприимчивые к пероксиду водорода и ультрафиолету [938-940], которые отвечают за передачу внешнего сигнала к клеточному ядру через ряд внутриклеточных посредников, что вызывает транскрипцию специфических генов ответа на воздействие УФ-излучения или  $H_2O_2$  и регулирует физиологическое состояние клеток. Поэтому клетки, устойчивые к УФ-излучению, обычно показывают повышенную устойчивость и к  $H_2O_2$ . Аналогичная перекрестная адаптация наблюдается и при воздействии радиоактивного излучения. Клетки *S. cerevisiae* приобретают устойчивость к УФ-облучению в результате воздействия рН шока и оксидативного стресса, индуцированного воздействием  $H_2O_2$  по отдельности и вместе [941].

Ближнее УФ-облучение (до 400 Лк) делает клетки молочнокислых бактерий устойчивыми к тепловому, осмотическому, оксидативному и некоторым химическим видам стресса [888, 942], а для *E. coli* адаптация к химическому стрессу под действием 4-нитрохиолин-1-оксида придавала устойчивость к УФ-облучению и антибиотику – налидиксовой кислоте [943].

Несмотря на то, что перекрестная адаптация повышает устойчивость микроорганизмов к действию множественных стрессов, в то же время возможна и обратная ситуация, когда клетки, подверженные воздействию одного вида стресса, становятся менее устойчивыми к другому стрессу. Например, бактерии, подвергнутые сублетальному температурному шоку, осмотическому шоку и ряду других воздействий, гибнут на средах с повышенной концентрацией солей, совершенно не опасной для нормальных клеток, или на средах с поверхностно-активными соединениями, также в концентрациях, не влияющих на рост нормальных клеток. У *L. acidophilus* NCFM экспрессия гена и содержание БТШ GrpE, связанного с DnaK и обладающего шаперонными функциями, резко снижалась (в 35 раз) при экспонировании к  $H_2O_2$  [641, 944]. Такая непредсказуемая реакция в отношении устойчивости к стрессу находится в противоречии с данными о приобретении устойчивости к разным видам стресса при перекрестной адаптации и свидетельствует о сложности системы ответов на стресс.

Способность микроорганизмов адаптироваться к различным стрессам зависит от их физиологического состояния и условий роста: субстрата в питательной среде [945], условий аэрации [848, 946], плотности клеток в популяции [947], фазы роста [702, 705, 948] и других факторов.

Рихванов и др. [945] наблюдали повышение устойчивости к тепловому шоку дрожжей *S. cerevisiae* при культивировании на этаноле по сравнению с культивированием на сахарозе, что авторы объяснили большей активностью антиоксидантных систем ответа на стресс.

В анаэробных условиях дрожжи часто намного более устойчивы к тепловому шоку, чем в аэробных [848]. В условиях лимитирования роста кислородом Арзуманян и др. [946, 949] наблюдали повышение устойчивости к высокой концентрации солей при переходе с аэробных условий к микроаэрофильным, при этом уровень NaCl, обычно оптимальный для умеренных галофилов (5–6%), становился оптимальным и для роста слабых галофилов (*Rhodococcus erythropolis* и *Shewanella sp.*); галотолерантные дрожжи *Yarrowia lipolytica* приобретали галофильные свойства с оптимумом роста при концентрации NaCl 10%, а скорость роста экстремофильных *Halobacterium salinarum* возрастала при супраоптимальных концентрациях соли 25–34%. Авторы объясняют подобные закономерности снижением нагрузки на метабо-

лизм со стороны АФК, образуемых в значительно меньшем количестве при дефиците кислорода в среде [950].

Напротив, в случае оксидативного стресса Cabisco et al. [902] наблюдали большую устойчивость клеток дрожжей-сахаромицетов, выращенных в аэробных условиях, что, очевидно, обусловлено индукцией антиоксидантных систем ответа в присутствии кислорода в среде.

Перекрестные ответы на различные виды стресса наблюдаются у молочнокислых бактерий [398, 419, 448, 918, 951]. Оксидативный стресс часто вызывает перекрестный ответ на другие виды стресса и наоборот, различные виды стресса активируют системы ответа на оксидативный стресс. Перекрестный ответ также наблюдается между холодовым и тепловым [578, 523, 542], осмотическим и тепловым [952] стрессами.

Подтверждением возникновения перекрестной устойчивости к различным стрессам является индукция генов, имеющих общие функции в отношении механизмов стресс-резистентности и находящихся под контролем регуляторных факторов [419].

У молочнокислых бактерий основные белки, вовлеченные в почти все стрессы окружающей среды, относятся к семейству DnaK и GroEL и экспрессируются наряду с Clp мультимерным комплексом. DnaK шаперонная машина кодируется опероном *grpE-dnaK-dnaJ*, а GroEL – опероном *groEL-groES* [419, 918]. Транскрипционная активность обоих шаперонов повышается не только в ответ на тепловой шок, но и на кислотный стресс.

При кислотном шоке у некоторых лактобацилл повышается экспрессия белков, вовлеченных в метаболизм углеводов, наблюдается сверхэкспрессия белков теплового шока и других стрессорных факторов GroES, GroEL, DnaK, GrpE, Hsp1, UspA (universal stress protein), протеаз Clp (ClpP, ClpE, ClpL), которые помогают неправильно уложенным белкам принять нужную конформационную структуру или деградируют их при невозможности исправления [953]. Однако у других МКБ содержание этих белков существенно не меняется [479, 495, 953-955].

Гены, вовлеченные в репарацию ДНК, также повышают свою активность при кислотном стрессе, например, *uvrB*, *uvrDI*, *vsr*. Ген *luxS* показал повышенную экспрессию в кислотных условиях в нескольких штаммах-пробиотиках, что свидетельствует о вовлечении кворум сенсинга в устойчивость к кислоте [487, 956]. Устойчивость лактобацилл к повышенной кислотности важна с точки зрения их выживаемости, как пробиотиков, в желудочно-кишечном тракте и негативного действия желчных кислот и солей.

У *L. casei* при холодовом шоке (4°C) индуцируется фактор RecA, который играет существенную роль в гомологичной рекомбинации и SOS-связанной репарации

ДНК в ответ на ее повреждение, в обеспечении устойчивости к тепловому и оксидативному стрессам [957]. У *L. plantarum* под действием желчных солей повышается экспрессия в том числе белков, участвующих в ответе на оксидативный стресс (GshR1 и GshR4) [953]. У *Streptococcus mutants* в аналогичных условиях индуцируется фактор Rex, который вовлечен в ответ на оксидативный стресс [958]. Для штамма *L. lactis* показано повышение содержания глутатиона, участвующего в ответе на оксидативный стресс и поддержании редокс-гомеостаза в клетке, в условиях длительного (несколько часов) умеренного кислотного стресса (pH 4,0) и кратковременного (несколько минут) кислотного стресса (pH 2,5) [959], а также при холодной температуре [960, 961].

Ответ на желчь включает повышение экспрессии молекулярных шаперонов (DnaK, GroES, GroEL, HSP20), протеаз (Clps, DegQ), ДНК-репарирующих белков (геликазы) и F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФазы. Также индуцируются гены, специфические при ответе на желчные соли [494, 953, 962]. У *L. plantarum* при действии желчных кислот показана индукция транскрипционного регулятора ответа на стресс CtsR. Этот регулятор контролирует экспрессию ClpP в ответ на различные абиотические стрессорные условия [551, 552]. Также в присутствии желчи экспрессируется NAD-киназа, которая играет критическую роль в поддержании баланса NAD:NADP [963], повышается активность лактатдегидрогеназы [964]. Экспорт желчных солей из клетки – еще один механизм противодействия их токсичности.

У *L. plantarum* 423 на богатой глюкозой среде при кислотном стрессе (pH 2,5) Heunis et al. [494] наблюдали увеличение синтеза белков ответа на общий стресс, включая Hsp1 и Hsp3, шаперонины DnaK, GrpE, GroEL, GroES, белок UspAs, а также некоторые другие с неидентифицированными функциями. Наблюдался существенный ответ на оксидативный стресс с повышением экспрессии глутатионредуктаз (GshR2 и 4), глутатиопероксидазы (Gpo), метионинсульфоксидредуктазы (MsrA2), тиолпероксидазы (Trx). У *L. lactis* MG1363 при кислотном стрессе также наблюдалось образование АФК, повышалась экспрессия супероксиддисмутазы (SodA), алкилгидропероксидредуктазы (AhpC) и тиолпероксидазы (Trx).

БТШ могут быть вовлечены в прикрепление клеток к клеткам организма-хозяина и друг к другу [965, 966], в преодоление стрессовых воздействий и стабилизацию рекомбинантных клеток с внедренными плазмидами, которые, как известно, привносят дополнительную метаболическую нагрузку и вызывают клеточный стресс. Внедрение оперона *groESL* штамма *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 в 2 плазмиды, содержащие системы экспрессии, индуцируемые низином, с последующим переносом вектора в штаммы *Lactococcus lactis* и *L. paracasei*, привело к синтезу GroEL в штаммах после индукции низином и повышению их устойчивости к теп-

ловому шоку, солевому стрессу (5 М NaCl, 1 час) и действию бутанола (0,5% об) [521]. При гетерологической экспрессии *dnaK* из *E. coli* в *L. lactis* у последнего повышалась устойчивость к кислотному, солевому и этанольному стрессам [967].

Возможна и обратная ситуация, при которой адаптация к специфическим стрессам, таким как УФ-радиация, голодание приводит к повышению множественной устойчивости клеток к тепловому шоку [358, 386, 427, 479, 498, 607, 887, 915, 968, 969].

Экспрессия белков теплового шока наблюдалась при кислотном стрессе, облучении ультрафиолетом и обработке пероксидом водорода [498, 887, 970]. К аналогичному повышению стрессоустойчивости приводит и нахождение клеток МКБ в стационарной фазе [489, 971]. Глюкозное голодание увеличивало устойчивость к тепловому, осмотическому, кислотному стрессам [386, 968].

При стрессовом воздействии NaCl на *Lactobacillus bulgaricus* наблюдали повышенную экспрессию фактора элонгации G (EF-G) и молекулярного шаперона GroEL [972, 973].

Перекрестный ответ между голоданием и оксидативным стрессом наблюдался у разных бактерий [974, 975]. Так, было показано, что у бактерий *L. plantarum* WCFS1 увеличивается активность каталазы в течение стационарной фазы, что повышает их устойчивость к возможному оксидативному стрессу и сопровождается снижением окисления липидов [976]. Эти результаты подтверждают данные Parente et al. [977] о более высокой устойчивости к тепловому шоку и оксидативному стрессу клеток в стационарной фазе по сравнению с экспоненциальной и аналогично, но менее выражено – по отношению к голоданию и кислотному стрессу. Это объясняется включением многих механизмов устойчивости к стрессу при замедлении активного роста. Однако для некоторых штаммов эффект ростовой фазы не проявлялся. Аналогичная закономерность для разных фаз роста наблюдалась в работе De Angelis et al. [969]. В другой же работе [978] наблюдалась обратная зависимость с более высокой устойчивостью термофильных стрептококков к тепловому шоку в экспоненциальной фазе роста по сравнению со стационарной. Корреляция между видовой принадлежностью и стрессоустойчивостью, в целом, не прослеживалась. Авторы делают вывод о более вероятном влиянии экологической ниши, из которой выделен штамм, на его стрессоустойчивость.

Zotta et al. [640, 674, 684] исследовали эффект температуры и дыхания на рост и ответ на стресс (тепло, оксидативное действие, замораживание, замораживание-высушивание) у *L. plantarum* C17 в ходе периодического культивирования. В целом, клетки, которые росли в экспоненциальной фазе в условиях дыхания, показали повышенную толерантность к тепловому и оксидативному стрессам, замораживанию

по сравнению с клетками, полученными в условиях анаэробнозиса. Результаты подтвердили данные Watanabe et al. [751, 979], Li et al., [980], а также Rezaiki et al. [981] для других лактобацилл и показали, что у *L. plantarum* индукция респираторного метаболизма позитивно воздействует на выживание при оксидативном стрессе, что связывают со способностью *L. plantarum* синтезировать Mn-зависимую псевдокаталазу и гем-зависимую каталазу [982].

В аэробных условиях культивирования молочнокислых бактерий в периодическом режиме концентрация  $H_2O_2$  существенно повышается по сравнению с отсутствием аэрации [983]. У *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* аэрация не изменяет максимальную скорость роста, но заметно снижает накопление биомассы и молочной кислоты [983]. Напротив, у членов групп *L. plantarum* и *L. casei* в аэробных условиях культивирования фенотипов с активным дыханием повышается выход биомассы без увеличения скорости роста и снижается выход молочной кислоты по сравнению с анаэробным культивированием [743, 748, 751, 980, 984-986]. Однако если дыхательный путь не активирован, присутствие кислорода и/или накопление побочных продуктов реакции с кислородом обычно приводит к угнетению роста [981]. Рост в условиях дыхания повышает устойчивость к оксидативному стрессу. Синтез и повышение активности ферментов антиоксидантного ответа в условиях дыхания способствует большей выживаемости при экспонировании к  $H_2O_2$ , генераторам супероксида (например, пирогаллолу и менадиону) и гидроксильным радикалам [640, 684, 749, 751, 985-987]. 80% мутантов дикого типа высокотолерантного к стрессу и способного к сдвигу в сторону аэробного/респираторного метаболизма штамма *L. plantarum* C17, полученных в анаэробных условиях, и 100% мутантов того же штамма, полученных в аэробных условиях, смогли расти лучше, чем исходный дикий тип как в анаэробных, так и в аэробных условиях и, как правило, имели более высокую выживаемость при оксидативном стрессе [640, 684, 749].

Повышение толерантности к тепловому, оксидативному и холодовому стрессу наблюдалось для аэробно выращенных клеток *L. delbrueckii* [980], для *L. casei* и *L. rhamnosus*, у которых компоненты системы ответа на тепловой шок регулируются множественными стрессами, протекающими до воздействия теплового шока: замораживанием-высушиванием, высокой кислотностью, желчными солями, присутствием р-кумариновой кислоты, стационарной фазой роста, при которой бактериальные клетки экспонируются к высокой кислотности и истощению питательных веществ [451, 494а, 555, 765, 962, 988]. С другой стороны, клетки, отобранные в стационарной фазе роста в аэробных условиях, не всегда показывали повышение устойчивости к тепловому стрессу, замораживанию и замораживанию-высушиванию [640, 743, 749]. То есть найденные различия не универсальны и зависят от штамма.

Углеводное голодание, дефицит азота и фосфора в среде вызывает множественный ответ у МКБ и развитие перекрестного ответа на тепловой или этанольный шок, кислотный, осмотический, оксидативный стрессы, замораживание [386, 989, 990]. Однако перекрестный ответ развивается не во всех случаях и зависит от вида МКБ, их физиологического состояния. Важную роль в ответе на голодание играют белки общего ответа на стресс (GSP, general stress proteins).

В исследованиях с хемостатом в аэробных условиях и при низком протоке среды выживаемость штамма *L. plantarum* C17 повышалась; одновременно повышалась активность каталазы и потребление кислорода [640, 749]. Условия медленного роста или истощения питания ведут к стационарной фазе, которые улучшают общий ответ на стресс, индуцируют механизмы перекрестной защиты [489].

Исследование роста в условиях ретеностата (хемостат с рециклом клеток) и математическое моделирование показали связь между скоростью роста и устойчивостью к стрессу [991, 992]. При скорости роста, близкой к нулю, метаболизм перестраивается на экспрессию генов и соответствующий синтез белков, поддерживающих сохранение физиологической активности клеток в этих условиях. При других условиях могут наблюдаться другие изменения в зависимости от вида МКБ, условий роста и других факторов [993].

Лактобациллы (*L. casei* и *L. plantarum*) лучше справляются с оксидативным стрессом, если в питательной среде присутствуют ненасыщенные жирные кислоты, аминокислоты L-аспарагин, L-пролин и L-серин [640, 749]. Выживаемость также резко повышается при внесении защитных веществ: аргинина, аспарагиновой кислоты, гистидина, глутатиона, глюкозы, твин 80, цитрата [409, 994]. Также на выживание и рост в аэробных и окислительных условиях влияет температура. Так, при 35°C аэробные условия не оказывают влияние на скорость роста, однако устраняют лаг-фазу; в то же время при 25°C удлиняется фаза адаптации [640, 749].

В обзоре De Angelis et al. [419] обобщены сведения об участии экспрессируемых белков лактобацилл в ответ на различные виды стресса. Сравнительные транскриптомные и протеомные исследования показали, что штаммы *Lactobacillus* в ответ на стресс изменяют активность или синтезируют набор белков: 1) БТШ, включающие шапероны семейства DnaK с молекулярной массой 70 кД, и шаперонин GroEL (60 кД); 2) Clp протеазный комплекс, состоящий из ClpP пептидазной субъединицы и Clp АТФазной субъединицы; 3) семейство белков холодового шока; 4) белки кислотного шока; 5) белки репарации ДНК; 6) общие/универсальные стрессорные белки; 7) транспортной системы; 8) протонной помпы.

Palud et al. [905] провели масштабный скрининг 1287 транспозонных мутантов *L. paracasei* на устойчивость к умеренному стрессу температурой (52 °C, 30 мин),

этанолом (170 г/л, 30 мин), солью (0,8 NaCl, 24 ч), кислотностью (рН 4,5, 24 ч), пероксидом водорода (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 ч), по результатам которого было выявлено 63 гена/промотора для теплового шока, 27 – для этанольного. Их разрушение вело к повышению чувствительности штаммов к стрессу. Среди них 14 генов или предполагаемых промоторов были общими для обоих стрессов. Для солевого, кислотного и оксидативного стрессов были идентифицированы соответственно 8, 6 и 9 генов или предполагаемых промоторов как существенные для адаптации к этим неблагоприятным условиям, с только тремя генами, общими по крайней мере для двух стрессов. Последующий RT-qPCR анализ 25 идентифицированных генов ответа на стресс выявил 11 генов с повышающейся экспрессией в ходе адаптации по меньшей мере к двум стрессам. 7 генов, кодирующих функции мембран, повысили экспрессию в ответ на специфические стрессы. Среди генов в множественный ответ были вовлечены шаперон *dnaK*, ген фосфоглюкозоизомеразы, экспрессирующийся в ответ на повышение температуры, этанол и оксидативный стресс, а также присутствие марганца.

Широко распространена перекрестная адаптация к биоцидам и антибиотикам [799, 995]. Так, адаптация *L. pentosus* MP-10 к биоцидам индуцировала физиологические модификации, частично подобные при воздействии антибиотиков, а также повысила устойчивость к кислотному стрессу и действию желчных кислот [995]. Это объясняется взаимодействием антибиотиков с липидами мембран и белками, что индуцирует повышенную экспрессию белков стресс-ответа, таких как NADH-пероксидазы *Nrx* и низкомолекулярных БТШ.

Наличие плазмид устойчивости, транспозонов, IS-элементов, (про)фагов и других мобильных элементов к определенным стрессам, включающих гены транспортеров металлов, устойчивости к Cu<sup>2+</sup>, фаговой резистентности, HSPs, sHSPs, антибиотикорезистентности, внедряющих дополнительные гены или (ин)активирующих существующие гены, расширяет возможности ответа на стресс у микроорганизмов [448].

В обзоре Wu et al. [409] обсуждаются результаты работ с различными подходами к созданию кислотоустойчивых штаммов методами метаболической инженерии: регуляция внутриклеточного метаболизма аминокислот (система аргининдезаминазы, внутриклеточное накопление аспартата, синтез разветвленных аминокислот: лейцина, изолейцина, валина и др.), регуляция синтеза глутатиона, накопление трегалозы, накопление бетаина, гетерологическая экспрессия *dnaK* из *E.coli*, *shsp* гена из *Streptococcus thermophilus*, *RecO* гена из *Lactobacillus casei*, повышение синтеза мононенасыщенных и разветвленных жирных кислот. Внедрение генов СОД и каталазы повышает устойчивость штаммов лактобацилл к хранению на холоду. Сверхпродукция *RecO* в *L. lactis* привела к повышению толерантности к кислотному стрессу и NaCl [409, 486]. Большинство из этих подходов повысили устойчивость не

только к кислотному стрессу, но и к тепловому и холодовому шокам, осмотическому шоку, этанолу, желчным солям,  $H_2O_2$ .

#### 2.4.6. Регуляторные функции пероксида водорода и других АФК

Из анализа данных литературы, представленных в предыдущих подразделах, следует, что АФК являются важными участниками внутриклеточных процессов и передачи регуляторных сигналов в прокариотических и эукариотических клетках. Выполняя функции окислителя, кофактора и регулятора метаболизма, АФК поддерживают оптимальный окислительно-восстановительный баланс, необходимый для нормального функционирования клеток, и который во многом определяется соотношением свободных радикалов, других форм АФК [996].

Надо отметить, что 10–20 лет назад в литературе присутствовали сомнения о наличии сигнальных функций у  $H_2O_2$  и других АФК, их участии как мессенджеров в регуляции внутриклеточных процессов. Однако к настоящему времени накоплено множество доказательств, что редокс регуляция может происходить с участием АФК на разных уровнях в сигнальных путях от рецепторов до ядра, от одиночных клеток до их популяций и агрегатов [330, 331, 342, 343, 348, 440, 830, 997-1010]. АФК способны играть роль вторичных мессенджеров в клетках бактерий, животных и растений, т.е. опосредовать действие внешних факторов на экспрессию генов [359, 590]. Как медиаторы экспрессии генов АФК модулируют активность факторов транскрипции, стимулируют накопление в клетке вторых посредников – циклических нуклеотидов cAMP и cGMP, изменяют редокс-состояние среды в клеточных органеллах, участвуют в гормональной регуляции [348, 1009, 1011, 1012] и в других процессах, которые были кратко отмечены в предыдущих подразделах.

Особое внимание уделяется роли пероксида водорода как мессенджера в передаче внутриклеточных сигналов как в оптимальных, так и в стрессовых физиологических условиях [348, 587, 903, 1002, 1003, 1005, 1010, 1013, 1014]. По сравнению с другими АФК  $H_2O_2$  – небольшая, относительно стабильная и в то же время реакционноактивная, легко диффундируемая в воде и через мембраны молекула, которая может быстро синтезироваться и разрушаться каталитическими и антиоксидантными системами в ответ на внешние стимулы.  $H_2O_2$  сама по себе не обладает мутагенным действием, но в определенных условиях может его проявить – в присутствии ионов металлов ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) вследствие образования гидроксильных радикалов, или в сочетании с аминокислотами, формальдегидом или ацетоном вследствие образования перекисных соединений [586, 1015]. Несмотря на низкую специфичность, как таковая она имеет необходимые свойства для выполнения роли как внутриклеточно-

го, так и межклеточного мессенджера [1005, 1014, 1016]. Например,  $\text{H}_2\text{O}_2$  легко реагирует с тиолат-анионом ( $-\text{S}^-$ ) с образованием остатка сульфеновой кислоты ( $-\text{SOH}$ ), который при нейтральных физиологических рН ионизируется с образованием сульфената ( $-\text{SO}^-$ ). Этот интермедиат может быть легко восстановлен, что делает реакцию обратимой и подходящей для выполнения сигнальных функций [1005]. Другими участниками передачи сигнала под действием  $\text{H}_2\text{O}_2$  рассматриваются белки пероксиредоксины [1014].

Внутриклеточный  $\text{H}_2\text{O}_2$  в низких концентрациях вызывает перераспределение потоков конструктивного и энергетического обмена, влияет на транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , переключает генетическую программу, связанную с ростом клеток, индуцирует системы ответа на различные стрессы [343, 348, 811, 914], а также апоптоз [1000, 1009, 1017]. Биологический регуляторный эффект экзогенного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрации 1–3 мМ наблюдался во многих исследованиях.

В клеточных культурах и тканях млекопитающих и растений  $\text{H}_2\text{O}_2$  действует как сигнальная молекула в передаче сигнала, регуляции клеточного роста и дифференцировке [1010, 1018-1023] и во многих эукариотических сигнальных путях, чувствительных к редокс-состоянию, подверженному воздействию АФК. В ответе на действие  $\text{H}_2\text{O}_2$  участвуют ростовые факторы, митоген активируемая протеинкиназа и регулятор p53, выполняющий центральную роль в регуляции клеточного цикла, митоза и апоптоза [1009, 1023, 1024].

Таким образом, несмотря на все еще встречающиеся в литературе критические мнения о наличии как таковых сигнальных функций у  $\text{H}_2\text{O}_2$  и других АФК, в целом к настоящему времени сложилось научно и экспериментально обоснованное представление об их важной роли в регуляции метаболизма и передаче сигналов внутри клетки. Результат действия сигнальных доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  будет определяться окислительно-восстановительными условиями во внутриклеточной и внеклеточной среде и физиологической активностью клеток. Это, в частности, создает основу для постановки задачи использования данных особенностей в управляемом культивировании микроорганизмов.

## **2.5. Системы репарации при повреждении ДНК**

Такие АФК, как ОН-радикал, супероксид-анион, синглетный кислород, способны повреждать ДНК и повышать частоту мутаций [300]. Повреждение ДНК вызывают и перекиси органических кислот, образующиеся при воздействии пероксида водорода [1015], а также ультрафиолетового излучения, во многих отношениях схожего с действием АФК. Особенно сильное повреждающее, прямое мутагенное дей-

ствии оказывает жесткий ультрафиолет УФС-диапазона 250–270 нм, в котором ДНК наиболее интенсивно поглощает кванты УФ-излучения [1025, 1026]. Воздействие жесткого ультрафиолета вызывает образование в ДНК циклобутильных пиримидиновых димеров, (6-4) фотопродуктов и т.д. Белки наиболее интенсивно поглощают УФ-излучение в диапазоне 270–290 нм. Поглощение обусловлено ароматическими группами триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина. Некоторые пигменты и липиды также интенсивно поглощают УФ-излучение. Денатурация различных макромолекул, особенно белков, инициированная воздействием ультрафиолета, приводит к соответствующей потере их структуры и функций, что ведет к гибели клетки.

Пребывание клеток в таких условиях приводит не только к развитию состояния оксидативного стресса, но и к активации систем, устраняющих или исправляющих повреждения ДНК в клетках, т.е. репарации. Одновременно повышенная частота мутаций приводит к ускорению адаптивной эволюции популяций микроорганизмов в условиях оксидативного стресса.

К настоящему времени выявлено более десятка различных систем, в той или иной степени имеющих отношение к репарации. К наиболее изученным относятся система адаптивного ответа, эксцизионная репарация, SOS-система, рекомбинационная (пострепликативная) репарация, фотореактивация (фоторепарация) с участием фермента фотолиазы [1027, 1028].

*Система адаптивного ответа клетки* – индуцибельная антимуtagenная система репарации. Ее функционирование приводит к резкому снижению (до 100 раз) частоты мутаций при повторном действии мутагена, хотя на количество первичных нарушений ДНК система не влияет. Более интенсивно начинают работать системы репарации. Время функционирования этой системы ~ 4 час после первого воздействия мутагена. Индукция системы происходит при концентрациях мутагенов в 10–100 раз меньших, чем необходимо для проявления их мутагенного действия. УФ-облучение не индуцирует работу этой системы.

Облучение и мутагены в низких дозах вызывают снижение частоты мутаций при последующих воздействиях. Облучение в дозе 12,5–50 рад в состоянии проявить защитный эффект в отношении последующего массированного облучения в дозах порядка  $10^3$  рад. Частота мутаций у *E. coli* возрастает эффективно лишь в первый момент инкубации в присутствии мутагена нитрозогуанидина. По мере инкубации частота мутаций падает, причем после индукции этой антимуtagenной функции клетки становятся устойчивыми к нитрозогуанидину в концентрации в 100 раз выше первоначальной. При удалении нитрозогуанидина из культуральной среды через четыре часа индуцибельная антимуtagenная функция полностью исчезает.

*Эксцизионная репарация* состоит в удалении поврежденного участка ДНК одной цепи и восстановлении нормальной последовательности оснований по матрице оснований на комплементарной цепи и относится к наиболее важным механизмам репарации ДНК во всех тестированных видах организмов [1027, 1029-1032]. Она репарирует, по-существу, все повреждения ДНК и, таким образом, в дополнение к главным функциям, играет дублирующую роль в других системах репарации. Среди наиболее характерных повреждений такие, которые индуцированы АФК и ионизирующей радиацией: фрагментированные пурины, пиримидиновые гидраты и гликоли, участки с потерей оснований (апуриновые/апиримидиновые участки – AP-участки) и одиночные или двойные разрывы нитей. УФ-индуцированные повреждения включают циклобутанпиримидиновые димеры (Pyr<>Pyr, CPDs), (6-4) дипиримидиновые димеры (6-4 PPs) и их изомеры и в меньшей степени дипуриновые аддукты.

Эксцизионная репарация может сопровождаться удалением модифицированных оснований как оснований (эксцизионная репарация оснований) или как нуклеотидов – обычно в виде олигонуклеотида (нуклеотидная эксцизионная репарация) [1025, 1027, 1029, 1033]. Для первого механизма характерна высокая специфичность при низких затратах энергии. Репарационная «заплатка» обычно включает 1 нуклеотид, за исключением случая, когда она образуется путем удаления Pyr<>Pyr комбинацией эксцизии основания и эксцизии нуклеотида, составляющие 4 нуклеотида. Ограничение, обусловленное высокой специфичностью узнавания, частично компенсируется экономией энергии на репарацию, поскольку независимо от АТР и включает замещение единственного нуклеотида. Во втором случае нуклеотидная эксцизионная репарация осуществляется непосредственно эндонуклеазой, которая узнает нарушения. Используется один и тот же набор белков для удаления фактически всех ДНК повреждений, включая большинство, если не все из тех, удаляемых с помощью эксцизии оснований. Аддукты удаляются в виде олигонуклеотидов, и репарационная заплатка намного превышает таковую для эксцизии оснований. Нуклеотидная эксцизия является энергетически затратным механизмом репарации. Однако эти затраты компенсируются отсутствием специфичности нуклеотидной эксцизии. Таким образом, вместо синтеза фермента, специфичного для каждого бесконечного числа возможных повреждений, клетка обладает одной ферментной системой, которая чинит все эти повреждения, хотя и до некоторой степени расточительным путем. Из всех систем репарации нуклеотидная эксцизионная репарация наиболее важна для выживания. В целом, репарация повреждений в активных генах протекает более интенсивно и эффективно, что обусловлено увеличенной эффективностью репарации транскрибируемых цепей.

*Рекомбинационная (пострепликативная) репарация*, т.е. репарация, включающая рекомбинацию, у *E. coli* представлена двумя типами. Во-первых, это репарация, при которой заполняется пробел в последовательности оснований во вновь синтезированной цепи на месте поврежденного участка. Этот процесс определяется, по крайней мере, четырьмя генами. Во-вторых, существует процесс связанного с репликацией восстановления двуниевых разрывов в ДНК, возникающих под действием УФ, ионизирующей радиации, митомицина, тоже определяемый активностью нескольких генов [1025].

Четвертый механизм связан с работой систем восстановления повреждений клеточных структур – *SOS-ответа*. К системе *SOS-ответа* относится система репарации ДНК и система шаперонов. У *E. coli* весь процесс *SOS-ответа* занимает ~1 час. Всего же время функционирования этой системы составляет, как и для системы адаптивного ответа, около 4 часов после первого воздействия мутагена, и индукция системы происходит при концентрациях мутагенов в 10–100 раз меньших, чем необходимо для проявления их мутагенного действия [862].

Наличие *SOS-системы* обнаружено у различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, у *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*. У последней при *SOS-ответе*, кроме всего прочего, развивается компетентное состояние клеток, т. е. они приобретают способность воспринимать экзогенную ДНК в процессе генетической трансформации.

Система *SOS-ответа* включается при грубых повреждениях в структуре ДНК или в системах ее репликации в результате действия ультрафиолета или химических мутагенов, когда возникает опасность экспонирования одиночной нити ДНК (ssDNA, single-stranded DNA) [448].

*SOS-регулон* включает около 20 генов, которые индуцируются в ответ на некоторые повреждения ДНК и образуют продукты, участвующие в ее репарации [445]. В состав *SOS-системы* входит ген *lexA*, продуктом которого является белок LexA – репрессор ряда генов, и ген *recA*, кодирующий белок RecA [915, 1034, 1035]. Переключение ответа регулируется согласованным действием репрессора LexA и активатора RecA, приводя к индукции экспрессии белков, вовлеченных в ДНК репарацию [1034-1036]. Ген *lexA* авторегулируемый, т.е. репрессируется собственным продуктом путем связывания LexA репрессорного белка с операторными сайтами в промоторном регионе *SOS* генов. Это обеспечивает постоянство концентрации белка LexA в процессе размножения бактерий. Белок RecA участвует в ряде клеточных процессов (в рекомбинации, расщеплении АТФ). Активированный сигналом – индуктором *SOS-системы*, он приобретает свойства протеазы и инактивирует репрессорный белок LexA. 80% LexA-белка разрушается за три минуты после УФ-облучения. В ре-

зультате разрушения белка LexA снимается репрессия с генов, участвующих в репарации, в ингибировании деления клеток, наблюдаемом при SOS-ответе, в изменении состава белков внешней мембраны, а также в повышении частоты мутаций (индуцированный мутагенез). В данном случае задачей систем репарации является стабилизация однонитевой ДНК и синтез цепи с проскоком дефектных нуклеотидов. В случае серьезного повреждения ДНК высокоточная ДНК-полимераза не может осуществлять репликацию через ДНК-повреждения и замещается менее точной ДНК-полимеразой. Последнюю функцию выполняют мутазы. Мутазы имеют низкую точность и могут копировать поврежденную ДНК. При работе таких полимераз частота мутаций увеличивается примерно в 100 раз, вследствие чего возрастает число ошибок в синтезируемой ДНК. Этот процесс, названный синтезом через повреждения, осуществляется главным образом SOS-индуцированной склонной к ошибкам полимеразой семейства Y (Pol IV и Pol V) или семейства C (DnaE) [1037]. При резком увеличении повреждений ДНК система мисметч репарации перестает справляться с ними, возникают клетки с резко выраженным гипермутабельным фенотипом [418, 632, 1038].

Биологическое значение SOS-репарации заключается в том, что она позволяет реплицировать ДНК с повреждениями, не устраненными другими системами репарации. Разумеется, в этом случае в дочерней нити появляется довольно много ошибок, мутаций. В результате SOS-репарации клетка спасается от гибели на этом этапе: ее ДНК оказывается удвоенной, хотя и с ошибками, и теперь может произойти клеточное деление. Летальные же мутации вызовут гибель клетки, но в целом часть популяции останется жизнеспособной. Именно поэтому индуцированный мутагенез имеет приспособительное значение – могут появиться мутанты, более приспособленные к условиям, которые вызывают SOS-ответ.

В процессе SOS-ответа можно выделить три фазы. Первая характеризуется подавлением синтеза ДНК и ее частичной деградацией в ответ на образование белка Rec A. Во вторую фазу синтез ДНК протекает с нормальной скоростью, но вновь синтезируемая ДНК содержит пробелы, которые восстанавливаются в процессе пострепликативной или рекомбинационной репарации.

При переходе к третьей фазе SOS-ответа в клетках начинается нормальный синтез ДНК, завершаются процессы репарации ДНК. Клетки переходят к нормальному росту.

SOS-система не связана непосредственно с системой адаптивного ответа; эти системы индуцируются различными воздействиями. Так, у *E. coli* УФ-облучение вызывает SOS-ответ, но не адаптивный ответ. Напротив, у *S. typhimurium* воздействие

УФА индуцирует и SOS-ответ, и систему адаптивного ответа на окислительный стресс [1039].

*Фотореактивация (фоторепарация)* является наиболее важным и распространенным механизмом прямой репарации, протекающей у организмов, подвергающихся воздействию солнечного света: вирусов, микроорганизмов, растений и животных за исключением плацентарных млекопитающих и человека [1040-1062]. Фотореактивация наблюдается при освещении клеток видимым или ближним УФ-светом и состоит в разрезании димеров, образующихся из пиримидиновых остатков тимина в ДНК, а также димеров в РНК и, таким образом, устраняет вредные эффекты УФА (320-400 нм) и УФВ (280-320 нм) радиации. Процесс фотореактивации связан с действием одиночного фермента фотолиазы (ЕС 4.1.99.3, фотореактивирующего фермента, PRE), являющегося флавопротеином и кодируемого геном *phr*. Отличительная черта фотолиаз – высокий квантовый выход реакции при поглощении света и их крайне низкие концентрации во всех организмах, обладающих ими (около 10–20 молекул на клетку в *E. coli*), поэтому, в частности, в стрессированных клетках и организмах, когда наблюдается экспрессия фотолиазы и механизм фоторепарации, физиологические изменения могут проявляться уже при уровнях освещенности объекта, существенно более низких, чем при фотосинтезе. Эта особенность позволяет объяснить сигнальные функции и чувствительность к низким дозам света, наблюдаемые в экспериментах. Так, ген фотолиазы плесени *Trichoderma* индуцируется уже после кратковременного импульса синего света или при освещении синим светом с интенсивностью всего 20 мкМ/м<sup>2</sup> [1063].

Выделяют 2 класса фотолиаз [1045, 1063, 1064, 1065]: класс I или микробные CPD фотолиазы и класс II или CPD фотолиазы высших эукариот. CPD-фотолиазы репарируют *cis-syn* циклобутановые пиримидиновые димеры P<sub>yr</sub><>P<sub>yr</sub>. В зависимости от вида светоулавливающего пигмента фотолиазы подразделяются на 2 типа: тип I (MTHF тип) и тип II (8-гидрокси-5-дезафлавин тип). Гены CPD фотолиазы принадлежат к семейству, которое помимо CPD фотолиаз также включает (6-4) фотолиазы и рецепторы синего света. 6-4-фотолиазы репарируют пиримидин-пиримидиновые (6-4) фотопродукты (6-4 PPs) [1047, 1057, 1062]. У плесневых грибов рецепторы синего света участвуют в фотоморфогенезе, у растений – в регуляции прорастания семян, в ингибировании удлинения гипокотыля, в фототропизме [1063].

В дрожжах в фоторепарацию вовлечены два гена *phr1* и *phr2*; *phr1* кодирует фотолиазу, а *phr2* – регуляторный белок для гена *phr1* [1066]. Несмотря на крайне малое количество фермента, присутствующего во всех фоторепарирующих организмах, ген, кодирующий фотолиазу (у *E. coli* ген *phr*), был клонирован из многих орга-

низмов и сиквенирован, и фермент был сверхпродуцирован в количествах, позволивших его очистку в объеме несколько сот мг чистой фотолиазы.

CPD фотолиаза способна узнавать специфичные димерные повреждения циклобутанового типа, обращая эти димеры в их составляющие пиримидины с помощью видимого или ближнего УФ-света. Действуя как типичный фермент с кинетикой Михаэлиса-Ментен, она связывается с пиримидиновыми димерами (Pyr<>Pyr) в ДНК, а также в РНК:



где PRE – фотореактивируемый фермент.

При этом специфическое связывание фермента с субстратом светонезависимо, а второй шаг зависит от света. Активация фермент-субстратного комплекса светом длиной волны 300–600 нм приводит к мономеризации димеров.

В *E. coli* и дрожжевых клетках фотолиаза циклобутанпиримидиновых димеров может непосредственно выщеплять УФ-индуцируемые пиримидиновые димеры, используя энергию видимого света [1046].

Несмотря на то, что в фотолиазе выявлен участок, сам служащий светочувствительным центром и способный адсорбировать фотоны в синей части спектра [1027], основные светочувствительные свойства обусловлены кофакторами, адсорбирующими свет.

Фотолиазы из различных организмов содержат два нековалентно связанных кофактора; один из них полностью восстановленный флавинадениндуклеотид (FADH<sup>-</sup>). Другой, известный как второй хромофор, представляет собой или метенилтетрагидрофолат (MTHF, птерин), или 8-гидроксидеазафлавин (8-HDF, 7,8-дидеметил-8-гидрокси-5-деазарибофлавин) [1049, 1053, 1057, 1067]. Вторым хромофором в фотолиазе – молекула, улавливающая свет, которая поглощает по большей части в ближнем УФ и видимом свете (300–500 нм) с высоким коэффициентом экстинкции. Вторым хромофором затем переносит свою энергию возбуждения на FADH<sup>-</sup>. Затем фотовозбужденный FADH<sup>-</sup> переносит электрон на Pyr<>Pyr, генерируя димерный анион-радикал (Pyr<>Pyr<sup>•-</sup>) и нейтральный флавиновый радикал (FADH<sup>•</sup>). Pyr<>Pyr<sup>•-</sup> очень нестабилен и претерпевает спонтанное расщепление, сопровождаемое обратным переносом электрона на FADH<sup>•</sup>. В дополнение к главному каталитическому кофактору FADH<sup>-</sup>, Trp (Trp277 в *E. coli*) в апофотолиазе, независимом от других хромофоров, также функционирует как сенсibilизатор для репарации Pyr<>Pyr путем прямого переноса электрона.

Спектр действия фотореактивации, подобно спектру адсорбции, по большей части определяется MTHF или 8-HDF хромофорами, в зависимости от типа фотоли-

азы. Фотолиаза типа 8-HDF, содержащая 8-гидрокси-5-дезафлавиновый хромофор, наиболее активна в видимой области спектра 435–445 нм, в то время как МТНФ-тип фотолиазы, с 5,10-метенилтетрагидрофолатовым хромофором, имеет максимум активности в ближнем УФ-диапазоне спектра около 380 нм.

Функционируя в фотолиазах как светоулавливающие молекулы, кофакторы МТНФ и 8-HDF дополняют светоулавливающую способность FADH<sup>Г</sup> путем поглощения в регионах ближнего УФ и видимого света, где FADH<sup>Г</sup> поглощает очень слабо.

Не наблюдается никакой корреляции между классами и типами фотолиаз и таксономическим положением организмов. Фотолиаза типа 8-HDF найдена у цианобактерий *Anacystis nidulans*, *Agmenellum quadruplicatum*, бактерий *Streptomyces griseus*, *Halobacterium salinarum*, *H. cutirubrum* и *Methanobacterium thermoautotrophicum*, зеленых водорослей *Scenedesmus acutus*, *Platymonas subcordiformis*, мхов *Bryum pseudotriquetrum*, мошек *Smittia* [1057, 1068-1072].

Фотолиазы МТНФ-типа функционируют у бактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, дрожжей *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, плесени *Trichoderma harzianum*, нитчатой плесени *Neurospora crassa* [1031, 1057, 1063, 1067, 1073-1075].

Для фотолиазы *Neurospora*, также принадлежащей к МТНФ-группе, спектр действия (макс. 395 нм) находится между классическим МТНФ-типом (380) нм и 8-HDF-типом (440 нм) фотолиаз. Это указывает, что диапазон максимума для спектра поглощения/действия фотолиазы МТНФ должен быть расширен от 380 до, по крайней мере, 395 нм. Для этой области был опубликован ряд неклассифицированных спектров действия, например, для фотореактивации в яйцах *Drosophila* и для фотолиазы из растения *Arabidopsis thaliana* [1057].

Индукция фотолиазы наблюдается при предоблучении клеток ультрафиолетом или их одновременном облучении ультрафиолетом и видимым светом. Однако она возможна и при освещении флуоресцирующим светом. Такое предоблучение флуоресцирующим светом повышает устойчивость к УФ экспоненциально растущих клеток рыб в темноте или при освещении флуоресцирующим светом [1052].

Фоторепарация и эксцизионная репарация взаимодействуют между собой и дополняют друг друга [1076-1081]. Более того, фотолиаза найдена у организмов, никогда не подвергавшихся действию солнечного излучения, что предполагает наличие нефотореактивирующих функций у фотолиазы [1078, 1082]. В темноте фотолиаза стимулирует удаление УФ-повреждений в ДНК эксцизионной репарацией в дрожжах и *E. coli* [1076, 1083]. Фотолиаза, связанная с P<sub>у</sub>г<>P<sub>у</sub>г в ДНК, не ингибирует, но фактически стимулирует эксцизионную репарацию [1029]. Это возможно из-за того, что фотолиаза близко контактирует с 5'-нуклеотидами только в поврежденной цепи

ДНК и, по меньшей мере в *E. coli*, по отношению к местам связывания эксцизионной нуклеазы фототиаза связывается на другой стороне ДНК. Этим она нацеливает белки эксцизионной репарации на специфические участки повреждений, увеличивая эффективность реакции репарации. Таким образом, возможно, что фототиаза, связанная с Puv<>Puv просто выглядит подобно одному из аддуктов для эксцизионной нуклеазы применительно к Puv<>Puv, и этим она облегчает репарацию. Поэтому связывание PRE с поврежденным участком ДНК не обязательно должно ингибировать связывание других репарирующих белков.

Фоторепарация с участием фототиазы единственная пока найденная ферментная репаративная реакция, в которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Все остальные типы репарации не требуют активации светом.

Наряду с описанной прямой имеет место непрямая фотореактивация, наиболее выраженная при облучении УФА в области 340 нм. Этот эффект не связан с расщеплением димеров. Нивелирование эффекта УФ-облучения в этом случае объясняется задержкой роста клеток микроорганизмов, в результате чего удлиняется период протекания репарационных процессов. Непрямая фотореактивация, таким образом, не связана с работой каких-либо специальных репарационных систем.

Биологическое значение фотореактивации состоит в том, что организмы, обитающие на поверхности земли, наряду с освещением видимым светом подвергаются вредному воздействию УФ-излучения Солнца и таких стрессов как тепловой шок, иссушение, осмотический стресс. Светособирающие функции МТНФ и 8-HDF в фототиазах и использование света мягкой области ультрафиолета или видимого диапазона могут использоваться в координации с ответом на стресс, что представляется существенными для выживания таких организмов. У человека и неплацентарных млекопитающих фототиаза не выявлена [1084]. Однако у человека выявлены рецепторы-криптохромы (Cry2) и гены с высоким сходством гомологичной последовательности к фоторецептору синего света, т.е. фототиазы типа 8-HDF, которые, как предполагают, участвуют в поддержании циркадных ритмов [1045, 1050, 1053, 1062, 1085-1088]. Фоторецепторы синего света и регуляторы ритмов выявлены и у других организмов [1063, 1089-1093].

Среди других репаративных систем, выявленных к настоящему времени в клетках человека, дрожжей и некоторых других организмов [1027]:

- репарация Об-алкилированного гуанина, О4-алкилтимина с помощью метилтрансфераз;
- репарация однонитевых разрывов ДНК прямым воссоединением разорванных концов в молекуле ДНК с помощью ДНК полинуклеотидлигазы;

- репарация разрыва гликозидной связи между пуриновым или пиримидиновым основанием и сахаром (апуриновых и апириимидиновых сайтов, АП-сайтов) за счет прямой вставки оснований с помощью ферментов – инсертаз (от англ. insert – вставлять);

- репарация неспаренных оснований для устранения ошибок спаривания во время репликации ДНК при включении в дочернюю цепь ДНК нуклеотидов некомплементарных в материнской нити (мисмэтчей);

- репарация, протекающая с повышенной частотой ошибок [1094].

В ходе эволюции организмы, по-видимому, приобрели разнообразные системы репарации, такие как фоторепарация, эксцизионная репарация, пострепликационная репарация, для устранения возникших повреждений. Поскольку возникают различные повреждения, можно полагать, что множество систем репарации функционируют кооперативно.

## **2.6. Перекрестные реакции между системами ответа на оксидативный стресс и репарацией**

Как и в случае ответа на стресс, между различными системами репарации существуют перекрестные реакции [1063, 1078, 1095]. Так, перекрестные реакции наблюдаются между ответом на оксидативный стресс и репарацией [1095-1098], в частности, в отношении действия УФ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, между репарацией и тепловым шоком [915], а также между фоторепарацией и ответом на тепловой шок [906, 1099, 1100]. Бактерии, устойчивые к ионизирующему излучению, резистентны и к УФ, и к Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [941]. При SOS-ответе действие различных стрессорных факторов синергично [884]. Фотолиаза, связанная с тиминовыми димерами, стимулирует эксцизионную репарацию [1029]. Наблюдается экспрессия синтеза фотолиазы в дрожжах и *E. coli* при действии мутагенных факторов.

Перекрестный ответ наблюдается между репарацией и продукцией рекомбинантных белков [420]. Активация SOS-ответа при действии АФК, УФ-радиации, химических веществ вызывает индукцию нескольких лямбдаоидных лизогенов, т.е. выщепление фага и литическую активацию [448].

Особого внимания заслуживают данные об индукции фотолиазы активными формами кислорода и химическими агентами, повреждающими ДНК в дополнение к УФ-радиации. Показано, что фотолиаза индуцируется активными формами кислорода (Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и др.) и химическими мутагенами. Индукция фотолиазы в клетках усиливается видимым светом. Обработка флуоресцирующим светом в присутствии рибофлавина, являющегося известным эндогенным фотосенсибилизатором, также усили-

вала индукцию фототиазы. Эти результаты предполагают **вовлеченность оксидативного стресса в индукцию фототиазы**, как и при облучении флуоресцирующим светом [1101, 1102, 1103].

Фукуи и Ласковски [1102, 1103] были изучены эффекты температуры и света на концентрацию фототиазы в гаплоидных клетках *S. cerevisiae*.  $N_{PRE}$  в клетках, выросших на свету было примерно в 2,8 раз больше, чем для выросших в темноте.  $N_{PRE}$  для клеток в логарифмической фазе роста было меньше, чем для клеток в стационарной фазе роста. С учетом данных о том, что предоблучение PRE молекул *in vitro* вызывало увеличение фотореактивирующей активности, а также увеличение устойчивости PRE к термоинактивации при 65°C, полученные результаты были объяснены прямыми фотохимическими изменениями в пределах молекулы PRE под действием фотореактивирующего света. Аналогичная модификация наблюдается при действии температуры. В пользу этого объяснения свидетельствуют данные об увеличении термостабильности и числа активных PRE молекул, присутствующих в экстракте из дрожжевых клеток, при иллюминировании ближним УФ или видимым светом коротковолновой области [1103].

Как уже отмечалось выше, обработка дрожжевых и бактериальных клеток низкими дозами пероксида водорода – при концентрации АФК в десятки-сотни раз меньших летальных доз – повышает их устойчивость к большим дозам  $H_2O_2$ . В этих условиях индуцируется система SOS-ответа. При превышении скорости повреждений, вызванных действием АФК, выше определенного уровня, клетка может переходить к апоптозу [1104]. Апоптоз в дрожжах *S. cerevisiae* может быть вызван истощением глутатиона или внесением малых доз  $H_2O_2$  [348, 1105], что подтверждает перекрестную связь между системами ответа на оксидативный стресс и системами репарации. В клетках животных появление разрывов в ДНК отслеживает белок p53, который в ответ на это: 1) активирует гены, кодирующие те белки, которые обеспечивают репарацию ДНК; 2) блокирует (если первое не помогает) синтез белков клеточного деления; 3) включает программу апоптоза, если количество повреждений ДНК превышает некий критический уровень [621].

## **2.7. Проявление светочувствительности при культивировании изначально нефоточувствительных микроорганизмов**

Рассмотренные системы репарации, включающие фоторепарацию, а также различные перекрестные реакции между ними и системами ответа на стресс, приводят к логичному умозаключению о возможном приобретении светочувствительности стрессированных популяций, в нормальном физиологическом состоянии нечувстви-

тельных к видимому свету. Такая чувствительность в состоянии стресса расширяет возможности управляемого культивирования нефототрофных микроорганизмов, в частности, путем комбинирования воздействия стрессорными факторами и светом. Однако до сих пор на эту возможность в литературе практически не обращалось внимания. В то же время большое число работ было посвящено исследованию воздействия видимого света вне связи со стрессом. В этой связи необходимо отметить основные моменты, которые целесообразно учитывать при рассмотрении состояния исследований в данной области фотобиологии.

1. Светочувствительность микроорганизмов может проявляться как фототропизм, дифференцировка, фототаксис, фотопериодизм, сдвиг фазы циркадных ритмов, видимое возбуждение. Молекулярная основа светочувствительности обусловлена наличием энзиматических реакций, измененных светом, и биологических фоторецепторов, носителем которых обычно являются белки с регуляторными функциями на уровне транскрипции и посттрансляционном уровне [1106, 1107].

Типы хромофоров, которые функционируют как фотохимически активные фоторецепторы в биологических системах, включают [1107-1109]:

- а) ретинальные пигменты (каротиноиды, родопсины, бактериородопсины);
- б) фитохромы (хромофорная группа – тетрапирролы), первичные рецепторы красного света, ответственные за фотоморфогенез);
- в) криптохромы, включающие хромофоры флавиновой и птериновой природы, которые ответственны за фототропизм и циркадные ритмы [1087, 1107, 1110]; пример – рецепторы синего света у зигомикетного гриба *Phycomyces*, плазмодия слизевика *Dictiostelium*, у плесени *Neurospora crassa* [359] и некоторых других микроорганизмов; спорангиофор гриба *Phycomyces* показывает фототропизм и связанный светоростовой ответ к синему свету в диапазоне от  $10^{-9}$  до  $10$  Вт/м<sup>2</sup>;
- г) ксантопсины, содержащие в качестве хромофорной группы производные кумариновой кислоты, ответственные за фототаксис, регуляцию синтеза флавоноидов; примером является фотоактивный желтый протеин (PYP), первоначально обнаруженный у галотолерантной эубактерии *Ectothiorhodospira halophila*, содержащий в качестве хромофорной группы *p*-кумариновую кислоту, и его функцией является фототаксис [1107, 1111, 1112];
- д) Фототропины, ответственные за фототропизм, перераспределение хлоропластов и содержащие флавины в качестве хромофорной группы [1107];

г) гиперцициновые пигменты (примеры – у простейших, а именно стенториновые пигменты в *Stentor coeruleus* и блефаризминовые в *Blepharisma japonicum*);

2. Также светочувствительность может проявляться как фотостимулирование, фотоингибирование – световой стресс [1095] и фотоповреждение [906, 1107].

Характерными примерами фотостимулирования являются фотоиндуцированные каротиногенез и биосинтез флавоноидов. У грибов синтез каротиноидов стимулируется синим светом [359, 1108]. Работы, проведенные на клетках грибов, указывают, что фотоиндукция связана с защитным действием каротиноидов против воздействия АФК, образующихся на свету в присутствии кислорода [359]. Спектры действия фотоиндукции каротиногенеза свидетельствуют об участии в этом процессе флавиновых порфириновых фоторецепторов с сенсibiliзирующими свойствами, поглощающих в длинноволновой УФ и коротковолновой видимой области спектра (350–500 нм). Биосинтез каротиноидов индуцируется также красным светом (> 600 нм) в присутствии искусственных фотодинамических красителей, генерирующих образование активных форм кислорода. Фоторегуляция биосинтеза флавоноидов опосредуется фотохромной системой, активируемой красным и дальним красным светом, и криптохромом – фоторецептором синего цвета. В зависимости от спектрального состава действующего света могут быть получены различные формы каротиноидов и моно- или дигидроксилированные производные флавоноидов с определенными фотопротекторными или антиоксидантными функциями.

У растений фотоингибирование в первую очередь влияет на хлоропласты и приводит к снижению фотосинтетической способности, торможению роста и изменению углеродного и азотного метаболизма. У цианобактерий фотоингибирование наблюдается при избытке видимого света, которое вызывает фотодинамические изменения в клеточных системах и характеризуется более медленным ростом и меньшим квантовым выходом фотосинтеза [1113]. Однако фотоингибирование не рассматривается как повреждающий процесс. В отличие от фотоингибирования фотоповреждение различных внутриклеточных компонентов происходит с помощью разнообразных химически и фотохимически генерируемых радикалов и других АФК в результате фотосенсибилизации, особенно выраженной при действии света синей и фиолетовой областей спектра [1114-1116], и других процессов, кратко рассмотренных в предыдущих разделах. Вещества, участвующие в этих процессах, могут проявлять прооксидантные и антиоксидантные свойства [688, 689, 1117, 1118].

3. Наряду с детально изученным воздействием света на фотолиазы, имеются многочисленные литературные данные о воздействии видимого света на другие ферменты не только фототрофов, но и гетеротрофов, в результате чего стимулируется их активность и происходят метаболические изменения. Так, при облучении видимым (синим, красным) светом и УФ стимулируется активность с-АМР-фосфодиэстеразы у гриба *Phycomyces*, гидрогеназы из *Proteus vulgaris*, оксидазы индолилуксусной кислоты из гороха, ксантинооксидазы из свежего молока, урокиназы из *Pseudomonas putida*, лигазы цитратлиазы *Rhodopseudomonas gelatinosa*, системы

ферредоксин/тиоредоксин, GTP-связывающего белка, участвующего в регулировании фосфорилирования белков на посттрансляционном и транскрипционном уровнях у *Neurospora crassa* [1109, 1119]. У *Rhodococcus* sp. активность нитрилгидратазы в течение нескольких дней быстро падает при аэрации среды в темноте и восстанавливается при освещении светом при инкубировании промытых клеток при 5°C. Ферментативная активность бесклеточных экстрактов инактивированных клеток также восстанавливается за 10 мин при фотооблучении светом с интенсивностью 71 Вт/м<sup>2</sup> (5000 Лк). Этот процесс не требует присутствия кислорода и не предотвращается диализом [1106].

4. Свет может стимулировать окисление CH<sub>4</sub> метанотрофами [1120]. Высокую чувствительность к свету проявляют бактерии, участвующие в трансформации неорганических соединений азота [1121]. Так, бактерии нитрификаторы (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) чувствительны к синему свету и отличаются низкой светотолерантностью к высокому уровню освещенности [1122, 1123]. Возможно, чувствительность нитрификаторов к свету объясняется протеканием свободнорадикального механизма биологического окисления ионов аммония.

Активность нитритредуктазы денитрификаторов также может повышаться при освещении низкоинтенсивным синим или белым светом, и наоборот, снижаться при освещении высокоинтенсивным светом [1119, 1124, 1125]. Основную роль в фоточувствительности нитрит- и натратредуктаз к синему свету выполняют флавиновые хромофоры в их каталитически активных центрах [1126, 1127].

У плесени *Neurospora crassa* активность нитратредуктазы и конидиеобразование повышаются в присутствии кислорода при освещении синим светом 450 нм с интенсивностью 250 Вт/м<sup>2</sup> в течение 30 мин [1128], при этом наблюдается световая стимуляция транскрипции и трансляции гена нитратредуктазы [1109, 1127]. Снижение активности нитратредуктазы при высокой интенсивности освещения обусловлено фотосенсибилизирующими свойствами ФАД и генерацией синглетного кислорода [1124, 1126, 1129].

5. Воздействие света видимого диапазона и ближнего ультрафиолета может приводить к ускорению роста микроорганизмов и повышению выхода биомассы. Так, в лабораторных исследованиях сотрудников кафедры биофизики МГУ показана возможность фотостимуляции накопления биомассы промышленных штаммов дрожжей под действием оптимальных доз ультрафиолетового света области 280–380 нм [1130, 1131]. Авторы объясняют стимулирующее действие УФ-облучения на деление и накопление биомассы дрожжей фотоактивацией биосинтеза серотонина [1132, 1133].

Имеются примеры положительного действия ультрафиолета и видимого света на активный ил очистных сооружений.

Еще в исследованиях И.А. Рапопорта и его сотрудников было показано, что после обработки мутагенами даже небольшой части активного ила очистного сооружения в результате перестройки популяционных отношений происходит достаточно заметное увеличение очищающей способности системы. Однако с течением времени активность снижается к исходному уровню [цит. по 379].

Показано [1134], что микроорганизмы активного ила положительно реагируют на освещение видимым светом при освещенности  $(10-55) \cdot 10^3$  Лк. При этом наблюдается увеличение скорости потребления субстрата. При освещенности  $70 \cdot 10^3$  Лк наблюдалось ингибирование его потребления. При одинаковых освещенностях зеленый (546 нм) и синий (436 нм) свет тормозили процесс потребления независимо от вида субстрата, а облучение красным (660 нм) интенсифицировало и реингибирovalo потребление. На основе наблюдавшихся изменений было предложено освещать аэротенк очистных сооружений красным светом, а регенератор – синим.

## **2.8. Управляемый стресс и его практическое использование**

В типичных случаях физиологическая активность микроорганизмов и, как следствие, эффективность биосинтеза, снижается при воздействии неблагоприятных факторов, таких как, например, агенты оксидативного стресса, голодание, тепловой или осмотический шок. С другой стороны, рассмотренные особенности ответа на стрессовое воздействие популяций и клеток микроорганизмов с участием антистрессорных, антиоксидантных, репарационных систем, наличие многочисленных перекрестных реакций, выполнение АФК определенных регуляторных физиологических функций, функций внутриклеточных и внеклеточных мессенджеров свидетельствуют в пользу предположения о том, что контроль количества и качества стресс- и антистресс-факторов, избирательное усиление или подавление их действия на клетки микроорганизмов могут быть использованы с целью получения положительных эффектов в системах синтеза и деструкции веществ, управления ростом и физиологической активностью микроорганизмов с одновременным, сопряженным протеканием микробиологических, химических и фотохимических реакций.

Как следует из выше рассмотренных литературных данных, стрессированные популяции, в нормальном физиологическом состоянии нечувствительные к видимому свету, могут приобрести светочувствительность при стрессе. Такая чувствительность в состоянии стресса расширяет возможности управляемого культивирования нефототрофных микроорганизмов, в частности, путем комбинирования воздействия

стрессорными факторами и светом. Однако до недавнего времени эта возможность в литературе практически не рассматривалась. В этой связи заслуживают внимания данные о положительном действии стресса на отдельные показатели биосинтеза, что может быть использовано на практике [863].

Воздействие стрессорных факторов на используемую культуру микроорганизмов может привести к повышению ее устойчивости. Большое значение имеет устойчивость дрожжей-бродильщиков к стрессу в виноделии [1135-1138]. В течение процесса роста и брожения клетки дрожжей подвергаются различным стрессам, таким как осмотический, оксидативный, тепловой и холодный, этанольный, высокий уровень  $\text{CO}_2$  (для игристых вин) и  $\text{SO}_2$ , голодание, высушивание, конкуренция со стороны других микроорганизмов, при этом осмотический, этанольный и оксидативный стрессы являются основными причинами стрессовой реакции клеток винных дрожжей. Эти стрессовые условия могут серьезно затрагивать характеристики бродительного процесса и технологические способности дрожжей: урожай биомассы и бродительную активность, что влияет на качество конечного продукта. Поэтому дрожжи «окультуривают», т.е. адаптируют к различным видам стрессовых условий. Большое значение в этом случае имеет и наличие перекрестной адаптации, при которой дрожжи, являющиеся устойчивыми к воздействию одних стрессорных факторов, легко переносят воздействие других, не снижая при этом физиологической активности [1137-1143].

Другим примером является стимуляция синтеза эргостерина в условиях оксидативного стресса у дрожжей-сахаромицетов, у которых эргостерин (провитамин  $\text{D}_2$ ) выполняет особую роль в поддержании функций клеточных мембран, высокой бродительной активности, жизнеспособности клеток и устойчивости к этанолу. Эргостерин не синтезируется в строго анаэробных условиях, но уже микроаэрофильного окружения достаточно для синтеза его в микроколичествах, необходимых для клетки [917, 1144, 1145]. В то же время воздействие стрессовых факторов на дрожжевые клетки может вести к адаптационным изменениям, сопровождающимся накоплением эргостерина. Стимулирующее действие на образование стеринов дрожжами оказывают ингибиторы гликолиза, в качестве которых могут выступать различные химические окислители, УФ- и рентгеновское излучение. При действии на дрожжи рентгеновского излучения содержание эргостерина увеличивается в 2–3 раза, что объясняется угнетением процесса аминирования, сопровождающегося повышением синтеза липидов. Подобно ионизирующим облучениям действуют радиометрические вещества, нарушающие метаболизм клетки и стимулирующие липидный обмен. Например, при комбинированном действии на клетки дрожжей радиометрического вещества эмбихина и рентгеновского излучения выход стеринов *S. cerevisiae* увели-

чивается на 109% по сравнению с контролем [1146]. Также было показано, что при термической обработке (при температуре 40°C в течении двух суток) содержание эргостерина увеличилось с 55 мг/г до 87 мг/г. При обработке холодом дрожжевые клетки также накапливают эргостерин [1147]. Таким образом, воздействие стресс-факторов может использоваться в промышленных условиях для повышения выхода эргостерина, синтезируемого дрожжами *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, которые содержат его до 3–4 % по сухому весу, а некоторые штаммы при продолжительной инкубации – до 8–10% [1146].

Важное практическое значение имеет повышение устойчивости микроорганизмов к оксидативному и другим видам стресса для получения промышленных стартерных культур различного назначения, пробиотиков и других препаратов живых или инактивированных клеток с улучшенными технологическими свойствами [640, 743, 748, 749, 751, 979, 1148-1150].

Устойчивость к стрессу важна и в производстве дрожжей для кормовых и пищевых целей [871, 1151], для приготовления продуктов питания и выживания бактерий [900], при использовании полезных микроорганизмов: бифидобактерий, молочнокислых бактерий, заквасок и др. [685, 905, 1152], а также при конструировании рекомбинантных продуцентов [685].

В работе [1153] исследовалась выживаемость *L. plantarum* после распылительной сушки при различных видах предварительного стрессирования в условиях комнатной и низкой (4 °C) температур в присутствии и отсутствии света. Выживаемость анализировали перед, сразу после распылительной сушки и в течение 180 дней в разных условиях хранения (комнатная температура и дневной свет, комнатная температура в отсутствие света, температура 4°C и дневной свет). Степень инактивации клеток при этом различалась несущественно. Проведение тех же манипуляций с *P. acidilactici*, показало, что любая предварительная обработка снижает выживаемость культуры, однако при комнатной температуре наблюдалось заметное уменьшение скорости потери жизнеспособности при воздействии света в сравнении с условиями его отсутствия.

Надо отметить, что типичные лабораторные среды обычно содержат микромолярные количества  $H_2O_2$ , образующиеся вследствие протекания химических и фотохимических процессов [788]. Поэтому даже в условиях казалось бы отсутствия АФК возможно проявление признаков оксидативного стресса.

Брюханов и Нетрусов [1154] проанализировали влияние аэробно-анаэробного стресса на облигатно анаэробные промышленные культуры микроорганизмов, его связь с оксидативным стрессом и антиоксидантными системами защиты применительно к условиям хранения жизнеспособных культур. Обращается внимание, что эффективной мерой

защиты против оксидативного стресса являются внесение антиоксидантов (цистеина, аскорбиновой кислоты, дрожжевого экстракта) и восстановителей в небольших концентрациях в питательные среды, а также внесение гема для стимулирования синтеза каталазы. С другой стороны, внесение некоторых антиоксидантов, в частности, аскорбиновой кислоты, в более высоких концентрациях провоцирует образование АФК, что отрицательно влияет на жизнеспособность микроорганизмов.

Биосинтез вторичных метаболитов, таких как пенициллины, гиббереллины, каротиноиды, меланины и ряда других соединений зависит от присутствия агентов оксидативного стресса. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих зависимостей еще далеко не расшифрованы, но очевидно, что появление вторичных метаболитов является результатом функционирования ферментов, чей синтез и/или активация индуцированы действием стрессорных факторов. Так, биосинтез каротиноидов в ответ на освещение и кислород – защитная реакция на окислительный стресс [1155]. Показано, что голодание, радиация, высокий уровень активных форм кислорода способны стимулировать каротиногенез и регулировать состав каротиноидов у *Phaffia rhodozyma* [1156], *Neurospora crassa* [359], *Blakeslea trispora* [654], *Halobacterium salinarum* [1157] и многих других микроорганизмов. Для повышения эффективности образования эндогенных антиокислительных ферментов (супероксиддисмутазы) у дрожжей, предложено использовать световой стресс [871].

Индийские исследователи [1158] индуцировали оксидативный стресс у *B. subtilis* – продуцента  $\alpha$ -амилазы и протеазы, воздействуя на культуру микроорганизмов пероксидом водорода и гипохлоритом. Воздействие  $\text{HClO}$  повысило уровень синтеза  $\alpha$ -амилазы в 2,2 раза и протеазы – в 2,6 раз. При воздействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  уровень  $\alpha$ -амилазы повысился в 1,5 раза, протеазы – в 1,9 раз. Рост накопления ферментов коррелировал с повышением концентрации АФК в культуре. Весьма важную роль в развитии оксидативного стресса играло время внесения стрессора. В лаг-фазе кривой роста популяция *B. subtilis* была наиболее уязвима к действию  $\text{H}_2\text{O}_2$ : даже концентрация в 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  вызывала стопроцентное летальное действие. Напротив, внесение  $\text{H}_2\text{O}_2$  на стационарной стадии роста культуры не оказывало практически никакого воздействия.

При внесении 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  на стадии экспоненциального роста выживаемость бактерий составляла 0,01–0,1%, однако конечный уровень накопления биомассы значительно повышался – максимальная концентрация клеток достигала 4,7 г/л, что было на 16% выше чем в контрольном варианте. Аналогичный результат наблюдался и при действии  $\text{HClO}$ : количество биомассы возросло на 29% и составляло 5,2 г/л.

Механизм увеличения синтеза ферментов в условиях оксидативного стресса был прослежен и на геномном уровне на основе анализа данных микрочипов. Результа-

ты анализа показали, что АФК стимулируют экспрессию гена пептидазы (*sipT*), которая является важнейшим компонентом секреторной системы использованного штамма; параллельно оксидативный стресс активировал ген синтеза  $\alpha$ -амилазы. Наряду с этим активировалась экспрессия еще примерно 75 генов и репрессировалось 120 генов.

В другой работе индийских исследователей с продуцентом рибофлавина *Ashbya gossypii* для стимулирования биосинтеза, но при снижении уровня повреждения генетического материала клеток и клеточных мембран использовался такой мягкий окислитель, как менадион, в интервале концентраций от 1 до 50 мкМ. В данном случае оксидативный стресс в оптимальных условиях стимулировал синтез и секрецию витамина В<sub>2</sub> [1159]. На 3-ий день культивирования с использованием 2,5 мкМ витамина Е и 2,5 мкМ менадиона общий выход рибофлавина повысился на 41%. Однако при концентрации менадиона 50 мкМ синтез В<sub>2</sub> падал в 10 раз по сравнению с контрольным вариантом.

Модификации генома вызывают отклонение клеточного метаболизма у рекомбинантных штаммов от состояния, наблюдаемого в нормальных физиологических условиях у их немодифицированных аналогов, т.е. наблюдаются изменения, подобные стрессорным. Это, в свою очередь, влияет на стабильность генома, вызывает повышенную генотипическую и физиологическую изменчивость в популяциях, а с этим ухудшает показатели биосинтеза. Поэтому актуальным является такое управление стрессом, которое стабилизирует геном.

Важное практическое применение управления оксидативным стрессом – борьба с ростом патогенных и других нежелательных микроорганизмов дезинфекцией, с биопленками, с цветением водоемов с использованием активных форм кислорода [758, 1160, 1161], а также в процессах ферментации для снижения содержания посторонней микрофлоры [1162, 1163]. Управляющим фактором в данном случае может быть не только доза АФК, но и видимый свет, на что необходимо обращать внимание для инициирования или избегания фоторепарации, повышающей жизнеспособность микроорганизмов после воздействия АФК [1164, 1165]. Напротив, в фотодинамическом уничтожении планктонных и биопленочных культур (фотодинамической дезинфекции) видимый свет активизирует их гибель в присутствии фотосенсибилизатора [1166].

В биологической очистке сточных вод стрессовые воздействия приводят к ухудшению состояния активного ила и, как следствие, к снижению качества очищенной воды. Так, применительно к гранулообразованию активного ила была показана важность механического стресса. В ряде работ, где определялось влияние гидродинамического фактора на образование гранул АИ, его значимость как стрессора,

доходила до 50 %. Стрессовые условия могут возникать при залповых сбросах, высокой концентрации тяжелых металлов и других токсичных веществ в сточной воде, при осмотическом шоке. Все они отдельно или комбинированно влияют на биоценоз активного ила, его морфологию количество микроорганизмов, их соотношение.

Обобщая рассмотренные особенности стрессовых воздействий, можно указать на следующие моменты с точки зрения возможностей совершенствования процессов культивирования микроорганизмов.

1) Стрессовые воздействия вызывают отклонение условий роста и биосинтеза от оптимальных. Переход микроорганизмов в состояние стресса индуцирует и стимулирует у них ответные реакции, направленные на преодоление неблагоприятных изменений. Ответ на стресс у микроорганизмов проявляется на различных уровнях: популяционном, физиологическом, клеточном, биохимическом, генетическом.

2) На популяционном уровне длительное воздействие стрессоров в сублетальных дозах вызывает адаптивные и микроэволюционные изменения. При воздействии таких стрессоров, как  $H_2O_2$  в присутствии ионов  $Fe^{2+}$  (реактив Фентона, генерирующий гидроксильные радикалы) и других активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на ДНК, мутационный процесс может ускоряться, что ускоряет автоселекцию. При функционировании микробных клеток и популяций в таких условиях и их эволюционной адаптации к экстремальным воздействиям можно ожидать появления новых полезных свойств у объектов культивирования.

3) На клеточном уровне выявлен широкий спектр механизмов, генетических и биохимических систем ответа, регуляторных путей, поддерживающих метаболический гомеостаз и повышающих выживаемость клеток в условиях стресса. Наблюдается определенная общность, консервативность и универсальность в путях регуляции ответа на стресс. Совокупно все они обуславливают различную чувствительность клеток к стрессорным факторам, передачу сигнала, транскрипционный и посттрансляционный контроль, накопление защитных веществ и активизацию репарационных функций. Имеются системы адаптивного ответа на биохимическом уровне, не затрагивающие генотип микроорганизмов.

4) Стрессорные факторы индуцируют возникновение в ДНК повреждений, которые устраняются с помощью различных систем репарации. Одной из них является система фоторепарации. Фоторепарация обычно происходит на фоне освещения клеток ближним УФ и видимым светом. Этот процесс связан с действием фотолиазы – фотореактивирующего фермента, являющегося флавопротеином. Поэтому клетки микроорганизмов, в норме нечувствительные к видимому свету, в состоянии стресса могут реагировать на видимый свет низкой интенсивности через систему фоторепарации.

5) Имеется тесная биохимическая и генетическая связь между различными системами ответа на стресс, а также между системами репарации при внутриклеточных повреждениях в стрессовых ситуациях. Например, активируется система фото-репарации при воздействии АФК, индуцируется система ответа на оксидативный стресс и SOS-ответа, в ответе на оксидативный стресс участвуют белки теплового шока и т.д. Поэтому часто наблюдается перекрестный ответ на различные виды стресса.

6) Часто наблюдается множественное и неоднозначное действие стресс-факторов в сублетальном диапазоне. Возможно синергичное и антагонистическое действие между разными стрессами, с усилением или снижением устойчивости к другому стрессору при действии первого стрессора. Эволюционная адаптация микробной популяции при воздействии множественного стресса может приводить к разным результатам в изменчивости популяции.

7) Результат зависит от дозы и интенсивности воздействия стрессора, кратности, частоты и длительности воздействия, морфофизиологического состояния микроорганизмов (плотность популяции, скорость роста, фаза клеточного цикла и роста, уровень дифференциации клеток, синхронизации деления клеток), питательной среды (источник углерода и других биогенных элементов, их концентрация в среде, содержание ионов железа, веществ с антиоксидантными и прооксидантными свойствами), физико-химического окружения (уровень аэрации, уровень освещенности, фаза обитания, близость к твердой поверхности, к границе раздела фаз), преадаптации к стрессу, времени развития ответа на стресс, скорости потери адаптивных признаков.

8) Из различных видов стресса наиболее физиологически значимым является оксидативный стресс, опосредующий в клетках другие виды стрессов через индукцию активных форм кислорода (АФК). В природных условиях оксидативный стресс регулярно наблюдается во многих экотопах, в том числе и таких, где живые организмы наиболее активно развиваются (приповерхностная пленка воды, поверхность почвы, листьев и т.п.). Оксидативный стресс возникает при резком усилении окислительных процессов и при недостаточной работе антиоксидантного механизма защиты, при этом размножение микроорганизмов сначала замедляется, а затем и вовсе прекращается. Происходит перестройка метаболизма на синтез белков, необходимых для выживания. АФК, прежде всего  $H_2O_2$ , могут выполнять роль вторичных мессенджеров и опосредованно участвовать в ответе клеток на другие виды стресса: при голодании, температурном, механическом, осмотическом и рН-шоке. Так как разнообразные стрессорные воздействия опосредуются через образование в клетках

АФК, свободных радикалов и перекисных соединений, то индуцируемые разными стрессорами системы репарации в определенной степени схожи.

9) Оксидативный стресс может быть обусловлен воздействием разных АФК: пероксида водорода и супероксид-аниона, пероксида водорода и кислорода, при этом возможны разные пути регуляции клеточного гомеостаза с их участием. Также возможны несколько путей регуляции для одних и тех же АФК, в частности, пероксида водорода, разные мишени регуляции и физиологические функции.

10) К экологически важным агентам оксидативного стресса относится мягкое ультрафиолетовое излучение УФА и УФБ диапазонов спектра. На поверхности клеток высших организмов имеются специализированные чувствительные рецепторы, которые воспринимают УФ-сигнал и далее, благодаря сопряжению рецепторов с внутриклеточными посредниками, запускается сложная регуляторная система, приводящая к активизации ряда генов и синтезу белков, участвующих в отклике объекта на действие УФ-излучения. Данная система регуляции внутриклеточного метаболизма относится к числу наиболее глобальных в мире высших животных и растений и, по-видимому, микроорганизмов.

11) Действие на микроорганизмы пероксида водорода и ближнего ультрафиолета можно соотнести с тремя функциями: 1) сигнальной функцией, 2) функцией поддержания в клетках организмов оптимальной концентрации реакционно активных частиц (перекисей, радикалов), необходимой для поддержания оптимального физиологического состояния биообъекта, 3) функцией облегчения доступа субстратов, устойчивых в окружающей среде, для деструкции микроорганизмами. Сигнальное действие УФ-излучения может быть смоделировано (имитировано) действием небольших концентраций  $H_2O_2$ , поскольку рецепторы, ответственные за восприятие УФ-излучения и  $H_2O_2$ , одни и те же, как и механизм отклика клеток организмов на эти агенты.

12) Преадаптация к низким дозам стрессоров увеличивает устойчивость к стрессу. Возможна перекрестная адаптация к действию стрессоров различного типа. Наличие перекрестной адаптации и перекрестных реакций может обеспечить, например, устойчивость клеток в состоянии оксидативного стресса, индуцированного действием  $H_2O_2$ , к тепловому шоку, к повышенным концентрациям субстрата или продукта биосинтеза, к тяжелым металлам и т.п. Поэтому устойчивость к стрессу и поддержание высокой физиологической активности в ходе роста и биосинтеза являются важнейшими показателями культуры.

13) Ответ на стресс проявляется как комплексная реакция на стрессоры и антистрессоры, оксиданты и антиоксиданты, поэтому при действии стрессоров необходимо учитывать совместное действие стресс- и антистресс-факторов. Также возмо-

жен перекрестный ответ клеток микроорганизмов на совместное действие стресс- и антистресс-факторов, в частности, при одновременном воздействии факторов окислительного стресса и видимого света. Учитывая совместное воздействие стрессоров и антистрессоров в природе, их одновременное участие в самоочищении природных сред, целесообразно рассмотреть такое совместное, сочетанное воздействие для управления микробной жизнедеятельностью и метаболизмом. Для микробиологического синтеза и катализа это указывает на возможность целенаправленного создания условий с оптимальным балансом стресс-антистрессовых воздействий и регулированием на этой основе активности микробных ферментов и клеток. В качестве антистресс-факторов наибольшего внимания заслуживает видимый свет, влияющий на стрессированные клетки через механизм фоторепарации, а также химические антиоксиданты. В частности, поскольку в природных условиях солнечный ультрафиолет не является изолированным фактором, а действует на фоне видимого света, то целесообразна апробация использования как отдельного, так и совместного действия ближнего ультрафиолета и видимого света, пероксида водорода и видимого света на микроорганизмы.

14) При культивировании микроорганизмов необходимо учитывать возможность прооксидантного и антиоксидантного действия компонентов питательной среды на клетки микроорганизмов. Вещества с оксидантной и прооксидантной активностями могут образовываться непосредственно в процессе культивирования при протекании химических и фотохимических реакций. При этом некоторые из них могут проявлять одновременно прооксидантные и антиоксидантные свойства. Прооксидантное и антиоксидантное действие факторов питательной среды и метаболитов влияет на клетки и популяции, на стабильность генома, генотипическую и физиологическую изменчивость в микробных популяциях, а с этим на показатели биосинтеза (уровень накопления целевого продукта, активность штаммов, продуктивность биореакторов, стабильность клеточного генома, выход с единицы субстрата и другие показатели). В частности, задача обеспечения стабильности генома особенно остро стоит при использовании рекомбинантных штаммов, полученных методами геномики и метаболомики с целью биосинтеза различных продуктов. Все это требует соблюдения оптимального баланса между окислением и восстановлением, между антиоксидантными и прооксидантными свойствами, оптимальных доз стресс- и антистресс-факторов для стабилизации нужного генотипа, фенотипа, популяционного распределения целевой физиологической активности в различных режимах культивирования микроорганизмов и поиска путей управления этими процессами.

15) Гетеротрофные микроорганизмы в стресс-индуцированном состоянии могут стать чувствительными к низкоинтенсивному воздействию света. В стрессиро-

ванном состоянии микробной популяции видимый свет может выступать, с одной стороны, в качестве антистресс-фактора, помогающего микробным клеткам переживать состояние стресса при протекании фоторепарации, с другой стороны, в качестве стресс-фактора – при протекании фотосенсибилизации в присутствии веществ-фотосенсибилизаторов.

16) Долгое время считалось, что стресс всегда неблагоприятно воздействует на микроорганизмы, снижая их физиологическую активность и, как следствие, эффективность биосинтеза. Однако, все больше появляется данных, свидетельствующих в пользу важности оптимальных стрессовых воздействий для жизнеспособности и развития организмов как на клеточном, так и на популяционном уровнях. В частности, целенаправленное воздействие оптимальных доз стрессорных факторов, например, активных форм кислорода, может улучшить физиологическое состояние микроорганизмов [863]. Положительные изменения могут проявляться через повышение устойчивости микробных популяций к неблагоприятным факторам окружения, через активизацию путей конструктивного обмена в клетке. Так, следуя данным литературы [811], одно из возможных объяснений может быть связано с репрессией гликолиза и энергетического метаболизма и одновременным повышением внутриклеточного пула NADPH, особенно необходимого для функционирования аппарата трансляции и относящегося к важнейшим факторам антиоксидантной активности клетки. Воздействие АФК активирует системы ответа на оксидативный стресс и пентозофосфатный цикл – ключевой для анаболических путей биосинтеза.

17) Описанное в литературе положительное воздействие АФК, в частности  $H_2O_2$ , на дрожжи и другие объекты свидетельствует о возможности целенаправленного использования факторов оксидативного стресса для улучшения выходных показателей культивирования микроорганизмов. В то же время такое целенаправленное совместное использование АФК, как стресс-факторов, с антистресс-факторами (видимого света, химических антиоксидантов) в процессах культивирования микроорганизмов в зарубежной литературе не описано и при патентном поиске не выявлено.

18) Создание условий с оптимальным балансом стресс-антистрессовых воздействий, контроль стресс- и антистресс-факторов, избирательное усиление или подавление их действия на микроорганизмы как метод управления биопроцессом целесообразно охарактеризовать как **контролируемый стресс** или **контролируемый оксидативный стресс**.

19) Удобным и эффективным приемом с методической, технологической и экологической точек зрения может быть воздействие малых, сублетальных доз  $H_2O_2$  (фактор с оксидантной активностью) и низких доз видимого света (может выступать как фактор с прооксидантной и одновременно с антиоксидантной активностью, в

последнем случае действующий, предположительно, через механизм фоторепарации). Другим вариантом комбинированного воздействия может быть внесение веществ с оксидантной (прооксидантной) и антиоксидантной активностями в среду культивирования.

20) При комбинированном воздействии стрессоров и антистрессоров важно учитывать возможность перекрестной адаптации у микроорганизмов, что может повысить гибкость такого подхода.

21) Важным условием для проявления положительных изменений может быть последовательное пассирование микробных популяций к действию стрессоров на фоне комбинированного направленного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов, сопровождаемое адаптационными и микроэволюционными изменениями. Адаптационные изменения на уровне фенотипа временные, поэтому положительные эффекты могут нивелироваться из-за нестабильности получаемых в процессе пассирования клонов, сопровождающейся утратой адаптивных преимуществ и приобретенных свойств.

22) Нивелирование стрессовых воздействий также можно рассматривать как вариант контролируемого стресса. Методы нивелирования могут включать:

- оптимизацию питательной среды;
- отвод продуктов, ингибирующих биосинтез, из зоны ферментации;
- повышение стрессоустойчивости продуцентов;
- использование управляемого стресса – комбинированного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов.

23) Воздействие  $H_2O_2$  и видимого света или ультрафиолета и видимого света воспроизводит природные условия на твердых и водных освещаемых поверхностях, где протекают реакции с участием АФК, ультрафиолета, ионов переходных металлов, других абиотических факторов. Микроорганизмы, обитающие в таких условиях, представляются наиболее подходящим объектом исследований и управляемого культивирования в условиях контролируемого стресса. Примерами таких микроорганизмов могут быть:

– Галобактерии – обитают в мелководных соленых озерах в аридной климатической зоне. В настоящее время используются для получения ряда продуктов, таких как бактериородопсин, лечебно-профилактический препарат «Баксин» (в России).

– Дрожжи *S. cerevisiae*, р. *Candida* – обитают на поверхности листьев и плодов растений. Питательная среда для них в природных условиях – растительные углеводы (фруктоза, сахароза), растительные эксудаты (в основном сахароза и полисахариды), этанол. Используются в крупномасштабных процессах получения этанола, кормового дрожжевого белка.

– Микроорганизмы – фенолдеградаторы и деградаторы природных полимеров (целлюлозы, лигнина). В природных условиях их естественными субстратами могут являться лигнин древесины и лигниноподобные вещества, гуминовые кислоты, содержащие большое число фенольных колец в своей полимерной структуре. Используются в системах биологической очистки сточных вод, переработке и обезвреживании твердых отходов.

Выяснение структуры и особенностей экологических процессов и воспроизведение экологических условий, в которых организмы-продуценты обитают в природе, при использовании гибридных, совмещенных систем, комбинированных воздействий стресс- и антистресс-факторов может служить основой не только для технологически и экономически эффективных, но и малоотходных, экологически чистых решений.

### ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОСОБЕННОСТИ

В данной главе представлено краткое описание актуальных микробиологических объектов применительно к теме диссертационной работы, использованных в экспериментальных исследованиях. Их можно разделить на две группы:

- 1) Микроорганизмы и микробиологический синтез для получения целевых продуктов;
- 2) Биологическая очистка сточных вод.

#### 3.1. Получение продуктов микробиологического синтеза

В крупнотоннажном микробиологическом производстве в структуре себестоимости продукции основная статья затрат приходится на стадию ферментации.

С точки зрения идеологии экологически чистого производства и эколого-экономической эффективности наиболее важные решения по совершенствованию стадии ферментации связаны с использованием штаммов микроорганизмов с более высоким содержанием целевого продукта, способных расти с максимальной степенью конверсии субстратов в целевой продукт и достижением его максимальной конечной концентрации на минимальных средах (снижение затрат на концентрирование, хранение и транспортировку целевого продукта, поступления объемов сточных вод, загрязнений в окружающую среду в виде остаточных компонентов питательных сред в сточной воде), с более высокой температурой культивирования (снижение затрат на потребление охлаждающей воды).

В этой связи на примере получения кормовых продуктов (дрожжи, галобактерии), продуктов брожения (этанол, молочная кислота), продуктов технического назначения (бактериородопсина) и как экологически дружественные решения нами были апробированы:

- различные методы высокоплотного культивирования: в режимах с подпиткой высококонцентрированным субстратом, в мембранном биореакторе, в реакторе с адсорбентом;
- культивирование в условиях контролируемого оксидативного стресса с совмещением стрессорного и антистрессорного воздействия для повышения выхода целевых продуктов.

Исследования проводились в рамках выполнения грантов и проектов научно-технических программ:

- 1) Использование биологических методов в экологически чистых производствах (МНТП 4.12 Биотехнология, 1998).

2) Разработка технологий высокоинтенсивного и ресурсосберегающего биокатализа и биосинтеза для получения продуктов кормового, пищевого и технического назначения (проект аналитической ведомственной научной программы «Развитие научного потенциала высшей школы», подпрограмма № 2 «Прикладные исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники» Рособразования по направлению № 3907 Технология живых систем, 2004, 2005 гг.).

3) Изучение коммуникационных взаимодействий в сообществе микроорганизмов при их структурной организации (проект АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы, подраздел № 2.1.1 «Проведение фундаментальных исследований в области естественных, технических и гуманитарных наук», 2006-2008 гг.).

4) Физиолого-биохимические и генетические основы управления микробным синтезом в условиях контролируемого стресса (проект № 2.1.1/3817 АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», 2009–2010 годы», мероприятие 2: Проведение фундаментальных исследований в области естественных, технических и гуманитарных наук. Научно-методическое обеспечение развития инфраструктуры вузовской науки, раздел 2.1: Проведение фундаментальных исследований в области естественных, технических и гуманитарных наук, подраздел 2.1.1: Проведение фундаментальных исследований в области естественных наук).

5) Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке (ГК № 02.740.11.0784 от 24 апреля 2010 г., ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы).

6) Разработка новой отечественной комплексной технологии получения полилактида (биоразлагаемого полимера), базирующейся на биокаталитической переработке сахаросодержащего сырья (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы», соглашение о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. №14.577.21.0037, рег. № 114111140107).

Исследования по биосинтезу этанола также выполнялись в рамках сотрудничества с ФГУП «Биотехнологический завод», пос. Серебряные Пруды.

### **3.1.1. Высокоплотностное культивирование как вариант малоотходного процесса для получения кормовых продуктов**

В технологии биосинтеза понизить объемы сточных вод можно путем проведения биопроцесса в периодическом режиме с подпиткой концентрированным суб-

стратом. Процесс, проводящийся по такому режиму, называют высокоплотностным культивированием (fed batch cultivation). В отдельных случаях с использованием режима высокоплотностного культивирования удается достичь высокого содержания биомассы и получить так называемую высокоплотностную культуру с накоплением к концу ферментации до 100 г/л и более сухой биомассы, что близко к плотной упаковке клеток, при которой все они тесно соприкасаются, в отличие от величин 20–30 г/л, достигаемых в традиционных процессах периодического и непрерывного культивирования, а также получить до 150 г/л целевого внеклеточного продукта биосинтеза (например, при биосинтезе аминокислот) при относительно невысоком содержании побочных внеклеточных продуктов – органических кислот, спиртов и др. [1167-1174].

Высокая производительность реактора обеспечивается повышенной концентрацией биомассы и интенсивным переносом кислорода воздуха в объем очищаемой среды. С технологической точки зрения преимущество этого способа заключается в повышении скорости биосинтеза, степени трансформации субстрата, концентрации целевого продукта в пост-ферментационной среде, использовании клеток продолжительный период, уменьшении объема реактора, в снижении риска заражения культуры извне, затрат на выделение продукта. Экологические преимущества метода заключаются в минимизации объемов сточных вод и количества избыточной биомассы, когда она не является целевым продуктом.

Ограничениями метода высокоплотностного культивирования являются постепенное накопление внеклеточных метаболитов, ингибирующих процессы роста и биосинтеза, а также более высокие требования к качеству используемых субстратов [132, 1175-1177]. В некотором отношении высокоплотностное культивирование представляет собой замкнутую биотехнологическую экосистему, в которой накапливается популяция микроорганизмов и продукты их жизнедеятельности. Удаление последних тем или иным способом из среды позволяет в идеальном случае обеспечить рост популяции вплоть до плотности упаковки микробных клеток без снижения производительности биореактора.

Высокоплотностное культивирование часто проводят с аэрацией среды чистым кислородом (или воздухом, обогащенным кислородом) [1168, 1171] или в среду подают пероксид водорода, а подачу субстрата осуществляют дробно – по сигналу датчика растворенного кислорода, т.е. в режиме оксистата (концентрация растворенного кислорода начинает быстро возрастать при исчерпании органического субстрата в среде). Подпитка углеродным субстратом осуществляется небольшими порциями и поддержанием концентрации растворенного кислорода на уровне 10–30% от равновесной за счет регулирования количества субстрата, добавляемого с

очередной порцией [24, 1171, 1172, 1178-1180]. Поддержание аэрации на этом уровне достаточно для физиологических потребностей микроорганизмов-продуцентов и в то же время не приводит к чрезмерному перерасходу энергии.

Ведение ферментации в режиме высокоплотного культивирования с подпиткой высококонцентрированным субстратом, таким как меласса без разбавления, упаренная или сухая молочная сыворотка, этанол, n-алканы и др., может быть использовано, в частности, для получения кормового белка микроорганизмов. Среда содержит минимальное количество минеральных компонентов, соответствующее стехиометрическим расчетам, т.е. без их избытка. Субстрат и минеральные компоненты вносятся в ферментационную среду по мере их исчерпания, что определяется по возрастанию текущей концентрации растворенного кислорода. В конце ферментации образуется минимальное количество сточных вод с минимальным содержанием остаточных загрязнений: органических веществ, минеральных компонентов.

Наличие высокоплотной суспензии в конце ферментации позволяет получить кормовую биомассу по схеме ферментация – сушка, снизить тем самым объем сточных вод и количество затрачиваемой энергии или топлива на удаление избыточной влаги из продукта. Аналогичный процесс высокоплотного культивирования может быть, на наш взгляд, апробирован для малосточной системы биодеструкции загрязненного высококонцентрированного потока с постепенной подачей его без разбавления в зону биоокисления, что уменьшит объем вторичных стоков на выходе.

Наиболее известные примеры высокоплотного культивирования – биосинтез рекомбинантных белков и других биологически активных веществ дрожжами *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, бактериями *E. coli* [1171, 1172, 1174, 1181-1194].

Высокоплотное культивирование штаммов *S. cerevisiae* находит довольно большой спектр применения для получения внутриклеточных и внеклеточных продуктов, синтезируемых дрожжами, и в ряде публикаций рассматриваются режимы и способы культивирования этих дрожжей [1195].

Заслуживает внимания публикация [1191], где рассматривается получение высокой клеточной концентрации штамма *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 с целью получения из этой массы  $\beta$ -глюкана – компонента клеточной стенки, который является одним из самых распространенных среди клеточных полисахаридов. При использовании в качестве продуцента штамма *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 в режиме высокоплотного культивирования удалось достичь концентрации клеток 95,7 г/л при использовании 50 % раствора мелассы. Полученная клеточная концентрация была почти в 2,4 раза больше, чем при отъемно-доливном культивировании.

Также высокоплотностное культивирование предложено использовать для получения молочнокислых бактерий [1196-1198]. Так, в патенте КНР 101230323 [1199] рассматривается технология снятия стресса при высокоплотностном культивировании бактерий симбионтов, а также простая и эффективная технология обогащения культур, которые могут применяться для высокоплотностного культивирования *L. acidophilus* и *B. bifidum*. Изобретение использует два типа химических веществ для устранения рН- и кислородного стресса – соответственно соли с щелочной реакцией (карбонат кальция или цитрат натрия) и антиоксидант (аскорбиновая кислота или эригаторбовая), что приводит к увеличению количества живых бактерий в 2–4 раза.

В нашей работе объектом исследования при получении кормовой биомассы методом высокоплотностного культивирования служили дрожжи из р. *Candida*, а именно *C. utilis* и *C. tropicalis* – потенциальные продуценты, используемые в крупномасштабных процессах получения кормового дрожжевого белка на различных субстратах. В лабораторных условиях дрожжи *C. utilis* и *C. tropicalis* способны расти с высокой скоростью на простых минеральных средах с такими углеродными субстратами, как сахароза, глюкоза, этанол, уксусная кислота, n-алканы и доминированием в неасептических условиях. Такая их способность упрощает работу с ними и задачу анализа кривых роста дрожжевой популяции при различных воздействиях внешних факторов.

### 3.1.2. Получение этанола

Из различных продуктов брожения в России накоплен огромный опыт по крупнотоннажному микробиологическому получению этанола. На долю исходного сырья приходится до 70–85% в себестоимости этилового спирта [1200, 1201]. С учетом структуры себестоимости продукции приоритет в повышении технико-экономической и эколого-экономической эффективности, как и при получении кормовых продуктов, следует отдавать стадии ферментации.

Среди мер экологизации производства, использования превентивных мер с целью снижения вторичных отходов и поступления загрязнений в окружающую среду при получении биоэтанола, молочной кислоты и других продуктов брожения наиболее важной считается решение проблемы утилизации барды, остающейся после выделения основного продукта, а также использование биомассы микроорганизмов как неизбежного побочного продукта, остающегося после брожения. Ежегодно спиртовыми заводами производится около 10 млн. м<sup>3</sup> этого отхода [1202]. Такой объем невозможно полностью реализовать в натуральном виде как кормопродукта. Это приводит к его потерям и загрязнению окружающей среды. Некоторые предприятия вы-

нуждены сокращать объемы производства из-за невозможности утилизации отходов. Более того, согласно относительно недавним изменениям в законодательстве об охране окружающей среды, заводы, не утилизирующие отходы, не могут продолжать работу.

Другие традиционные решения по совершенствованию стадии ферментации связаны с использованием штаммов микроорганизмов и биореакторов с более высокой продуктивностью, снижением содержания побочных внеклеточных продуктов метаболизма, с максимальной степенью конверсии углеводного субстрата в целевой продукт и достижением максимальной конечной концентрации целевого продукта (снижение затрат на концентрирование и очистку целевого продукта, объемов барды, сточных вод, поступления загрязнений в окружающую среду в виде остаточных компонентов питательных сред и побочных продуктов биосинтеза в сточной воде) [1202-1206].

В спиртовом производстве дрожжи выращивают в микроаэрофильных и не-асептических условиях. Следы кислорода в среде необходимы для синтеза дрожжами эргостерина, ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов и клеточных мембран [1200]. Для того, чтобы предотвратить инфицирование, поддерживают рН в пределах 3,8–4,0. Этот рН можно создать добавлением, например, соляной, серной, ортофосфорной, уксусной, лимонной и других кислот.

При правильном ведении дрожжей смена культуры требуется очень редко. Некоторые заводы работают на одной и той же культуре в течение нескольких лет.

ВНИИ пищевой биотехнологии отселекционированы расы термотолерантных дрожжей *S. cerevisiae* 985 Т, которые успешно были внедрены на заводах отрасли [1207, 1208]. Дрожжи расы 985 Т выдерживают не только высокие температуры брожения (до 38°C), но и кислотоустойчивы, конкурентоспособны по отношению к посторонней микрофлоре, выдерживают повышенные концентрации спирта (до 12–14%).

Классические способы брожения (периодический, непрерывно-поточный, проточно-рециркуляционный, циклический) имеют ряд недостатков (отсутствие асептических условий и инфицированность бражки, наличие недосброженных остатков крахмала и других углеводов, недостаточно высокая интенсивность брожения), поэтому за рубежом и у нас в стране уделяется много внимания и продолжает оставаться актуальным совершенствование способов и технологии спиртового брожения.

В типичном варианте повышения продуктивности бродильного аппарата биомасса дрожжей отделяется от бражки сепарацией. Часть получаемого концентрата биомассы рециркулируется на стадию брожения [1200]. Это приводит к повышению выхода этилового спирта на 10% и уменьшению количества сточных вод. Однако проведение непрерывного процесса брожения на сахар- и крахмалсодержащем сы-

рье при рециркуляции дрожжевой биомассы часто приводит к бактериальному заражению. Кроме того, сепарация не используется при сбраживании сусла с высоким содержанием твердой фазы, в частности, зерновой дробины, остающейся в сусле при разваривании зерна.

Ферментацию с рециклом биомассы можно реализовать при использовании флокулирующих и оседающих дрожжей в реакторах с восходящим потоком субстрата [1200, 1209, 1210]. В таком реакторе достигается высокая концентрация клеток без использования механического сепаратора, и при времени пребывания среды в реакторе 4 ч, концентрации сахара 12% наблюдается продуктивность до 25 г/л по этанолу при сбраживании 90% сахарозы и степени конверсии сахарозы в этанол 90%.

Разработаны способы проведения процесса при удалении этанола с помощью жидкостной экстракции и вакуумной отгонки. В результате снижается ингибирующее действие этанола и в несколько раз повышается продуктивность реактора (см. раздел 1.2.1). Большое внимание уделялось и продолжает уделяться аналогичным процессам удаления этанола из ферментационной среды с применением мембранного биореактора, позволяющего достигнуть высокой продуктивности биореакторов – вплоть до 100 г/л.ч по этанолу (см. раздел 1.2.2).

При сбраживании мелассы с рециркуляцией барды и биомассы дрожжей на стадию брожения расход мелассы снижается на 8%. Рециркуляция 15–70% барды из предыдущей партии на стадию брожения обеспечивает снижение на 13–17% расхода воды и объема барды, сбрасываемой на очистные сооружения [1211].

На ФГУП «Биотехнологический завод» использовали периодическое брожение. После осахаривания сусло через ловушку сусловым насосом подавали в пластинчатый теплообменник для охлаждения до 25–27°C и далее в бродильное отделение. После трёх суток брожения зрелую бражку перекачивали в передаточный чан для дальнейшей переработки на брагоректификационной установке [1212].

Использовали культуру термотолерантных дрожжей *S. cerevisiae* Meyen расы Т 985 по ТУ 9182-400-00008064-2000. Дрожжи вели по методу естественно-чистой культуры в соответствии с технологической инструкцией [1207] при поддержании кислотности сусла в пределах от 0,7–0,8° (рН от 3,6 до 3,8). Подкисление дрожжевого сусла производили серной кислотой. В обычном режиме производственного цикла в качестве засевных дрожжей использовали зрелые дрожжи из очередной дрожжанки перед их спуском в бродильный чан. При необходимости получали чистую культуру дрожжей путем последовательных пересевов с доведением объема среды до производственной дрожжанки.

Для разведения дрожжей сусло готовили из ржаной или пшеничной муки и воды, подкисляли, профильтровывали и обрабатывали бактериальной  $\alpha$ -амилазой при

температуре от 85 до 90°C в течение 1 ч и глюкоамилазой при температуре 56–57°C в течение от 2 до 3 ч.

На стадии приготовления сусла в дрожжанке перед стерилизацией в сусло вводили дополнительное минеральное питание в виде карбамида из расчета 500–700 г на 1 м<sup>3</sup> сусла. Стерилизацию сусла проводили при температуре 80–85°C в течение от 20 до 30 мин.

Сусло для дрожжей получали по действующей на заводе схеме производства с использованием доброкачественной пшеницы, ржи или их смеси. Концентрация сусла в осаживателе была не менее 17 % по сахарометру.

Несмотря на отработанность рассмотренной выше процедуры получения посевного материала на ФГУП «Биотехнологический завод», ее недостатками оставались низкая засевная плотность дрожжевой культуры и высокая вероятность инфицирования дрожжей. Таким образом, проблема инфицированности сброживаемого сусла остается актуальной и требует своего решения в условиях модернизации производства.

Для спиртового брожения наиболее опасны разнообразные кислотообразующие бактерии, обладающие высокой кислото- и спиртоустойчивостью, такие как молочнокислые бактерии р. *Lactobacillus* и др. Они снижают концентрацию этанола в культуральной жидкости и образуют молочную и уксусную кислоты, ингибирующие рост дрожжей [1213-1216].

В качестве профилактической меры для уменьшения инфицированности дрожжей применяют мойку, дезинфекцию и тепловую обработку технологического оборудования паром или химическими средствами, стерилизацию воздуха при получении чистой культуры дрожжей, снижение рН, добавление антимицробных веществ [1205, 1216-1219]. Поскольку дрожжи обладают каталазной активностью в отличие от молочнокислых бактерий и благодаря эколого-гигиеническим преимуществам весьма привлекательным решением представляется внесение в среду с дрожжами пероксида водорода в качестве средства, уменьшающего численность молочнокислых бактерий [1162]. Для пролонгирования и повышения эффективности бактерицидного действия пероксида водорода предложено использовать Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, стабилизированный мочевиной и вносимый после разваривания сусла на стадии ферментативного осахаривания крахмала зерна перед внесением дрожжей [1163]. Этим предотвращается быстрый распад Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> под действием каталазы дрожжей и повышается бактерицидный эффект. Кроме того, мочевина, стабилизирующая Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, используется дрожжами в качестве источника азота.

При рассмотрении в разделе 2.4 особенностей воздействия пероксида водорода на микроорганизмы уже отмечалось, что у дрожжей-сахаромицетов, как и у других

эукариот,  $H_2O_2$  может вызывать не только состояние оксидативного стресса [348] с индукцией и репрессией ферментов, входящих в систему отклика на стресс, но и изменять интенсивность синтеза ряда ключевых ферментов катаболизма и анаболизма, в частности активизировать синтез гексокиназы, ферментов пентозо-фосфатного цикла и регенерации NADPH [811], изменять проницаемость клеточной мембраны для  $H_2O_2$  в адаптированных к  $H_2O_2$  клетках [415].

Таким образом, представляется целесообразным исследование метода культивирования дрожжей-сахаромицетов с целью получения качественного посевного материала с минимальным содержанием посторонней микрофлоры и использованием  $H_2O_2$  не только как бактерицидного средства, но и агента, регулирующего физиологическое состояние клеток дрожжей. Не исключено, что изменения в дрожжевых клетках, адаптированных к  $H_2O_2$ , будут благоприятно влиять на накопление посевной культуры и ее стартовую бродильную активность.

### **3.1.3. Получение молочной кислоты из углеводного сырья**

В диссертационной работе как экологически дружелюбные были апробированы следующие совмещенные процессы при получении молочной кислоты:

- культивирование молочнокислых бактерий – продуцентов молочной кислоты с совмещением биологического процесса и выводом бесклеточной культуральной жидкости в мембранном биореакторе для повышения продуктивности биореактора, снижения количества образующихся вторичных отходов в виде избыточной биомассы;
- апробация совмещенного стрессорного и антистрессорного воздействия для повышения выхода молочной кислоты, устойчивости процесса биосинтеза.

#### **3.1.3.1. Основные сферы применения молочной кислоты**

Молочная кислота широко используется в самых различных областях, при этом около 50 % от выпускаемого объема молочной кислоты потребляется в пищевой отрасли и 45% – в промышленности [1220-1226].

При общей мировой потребности около 1,5 млн. т потребность в молочной кислоте в непищевых областях применения оценивается на данный момент в 500–700 тыс. т/год [1224, 1227, 1228]. Фирмы Archer Daniels Midland Company (США), NatureWorks (США), Corbion Purac (США), Purac (Нидерланды), Galactic (Бельгия), CCA Biochemical Co. (Changzhou, КНР), Henan Jindan Lactic Acid Technology (КНР), Musashino Chemical Co. (КНР) являются крупнейшими производителями молочной кислоты.

На основе молочной кислоты получают биоразлагаемые полимеры – полилактид (PLA) и различные его модификации [1229-1237]. По химической структуре полилактид представляет собой линейный полиэфир молочной кислоты, получаемый из лактида – циклического димера молочной кислоты. Во всех промышленных процессах исходным сырьем для получения лактида является только молочная кислота, а для синтеза из нее полилактида требуемой молекулярной массы (не менее 100 кДа) используются энерго- и ресурсоемкие технологии очистки лактида от микропримесей молочной кислоты (до  $10^{-6}$  моль/г). В 2014 г. мировые мощности по производству полилактида достигли 300–400 тыс. т/год при варьировании цены от \$1800/т (в США) до \$3500/т (в Китае) [1224, 1228, 1236]. По прогнозу, изложенному на заседании президиума Совета по модернизации экономики и инновационному развитию России от 4 февраля 2014 года, к 2020 году Россия должна была производить 400 тыс. тонн в год собственного полилактида.

Несмотря на заявленные планы по состоянию на 2019 г. в России полилактид выпускали лишь несколько компаний, в основном в качестве упаковочных материалов. Суммарное количество выпускаемого полилактида составляет не более нескольких сотен тонн в год. Широкое внедрение полилактида как полимера бытового и технического назначения сдерживается более высокой стоимостью по сравнению с традиционными полимерами, значительный вклад в которую вносит себестоимость молочной кислоты. Стоимость PLA пока выше на 10–50% стоимости полимеров, полученных традиционным способом.

### **3.1.3.2. Молочная кислота, основные особенности ее получения микробиологическим синтезом, выделения и очистки**

Молочная (2-гидроксипропановая) кислота существует в виде двух оптических изомеров (энантиомеров), L(+) - и D(-). Химический синтез дает смесь L-молочной кислоты и D-молочной кислоты. Оптически активные формы (L-лактат и D-лактат), а также рацемическую смесь изомеров получают, в основном, микробиологическим синтезом, используя способность некоторых бактерий и грибов сбраживать углеводсодержащие субстраты до молочной кислоты. При этом, поскольку только L-изомер молочной кислоты является биологически активной формой, которая быстро и целиком утилизируется организмом человека или животного, основные усилия в биосинтезе молочной кислоты были традиционно направлены на использование штаммов, образующих L-изомер. L(+) – молочная кислота по классификации США относится к GRAS-соединениям (Generally Recognized As Safe), безопасным для использования в пищевых целях. D(-) – молочная кислота относительно безопасна, но ино-

гда отрицательно влияет на метаболизм у человека, вызывая ацидоз и декальцификацию [1221].

Само производство молочной кислоты микробиологическим синтезом является одним из старейших в мире и основано на технологии молочнокислого брожения (ферментации) [1220, 1221, 1238, 1239].

В большинстве стран молочную кислоту традиционно вырабатывают из сахаросодержащего сырья (меласса свекловичная, сахар-сырец, патока рафинадная, сок сорго, молочная сыворотка). Классический способ получения молочной кислоты предусматривает периодическое культивирование с использованием гомоферментативных молочнокислых бактерий (МКБ) семейства *Lactobacillaceae* с добавлением в питательную среду мела для нейтрализации образующейся молочной кислоты [1220, 1239-1241]. Полученный раствор фильтруют, очищают активным углем, концентрируют, охлаждают и выкристаллизовывают из него лактат кальция. К выделенному лактату кальция добавляют серную кислоту, при этом в раствор переходит молочная кислота и выпадает в осадок сульфат кальция (гипс –  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

По такой технологии: время ферментации составляет от 2 до 6 суток; выход молочной кислоты не превышает 83–87%; производительность биореактора по молочной кислоте не более 5–8 г/(л.ч); потребление концентрированной серной кислоты – не менее 550 кг на 1 т молочной кислоты; количество отходов сульфата кальция (гипса) – не менее 770 кг на 1 т молочной кислоты. Последнее является основным недостатком традиционного метода, поскольку гипсу трудно найти квалифицированное применение.

По другому варианту выделяющуюся в ходе биосинтеза молочную кислоту нейтрализуют водным раствором аммиака с получением раствора лактата аммония. В отличие от первого, второй вариант может быть осуществлен как полупериодическим, так и непрерывным способом. Однако и в этом случае в качестве отхода образуется сульфат аммония.

Еще одним недостатком традиционного метода является использование в составе питательной среды в значительных количествах дорогостоящих компонентов: факторов роста, органических соединений азота, в которых нуждаются молочнокислые бактерии [1223, 1242-1244]. По данным [1245, 1246] и компании Uhde, затраты на ростовые факторы достигают 30–38% от общих затрат на получение молочной кислоты. При использовании в качестве продуцентов менее требовательных к питательной среде грибных и дрожжевых культур, как правило, ухудшаются выход и конечная концентрация молочной кислоты, в некоторых случаях часть углеводного субстрата может превращаться в этанол и нецелевые органические кислоты, что

усложняет последующие стадии выделения и очистки. Все это повышает затраты на ферментацию и выделение МК.

### 3.1.3.3. Виды и штаммы микроорганизмов для получения молочной кислоты

Молочная кислота является метаболитом микроорганизмов различных таксономических групп и может быть получена путем сбраживания различных углеводовсодержащих субстратов с использованием бактерий, грибов, дрожжей, водорослей и цианобактерий.

К промышленно ценным продуцентам молочной кислоты можно отнести представителей бактерий и микроскопических плесневых грибов, основные из которых представлены бактериями рр. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, и *Pediococcus*.

Большинство МКБ нуждается в ряде витаминов и аминокислот, а также в пуринах и пиримидинах. Поэтому эти бактерии культивируют на сложных средах, содержащих относительно большие количества дрожжевого экстракта или другого источника ростовых факторов [1247]. В отсутствие ростовых факторов на среде с глюкозой и солями аммония не может расти ни один представитель этой группы.

Представители родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* имеют статус GRAS [1248, 1249] и наиболее часто используются в пищевой промышленности для предотвращения порчи продуктов [1250]. Среди них выявлены наиболее важные и перспективные продуценты молочной кислоты.

Молочнокислые бактерии способны только к брожению, при этом ряд представителей *Lactobacillus* сбраживают различные сахара [1251-1254]. Некоторые из видов молочнокислых бактерий (*L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. manihotivorans*) способны непосредственно сбраживать в молочную кислоту крахмал, гидролизуемый с помощью секретлируемых во внешнюю среду  $\alpha$ -амилаз [1228, 1255-1258], а также гидролизаты растительных материалов, содержащие сахара [1259-1261].

МКБ не содержат гемопротеинов (например, цитохромов и каталазы) и активной дыхательной цепи переноса электронов. Однако, несмотря на это, могут расти в присутствии кислорода воздуха, потому как будучи анаэробами, они все же аэротолерантны. Считается, что если какая-нибудь бактерия растет в аэробных условиях, но не образует каталазу, то ее с большой вероятностью можно отнести к молочнокислым бактериям [365, 1251-1253]. Вместе с тем, некоторые МКБ, в частности, представители *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* содержат гены, кодирующие синтез ферментов аэробного дыхания, и способны переходить к аэробному дыханию при добавлении гем-содержащих компонентов в питательную среду [684, 1221, 1262,

1263]. В отсутствие каталаз в защите от образующихся в аэробных условиях активных форм кислорода участвуют пероксидазы, NADH:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оксидаза, Mn-содержащая псевдокаталаза [1247].

В зависимости от вида бактерии-продуценты могут расти в диапазоне pH 3,5–9,6 и при температуре 7–45 °С. Наилучшая бродильная активность проявляется при pH 5,5–6,5, температуре 30–40 °С. Среди МКБ выявлены и психрофилы, которые могут развиваться и при температуре около 3 °С, и термофилы, способные расти при 45–62 °С [1264].

Из микроскопических грибов, как продуцентов молочной кислоты, наибольшее внимание уделяется муковровым грибам р. *Rhizopus*. Грибы *R. oryzae* и *R. arrhizus* более устойчивы к накапливаемой молочной кислоте [1265], способны расти на дешевых и простых, практически минимальных средах с гексозами и пентозами, глицерином в качестве источника углерода и, обладая амилолитической активностью, утилизировать крахмалсодержащее сырье без предварительного осахаривания [1266-1271].

Дрожжи не способны продуцировать молочную кислоту в большом количестве, но они отличаются большей устойчивостью к низким pH по сравнению с молочно-кислыми бактериями, что имеет определенные технологические преимущества (большая устойчивость к инфицированию, отсутствие необходимости добавлять щелочной реагент в ферментационную среду для поддержания pH). К настоящему времени созданы рекомбинантные штаммы дрожжей pp. *Kluuveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Yamadazyma*, с использованием которых удается достичь высокой продуктивности биореакторов. Такие штаммы, как правило, содержат внедренные в геном гены лактатдегидрогеназ, и блокированные гены пируватдекарбоксилаз. Источником гена лактатдегидрогеназы в большинстве случаев являются молочнокислые бактерии сем. *Lactobacillaceae*, реже бактерии р. *Bacillus*, грибы *Rhizopus oryzae* [1228, 1272-1276].

Несомненным достоинством подхода с конструированием рекомбинантных продуцентов дрожжей и грибов является возможность создания штаммов-продуцентов с относительной кислотоустойчивостью и заранее известными потребностями в факторах роста, синтезирующих требуемый оптический изомер молочной кислоты (L или D) или рацемат.

Вместе с тем, анализируя использование для биосинтеза лактатов генно-модифицированных штаммов дрожжей, можно отметить главные недостатки процесса: низкую продуктивность, которая, как правило, лишь немного превышает 3 г/л.ч, неполную конверсию субстрата (65–88%), а также образование побочных продуктов (этанола, органических кислот), что снижает эффективность биосинтеза. Кроме того, такие штаммы требуют специфических условий поддержания и, как

правило, наличия в среде селективного фактора, предотвращающего потерю генетической конструкции, например, антибиотика. Дрожжевые и грибные культуры, как облигатные аэробы, требуют усиленной аэрации со скоростью подачи кислорода более чем 0,3 г O<sub>2</sub>/л.ч [1277], что ограничивает продуктивность биореактора вследствие невысоких скорости роста и массообмена [1221, 1223, 1278, 1279], поэтому бактериальные продуценты, не требующие аэрации среды, в настоящее время выглядят предпочтительнее [1221, 1223, 1241].

Важными для выбора продуцентов молочной кислоты являются требования гомоферментативности процесса сбраживания углеводов, что необходимо для получения высокого выхода молочной кислоты из сбраживаемого субстрата. Гомоферментативные молочнокислые бактерии сбраживают глюкозу практически стехиометрически по фруктозобифосфатному пути:



т.е. образуют практически только одну молочную кислоту (она составляет не менее 85–90% всех продуктов брожения). Лишь небольшая часть пирувата декарбоксилируется, превращаясь в ацетат, этанол и CO<sub>2</sub>, а также в ацетон. Количество образующихся побочных продуктов зависит от доступа кислорода. К этой группе бактерий относятся некоторые представители сем. *Lactobacillaceae*: *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, а также некоторые виды родов *Carnobacterium* и *Enterococcus* [1247, 1254, 1280].

Гетероферментативные молочнокислые бактерии осуществляют сбраживание сахаров по пентозофосфатному пути. Конечными продуктами этого процесса являются лактат, этанол и уксусная кислота. Максимальный выход молочной кислоты при гетероферментативном сбраживании углеводов не превышает 0,6 г на 1 г пентоз. Поэтому гетероферментативные бактерии неперспективны для микробиологического получения молочной кислоты (низкая степень конверсии субстрата в целевой продукт), однако часто используются в молочной промышленности для приготовления кисломолочных продуктов.

К облигатным гетероферментативным молочнокислым бактериям относятся *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. reuteri*, *L. viridescens* [1247, 1254], а также бактерии р. *Leuconostoc*, бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum*.

Следует отметить, что понятие гомоферментативности и гетероферментативности конкретного вида бактерий не носит абсолютного характера. Многие виды и штаммы способны переключаться на гетероферментативный способ сбраживания субстрата при определенных условиях: сбраживании различных сахаров, отличных

от глюкозы, пентоз, при стрессовых условиях (высокие рН, неоптимальные температуры) [1281-1283].

Среди наиболее известных продуцентов молочной кислоты практически чистую L-форму лактата (содержание около 100 %) образуют *Lactobacillus casei* и подвиды *L. casei var. casei*, *L. casei var. rhamnosus*, *L. casei var. tolerans*, *L. casei var. alactosus* [1254, 1280, 1284]. Бактерии рр. *Bacillus* и *Enterococcus*, мукоровые грибы *Rhizopus* и плесневые грибы вида *Aspergillus oryzae* синтезируют только L-молочную кислоту.

Штаммов МКБ, продуцирующих оптически чистую D-МК, относительно немного. В частности, р. *Lactobacillus* насчитывает всего несколько видов, исследованные штаммы которых выделяют только D-МК: *L. pantheris*, *L. jensenii*, *L. coryniformis*, *L. delbrueckii* (разные подвиды), *L. vulgaricus* [1254, 1280]. Практически только D-молочную кислоту синтезируют бактерии р. *Leuconostoc*.

#### **3.1.3.4. Особенности молочнокислых бактерий как объектов исследования и основные условия культивирования при биосинтезе молочной кислоты**

Процессы биосинтеза таких метаболитов как молочная кислота ведутся чистыми культурами микроорганизмов, что обуславливает соблюдение стерильности или, как минимум, асептических условий. С точки зрения требований к штаммам-продуцентам важны высокая степень конверсии субстрата и уровень накопления МК, высокая продуктивность биореактора, способность расти на относительно простых и дешевых средах, устойчивость к высоким концентрациям МК, способность образовывать конкретный оптический изомер МК (в некоторых случаях допустимо образование рацемата) и непатогенность штамма-продуцента. Общими в любом случае остаются требования гомоферментативности осуществляемого продуцентом процесса сбраживания углеводов по причине более высокого выхода молочной кислоты и, соответственно, менее затратного выделения МК [1250, 1258, 1285].

По литературным данным наибольшим выходом L-молочной кислоты обладают некоторые штаммы *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*. Наибольшая продуктивность отмечена у штаммов *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis ssp. lactis*. Они способны накапливать в среде до 100–120 г/л, а в некоторых случаях и более, молочной кислоты при степени конверсии субстрата близкой к 100% [1221].

Выделение антимикробных веществ – бактериоцинов (лактоцинов) молочнокислыми бактериями [1247, 1286], а также пероксида водорода [983], их относительно низкая чувствительность к накапливаемой молочной кислоте обуславливают до-

минирование МКБ, устойчивость их роста и биосинтеза при нарушении асептичности процесса, что важно в условиях крупнотоннажного промышленного культивирования. Другим преимуществом молочнокислых бактерий является возможность использования их биомассы в кормовых целях [1287]. Этот факт решает проблему утилизации избытка биомассы при использовании МКБ для промышленного получения молочной кислоты.

Вместе с тем, недостатком молочнокислых бактерий остается их существенное требование к содержанию в питательной среде различных, часто дорогостоящих азотсодержащих органических субстратов – источников аминокислот, витаминов, микроэлементов и других факторов роста.

Имеется широкий перечень питательных сред, используемых для культивирования лактобактерий, но не всегда искусственная среда отвечает питательным потребностям бактерий. Например, классическая МРС-среда [1288], широко используемая на практике, не всегда оптимальна в отношении органического азота, источников марганца, магния, фосфора, поэтому стараются найти альтернативные и более дешевые источники углерода и других компонентов питательной среды.

Традиционными субстратами для получения молочной кислоты являются различные легкодоступные моно- и дисахариды, источником которых служит крахмалсодержащее сырье (кукуруза, картофель, пшеница, рис, тапиока (маниока), сладкое сорго, кассава, рожь и другие крахмалсодержащие продовольственные культуры [1221]. Наиболее легко сбраживаемыми субстратами являются глюкоза (декстроза) и глюкозные сиропы различного качества, как конечные продукты процессов конверсии крахмала с применением либо химического, либо ферментативного гидролиза. В промышленности возможно применение сахарозы и мелассы как более дешевых источников углерода. Многие известные гомоферментативные организмы *Lactobacillus* могут использовать сахарозу, за исключением *L. bulgaricus* и *L. helveticus*. Эффективные продуценты выявлены среди *L. delbrueckii*, которые пригодны для ферментации сахарозы, мелассы, патоки, багассы, других сахаросодержащих отходов [1289-1296].

В качестве источника азотсодержащих ростовых факторов могут служить разнообразные растительные, животные, дрожжевые гидролизаты и экстракты. Обычно используются дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, пептоны, соевые гидролизаты [1223, 1241, 1242, 1244, 1297-1309], автолизаты [1310].

Заменить дрожжевой экстракт в составе питательных сред другими источниками азота довольно сложно, так как он содержит важные для молочнокислых бактерий факторы роста – витамины и микроэлементы [1302, 1308, 1311, 1312]. Поэтому выход продукта при замене дрожжевого экстракта зачастую бывает ниже, чем при его использовании. Например, замена дрожжевого экстракта на жидкий кукурузный

экстракт в качестве источника азота привела к снижению продуктивности синтеза молочной кислоты культурой *L. rhamnosus* в два раза [1313].

Для лактобактерий оптимальная температура обычно находится в диапазоне 30–37 °С, рН 5,0–5,7. Лактобактерии неспорообразующие, поэтому при повышении температуры выше сублетальных величин погибают, однако они легко переносят высушивание, устойчивы к диоксиду углерода и этанолу, многие виды могут существовать при содержании спирта в среде 10–15% и более. МКБ, в целом, более устойчивы к закислению (рН<5), чем большинство других микроорганизмов, что позволяет им успешно конкурировать с другими бактериями в этих условиях [1254].

В классическом культивировании лактобактерий с получением молочной кислоты в процессе периодической ферментации наблюдается снижение рН в результате ее выделения. Во избежание ингибирования роста и биосинтеза в среду культивирования вносят мел. Гидроксид аммония и гидроксид натрия – другие относительно дешевые и часто используемые реагенты для нейтрализации кислотности и поддержания рН. Замена CaCO<sub>3</sub> на NH<sub>4</sub>OH или NaOH необходима при реализации проточных методов биосинтеза и во избежание образования твердых шламов в виде сульфата гипса при выделении молочной кислоты [140, 1228, 1314]. Однако использование NH<sub>4</sub>OH или NaOH не сопровождается выведением образующегося лактата из водной фазы, что приводит к повышению ионной силы раствора и ингибированию синтеза молочной кислоты в поздней фазе роста [478, 1228, 1315].

Высокие концентрации субстрата в исходной среде или молочной кислоты, накапливаемой к концу ферментации, осуществляемой классическими периодическими или непрерывными способами, существенно ингибируют рост микроорганизмов, снижают активность метаболизма [1316, 1317].

### **3.1.3.5. Способы интенсификации процесса культивирования молочнокислых бактерий и биосинтеза молочной кислоты**

Традиционный периодический режим культивирования имеет определенные преимущества, такие как приемлемая устойчивость к контаминации и достаточно высокий уровень накопления молочной кислоты, высокая степень конверсии субстрата (до 98%) в сравнении с другими методами культивирования [1283, 1318–1320]. При росте на глюкозе увеличение начальной концентрации субстрата вплоть до 200 г/л приводит к повышению уровня накопления МК [1321, 1322]. Так, при использовании штамма *L. paracasei subsp. paracasei* CB2121 конечная концентрация молочной кислоты достигала 192 г/л при начальной концентрации глюкозы 200 г/л [1284]. Вместе с тем, продуктивность традиционного простого периодического

культивирования с поддержанием рН среды невелика. Это обусловлено необходимостью частого слива ферментера и циклическим производством продукта, низкими концентрациями накапливаемой биомассы, возможным ингибированием биосинтеза исходными начальными концентрациями субстрата и/или конечным продуктом [1323, 1317, 1320, 1324].

Ненамного продуктивнее непрерывное хемостатное культивирование. Варианты хемостатного культивирования для продуцентов молочной кислоты описаны в многочисленных публикациях, причем как чистыми культурами молочнокислых бактерий, так и смешанными культурами, и даже рекомбинантными штаммами дрожжей [138, 139, 142, 1264, 1325-1332]. Хемостатная реализация непрерывного процесса не обеспечивает высокую степень конверсии субстрата в молочную кислоту и конечные концентрации МК из-за расхода части субстратов на постоянный рост культуры и пополнение убыли биомассы, а также ингибирования биосинтеза накопленной молочной кислотой.

Повышение продуктивности можно обеспечить путем: 1) более рационального профиля концентрации субстрата по ходу ферментации; 2) повышения концентрации клеток продуцента в рабочей зоне; 3) снижения ингибирования роста и физиологической активности продуцента накапливаемым целевым продуктом за счет удаления последнего из зоны ферментации [1221]. Поскольку процесс молочнокислого брожения протекает в анаэробных условиях, то обеспечение аэрации воздухом (кислородом) не требуется, поэтому массообменные ограничения несущественны.

Первый вариант с более рациональным профилем концентрации субстрата по ходу ферментации реализован в периодическом культивировании с подпиткой субстратом (*fed-batch cultivation*) [1195, 1246, 1333-1337] и в двухстадийном процессе [1338-1340]. Подпитки могут вноситься в экспоненциальной фазе, фазе замедленного роста, стационарной фазе. Все эти методы просты в исполнении и не требуют серьезного аппаратного оформления, позволяя при этом добиваться высокой продуктивности биореактора и уровня накопления молочной кислоты. Контроль остаточного содержания глюкозы на постоянном уровне позволяет поддерживать необходимую физиологическую активность молочнокислых бактерий на протяжении всего цикла ферментации в режиме с подпиткой субстратом [1246]. Однако несмотря на то, что способ культивирования с подпиткой субстратом является более предпочтительным по сравнению с периодическим и позволяет достигать высоких концентраций молочной кислоты, продуктивность биореактора по-прежнему остается достаточно низкой.

Использование иммобилизованных на носителе клеток МКБ позволяет, отчасти, повысить их концентрацию без вымывания из рабочей зоны биореактора и реа-

лизовать биосинтез в периодическом или непрерывном режиме с одновременным отводом молочной кислоты из ферментационной зоны [1341-1349]. Достигнутые показатели биосинтеза свидетельствуют о целесообразности приема иммобилизации биомассы для получения молочной кислоты, поскольку решается одновременно несколько задач: повышается продуктивность реактора, культуральная жидкость в значительной мере освобождена от клеток, а в некоторых случаях удается снизить потребность культуры в ростовых факторах до приемлемого уровня. Однако включение клеток в матрицу носителя имеет ряд недостатков, таких как диффузионные ограничения в транспорте субстрата к клеткам и отводе продукта, образование градиента рН внутри частиц носителя, неравномерное обтекание слоя частиц подаваемым потоком с субстратом, потеря со временем физиологической активности клеток продуцента, а также механической прочности носителя из-за возможного размножения клеток и коррозионного действия молочной кислоты. Все это значительно удорожает технологию биосинтеза молочной кислоты и в настоящее время не получило широкого практического применения.

Повышение содержания биомассы продуцента в ферментационной зоне возможно в циклическом отъемно-доливном режиме ферментации, в котором каждый цикл включает отстаивание в покое ферментационной среды с клетками и удаление части осветленной среды из зоны ферментации [1350].

Другая возможность заключается в естественной самоиммобилизации микробных клеток в результате образования биопленок и агрегатов бактерий, флокулообразования. Образование агрегатов наблюдается, в основном, у грибных культур, однако встречается и у молочнокислых бактерий, в частности, у *Lactobacillus salivarius* [1351]. Агрегация сопровождается образованием внеклеточных полисахаридов и приводит к увеличению содержания клеток продуцента в рабочей зоне и повышению продуктивности биореактора [1351].

Самоагрегация термофильных молочнокислых бактерий в сообществе с другими микроорганизмами была показана в работе корейских исследователей [1352-1354]. Брожение модельной среды, содержащей 25 г/л глюкозы в качестве источника углерода, осуществлялось смешанной культурой, а именно анаэробным активным илом в UASB-реакторе с восходящим потоком жидкости. В этих условиях сначала наблюдалась флокуляция биомассы, аналогично таковой для дрожжей-сахаромицетов [1209], через некоторое время начинали формироваться гранулы диаметром до 6 мм с доминированием бактериальных видов *Bacillus coagulans* и *Lactobacillus fermentum*. Процесс велся при температуре от 35 до 60 °С. Максимальная концентрация молочной кислоты составляла 23 г/л, что соответствует выходу 92%. Пиковая продуктивность биореактора достигала 67 г/л.ч при скорости разбав-

ления среды  $0,17 \text{ ч}^{-1}$ . Проведение биосинтеза в таком режиме позволяет осуществлять процесс длительно без строгих требований к стерильности.

Вариант процесса с отводом продуктов биосинтеза представляет сахарификация с одновременной ферментацией [SSF-процесс]. В этом случае исходный субстрат (крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза) гидролизуется с помощью вносимых или синтезируемых продуцентом ферментов до мономеров (гексоз, пентоз) с одновременным сбраживанием в молочную кислоту [1296, 1355-1366]. Сбраживание образующейся в ходе ферментативного гидролиза глюкозы снижает ингибирование ферментов, а также катаболитную репрессию потребления других моносахаров глюкозой, что повышает совокупную скорость гидролиза и брожения [1337, 1367, 1368]. Такой вариант ферментации может быть реализован с использованием смешанных культур микроорганизмов, в которых один из них обладает гидролитической активностью, а другой – сбраживает продукты гидролиза в молочную кислоту [1369].

Современное развитие идея снижения ингибирования роста и физиологической активности продуцента за счет отвода продукта из зоны ферментации получила при сочетании ферментации с поглощением выделяемой молочной кислоты экстракцией [92, 93, 1370-1374], адсорбцией [90], ионным обменом [91, 1375, 1376], диализом [1377, 1378], электродиализом [82, 105-112, 1379]. Такое удаление позволяет не только повысить выход молочной кислоты, но и избежать внесения  $\text{CaCO}_3$  в ферментационную среду для нейтрализации кислотности, а с этим – образования гипса [1374].

В наибольшей мере апробировано сочетание ферментации с баромембранными процессами в мембранном биореакторе, МБР [117, 120, 136-143, 1196, 1197, 1223, 1241, 1245, 1380, 1381]. В МБР могут использоваться микрофльтрационная, ультрафльтрационная или нанофльтрационная мембраны [74, 1382]. В таких системах достигается высокая плотность популяции клеток продуцента (до 10 раз выше, чем в простом периодическом процессе), в результате чего существенно повышается продуктивность реактора.

В МБР чаще всего проводится одностадийный непрерывный процесс ферментации с постоянным отводом бесклеточной среды с продуктом и добавлением эквивалентного количества исходной питательной среды [120, 139, 142, 143, 1330, 1383], но апробированы двухстадийные процессы [1339, 1380, 1384] и отъемно-доливной метод культивирования [1350, 1381, 1382]. Биомасса продуцента может либо частично выводиться из зоны ферментации для ее «омоложения», либо полностью удерживаться в рабочей зоне [1385, 1386].

На сегодня в системе с МБР в лабораторных условиях достигнуты наибольшие продуктивности по молочной кислоте с использованием молочнокислых бактерий – до  $50 \text{ г/л.ч}$  и выше. Аналогичное повышение продуктивности наблюдается и для

других микроорганизмов, синтезирующих молочную кислоту [1387]. Поскольку процесс молочнокислого брожения анаэробный, то повышение продуктивности не лимитируется подачей воздуха или кислорода, как это наблюдалось бы при проведении аэробной ферментации в МБР.

Наряду с повышением продуктивности в МБР возможно обеспечение высокой степени конверсии исходного субстрата и высоких уровней накопления молочной кислоты [1383]. Другое преимущество заключается в возможности существенной экономии дорогостоящих ростовых факторов при удержании клеток в системе культивирования, поскольку расход этих компонентов питания на прирост клеток снижается [1350, 1381, 1388]. Так, в исследованиях Oh et al. [1350] в системе отъемно-доливного культивирования с рециклом биомассы было достигнуто содержание клеток 28 г/л с продуктивностью реактора 6,4 г/л.ч, при этом расход ростовых факторов составлял всего 26% по сравнению с их расходом в обычном периодическом процессе.

Вместе с тем, обычно – при непрерывной подаче субстрата в зону ферментации и отводе продукта (молочной кислоты в виде лактата) с фильтратом, достижение высокой продуктивности мембранного биореактора сопровождается существенным снижением степени потребления и ростом остаточного содержания субстрата [1380]. Другие проблемы, которые могут возникнуть при долговременной эксплуатации мембранного биореактора, – его инфицирование посторонней микрофлорой, генетический дрейф популяции, в частности, ведущий к возможному изменению соотношения синтезируемых D- и/или L-лактата, повышенному образованию побочных продуктов биосинтеза.

Однако основной недостаток МБР обусловлен резким падением проницаемости мембран при работе с реальными биологическими средами вследствие забивки пор мембран клетками и высокомолекулярными внеклеточными продуктами метаболизма [139, 1245, 1389, 1390]. В ряде случаев молочнокислые микроорганизмы способны выделять в среду высокомолекулярные соединения углеводной природы [767, 768]. Это снижает степень конверсии субстрата в молочную кислоту и приводит к резкому увеличению вязкости ферментационной среды, что может усложнить выделение МК и понизить производительность мембран в случае применения мембранного биореактора. Повышенное накопление высокомолекулярных соединений углеводной природы особенно характерно для штаммов, выделенных из кисломолочных продуктов, например, для термофильных штаммов *Lactococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*. Накопление высокомолекулярных соединений углеводной природы гораздо менее выражено для видов *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus*. В этой связи требуются дополнительные меры по снижению уровня загрязнения и регенерации мем-

бран [1391]. Все это, в свою очередь, повышает требуемую площадь мембран и затраты на мембранное разделение и эксплуатацию МБР [1392]. Резкое падение проницаемости мембран (в разы и десятки раз), сложности стерилизации мембранных модулей, ограничения в площади мембран, а также диффузионные ограничения, которые возникают при высокой концентрации биомассы в реакторе, сводят на нет его преимущества.

Несмотря на отмеченные недостатки иммобилизованных систем и мембранных реакторов идея повышения продуктивности ферментационных систем путем удержания и повышения концентрации клеток в рабочей зоне остается привлекательной.

Обобщая рассмотренные особенности микробиологического синтеза молочной кислоты, можно указать на следующие наиболее важные моменты, которые необходимо учитывать при совершенствовании процессов культивирования с учетом эколого-экономических ограничений.

1) Наиболее актуальными задачами является снижение затрат на питательные субстраты, в первую очередь, на ростовые факторы, а также повышение продуктивности биореактора при одновременном обеспечении высокого выхода и конечной концентрации молочной кислоты, обеспечении устойчивости биосинтеза к контаминации.

2) Наиболее рациональным решением при выборе продуцентов остается использование традиционных молочнокислых бактерий с природным геномом по причине большей стабильности процесса, возможности реализации непрерывной ферментации без потери целевой физиологической и биосинтетической активности.

3) Из молочнокислых бактерий в наибольшей степени для получения молочной кислоты подходят штаммы с гомоферментативным молочнокислым брожением с синтезом только одного оптического изомера молочной кислоты (L-лактата).

4) Использование в качестве нейтрализующего агента растворов  $\text{NH}_4\text{OH}$  или  $\text{NaOH}$  позволяет избежать образования гипса, что важно при реализации микробиологического синтеза молочной кислоты в промышленном масштабе.

5) Из различных альтернативных вариантов наиболее многообещающим представляется сочетание культивирования в мембранном биореакторе с отъемно-доливным режимом с подпиткой, позволяющем снизить ингибирование накапливаемой молочной кислотой и в то же время обеспечить более высокую конверсию субстрата в целевой продукт – молочную кислоту.

6) Использование мембранного биореактора позволяет решить проблемы неполного потребления субстрата, ингибирования процесса продуктами реакции, обеспечивая непрерывный способ производства. Кроме того, применение мембранного модуля позволяет достичь высокой концентрации клеток в реакторе и, таким

образом, высокой его производительности, а также повысить выход молочной кислоты из углеводного субстрата и снизить расход ростовых факторов.

7) При культивировании в отъемно-доливном режиме и в МБР необходимо, чтобы жизнеспособные клетки молочнокислых бактерий как можно дольше сохраняли свою биохимическую и физиологическую активность при возникающих неблагоприятных условиях, а при наступлении благоприятных условий являлись бы быстро адаптирующимися и возобновляющими активный метаболизм.

8) Способы культивирования с использованием высоких плотностей клеток (HCDs), достигаемых с помощью мембранных биореакторов различных типов, позволяют добиться высокой скорости молочнокислого брожения. Кроме того, последние достижения в области интегральных мембранных систем позволяют говорить о том, что использование мембранного биореактора является перспективной технологией промышленного производства молочной кислоты.

9) Важной задачей остается поиск перспективных высокопродуктивных и стабильных в ходе длительного культивирования штаммов – продуцентов молочной кислоты и проведение исследований по оптимизации состава питательной среды (в том числе по основному субстрату), физико-химических условий и режимов, параметров культивирования в мембранном биореакторе.

### **3.1.4. Галобактерии и бактериородопсин как объекты исследования и практического применения**

#### **3.1.4.1. Бактериородопсин и пурпурные мембраны галобактерий**

Облигатные галофильные архебактерии достаточно давно известны как объекты разнообразных микробиологических, генетических и биохимических исследований и прикладных применений. Наибольшее внимание галобактерии привлекли как продуценты бактериородопсина (БР) – белка, входящего в состав пурпурных мембран (ПМ).

Пик исследований галобактерий пришелся на середину 1970-х – начало 2000-х гг., в ходе которых основное внимание уделялось выяснению особенностей и механизмов функционирования бактериородопсина, получению различных его вариантов, расширению возможностей его практического применения. По количеству публикаций бактериородопсин можно отнести к наиболее изученным и востребованным для исследований белкам [1393-1403].

Бактериородопсин (БР), впервые найденный у *Halobacterium salinarum* [1404-1407], представляет собой ретиналь-содержащий трансмембранный белок (248 ами-

нокислотных остатков, молекулярная масса 26,8 кДа), состоящий из белковой части – апобелка, называемого бактериоопсином (БО), со структурой в виде семи  $\alpha$ -спиральных сегментов (A, B, C, D, E, F, G), расположенных перпендикулярно плоскости мембраны, и хромофорной части – молекулы ретиналя, связанной с белковой частью во внутренней гидрофобной части молекулы БО в молярном соотношении 1 : 1 через протонированное основание Шиффа, образуемого альдегидной группой ретиналя с концевой аминогруппой остатка лизина в положении Lis216 в активной части внутримолекулярного канала БР. Поглощение кванта света приводит к изомеризация ретиналя из 13-*cis*-формы в *all-trans*-форму, при этом БР претерпевает ряд конформационных превращений белковой части, называемых фотоциклом, сопровождаемых спектральными изменениями в области от  $\lambda = 412$  нм до  $\lambda = 640$  нм.

В клетках галобактерий бактериородопсин входит в состав пурпурных мембран, которые содержат бактериородопсин, специфические фосфо- и гликолипиды, каротиноиды и воду. Обычно ПМ имеют округлую форму, размером достигая 0,5 мкм при толщине около 5 нм [1394, 1400, 1408, 1409]. В составе пурпурных мембран бактериородопсин чрезвычайно устойчив, однако в смеси полярных органических растворителей с водой ПМ и БР сольбилизируются, теряют свою структуру и свойства [1405, 1406].

Пурпурные мембраны выделяют из клеток стандартной процедурой, включающей осмотический лизис клеток галобактерий, обработку ДНК-азой I и дифференциальное ультрацентрифугирование [1405, 1406, 1410]. При удалении из среды солей клеточная стенка растворяется, а ЦПМ распадается на мелкие фрагменты, при этом участки мембраны красного цвета диссоциируют, а пурпурные бляшки сохраняются и могут быть получены в виде отдельной фракции высокоскоростным центрифугированием. Получаемые препараты ПМ содержат БР в комплексе с фосфолипидами, стабильны и для большинства практических применений их дальнейшая очистка не требуется. Однако в таких препаратах компоненты пурпурных мембран хаотично перемешаны, в то время как для многих исследований и практических применений необходимы препараты с ориентированными слоями [1411]. Для решения этой проблемы предложены различные методы – от электростатического включения БР в везикулы с липидами до прямого лизиса клеток галобактерий на гидрофобных подложках и ультрафильтрационных мембранах с последующей отмывкой адсорбированных ПМ от остальных клеточных веществ [1411].

Бактериородопсин является основой уникальной и наиболее просто устроенной биосистемой преобразования энергии солнечного света в электрохимическую энергию [1404, 1412-1421]. Протонный градиент, создаваемый на свету посредством функционирования фотоцикла данного белка, используется галобактериями (ГБ) для

синтеза АТФ в условиях недостатка кислорода. Молекулы бактериородопсина служат насосом, который под действием солнечного света выкачивает  $H^+$  ионы из клеток наружу. Возникающий в результате этого переноса градиент концентрации  $H^+$  ионов, достигающий 230 мВ, является источником энергии для синтеза АТФ АТФ-азой, локализованной на внутренней поверхности мембраны. Такой комплекс БР с АТФ-азой высокоорганизован. Исследования образцов ориентированных пурпурных мембран методом атомно-силовой микроскопии показали, что в культуре галобактерий с повышенным содержанием бактериородопсина многочисленные шаровидные участки размером 10–11 нм с АТФ-синтетазным комплексом расположены по периметру ПМ с бактериородопсином [1411]. Таким образом, у галобактерий реализуется прямая конверсия энергии света в химическую энергию без участия электрон-транспортной цепи.

Основной фотоцикл БР, функционирующего в составе пурпурных мембран, инициируется поглощением кванта света (первая стадия, переход В→J) и дальше протекает уже без воздействия света. Фотоцикл сопровождается высоким квантовым выходом (около 64%) [1422]. При его функционировании хромофор претерпевает *trans-cis* фотоизомеризацию с конформационными изменениями и наведенным изменением дипольного момента. *Cis*-состояние нестабильно, и хромофор возвращается в *trans*-состояние вследствие термической и фотостимулированной релаксации в течение от нескольких миллисекунд до секунд – в зависимости от модифицированной формы БР и ПМ. Весь фотоцикл у природного БР длится около 10 миллисекунд. Рефракторный период после каждого цикла не требуется, поэтому за 1 сек теоретически возможны до 100 фотоциклов одной и той же молекулы БР, сопровождаемых переносом 100 протонов в направлении изнутри клетки – наружу. Однако в реальности даже при ярком освещении молекула БР далека от светового насыщения.

В ряде прототипов БР-содержащих материалов используются свойства основного фотоцикла БР, сопровождаемого изменением спектральных свойств БР и включающего основные стабильное В- и нестабильное М-состояния с максимумами поглощения для В-состояния 568 нм и 412 нм – для М-состояния. Важно, что все изменения в системе БР достигаются в результате внутримолекулярных перестроек и поляризации ближайшего окружения ретиналя. Не менее существенно для практических применений БР то, что все переходы между конформационными состояниями этого белка регулируются кулоновскими взаимодействиями, в частности, в области активного центра (т.е. тесно связаны с внутримолекулярным переносом протона). Сам фотоцикл БР сопровождается возникновением устойчивых и хорошо разрешимых спектральных максимумов оптического поглощения, причем продукты фотосинтеза – формы БР – не только светочувствительны к определенным длинам волн и

изменяют свое состояние при дополнительном освещении, но и переходы между различными состояниями сопровождаются образованием фотопотенциала (величиной до 1 В) [1423]. Фотоцикл зависит от температуры, но на него мало влияют уровень солености и рН. Основные усилия при разработке материалов и устройств на основе использования основного фотоцикла направлены на повышения длительности нахождения БР в М-состоянии – до нескольких секунд и более.

В 1990-2000-х гг. были получены методами традиционного и точечного мутагенеза, селекции, рекомбинантных ДНК различные модификации БР для использования в предложенных прототипах технических изделий. Так, наиболее исследованным является мутант D96N, содержащий замену аспарагиновой кислоты на аргинин и имеющий относительно длительное время жизни М-интермедиата – 1–2 сек вместо 20 мсек [1398, 1400, 1424-1429].

Кроме основного фотоцикла имеется побочный фотоцикл с разветвлением, начинающимся из О-состояния, и включающий Р- и Q-промежуточные состояния без переноса протона, из которых Q-состояние метастабильно [1429]. Побочный фотоцикл может протекать в так называемых голубых мембранах [1430], при освещении которых БР переходит в Q-состояние, при этом голубые мембраны переходят в так называемые розовые мембраны, в составе которых при создании оптимальных условий БР в Q-состоянии может находиться несколько лет, что может использоваться для долговременного хранения и чтения информации на оптических носителях. Однако квантовый выход побочного фотоцикла при переходе из В-состояния в Q-состояние природного БР крайне низкий (всего около 0,02% от светового потока). Возврат в исходное В-состояние наблюдается при воздействии синего света с квантовым выходом около 1% или двух фотонов красного света. Ввиду нестабильности голубых мембран с природным БР и низких квантовых выходов при прямом и обратном В-Q-переходах усилия были направлены на получение материалов и устройств с модифицированными аналогами БР с целью повысить квантовый выход побочного фотоцикла и стабильность мембран.

БР, содержащийся в пурпурной мембране *H. salinarium*, во многом подобен зрительному белку родопсину, хотя их физиологические функции различны [1397]. В то время как зрительный родопсин действует как первичный фоторецептор, который обеспечивает темновое зрение большинства позвоночных животных, физиологическая роль БР заключается в том, чтобы давать возможность галобактериям действовать как факультативным анаэробам. В случае, когда парциальное давление кислорода в окружающей среде мало, а освещение интенсивно, он функционирует как светозависимый протонный насос, который обеспечивает образование электро-

химического градиента протонов на поверхности мембраны клетки, служащий, в свою очередь, для аккумуляции энергии.

### 3.1.4.2. Практическая значимость бактериородопсина и галобактерий

Обнаружение у галобактерий в начале 1970-х гг. системы преобразования энергии света в электрохимическую энергию на основе пурпурных мембран и входящего в их состав белка бактериородопсина стимулировало множество исследований по его практическому применению. С начала 1980-х гг. начались активные разработки БР-содержащих материалов для молекулярной электроники и молекулярной фотоники, принцип действия которых основывается на циклических изменениях оптико-физических характеристик ПМ: фотохромных, показателей преломления и поглощения, значений фототока и фотопотенциала. Физические и химические воздействия (например, низкие температуры, электрические поля, контроль влажности, рН и т.д.), замена хромофора на его синтетические аналоги, сайт-направленный мутагенез полипептидной части предоставляют широкие возможности для изменения фотохромных свойств БР. Наиболее важные обзоры по потенциальному применению БР представлены в публикациях [1400, 1425, 1431-1461].

В чистом солиобилизованном виде БР обычно не используется и в таком состоянии он менее устойчив к экстремальным воздействиям. В большинстве случаев БР в составе пурпурных мембран включают в полимерные матрицы в виде пленок или гелей различного состава, в которых он сохраняет свои фотохимические свойства. По сравнению с другими органическими материалами материалы на основе пурпурных мембран с бактериородопсином отличаются высокой скоростью превращений и их обратимостью при достаточной спектральной селективности, исключительной стабильностью, непревзойденными циклическостью функционирования БР (не менее  $10^6$  актов) и чувствительностью к свету (пороговая плотность мощности  $< 0,1$  мВт/см<sup>2</sup>), устойчивостью к деструктивному влиянию фотохимических и температурных факторов (до 80°C в водных средах и до 140°C в сухих пленках), к действию протеаз. ПМ чувствительны к смесям полярных органических растворителей с водой, но устойчивы к неполярным растворителям типа гексана, устойчивы к изменению рН в диапазоне от 0 до 12, воздействию мощных электромагнитных полей в десятки кВ и кГаусс, кроме специфических лазерных лучей, выдерживают среды с высокой ионной силой (3 М NaCl). Препараты ПМ могут храниться без потери свойств в течение нескольких месяцев при комнатной температуре и освещении. В составе же сухих пленок на фоне отмеченных экстремальных воздействий БР сохраняет свои фотохромные и фотоэлектрические свойства в течение многих лет. Все эти

особенности обусловили рассмотрение бактериородопсина как уникального материала для применения в целях безопасности информации и практического исключения попыток внесения искажения и подделки. Молекулярные размеры и высокая плотность активных элементов делали возможным миниатюризацию оптоэлектронных систем. Еще одним достоинством материалов с БР являлось безвредность и экологическая чистота их получения.

БР обнаружен во многих штаммах экстремально галофильных археобактерий, но для его производства используют культуры *Halobacterium salinarum*, содержащие повышенные количества БР, а также культуры *H. salinarum*, модифицированные по структурному *bor*-гену синтеза БР с более подходящими для применения в биоэлектронных устройствах свойствами. Возможности модификации белковой и ретинальной части БР мутантных штаммов, состава липидов ПМ, как и свойств полимерной матрицы, позволяют менять характеристики материалов в широком диапазоне, например, иметь другие начальные цвета: синий, красный или зеленый.

Для разных сфер применения бактериородопсина требуются препараты данного белка с различающимися свойствами. Так, например, для использования в системах хранения информации и для сенсорных устройств требуется белок, способный длительное время находиться в альтернативном природному конформационном состоянии. Для устройств генерации водорода, для динамических голограмм и в системе защиты ценных бумаг, напротив, используется высокая конформационная реверсивность бактериородопсина.

В бывш. СССР в рамках проекта «Родопсин» впервые в мире были получены и исследованы пленки с фотохромными свойствами на основе БР диких штаммов. В 1980-х гг. была продемонстрирована эффективность и перспективность применения таких материалов, названных «Биохром», в качестве среды для создания голографических изображений и голографической записи информации [1431, 1462, 1463].

В 2001 г. фирма Munich Innovative Biomaterials GmbH (MIB) [1464] представила на рынок голографический интерферометр FringeMaker-plus<sup>®</sup> на основе пленки модифицированного БР, синтезируемого мутантным штаммом *H. salinarum* D96N.

В 2006 г. профессором Гарвардской медицинской школы (Harvard Medical School) при Гарвардском университете (Harvard University) Венкатесан Ренугопалакришнаном (Venkatesan Renugopalakrishnan) с коллегами на Международной конференции по наноисследованиям и нанотехнологиям (International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, 2006) была анонсирована технология записи на основе БР на лазерный диск до 50 терабайт информации, то есть приблизительно в десять тысяч раз больше чем выпускавшимися в то время традиционными DVD.

Как заметил Lanуі [1400], за последние три десятилетия немногие биологические объекты привлекли такое пристальное внимание исследователей, как это сделал БР. Это доказывают более 5000 статей, посвященных исследованию самого белка и еще большее количество статей, посвященных прикладным аспектам его применения. С 1980 г. по декабрь 2004 г. было защищено 258 патентов США, посвященных БР, при этом в период с июля 2001 по декабрь 2004 было защищено 136 патентов США непосредственно по применению, из них в области медицины, косметики и сельского хозяйства – не менее 15.

Исследованиями в области БР были заняты более 30 научных центров в США, более 40 в Европе. В США основные работы проводились в Калифорнийском университете (Дж. К. Лани), в Сиракузском университете (Дж. А. Стюарт), в Университете Коннектикута (Р. Р. Бердж). В Германии ведущими центрами являлись Институт Макса Планка (Д. Остерхельт), Марбургский университет (Н. Хампп) и активно сотрудничающая с Марбургским университетом компания «Munich Innovative Biomaterials GmbH» («МІВ»), в которой интенсивно разрабатывались вопросы использования БР как средства защиты ценных бумаг от подделок. По оценкам немецких специалистов со ссылкой на US Int. Trade Commission мировой рынок БР мог составить порядка 43–61 млрд. долларов США [1465].

Бактериородопсин был единственным биологическим материалом, вошедшим в перечень финансирования разработок в рамках ФЦП «Национальная технологическая база» на 2007–2011 гг. Необходимость использования отечественного бактериородопсина отмечалась в двух разделах Перечня программных мероприятий. В главе «Технологии новых материалов» потребность в производстве бактериородопсина следовала из требования разработки современных материалов для создания:

- устройств для записи и хранения информации;
- элементов систем управления особо точной техникой;
- особо чувствительных сенсорных устройств;
- функциональных материалов и многослойных структур на основе материалов с фотонной запрещенной зоной;
- новой системы защиты ценных бумаг.

Наличие других уникальных компонентов в биомассе ГБ, обусловленных экстремальными условиями обитания, систем и механизмов защиты от неблагоприятных внешних воздействий, помимо практического применения бактериородопсина стимулировало множество других предложений для использования галобактерий в сельском хозяйстве, фармацевтике, здравоохранении.

Биомасса галобактерий может использоваться в качестве биологически активной добавки с иммунопротекторными, антиоксидантными и радиопротекторными

свойствами, как фитостимулятор в растениеводстве и стимулятор прироста в животноводстве [1466-1469]. Так, в опытах на различных видах животных и домашней птицы показано резкое повышение их сопротивляемости стрессам и инфекциям и повышение продуктивности по всем показателям не менее чем в 1,5 раза при ежедневном потреблении в пересчете на бактериородопсин не более 1 микрограмма БР на 1 кг веса животного.

Вытяжки из биомассы галобактерий обладают иммунопротекторным, радиопротекторным эффектами, благотворно влияют на зрение, их применяли в послеоперационной реабилитации космонавтов в СССР 80-х годов 20-го века (в то время активно развивался «бактериородопсиновый» проект), при реабилитации детей после лучевой терапии и при лечении злокачественных образований. Лабораторные исследования на мышах показали полное излечение от карциномы – одного из видов рака. Медицинское применение находят ферменты, антибиотики галобактерий и так называемые археасомы (липосомы галобактерий), являющиеся перспективными средствами доставки лекарств в организме. Антиоксидантное, противовоспалительное, регенерирующее действие препаратов на основе ГБ делает их перспективными для косметических применений [1470].

Поскольку галобактерии являются экстремальными галофилами, интерес представляют и некоторые из их ферментов, способные эффективно работать в условиях с высокими концентрациями солей, галоцины и антибиотики, а также вещества-осмолиты, синтезируемые некоторыми из представителей галофилов [1471-1484].

На начало 2000-х гг. большинство из вышеупомянутых предложений рассматривались как весьма перспективные и основывались на существенных достижениях в получении модифицированных форм БР, оптимизации его окружения [1485, 1486]. Все это предопределило выбор галобактерий и получаемого на их основе бактериородопсина как одного из основных объектов наших исследований на тот момент.

В настоящее время, несмотря на многочисленные предложения и разработки по применению бактериородопсина, в качестве наиболее перспективных рассматриваются медицинское, ветеринарное и агрохимическое направления использования галобактерий и их компонентов.

В России существует не более трех малых производств, производящих биомассу «галобактериального» происхождения. Наиболее технологически разарботана схема производства, реализованная в компании «Никофарм» (г. Москва) [1466], выпускающей препарат под коммерческим названием «Баксин» по технологии, разработанной в ГосНИИсинтезбелок, и представляющим собой высушенную биомассу галобактерий р. *Halobium* в виде порошка или в составе мазей, содержащей каротиноиды и практически не содержащей бактериородопсина (не более 0,1–0,2%). Это

обусловлено особенностями используемой технологии культивирования галобактерий, при которой БР практически не накапливается. Данный препарат прошел длительную и всестороннюю медико-биологическую проверку, сертифицирован и успешно используется в ветеринарии, показал высокую эффективность как БАД для птицеводства, как стимулятор роста растений, а также как иммунокорректирующая и иммуностимулирующая пищевая добавка для людей. Однако из-за относительно высокой стоимости этой добавки (около 1000 долл. США за 1 кг), спрос на нее остается невысоким.

Следует отметить, что технология, используемая на производстве фирмы «Никофарм» устарела и не соответствует современным критериям GMP производств. Процесс ферментации осуществляется в непрерывных неасептических условиях без должного контроля за видовым составом культивируемой популяции. Используемые биореакторы обладают низкой продуктивностью, а биомасса галобактерий имеет нестабильное качество.

Известны несколько предложений от крупных химических фирм, торгующих бактериородопсином, как особо чистым реактивом, и его аналогами, полученными на основе генетически модифицированных штаммов для научных исследований. По данным каталожных цен реактивов и препаратов ведущих фирм (Sigma и др.) рыночная цена бактериородопсина в настоящее время колеблется в диапазоне 20-400 € за миллиграмм (за 1 мг!). Данные препараты отличаются высоким качеством, сертифицированы и продаются в мелкой фасовке. При поиске в Интернете можно найти до 20 предложений различных небольших фирм и лабораторий по цене примерно в 10 раз ниже.

Что касается предложений по применению БР в области молекулярной электроники и фотоники, то еще 10–15 лет назад ожидалось, что появление на мировом рынке относительно дешевых препаратов пурпурных мембран галобактерий, содержащих бактериородопсин в высокой концентрации и в состоянии, наиболее подходящем для использования в биоэлектронных и других устройствах, простимулирует завершение соответствующих разработок и ускорит появление коммерческих устройств.

На сегодня коммерчески реализованы только оптические приложения пленок с БР, поскольку их интеграция в современные технические системы наиболее проста. Некоторые из этих направлений разрабатываются крупнейшими фирмами – NEC, Samsung. Перспективность других применений оценить сложно, поскольку кроме многочисленных спекуляций на тему БР существует много туманных сведений об изделиях, где он используется.

К сожалению разработчиков БР-памяти, устройства, предлагавшиеся для записи и считывания данных, оказались слишком сложны и не устояли перед напором неор-

ганических элементов памяти современных флэш-накопителей. Проблемой является и создание надежных фотопленок со стабильными свойствами БР, которые выдерживают хотя бы несколько десятков миллионов фотоциклов. С этой целью продолжают изучаться материалы с различными модифицированными бактериородопсинами, полученными методами генетической и белковой инженерии и содержащими замены аминокислотных остатков в определенных положениях белковой цепи. Однако в доступной печати какие-либо заслуживающие внимания сведения о разработках пленок, которые уже обладали бы требуемыми характеристиками, отсутствуют. Имелись лишь краткие сообщения о разработке в Японии и Южной Корее высокоразрешающих видеокамер, фотоаппаратов и т.п., где используются пленки с БР.

Нет каких-либо существенных успехов и в применении БР для фотопреобразования световой энергии в электрическую. Ранее также предпринимались попытки совмещения функционально связанных БР и АТФ-синтетазы в искусственных липосомах [1487, 1488], однако кроме демонстрации принципиальной возможности создания подобных нанобиоконструкций иных результатов не было.

Основным препятствием на пути массового получения изделий на основе БР является высокая стоимость, а также многочисленные технические проблемы.

Несовершенна и технология культивирования галобактерий и выделения БР в составе пурпурных мембран. Несмотря на возможность культивирования галобактерий, как экстремофилов, в неасептических условиях, непатогенность всех до сих пор выявленных штаммов [1489], продукты на их основе имеют высокую стоимость, проистекающую из повышенных требований к составу питательных сред и сложности выделения целевых компонентов. Традиционные методы культивирования дают небольшой выход биомассы и целевых компонентов, продуценты морфологически и физиологически нестабильны, с высокой частотой спонтанно мутируют, чувствительны к изменению условий [1490-1493], поэтому и результаты культивирования отличаются нестабильностью. По оценкам, себестоимость получения биомассы галобактерий может составить от 0,4 до 2,5 долл. США за 1 г сухой биомассы. Несовершенство технологии выделения бактериальных компонентов и пурпурных мембран из клеточной массы многократным высокоскоростным ультрацентрифугированием обуславливает и сверхвысокую стоимость бактериородопсина. Выделение его многократно осложняется наличием каротиноидов у вырабатывающих БР штаммов.

Существующие данные говорят о том, что на настоящий момент в мировой практике нет промышленной высокоэффективной технологии культивирования галобактерий для производства бактериородопсина. Из литературы известны лишь единичные попытки разработки технологии производства БР полупромышленного уровня, поэтому известные лабораторные методы получения этого белка не превы-

шают масштаб в несколько граммов. Также малочисленны работы по созданию штаммов, которые отвечали бы всем требованиям, предъявляемым к промышленным штаммам-продуцентам. Все это обуславливает высокую рыночную цену бактериородопсина, что резко ограничивает его коммерческий спрос. Рыночный спрос бактериородопсин может иметь при цене 1–2 € за мг и ниже.

Таким образом, исследования с использованием галобактерий как практически важных объектов продолжают оставаться актуальными на протяжении уже около 50 лет и могут послужить основой для отработки эффективных способов их культивирования с учетом различных факторов управления процессом.

### **3.1.4.3. Особенности галобактерий как объектов исследования и культивирования**

Галобактерии относятся к галотолерантным и экстремальным галофилам. Последние способны обитать при содержании NaCl 2,5–5,2 М [1494-1499], что в 4–9 раз выше, чем в морской воде. облигатные экстремальные галофилы могут расти в насыщенном растворе NaCl (30%). Нижний предел концентрации соли для роста большинства их видов составляет 12–15% (2–2,5 М); оптимальное содержание – между 20 и 26% (3,5–4,5 М). Солеустойчивость обусловлена тем, что клетки обладают мощной системой активного транспорта, благодаря которой концентрация  $\text{Na}^+$  в цитоплазме поддерживается на низком уровне, тем самым снижая ингибирующее действие NaCl [1499]. Потребность в ионах  $\text{K}^+$  умеренная (5–50 мМ), при этом концентрация  $\text{K}^+$  внутри клетки существенно выше, чем внеклеточная [1499]. Потребность же в ионах  $\text{Mg}^{2+}$  составляет 0,1–0,5 М, что на 1–2 порядка выше, чем в целом для бактерий [1494, 1500].

Экологическая среда обитания галобактерий – сильно минерализованные озера и лиманы в аридных зонах. Галобактерии встречаются на кристаллах соли в прибрежной полосе, в местах добычи соли путем выпаривания морской воды, в солеварнях, на соленой рыбе, на засоленных шкурах животных, на рассольных сырах, в капустных и огуречных рассолах, вызывая порчу консервируемых с использованием высоких концентраций поваренной соли продуктов и сырья. Внутри кристаллов соли галобактерии могут длительное время сохранять свою жизнеспособность – они выделены из каменной соли, геологический возраст которой порядка 195–250 млн. лет [1501].

Являются хемоорганотрофами, наиболее благоприятная температура для их роста составляет 36–40 °С. Среди галобактерий встречаются термофильные, психро-

фильные, алкалофильные формы, однако ацидофильные, обитающие при рН ниже 6,0, не найдены [1499].

Галобактерии включены в семейство *Halobacteriaceae* и представлены более 60 видами, сгруппированными в 19 различных родов: *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Natronobacterium*, *Natronomonas* и др., различающихся формой клеток (палочки, кокки, квадраты, плеоморфы), способностью к движению, отношением к кислотности среды, устойчивостью к NaCl, ростовыми характеристиками, присутствием или отсутствием маркерных липидов, последовательностью генов 16S рРНК и другими физиологическими, биохимическими и генетическими признаками [1501, 1502].

Широко известными видами рода *Halobacterium* являются  $\Gamma^-$  палочки *H. salinarum* (ранее данный вид носил название *H. halobium*) и *H. cutirubrum*. Эти виды давно и успешно применяются в исследованиях галофилизма. *H. salinarum* относится к видам, накапливающим наибольшее количество бактериородопсина и каротиноидов. Содержание каротиноидов в природных штаммах *H. salinarum* составляет 7–10% от суммарной фракции липидов [1407].

В типичных условиях обитания клетки р. *Halobacterium* имеют палочковидную форму, размерами 0,5–1,0 : 1,0–10,0 мкм [1494, 1496]. Размножаются делением пополам, движутся при помощи полярных жгутиков, спор не образуют, клетки многих видов содержат газовые везикулы, обеспечивающие плавучесть клеток. Концентрация соли 0,5–1,0 М вызывает лизис клеток, в результате чего суспензия приобретает более вязкую консистенцию. Также лизис происходит при одновременном уменьшении концентрации NaCl и MgCl<sub>2</sub> ниже 2 М и 20 мМ соответственно [1407]. Раньше считалось, что единственным определяющим фактором лизиса является осмотическое давление. Однако позже было показано, что главную роль здесь играют клеточные оболочки, из-за эластичности которых объем клеток сильно зависит от состава ионов и рН внешней среды.

Среди галобактерий не выявлены патогенные формы – очевидно, что внутренняя среда человека непригодна для жизнедеятельности, поэтому работа с микроорганизмами этой группы не требует специальных мер предосторожности.

Клетки галобактерий *H. salinarum* подвижны и несут 2 полярно расположенных на концах пучка жгутиков. Движение клетки осуществляется за счет вращения заднего пучка флагелл вокруг своей оси и вращения переднего пучка вокруг оси клетки. В отсутствие внешнего стимула движение клетки маятникообразное, со спонтанным вращением флагеллярного мотора по часовой и против часовой стрелки каждые несколько секунд. Неожиданное увеличение аттрактантного сигнала, в частности интенсивности оранжевого света, воспринимаемого сенсорным родопсином SR1, бло-

кирует переключение вращения на некоторое время, что приводит к совокупному движению по направлению к свету. Напротив, увеличение репеллентного фотосигнала, воспринимаемого сенсорным родопсином SR2, или снижение аттрактантного сигнала, повышает частоту переключения направлений вращения, что позволяет клеткам избежать неблагоприятных условий [1402, 1503]. При постоянном действии одного и того же сигнала клетки адаптируются к нему и деадаптируются при его прекращении.

У галобактерий вывлены фоторецепторы, отвечающие за возникновение циркадных ритмов [1087, 1503], но их роль пока что еще до конца не выяснена. Они гомологичны флавопротеиновым криптохромам Cry1 и Cry2, функционирующим у растения *Arabidopsis* и мышей, а также цианобактериальному белку KaiC. С другой стороны, они близки к фотолиазам микроорганизмов. Но понятно, что наличие таких фоторецепторов дает определенные преимущества популяциям галобактерий, синхронизирующих свою активность с суточным ритмом смены условий освещенности и доступной энергии.

Галобактерии способны синтезировать вещества белковой или пептидной природы с антибиотической активностью – галоцины, вызывающие гибель и лизис представителей других конкурирующих видов галобактерий [1472, 1481, 1482, 1504]. Молекулярная масса этих веществ варьируется в интервале 3–35 кДа. Большинство из них начинает синтезироваться при переходе клеток от экспоненциальной к стационарной фазе роста. Пептидные галоцины (микроголоцины с молекулярной массой <10 кДа) весьма устойчивы к кислотам, щелочам и органическим растворителям, и их активность сохраняется при обессоливании или кипячении.

Генетический материал экстремальных галофилов представлен в виде основной и сателлитных ДНК. Последние составляют от 11 до 36% всей содержащейся в клетках ДНК [1492] и состоят из замкнутых кольцевых плазмид, не содержащих повторяющиеся последовательности нуклеотидов. Основная и сателлитные ДНК различаются нуклеотидным составом: молярное ГЦ-содержание основной ДНК – порядка 66–68, а сателлитных – 57–60%. Высокий уровень сателлитных ДНК – уникальная черта организации генетического материала экстремальных галофилов и составная часть генома этих бактерий. Высокое содержание плазмид коррелирует с присутствием газовых вакуолей, синтезом бактериоруберина и другими функциями [1491, 1492].

Наиболее изучен геном *Halobacterium salinarum* NRC-1, который первым среди галобактерий был полностью картирован в 2000 г. [1501, 1505, 1506]. Он содержит хромосому величиной около 2 Мbp, и 2 больших автономных реплика, pNRC200 и pNRC100, около 350 и 200 Кbp соответственно. Могут присутствовать несколько плазмид меньшего размера, являющихся фрагментами плазмиды pNRC100. Геном ко-

дирует около 2600 белков, 90 инсерционных элементов и обеспечивает функционирование репликации ДНК, системы транскрипции и трансляции, сходной в большей степени с эукариотическими организмами, путей утилизации аминокислот, активного антипорта ионов  $\text{Na}^+$ , транспорта  $\text{K}^+$ , переноса сенсорных сигналов и других физиологически важных систем. Многие из белков подобны белкам  $\Gamma^+$  бактерии *Bacillus subtilis*. Также в геноме присутствует большое число последовательностей нуклеотидов, гомологичных устойчивой к радиации бактерии *Deinococcus radiodurans*, что указывает на наличие мощного аппарата репарации ДНК у галобактерий.

Галобактерии показывают высокую степень генетической вариабельности и частоты спонтанных мутаций ( $10^{-4}$ – $10^{-2}$  мутантов на высеянные клетки), приводящих к геномным перестройкам [1490, 1491, 1492, 1493, 1503, 1507]. На фенотипическом уровне это проявляется при высеве на чашки Петри, когда наблюдаются колонии галобактерий, окрашенные в оранжевый, оранжево-желтый, варианты от розово-сиреневого до сиреневого (пурпурного) цвета, белесые. При культивировании образуется около 10% мутантных клеток. Часть из мутаций обусловлена присутствием плазмид, содержащих большое количество транспозабельных инсерционных элементов [1491, 1490]. IS-элементы также присутствуют в хромосоме галобактерий. Такая вариабельность и наличие горизонтального переноса генов обуславливает высокую структурную и функциональную пластичность и позволяет галобактериям быстрее адаптироваться к изменениям и стрессам окружающей среды: солености, свету, кислороду, компонентам питания [1503, 1507].

При спонтанной мутации были выделены штаммы, дефектные по структурному *bor*-гену синтеза бактериоопсина и так называемые «белые штаммы», дефектные по синтезу ретиналя, синтезирующие только бактериоопсин [1491, 1503].

Галофилы выработали две различные адаптивные стратегии противостоять осмотическому давлению, обусловленному присутствием высоких концентраций  $\text{NaCl}$  [1499, 1508, 1509]. Галобактерии аккумулируют неорганические ионы в цитоплазме ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) для балансировки осмотического давления в среде, и они синтезируют специфические белки, стабильные и активные в присутствии соли. В стабилизации участвуют ионы  $\text{K}^+$ , замещающие ионы  $\text{Na}^+$  в цитоплазме [1499]. Внутриклеточная концентрация ионов  $\text{Na}^+$  ниже внеклеточной, что обеспечивается активным электрогенным антипортом  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Напротив, содержание внутриклеточного  $\text{K}^+$  поддерживается при постоянно высоких уровнях, даже когда содержание  $\text{K}^+$  во внешней среде менее 1 мМ, при этом чем выше концентрация натрия в среде, тем выше содержание  $\text{K}^+$  внутри клеток, достигая от 30 до 40% сухого вещества клеток при градиенте между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями 1:1000.  $\text{K}^+$  очень медленно выходит из клетки, что обусловлено нахождением внутриклеточного  $\text{K}^+$ , в отличие

от  $\text{Na}^+$ , в связанном состоянии, причем одна часть катионов уравновешена  $\text{Cl}^-$ , а другая – органическими анионами [1510]. Внутриклеточная концентрация хлорид-иона меньше, чем наружная. Селективное накопление неорганических ионов требует меньших энергетических затрат, чем синтез осмолитов *de novo*, что важно в условиях высоких затрат для выживания в гиперсоленой среде [1508]. Другие низкомолекулярные компоненты (аминокислоты, фосфаты) выявлены в клетках в незначительных количествах [1511].

Протеом NRC-1 содержит высокую долю кислых белков (среднее pI около 4,2) с преобладанием аспарагиновой и глутаминовой кислот при низком содержании щелочных и гидрофобных, что необходимо для стабилизации белков и адаптации в условиях высокой концентрации соли в среде [1501, 1503]. Ферменты галофилов работают при высоких солевых концентрациях, при которых аналогичные ферменты других организмов теряют активность. Однако некоторые белковые комплексы, включая бактериородопсин, нечувствительны к изменению концентрации соли.

В отличие от экстремофилов, умеренные галофилы накапливают в цитоплазме высокие количества специфических органических осмолитов – водорастворимые сахара (трегалоза), многоосновные спирты (глицерин), аминокислоты и их производные (эктоин, глюкозилглицерин), которые функционируют не только как осмопротекторы, обеспечивая осмотический баланс без прерывания нормального метаболизма клетки, но и как криопротекторы, защищающие клетки от замораживания-размораживания, лиофильного высушивания, нагревания. Культуры штаммов *H. salinarum* хранятся на агаризованной среде до года при 4 °C и длительно – в стеклянных ампулах в лиофилизированном виде. Оптимальная температура для роста – (40 ± 2) °C.

Клеточная оболочка ГБ состоит из клеточной мембраны и двух наружных белковых слоев. Внешний слой, называемый S-слоем, представляет собой совокупность частиц белковой или гликопротеиновой природы, правильно упакованных в гексагональные структуры и богатых кислыми аминокислотами, и идентифицирован как клеточная стенка [1503]. По структуре гликопротеин сходен с поверхностными гликопротеинами клеток эукариот [1512]. Гликопротеины составляют 40–50% от общего белка S-слоя и придают клеточной стенке стабильность и жесткость, остальное – это около 20-ти различных белков меньшего размера [1512].

Еще одной важной характеристикой организмов р. *Halobacterium* является отсутствие в клеточной стенке мурамовой и диаминопимелиновой кислот [1513], столь важных компонентов пептидогликана у негалофилов.

Между внешним белковым слоем и клеточной мембраной находится внутренний белковый слой толщиной 20 ангстрем, отделенный от внешнего пространством

шириной 65 ангстрем [1514]. Понижение концентрации NaCl в окружающей среде до 2 М ведет к дезинтеграции обоих белковых слоев.

Клеточная мембрана галобактерий имеет структуру ассиметричного белкового бислоя, содержит по массе около 1/3 липидов и 2/3 разных гидрофобных белков, включая флавопротеины и цитохромы, проникающих глубоко в липидный слой [1514]. Сплошной липидный слой пронизан большим количеством пор, образованных функциональными белковыми структурами.

Липиды мембран галобактерий необычны. Они почти не содержат азота. В их состав вместо жирных кислот входят жирные спирты, которые не содержат двойных связей, из них наибольшую долю составляет C<sub>20</sub>-терпеноидный спирт – фитанол, состоящий из 4-х остатков изопрена [1511, 1512]. Жирные спирты связаны с глицерином постой эфирной связью [1503]. В основном это фосфолипиды – диэтиловые аналоги фосфатидилглицерофосфата и фосфатидилглицеросульфата, фосфатидилглицерин; полярные липиды представлены гликолипидами [1511, 1512, 1515]. Фосфолипидные и гликолипидные производные глицеринового диэфира могут в определенных условиях составлять до 80% общего содержания липидов в клетках. Эти липиды архебактерий – общая черта среди архей. Они помогают стабилизировать мембраны в экстремальных условиях.

Помимо уникальных липидов клеточные мембраны экстремальных галофилов содержат много каротиноидов, основные из которых C<sub>50</sub>-каротиноиды – бактериоруберины, составляющие 94–99% от всех каротиноидов [1503, 1516]. Остальное количество приходится на их C<sub>40</sub>-предшественники – фитоен, фитофлуен, ликопин, а также бета-каротин – предшественник C<sub>20</sub> изопреноидного ретиналя, входящего в состав бактериородопсина. Содержание каротиноидов и их предшественников в клетках галобактерий обычно велико.

Синтез каротиноидов происходит интенсивнее в клетках, освещенных синевioletовым светом с длиной волны 380–450 нм, и менее интенсивно при освещении красным светом с длиной волны 590 нм. Значительную роль в синтезе каротиноидов в клетке играют содержащиеся в среде глицерин и глюкоза. В частности, глюкоза стимулирует синтез бактериоруберинов [1517].

Присутствие каротиноидов, в первую очередь C<sub>50</sub>-соединения –  $\alpha$ -бактериоруберина или его производных, а также фиолетового (пурпурно-сиреневого) бактериородопсина обуславливает окраску колоний и биомассы галобактерий в красный (бактериоруберин), оранжевый и бледно-морковный (бета-каротин) или фиолетовый (бактериородопсин) цвета [1514]. Галофилы не выделяют красителей в среду обитания, а окраску водоемам придают сами окрашенные микроорганизмы. Соль, полученная из таких озер, также окрашена в оранжево-красный цвет.

Каротиноиды у галобактерий выступают антиоксидантами [333, 635, 636, 638], защищающими клетки от повреждающего действия коротковолновой части спектра солнечного излучения, достигающего поверхности земли, которому они подвержены в естественных условиях обитания с высокой освещенностью [1501, 1518]. Однако имеются сообщения [333, 638, 657], что каротиноиды в определенных условиях приобретают прооксидантные свойства. При взаимодействии их как антиоксидантов с активными формами кислорода в реакциях окисления – дезактивации могут образовываться токсичные соединения.

Несмотря на то, что галобактерии синтезируют довольно типичный для бактерий набор витаминов: А, β-каротин, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>12</sub>, Вс, Н, Е, природный витаминный комплекс клеток галобактерий практически невозможно полноценно заменить отдельными искусственно синтезированными соединениями или их смесью. Соответственно, биомасса галобактерий может рассматриваться как источник уникального сбалансированного комплекса природных витаминов и микроэлементов. Содержание витаминов в биомассе обычно мало зависит от условий выращивания галобактерий.

Рост галобактерий сильно зависит от условий инкубационной среды – ее состава, физических параметров, освещения, интенсивности аэрации.

Штаммы галобактерий, используемые в научных и практических целях, отличаются требовательностью к составу органических компонентов питательных сред. Основным источником углерода для большинства экстремальных галофилов служат аминокислоты [1500, 1507, 1519], углеводы используются незначительно, среда становится щелочной в результате дезаминирования и/или декарбоксилирования аминокислот.

Качество и состав аминокислот сильно влияют на рост галобактерий. Источниками аминокислот являются гидролизаты белков или биомассы микробного, животного или растительного происхождения. В качестве таковых обычно используются гидролизаты казеина, пептон или триптон [1500, 1507, 1519, 1520], а также источники ростовых факторов – дрожжевой экстракт и другие. Применяемые в биологической промышленности сухой пептон или триптон являются продуктами ферментативного гидролиза белков. При приготовлении пептона и триптона глубина и степень гидролиза трудно регулируется, поэтому в различных марках пептона и триптона для бактериологических целей соотношение компонентов неодинаково, что сильно влияет на показатели роста и биосинтеза [1507, 1521]. Замена на более дешевые гидролизаты с неконтролируемым составом, как правило, снижает показатели биосинтеза, но может быть оправдана по экономическим причинам.

Другой вариант заключается в использовании синтетических сред с контролируемым составом минеральных солей, аминокислот и других ростовых факторов [1507, 1519, 1520, 1522-1524]. Подходит ростовая среда, содержащая десять аминокислот: аргинин, валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, серин, тирозин, треонин, фенилаланин [1520]. Модифицированная синтетическая среда, обеспечивающая хороший рост всех экстремальных галобактерий помимо неорганических солей содержит 15 аминокислот, 2 нуклеотида (аденозин и уридин) и глицерин [1520, 1524].

Из аминокислот наиболее важными компонентами для роста галобактерий являются аргинин, валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин [1522]. 4 аминокислоты (аргинин, лейцин, лизин, валин) обязательны, остальные стимулируют рост.

Во многих случаях питательная среда часто содержит глицерин в качестве дополнительного источника углерода. Небольшие добавки глицерина (0,1–1%) стимулируют рост галобактерий [1519, 1525].

Нуклеиновые компоненты положительно влияют на рост только при нехватке в среде источников фосфатов [1520]. Галобактерии обычно не метаболизируют углеводы [1500]. Из витаминов наиболее важными являются тиамин, фолиевая кислота, биотин [1507].

Вместе с тем, высокая стоимость качественных компонентов питательных сред – источников аминокислот и витаминов, обуславливают маловероятность применения синтетических сред (композиций) в производственных масштабах.

Источником фосфора для галобактерий могут быть неорганические фосфаты. При выращивании на комплексных средах фосфатные остатки нуклеотидов, содержащихся в триптоне и дрожжевом экстракте (так называемый органический фосфор), могут так же эффективно использоваться, как и неорганические. Галобактерии способны аккумулировать фосфаты в форме орто- и полифосфатов [1479].

Для экстремальных галофилов возможна частичная замена иона  $\text{Na}^+$  на  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . При отсутствии калия клетки экстремальных галофилов не растут. Их потребность в ионах  $\text{K}^+$  лишь немного выше, чем для большинства других организмов и составляет от 0,05 до 0,1 г/л  $\text{K}^+$  (0,0013–0,0025 М). Калий в количестве 1 г/л (0,025 М) необходим для максимального роста галобактерий на синтетической среде. При этом не отмечалось ингибирования роста при концентрации калия до 3 М [1507].

Экстремальные галофилы требуют для хорошего роста необычно высокие концентрации  $\text{Mg}$  (0,1–0,5 М) [1499], ингибирования роста не наблюдалось до концентраций магния 3 М. При концентрациях магния ниже 0,01 М палочки галобактерий превращаются в кокки.

Для роста галобактерий необходимы микроэлементы:  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , как кофакторы некоторых их специфических ферментных систем. Оптимальная концен-

трация ионов  $\text{Fe}^{2+}$  – 0,5 г/л. Стимулирующий эффект  $\text{Mn}^{2+}$  отмечается при концентрациях 0,05 г/л [1494, 1507]. Микроэлементы вносятся в среду в виде солей, однако основную потребность в микроэлементах обеспечивают источники ростовых факторов.

Галобактерии преимущественно аэробы, но могут переносить и очень низкое содержание кислорода в среде и использовать энергию Солнца даже при полном отсутствии кислорода [1526].

Галофильные микроорганизмы имеют три энергетические системы: цепь дыхания – окислительное фосфорилирование, фотофосфорилирование с использованием имеющейся фотохимической системы на основе белка бактериородопсина и фосфорилирование при ферментации аргинина [1499, 1510, 1527]. Первые две системы имеют наибольшее физиологическое значение. В аэробных условиях АТФ образуется за счет функционирования цикла трикарбоновых кислот и переноса электронов через электрон-транспортную цепь [1527]. В ЦПМ обнаружены цитохромы *b*, *c*, а также цитохромоксидаза *o*-типа, участвующие в аэробном дыхании галобактерий. Электроны в дыхательную цепь поступают с НАД-зависимых дегидрогеназ. При высокой концентрации кислорода и затемнении культуры, клетки растут хорошо, но пурпурные мембраны при этом практически не образуются.

Фотофосфорилирование, обусловленное функционированием бактериородопсиновой системы, – единственный пример превращения энергии света в химическую энергию АТФ без участия электрон-транспортной цепи. У галобактерий оно выполняет важную физиологическую функцию, обеспечивая энергией клетки, находящиеся в среде с низким парциальным давлением кислорода. При отсутствии освещения среды, но при высоком парциальном давлении кислорода бактерии возвращаются к аэробному окислительному фосфорилированию [1528]. Способность переходить от аэробного дыхания к фотофосфорилированию является очень важной экологической функцией, поскольку в сильно соленой воде растворимость кислорода в несколько раз ниже, чем в пресной – 9,1 мг/л в пресной при 20 °С и 1,7 мг/л при содержании соли в количестве 260 г/л [1529].

В анаэробных условиях в темноте после истощения остатков кислорода уровень АТФ быстро истощается, клетки теряют подвижность. Однако так же быстро уровень АТФ восстанавливается до 30% от начального количества АТФ. В этих условиях клетки выключают большинство своих энергопотребительных функций, прежде чем резерв АТФ будет истощен. Источником энергии может служить анаэробное дыхание с использованием  $\text{NO}_3^-$  в качестве конечного акцептора электронов, а также процесс сбраживания аргинина и цитрулина. При появлении кислорода, света или аргинина в среде дыхание или фосфорилирование в качестве источника энергии быстро реактивируются, клетки восстанавливают подвижность [1527]. Наличие

трех систем преобразования энергии поддерживает динамическое равновесие между системами фосфорилирования на постоянном уровне и позволяет выживать галобактериям в различных экстремальных ситуациях.

При культивировании галобактерий в стандартном периодическом режиме наиболее высокое внутриклеточное содержание бактериородопсина наблюдается в поздней фазе роста, при высокой плотности клеток в культуральной жидкости, в микроаэрофильных условиях и освещении среды, при этом клетки, культивируемые на свету, содержат в 6–7 раз больше ПМ, чем темновая культура [1530]. Аналогичные условия способствуют накоплению БР в проточном режиме культивирования с низкой скоростью разбавления [1408, 1531].

Аэробные условия способствуют накоплению каротиноидов, прежде всего бактериоруберина. Понижение концентрации кислорода в среде культивирования и освещение переключают метаболизм галобактерий на синтез БР [1157, 1530, 1531, 1532]. Синтезируемый опсин контролирует синтез бактериородопсина, ингибируя собственный биосинтез и стимулируя трансформацию ликопена в  $\beta$ -каротин и последующее образование ретиналя, взаимодействующего, в свою очередь, с опсиновой частью БР. С другой стороны, повышение содержания бактериородопсина снижает концентрацию опсина и тем самым снимает репрессию опсином и одновременно снижает скорость образования  $\beta$ -каротина [1533]. В свою очередь, количество синтезированного ретиналя может регулировать образование БР.

Увеличение количества БР в клетке ведет к росту содержания АТФ, образование АТФ за счет дыхания снижается, потребность в кислороде уменьшается. Однако полное отсутствие кислорода в среде сильно затормаживает или полностью прекращает окислительные процессы в клетках, необходимые для их жизнедеятельности, перехода  $\beta$ -каротина в ретиналь и образования бактериородопсина.

Уровень освещения среды обитания также влияет на физиологию и метаболизм галобактерий, регулирует факультативный анаэробный и фототрофный рост, фототаксис, образование газовых везикул, циркадные ритмы, фоторепарацию [1503, 1534]. При индукции фототрофного роста одновременно с накоплением БР повышается содержание газовых везикул в клетках, а с этим их плавучесть и движение клеток к поверхности и свету, развивается сенсорный аттрактантный или репеллентный ответ, в котором участвуют сенсорные родопсины и переносчики сигнала [1527].

В микроаэрофильных условиях освещенная культура галофилов растет быстрее темновой, что обусловлено образованием АТФ за счет функционирования бактериородопсиновой помпы. При перенесении световой культуры, выращенной при лимитированной аэрации, в темноту без изменения кислородного режима, наблюдается снижение скорости роста, поскольку бактериородопсиновая помпа перестает функ-

ционировать. В присутствии света одновременно повышается и содержание бактериоруберина, и конверсия  $\beta$ -каротина в ретиналь. В то же время для клеток, выросших в аэробных условиях и не содержащих бактериородопсина, уровень освещенности не влияет существенно на скорость роста.

Помимо зависимости от интенсивности освещения, скорость роста клеток весьма чувствительна и к длинам волн света. Так, максимальная скорость отмечена при 540–610 нм, что совпадает с максимумом поглощения бактериородопсина – 570 нм. Однако сам синтез БР интенсифицируется при 475 нм.

Традиционный подход к совершенствованию методов культивирования галобактерий основан на подборе и оптимизации питательных сред и условий ферментации. Надо учесть, что достижение высоких показателей биосинтеза за счет повышения удельного содержания БР в клетках ограничивается площадью пурпурных мембран (не более 50–70% от площади клеточных мембран), поэтому основные усилия сосредоточены на повышение выхода и уровня накопления биомассы галобактерий, выращиваемой в режиме синтеза бактериородопсина.

В качестве примера можно отметить работу по оптимизации состава питательной среды статистическими методами планирования эксперимента [1493], в которой основными факторами оптимизации выступали органические компоненты питательной среды – источники энергии, аминокислот и ростовых факторов. Оптимизация позволила повысить уровень накопления бактериородопсина в условиях обычного периодического культивирования с 67 мг/л до 190 мг/л – в колбах и до 235 мг/л – в биореакторе по сравнению с базовой средой. В другом исследовании [1535] удалось повысить выход биомассы (в 2,4 раза), а с этим и синтез БР путем оптимизации состава питательной среды и внесения желатина и растворимого крахмала. Авторы связали этот эффект с поглощением внесенными компонентами желчных кислот (таурохолиновой кислоты, деоксихолиновой кислоты и других), которые могут присутствовать в источнике ростовых факторов (пептоне, триптоне, дрожжевом экстракте) и сильно угнетают рост галобактерий [1536-1538].

В статье корейских авторов [1539] приводятся результаты культивирования галобактерий *Halobacterium salinarum* R1 в мембранном биореакторе. Для удержания клеток использовался выносной модуль с полым волокном из полисульфона с пределом отсечения 500000 Да. На 10-ые сутки культивирования была достигнута концентрация клеток галобактерий в среде 30,3 г асв/л, а бактериородопсина – 282 мг/л. Продуктивность по бактериородопсину достигла 1,15 мг/л.ч, что намного выше, чем в стандартном периодическом режиме с временем ферментации 3–5 дней, концентрацией биомассы около 0,9–1,8 г/л, продуктивностью 0,16 мг/л.ч [1406]. Авторы заключили, что рост клеток галобактерий в периодическом режиме ингибируется

накапливающимися продуктами метаболизма, одним из которых может быть ацетат. Вместе с тем надо отметить, что при использовании данного способа по-прежнему наблюдались невысокий уровень удельного накопления бактериородопсина в биомассе галобактерий, наличие большого количества каротиноидов, большой расход питательной среды.

Другой весьма эффективный подход связан с получением и использованием рекомбинантных продуцентов БР и его модифицированных форм.

На генетическом уровне за синтез БО и БР ответственен *bop*-кластер. Этот кластер состоит из генов *bop* (бактериоопсин), *brp* (bacterioopsin-related protein), *bat* (bacterioopsin activator), а также включает гены *crtB1*, *blp*, *blh*, вовлеченные в синтез хромофора, генетическую регуляцию и биогенез мембран. Эти гены составляют единый регулон, контролируемый геном *bat*. Последний может включать несколько дополнительных регуляторных генов – аналогов *bat*. Экспрессия *bat*-гена зависит от окислительно-восстановительного состояния внутриклеточной среды, индуцируется низкой концентрацией растворенного кислорода, а продукт *bat*-гена, в свою очередь, активирует экспрессию структурного *bop*-гена. Свет индуцирует транскрипцию *brp*, который стимулирует или модулирует транскрипцию *bat* и конверсию β-каротина в ретиналь [1505, 1532, 1534, 1540, 1541]. Такая тонкая регуляция позволяет клеткам поддерживать оптимальную концентрацию БР при изменении экологических условий. Использование методов направленного мутагенеза в *bop*-гене, в регуляторных генах, рекомбинантных ДНК позволило получить штаммы галобактерий с большим разнообразием функциональных свойств.

Надо учитывать, что в экологической среде обитания ГБ с высокой соленостью, засушливостью, повышенными температурами, зачастую недостатком кислорода, интенсивным освещением и воздействием ультрафиолетового излучения Солнца и активными формами кислорода наблюдаются различные стрессовые воздействия на живые клетки микроорганизмов (температурное, оксидативное, осмотическое, голодание, высушивание, изменение pH, воздействие метаболитов – ингибиторов биосинтеза). Обитая долгое время в таких условиях, ГБ выработали разнообразные механизмы ответа на внешние воздействия и чувствительные системы регуляции (системы репарации, каротиногенез, индуцируемые продуктами химического и фотохимического окисления и образуемыми перекисными и радикальными частицами и др.), позволяющие им успешно адаптироваться к изменениям во внешней среде [586, 1498, 1515]. Клетки галобактерий весьма устойчивы также к повышенным дозам радиации и к небезопасным для других организмов веществам. Можно предположить, что системы ответа на такие стрессы могут быть в числе наиболее значимых, управляющих метаболизмом ГБ и синтезом компонентов ГБ.

*H. cutirubrum* является организмом довольно устойчивым к УФ-излучению: УФ-поток с  $\lambda=254$  нм при 1% выживаемости составляет 250 Дж/м<sup>2</sup> по сравнению с 40 Дж/м<sup>2</sup> для дикого штамма *E. coli*. Высокая устойчивость к ультрафиолету может быть объяснена высоким содержанием пар GC (около 68%) в ДНК галобактерий. Это уменьшает образование пиримидиновых димеров, но с другой стороны способствует образованию 6-4 фотопродуктов [1070, 1542].

В галофильных бактериях функционирует ряд неферментативных механизмов снижения содержания АФК, в которых могут участвовать ионы  $\text{Cl}^-$ , осмопротекторы (бетаины, глицерин, пролин, глицинбетаин) и жирные кислоты. Но наиболее важную роль в защите от химического и фотохимического окисления активными формами кислорода и УФ-радиации выполняют каротиноиды [333, 586, 635, 636, 638], особенно бактериоруберин [1543, 1541] из-за его высокого содержания в клетках галобактерий. Определенной антирадикальной активностью обладает бактериородопсин.

Галобактерии содержат марганецзависимую супероксиддисмутазу [717]. Интересно, что ген СОД расположен близко к гену, кодирующему фотолиазу [710, 711, 717, 1071], – фермент фоторепарации. Оба фермента могут транскрибироваться одновременно или независимо, индуцируясь различными факторами, такими как  $\text{O}_2$  или УФ-свет [1071]. Такая особенность индукции обоих ферментов уникальна для галобактерий, поскольку у других прокариот она не обнаружена.

Каталаза галобактерий имеет заметное сходство с каталазой бычьей печени по молекулярной массе и кинетическим свойствам. Ее активность максимальная при 1 М NaCl [1544, 1545].

Пероксидаза галобактерий обладает и слабой каталазной активностью. Фермент устойчив только в присутствии высокой концентрации соли и имеет максимальную активность при 3 М NaCl [722].

Также у галобактерий найдена и очищена каталаза-пероксидаза [721]. Ее активность максимальна при 1 М NaCl (пероксидазная активность) и 2 М NaCl (каталазная активность). Фермент термостабилен и сохраняет свою активность вплоть до 80–90 °С.

Уровень СОД возрастает в аэробных условиях [717, 1071], при повышении температуры до 50–60 °С и при гипоосмотическом стрессе [912]. Уровень СОД, каталазы и пероксидазы повышается при внесении 20 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среду с растущими клетками [586].

У *H. salinarum* JW5 выявлен и изолирован железо-связывающий белок DpsA, принадлежащий структурно к семейству белков ферритинов, но отличающийся от них по функциям и регуляции. Увеличение экспрессии гена *dpsA* наблюдается в условиях среды, богатой железом, и в условиях окислительного стресса, что отличает

белок DpsA от белков-ферритинов у других бактерий, которые синтезируются при дефиците железа в среде [1546].

Наряду с отмеченными ферментами в защите ДНК от фотооксидативных повреждений у галобактерий могут участвовать гликозилазы, AlkA, MutT, глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) и ряд других [1547].

*H. salinarum*, как экстремальный галофил, обладает мощной системой репарации ДНК, намного более активной, чем у умеренных галофилов и галотолерантных микроорганизмов [627, 1072].

Из наиболее важных систем репарации у *H. salinarum* функционирует эксцизионная репарация [1072, 1542, 1547, 1548] и фоторепарация, катализируемая фотолиазой [1070, 1542, 1547, 1549, 1550]. Эксцизионная репарация эффективна в репарации 6-4 фотопродуктов [1072, 1542, 1547].

У галобактерий *H. salinarum* и *H. cutirubrum* выявлены две фотолиазы Phr1 и Phr2. Фотолиаза Phr2 относится к 8-гидрокси-5-дезафлавиновому типу. Максимальная активность фермента наблюдается при 440 нм в 1 М NaCl [1070, 1550]. Фотореактивация с участием фотолиазы Phr2 наиболее эффективна в репарации циклопиримидиновых димеров. Она устраняет на свету более 50% всех повреждений в течение 30 мин [1542]. Фотолиаза Phr1 является паралогом фотолиазы Phr2 и может действовать как криптохром, контролируя циркадные ритмы в ответ на синий свет. Однако из-за того что фотолиазы не отличаются от криптохромов по их первичной аминокислотной последовательности, сложно сделать однозначный вывод об их участии в суточных циклах [1547].

Геном *H. marismortui* кодирует три аналога фотолиаза/криптохром, два из которых аналогичны *phr2* штамма *Halobacterium* NRC-1. Один из этих гомологов физически связан с единственным геном, кодирующим СОД *H. marismortui*. Это указывает на тесную связь систем репарации при повреждении ДНК под действием ультрафиолета, и их фотопродуктов, образующихся в среде обитания этих микроорганизмов [1547].

Анализ генома *Halobacterium* NRC-1 выявил наличие генов супероксиддисмутазы (*sod*), генов двух гомологичных дезоксирибодипиримидинфотолиаз/криптохромов *phr1* и *phr2*, принадлежащих к классу I семейства фотолиаз, и сопутствующих генов *pll*, генов эндонуклеаз *rad2*, *rad25a*, *rad25b*, *rad3a*, *rad3b*, *rad3c*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *uvdE*, участвующих в эксцизионной репарации нуклеотидов, генов эксцизионной репарации оснований (*ogg*, *mutT/mtl*, *mutY*, *urg*, *alkA*, *nfi*, *xthA*), генов гомологичной рекомбинации (*radA1-2*, *hjr*, *rbl*, *recJ*, *arj*), ДНК-рекомбиназ *radA1*, *radA2* (гомологов *recA*), негомологичных генов нуклеаз, геликаз, полимераз, участвующих в репарации посредством модификации концевых участков (*mre11*,

*rad50*, *EIF4A*, *polIV*), гена ДНК-полимеразы *umuC* с байпасной активностью, игнорирующей поврежденные участки, генов АТФ-зависимых лигаз, а также гомологичных генов мисмэч репарации (*mutS1*, *mutS2*, *mutL*) [1503, 1505, 1547]. Кроме того, у *Halobacterium marismortui* выявлены CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) участки наряду с CRISPR-ассоциированными *cas*-генами (*cas2*, *cas1*, *cas3*, *cas4*). У штамма *Halobacterium* NRC-1 CRISPR-CAS система не выявлена. Также не выявлена система SOS-ответа [1547].

Обобщая рассмотренные особенности галобактерий, можно указать на следующие наиболее важные моменты, которые необходимо учитывать при совершенствовании процессов их культивирования.

1) Специфика обитания, фототрофность, способность переносить экстремальные условия обуславливает разнообразие в плане ответа галобактерий, таких как *Halobacterium salinarum*, на различные факторы, которыми можно воспользоваться с целью управления процессом культивирования *in vitro*. Такими факторами выступают состав питательной среды, излучения различных длин волн, доступность субстрата, концентрация растворенного кислорода, стрессовые воздействия.

2) Галобактерии показывают разнообразие ответов на свет, включая фототрофный рост, фототаксис, регуляцию циркадных ритмов и механизмы фотозащиты. Регулирование количества газовых везикул и фототаксис, обусловленное восприятием света сенсорными родопсинами SR1 и SR2 и жгутиковым аппаратом клеток, способствуют перемещению галобактерий в оптимальные условия фотофосфорилирования в случае синтеза пурпурных мембран. Синтез каротиноидных пигментов защищает клетки от повреждающего действия коротковолновой составляющей Солнца, достигающей поверхности земли.

3) Штаммы галобактерий отличаются требовательностью к составу органических компонентов питательных сред и условиям культивирования, нестабильностью синтеза и невысоким выходом бактериородопсина (не более 5–7% от массы клеток галобактерий).

4) Наблюдаемые при стандартном культивировании неудовлетворительные воспроизводимости и нестабильность результатов, зачастую плохой рост галобактерий, вариабильность в морфологии и цвете колоний и клеток могут быть обусловлены особенностями их как экстремофилов, нестабильностью клонов, генетическими перестройками, большой зависимостью от условий среды обитания и состава компонентов питания в среде, наличием в ней нежелательных примесей.

5) Существует очевидный предел продуктивности по бактериородопсину для штаммов галобактерий: площадь пурпурных мембран не может превышать 50–70% площади поверхности клеток. Это означает, что повысить эффективность биосинте-

за БР возможно только путем повышения уровня накопления биомассы, скорости роста, конверсии ростовых факторов в клеточную массу. Промышленные штаммы продуцентов бактериородопсина и режимы культивирования должны отличаться минимальным накоплением в биомассе каротиноидов, мешающих выделению и очистке БР в составе пурпурных мембран и снижению его стоимости.

б) При высокой концентрации соли растворимость кислорода в концентрированной среде невысокая и может существенно ограничивать обеспечение культуры кислородом. Также необходимо учесть агрессивную природу среды с солью, что требует изготовления ферментационного оборудования, датчиков и т.п. из коррозионностойких материалов. Такие реакторы могут быть изготовлены из поликарбоната и других полимерных материалов.

### **3.1.5. Культивирование рекомбинантных штаммов – трансформантов по рибофлавиновому оперону**

Исследования с рекомбинантными штаммами микроорганизмов проводились на примере бациллярных трансформантов по оперону синтеза рибофлавина.

#### **3.1.5.1. Свойства рибофлавина как фотосенсибилизатора и вещества с антиоксидантной и прооксидантной активностью**

Рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>, 6,7-Диметил-9-(D-1-рибитил)-изоаллоксазин) – водорастворимое соединение, основной функцией которого в клетке является его участие в качестве прекурсора в синтезе флавиновых коферментов (FMN и FAD). Флавопротеины принимают участие в регуляции окислительно-восстановительного потенциала клетки.

Рибофлавин плохо растворяется в воде (1 г в 3–15 литрах воды в зависимости от кристаллической структуры) и спирте, но достаточно хорошо растворим в разбавленных растворах щелочей, образуя ярко-желтый или оранжевый флуоресцирующий раствор с максимумом флуоресценции при 565 нм. В нейтральных и кислых растворах и в темноте рибофлавин относительно устойчив – за месяц хранения при рН 6,0 и 27 °С сохраняется в неизменном виде 97% рибофлавина. Эти растворы устойчивы к нагреву, окислению, кислотам и перексиду водорода. Кислые растворы могут быть стерилизованы автоклавированием. Щелочные растворы рибофлавина нестабильны.

В отсутствие кислорода рибофлавин восстанавливается в 1,5-дигидрорибофлавиновую форму.

В клетке совместно с глутатионредуктазой рибофлавин участвует в поддержании достаточного уровня глутатиона GSH и, таким образом, обладает антиоксидантным действием. Часто рибофлавин опосредованно через GSH участвует в гашении активных форм кислорода и тем самым предотвращает перекисное окисление липидов мембран [1551].

Рибофлавин нестабилен в присутствии солей железа, меди и солнечного света, особенно его УФ части спектра диапазона 350-400 нм [623]. В этих условиях он может распадаться в течение нескольких часов с образованием рибитил-оксохиноксалевой кислоты, 8- $\alpha$ -гидроксирибофлавина, формилметилфлавинацеталя, люмихрома, люмифлавина и др. Скорость распада более высока при высоких температурах и в растворах низкой концентрации.

Рибофлавин сам по себе является эндогенным фотосенсибилизатором и прооксидантом [1101], что может использоваться в практических целях, например, для стимулирования корневого дыхания, фотосинтеза и роста растений [1552], при накожном применении кремов, содержащих рибофлавин совместно с антиоксидантами, для усиления загара [1553].

Как компонент среды культивирования рибофлавин может являться источником свободнорадикальных частиц [623, 1554, 1555]. В водном растворе он образует комплексы с различными ионами металлов и аминокислотами, что важно, так как некоторые из этих комплексов переходят в токсичные субпродукты при освещении. Прием витамина B<sub>2</sub> в больших количествах может способствовать развитию катаракты у человека.

Присутствие рибофлавина усиливает повреждающее действие УФ-радиации на ДНК. Фотовозбужденный рибофлавин проявляет мутагенные свойства и реагирует с dGMP с образованием анион-радикала рибофлавина и катион-радикала гуанина [371, 625].

Комплексы рибофлавина с триптофаном и тирозином в условиях освещения обладают токсичностью [624]. В присутствии тирозина или триптофана рибофлавин на свету распадается с образованием в качестве субпродукта пероксида водорода и других АФК. Пероксид водорода формируется медленнее в отсутствие тирозина и триптофана при деградации рибофлавина [371, 624]. В дополнение к пероксиду водорода комплекс рибофлавина с триптофаном может генерировать синглетный кислород, который, окисляя гистидин, метионин и тирозин, приводит к образованию их токсичных субпродуктов. При интенсивном освещении и в присутствии кислорода токсические эффекты от образования комплексов резко усиливаются [623]. В анаэробных условиях образование рибофлавин-триптофан аддуктов ингибируется в кислой среде и при добавлении анионных (додецилсульфат натрия) или катионных (це-

тилтриметиламмоний бромид) мицелл. Окисление триптофана, фотоиндуцированного рибофлавином, существенно интенсивнее в щелочных растворах [624].

Очевидно, в аэробных условиях ферментации продуцентов рибофлавина последний, как целевой продукт биосинтеза, может, с одной стороны, подвергаться распаду и модификации, с другой – выступать как фактор генерации свободных радикалов в составе многих сред, особенно при освещении, т.е. обладает прооксидантным и стрессовым действием в отношении клеток микроорганизмов. Такое воздействие может усиливаться при сверхпродукции рибофлавина. Вероятно, клеточный ответ в этом случае будет аналогичен ответу на оксидативный стресс, с ингибированием биосинтеза, изменением скорости реверсии рекомбинантных штаммов к дикому типу и резкому снижению продуктивности по рибофлавинову. Исследование прооксидантного действия рибофлавина может быть интересно с точки зрения моделирования условий и изучения отклика популяции микроорганизмов при ведении биосинтеза с комбинированным действием стрессоров и антистрессоров и управления уровнем биосинтетической активности продуцента.

### **3.1.5.2. Биохимические и генетические особенности синтеза рибофлавина у рекомбинантного продуцента *Bacillus subtilis***

В генетическом и биохимическом отношении биосинтез рибофлавина лучше всего изучен у *B. subtilis*. Согласно имеющимся на сегодняшний день данным, в бактериях, как в грамположительных так и в грамотрицательных, рибофлавин синтезируется в пять стадий. Предшественником рибофлавина служит гуанозин-5-фосфат (ГТФ) и рибулозо-5-фосфат или его метаболит. Синтез рибофлавина подавляется при добавлении в среду экзогенного рибофлавина и его производных FMN и FAD. У *Bacillus subtilis* часть внутриклеточного пула флавинов всегда находится в восстановленной форме, причем субстратами для флавокиназы/FAD-синтазы и флавокиназы являются восстановленные формы рибофлавина и FMN. У *B. subtilis* рибофлавин и его производные в составе флавопротеинов участвуют в декарбоксилировании пирувата и  $\alpha$ -кетоглутарата, окислении жирных кислот, синтезе пиридоксальфосфата, катаболизме триптофана и *red/ox*-вариабельности глутатиона [1551].

Повышению ферментативной активности и интенсификации синтеза рибофлавина способствует более активное образование NADPH. NADPH образуется в окислительной части пентозофосфатного пути, в частности в первой реакции, катализируемой NADP<sup>+</sup>-зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой. Восстановленный NADPH ингибирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Превращение NADPH в окисленное состояние NADP<sup>+</sup> приводит к ослаблению ингибирования фермента. При

этом скорость соответствующей реакции возрастает, и образуется большее количество NADPH. То есть данный механизм отвечает принципу регулирования с положительной обратной связью: чем больше у клетки имеется потребностей в анаболических процессах и затратах NADPH, тем более интенсивно работает окислительная часть ПФП. Если потребности клетки в NADPH незначительны, то рибозо-5-фосфат образуется в результате обратимых реакций неокислительного этапа пентозофосфатного пути, используя в качестве исходных веществ метаболиты гликолиза – глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат [1556].

Рибофлавиновый оперон *B. subtilis* представляет собой группу из пяти структурных неперекрывающихся генов *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH*, *ribT*, транскрибируемых и регулируемых совместно как один *rib*-оперон. Также был обнаружен локус (*ribC*), не сцепленный с *rib*-опероном, мутации в котором существенно влияли на уровень экспрессии генов *rib*-оперона.

Транскрипция с основного промотора *rib*-оперона контролируется внутриклеточным уровнем FMN (и частично FAD) без участия каких-либо дополнительных белковых факторов, поскольку FMN может непосредственно связываться с лидерной мРНК и способствовать формированию терминирующей шпильки, в результате чего происходит подавление экспрессии структурных генов оперона. Как было установлено Мироновым А.С. и др. [1557-1559] такая модель регуляции транскрипции соответствует регуляции при помощи «рибо-переключателей» или «riboswitch».

Следует отметить, что оперонная структура генов биосинтеза рибофлавина у *B. subtilis* отличается от организации генов *rib*-оперона в *E. coli* и других грамм-отрицательных бактериях, в которых гены биосинтеза рибофлавина разбросаны по хромосоме в четырех или пяти несцепленных локусах.

Имеются данные о связи регуляции генов синтеза рибофлавина и окислительного стресса, индуцируемого у одноклеточных и многоклеточных организмов действием активных форм кислорода. Установлено [1560, 1561], что у *E. coli* экспрессия как минимум одного гена биосинтеза рибофлавина, а именно *ribA* (кодирует GTP циклогидролазу 2), контролируется SoxR/S системой регуляции, активация которой происходит в ответ на оксидативный стресс. Также под контролем данной системы находятся более 10 генов (ген глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, эндонуклеазы IV, фумаразы, ряд регуляторных белков). Система SoxR/S включает два белка SoxR (17 кДа) и SoxS (14 кДа), являющихся ДНК-связывающими белками. SoxR также содержит редокс активный железо-серный кластер [2Fe-2S]. Именно SoxR является чувствительным к окислителям элементом регуляторной системы. В условиях окислительного стресса SoxR переходит в окисленное состояние

и активирует транскрипцию гена *soxS*, который и является, в свою очередь, транскрипционным активатором генов, попадающих под контроль *soxR/S* системы.

Обобщая рассмотренные особенности, можно отметить, что у штаммов *B. subtilis* сверхпродукция рибофлавина обычно достигается благодаря интенсификации процессов пентозофосфатного пути, биосинтеза пуринов, дерегуляцией рибофлавинового биосинтеза и внедрением генетических конструкций [1558]. Также вполне возможно ожидать сходной активации промоторов (промотороподобных структур) рибофлавинового оперона и биосинтеза рибофлавина в условиях оксидативного стресса. Однако в связи с тем, что такой путь повышения активности продуцента рибофлавина до последнего времени практически не рассматривался, целесообразно остановиться на более детальном рассмотрении такой возможности.

Для *B. subtilis* агенты оксидативного можно условно разделить на две группы [1562]. В первую входят типичные генераторы АФК, способные восприниматься общим фактором стресса *sigB* и активировать выработку антиоксидантных ферментов [799]. Обычно это пероксиды, гипохлориты, плюмбагин, менадион и т.д. У *B. subtilis* пероксид водорода и его производные способны активировать регулоны стрессоустойчивости *perR*, *spx*, *ohrR*, *marR*, экспрессию генов биосинтеза антиоксидантов, в частности цистеина, метионина [612, 780-782, 798], а также вызывать переход к анабиозу и апоптозу, тормозя тем самым процессы репарации и самоподдержания.

Ко второй группе относятся неспецифические акцепторы электронов, действие которых связано с генерацией АФК косвенно. Обычно это вещества ароматической и гетероциклической природы: (паракват, дикват, пирогаллол, бензидин, нитрофурантоин и т.д.). Их распознают специфические регулоны сигнальной трансдукции (*sigM*, *pqr*); имеются данные о работе селективных систем резистентности [799, 884, 1562].  $\sigma^M$  – фактор локализован на цитоплазматической мембране и участвует вместе с сопряженными с ним ECF факторами в системе сигнальной трансдукции. Данная система репаративных генов активируется и при воздействии света видимой и ближней УФ-области [884].

Наиболее важную роль в *sigM*-регулоне играет белок *uqjL* [1562]. Он опосредованно активирует системы деградации пиридиновых колец параквата [1563]. Генетический ответ на PQ-индуцированный стресс проявляется на стадии инициации транскрипции. Также в *sigM*-регулоне имеются гены репарации ДНК (*radC*, *ypbG* и *recU*), экспрессируемые в условиях стресса.

У *B. subtilis* имеется система LOV (light, oxygen and voltage), то есть своеобразный преобразователь световой энергии в потенциал или энергию химической связи по аналогии с фототрофными организмами [882]. Основную роль играет белок *YtvA*-

флавопротеин (с коферментом FMN), рецептор синего света. Вероятнее всего имеются рецепторы и на другие области спектра, но надежные данные об этом отсутствуют. *YtvA* является частью *spx*-регулона, включающего гены факторов транскрипции и гены, ответственные за восстановление функций белков, поврежденных от оксидативного стресса. Имеются данные, что *YtvA* является позитивным регулятором транскрипции *sigB* – фактора общего стресса, который контролирует экспрессию индуцибельной каталазы, SOD и других систем устойчивости (*spx*, *ohr*). Через систему *spx*-регулона налажены регуляторные связи между *sig*-регулонами, в частности между *sigM* и *sigB*. То есть, возможно проявление синергетического действия вещества-прооксиданта и света на экспрессию генов, при котором прооксидант проявляет оксидантное воздействие, а свет усиливает это действие, обусловленное фотохимической трансформацией вещества-прооксиданта с усилением физиологической активности последнего. Аналогичные особенности могут наблюдаться и при влиянии рибофлавина на экспрессию репортерных генов.

### **3.1.5.3. Совершенствование ферментации при микробиологическом синтезе рибофлавина**

Микробиологический синтез рибофлавина ведут в типичных условиях периодического культивирования с аэрацией ферментационной среды от 16 до 72 ч, при температуре от 30 до 45 °С, рН – от 5 до 8. рН поддерживают, используя неорганические и органические кислоты и основания. Однако культивирование продуцентов рибофлавина является довольно «капризным» процессом, так как зависит от очень многих факторов, и незначительное их изменение может повлиять не лучшим образом.

Выход рибофлавина сильно зависит от аэрации, что, как было отмечено выше, может быть обусловлено прооксидантными свойствами рибофлавина, способствующего образованию АФК в этих условиях. Поэтому в каждом отдельном случае необходимо подбирать четко определенные условия. При небольшой или избыточной аэрации конечная концентрация целевого продукта может резко падать, что не соответствует утверждению, что чем лучше аэрация, тем больше выход рибофлавина.

Ряд селекционированных и рекомбинантных бактерий, дрожжей и микроскопических грибов: *B. subtilis*, *Candida famata*, *Ashbya gossypii* и другие могут выступать в качестве продуцентов рибофлавина [1564]. Для повышения выхода рибофлавина оптимизируют состав питательной среды и другие условия, реализуют процесс с подпиткой, используют различные варианты иммобилизации [1565-1567].

Так, согласно патенту [1566] биосинтез рибофлавина осуществляют с помощью дрожжей *Candida famata* АТСС 20849 в условиях высокоплотностного культивиро-

вания с подпиткой субстратом и лимитирования скорости роста биомассы в интервале от 2 до 20% от максимальной и соответственно биосинтеза рибофлавина добавляемыми компонентами питания (глюкозы) при pH 3,0–5,5, регулировании содержания неорганических источников азота, железа и меди. Найденные режимы культивирования снижают накопление этанола и арабитола, отношение выделяемого CO<sub>2</sub> к потребляемому кислороду и повышают выход рибофлавина от субстрата. В режиме подпитки концентрация субстрата поддерживается в интервале 1–5 г/л. Особенностью дрожжей является их устойчивость к повышенным концентрациям меди.

В патенте [1567] описан метод культивирования рибофлавин-продуцирующего микрогриба *Ashbya gossypii* ATCC10895, используя в качестве источника углерода растительный или животный жир, при котором синтез и накопление рибофлавина происходит с использованием носителя – минеральной глины, обладающей жирoadсорбционными свойствами. Рибофлавин затем отделяется химически или с помощью кальциевого компаунда. Способ обеспечивает высокий выход, скорость синтеза и выделения рибофлавина, а также эффективное потребление субстрата при оптимальном соотношении глины в водной фазе и компонентов жира от 20:1 до 5:1.

Наиболее активные продуценты рибофлавина получены на основе рекомбинантных штаммов *Bacillus subtilis*, обладающих сверхпродукцией рибофлавина. При использовании сложных питательных сред, а также при введении в ферментер углеродной подпитки достигают высоких плотностей популяции и уровней синтеза рибофлавина [1568-1570].

В ГосНИИгенетики проводились работы по созданию штаммов-сверхпродуцентов рибофлавина путем направленного внесения мутаций в *rib*-оперон. В результате были получены штаммы *B.subtilis* GM44/pMX45, *B.subtilis* GM51/pMX45, *B.subtilis* GM41/pMX45, содержащие рибофлавиновый оперон из *Bacillus amyloliquefaciens* на плазмиде и в хромосоме, способные к утилизации глицерофосфата в качестве единственного источника углерода, устойчивые к ингибированию роста глиоксилатом. Наиболее высокопродуктивный штамм был способен производить 9,6 г/л рибофлавина в течение 70 часов ферментации в колбах и 21 г/л рибофлавина в течение 70 часов ферментации в ферментерах объемом 1 л [1570].

Известны решения, когда накопление рибофлавина повышали в результате отбора клонов на стрессоустойчивость, в частности, к осмотическому давлению [1569].

Согласно патенту [1569], для биосинтеза рибофлавина используется мутант *Bacillus subtilis* СЖВ0001 с повышенной продуктивностью по рибофлавину и устойчивый к осмотическому стрессу, возникающему при высоких концентрациях сахаров в питательной среде и вследствие накопления продуктов метаболизма. Штамм получают, обеспечивая его устойчивость к аналогам пролина (тиопролину),

для того, чтобы повысить внутриклеточное накопление пролина, как осмопротектора. Штамм накапливал 8,0 г/л рибофлавина при культивировании в колбах и 26,8 г/л рибофлавина при культивировании в 5 л ферментере, что выше на 19,6% по сравнению с исходным штаммом, из которого был получен осмоустойчивый штамм.

Дикий тип *A. gossypii* показывал сверхэкспрессию рибофлавина после резкого уменьшения скорости разбавления в непрерывной культуре. Однако другие стрессовые воздействия (снижение аэрации, изменение температуры культивирования, внесение соли) не оказывало такого стимулирующего воздействия на биосинтез рибофлавина [1569].

Таким образом, при постановке экспериментов с продуцентом рибофлавина необходимо учитывать, что компоненты среды, включая рибофлавин, в аэробных условиях могут окисляться с образованием АФК, т.е. оказывать прооксидантное действие на микробные клетки [371, 623, 624]. Скорость образования таких продуктов может повышаться при освещении среды в результате фотосенсибилизации и фотоокисления. Важно учитывать стрессорное действие АФК и окисленных продуктов рибофлавина и двойственное действие света: антистрессорное через фоторепарацию и стрессорное через фотосенсибилизацию рибофлавина.

### **3.2. Биологическая очистка сточных вод**

В главе 1 были кратко изложены основные подходы к дальнейшему совершенствованию современных методов переработки отходов и биологической очистки сточных вод. Сами методы биологической очистки, их преимущества и недостатки, особенности их использования в решении экологических проблем были рассмотрены подробно нами в кн.: Кузнецов А.Е. и др. Прикладная экобиотехнология, 2010.

С точки зрения методологии управляемого культивирования микроорганизмов микробиологическая очистка сточных вод весьма несовершенна. Очевидно, это объясняется, во-первых, огромными потоками стоков, поступающих на очистку, что не позволяет их изолировать от окружающей среды и перерабатывать методами асептической ферментации, во-вторых, функционированием в очистных сооружениях сообществ микроорганизмов (активного ила, биопленок, гранул), а не чистых монокультур. Несмотря на эти особенности, подходы, апробированные для совершенствования ферментационных процессов, могут использоваться и в практике очистки сточных вод. Рациональное применение решений, найденных для совершенствования методов ферментации, здесь может иметь наибольшее практическое значение. В этой связи в нашей работе биологической очистке сточных вод, как объекту исследований, уделялось большое внимание.

Рассматривались следующие направления совершенствования биологической очистки и их сочетания:

- локальная биологическая очистка стоков с высокой концентрацией загрязнений, токсичных веществ в биореакторах;
- переработка органических отходов анаэробно-аэробным методом;
- повышение окислительной мощности (производительности) биореакторов;
- повышение эффективности удаления загрязнений;
- повышение биодоступности органических отходов и загрязнений;
- уменьшение количества вторичных отходов;
- энергосберегающие решения;
- эффективное удаление избытка азота и фосфора.

Как и в исследованиях процессов биосинтеза, особое внимание было уделено способам очистки с использованием пероксида водорода. Это было обусловлено несколькими причинами:

1. Поскольку  $H_2O_2$  играет важную роль в процессах самоочищения в природе, в частности, в замкнутых водоемах, то предполагалось, что его использование, воспроизведение процессов самоочищения в техногенных средах приведет к повышению качества очистки сточной воды, снижению образования вторичных отходов (избыточной биомассы).

2. Апробация варианта повышения биодоступности стойких поллютантов и улучшения показателей очистки при сочетании химических/фотохимических и биологических процессов.  $H_2O_2$  в таком случае может выступать как химический агент, окисляющий и переводящий стойкое соединение в его биодоступную форму.

3. Апробация и развитие предложенного нами подхода «контролируемый оксидативный стресс» применительно к биологической очистке сточных вод. В частности, комбинированное, сочетанное воздействие  $H_2O_2$  и видимого света представлялось наиболее удобным вариантом с методической, технологической и экологической точек зрения, в наибольшей степени воспроизводящим природные условия на твердых и водных освещаемых поверхностях.

4. Предположением о возможной роли  $H_2O_2$  как регулятора физиологического состояния микробных популяций, рассмотренной в главе 2.

С целью разработки более эффективных интенсивных систем биодеструкции органических загрязнений, содержащихся в стоках в различных концентрациях, при одновременной минимизации вторичных отходов, образующихся в ходе биологической очистки, нами решались следующие задачи:

- разработка методологии и получение микробиоценозов для деструкции органических токсикантов, содержащихся в стоках в высоких концентрациях;

- исследование биодеструкции в различных режимах: в периодическом, непрерывном хемостатном, с рециклом биомассы (в частности, в мембранном биореакторе);

- разработка способов минимизации вторичных отходов при проведении интенсивных процессов биодеструкции, в частности, апробация режима периодического процесса с подпиткой высоконцентрированным субстратом-токсикантом, режима с полным рециклом активного ила;

- апробация гибридного процесса деструкции, при котором одновременно в одном и том же реакторе осуществляется и химическое, и биологическое разложение токсиканта;

- исследование биологической очистки в условиях контролируемого оксидативного стресса;

- исследование процессов с биопленками и гранулированным илом.

Исследовались:

- модельные и реальные фенол- и азотсодержащие стоки (см. разделы 3.2.2, 3.2.6.1, 6.2);

- модельные и реальные сточные воды пивоваренной промышленности (см. разделы 3.2.3, 3.2.4, 6.1, 6.3.1, 6.3.3);

- модельные хозяйственно-бытовые стоки (см. разделы 3.2.4, 3.2.6, 6.3.3, 6.4);

- модельные фосфорсодержащие стоки (см. раздел 3.2.6.2, 6.3.3);

- образование биопленок и гранул ила (см. раздел 3.2.5, 3.2.6, 6.3.2, 6.3.3);

- очистка модельных хозяйственно-бытовых стоков в мембранном биореакторе (см. раздел 6.4).

- очистка с участием микроводорослей и цианобактерий (см. раздел 3.2.7, 6.5);

Исследования по биологической очистке сточных вод инициировались организациями и предприятиями, эксплуатирующими или проектирующими очистные сооружения (ФГУП «Биотехнологический завод», пос. Серебряные пруды, Моск. обл.; Вороновский завод по производству солода, ВЗПС, пос. Вороново, Московская обл.; фирма «Энви́ро-Хеми ГМБХ», ФРГ; коксохимическое производство Череповецкого металлургического комбината, АО «Северсталь»), а также проводились при финансовой поддержке в рамках грантов и проектов:

1) Биологическая трансформация соединений азота в системах биологической очистки и биоремедиации (МНТП 4.12 Биотехнология, 1998).

2) Использование биологических методов в экологически чистых производствах (МНТП 4.12 Биотехнология, 1998).

3) Микробиологическая детоксикация природных сред, загрязненных органическими и неорганическими ксенобиотиками» (МНТП 4.12 Биотехнология, 1998).

4) Микробиологическая переработка высококонцентрированных стоков техногенного происхождения (АВП «Научные исследования высшей школы в области химии и химических продуктов». Раздел Биотехнология, 1999).

5) Разработка высокоинтенсивных малосточных систем очистки техногенных потоков от органических поллютантов на основе микроорганизмов, адаптированных к окислительному стрессу (проект № 207.04.01.054 НТП «Научные исследования высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники», подпрограмма № 207 «Научные исследования высшей школы в области экологии и рационального природопользования», раздел «Проблемы техногенных образований и использования промышленных и бытовых отходов, 2001–2002», Заказчик Минобразование РФ).

6) Разработка технологий высокоинтенсивного и ресурсосберегающего биокатализа и биосинтеза для получения продуктов кормового, пищевого и технического назначения (АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», подпрограмма № 2 «Прикладные исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники», направление № 3907 Технология живых систем (2004, 2005 гг.), профинансировано Рособразованием).

7) Изучение коммуникационных взаимодействий в сообществе микроорганизмов при их структурной организации (АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы», подраздел № 2.1.1 «Проведение фундаментальных исследований в области естественных, технических и гуманитарных наук», (2006–2008 гг.), профинансировано Рособразованием).

8) Разработка гибридных биотехнологий для глубокой очистки сточных вод промышленных предприятий (шифр 2007-2-1.2-00-02-002, профинансированного Федеральным агентством по науке и инновациям, ГК 02.512.11.2157 от 1 августа 2007 г. (2007, 2008 гг.).

9) Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке (ГК № 02.740.11.0784 от 24 апреля 2010 г., ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы).

### **3.2.1. Концентрированные стоки**

В биологической очистке сточных вод актуальным является решение задачи переработки концентрированных стоков, содержащих свыше 0,5–5% веществ, растворенных в жидкой фазе. Примерами таких загрязненных потоков являются

сточные воды пищевой и перерабатывающей промышленности (барда, молочная сыворотка и др.), различные маточники при выделении целевых веществ в химической и микробиологической промышленности, стоки с ионообменных колонн, концентраты после упаривания и отгонки растворов, стоки и шламы предприятий металлургической, химической, фармацевтической, нефтеперерабатывающей, нефтехимической и других отраслей промышленности, вторичные отходы, шламы и осадки очистных сооружений, стоки животноводства и птицеводства, загрязнения в замкнутых системах водопотребления, в системе очистки газов. К этой группе стоков также можно отнести и накопленные и запрещенные к использованию химикаты: хлорорганические соединения, такие как полихлорированные бифенилы, хлорбензолы, некоторые пестициды, отработанные низкорadioактивные полимерные материалы и др. Их накопленные количества исчисляются сотнями тысяч тонн. Эти отходы являются одними из наиболее трудноперерабатываемых и обезвреживаемых.

Стоки пищевой, перерабатывающей, микробиологической промышленности, содержащие в большом количестве органические вещества в легкоусвояемой форме, минеральные соединения азота и фосфора, могут быть утилизированы с получением полезных продуктов. Токсичные и опасные стоки и отходы либо складировуются и захораниваются, либо перерабатываются на локальных очистных сооружениях. Часто высококонцентрированные стоки перерабатывают химическими методами, сжиганием, что повышает капиталовложения, трудоемкость очистки, снижает ее эффективность. Использование же биологических методов сопряжено с определенными трудностями.

Переработка концентрированных стоков отработанными и традиционными аэробными биологическими методами – в аэротенках или на биофильтрах имеет ряд недостатков:

- необходимость предварительной подготовки и многократного разбавления высококонцентрированных стоков для минимизации токсичного действия на живые организмы очистных сооружений и других негативных эффектов присутствующих токсикантов; разбавление для обеспечения стабильной аэробной очистки ведет к увеличению объемов перерабатываемых стоков (иногда в десятки и сотни раз), очистных сооружений, потребляемой технологической воды, энергозатрат на прокачивание сточной воды и совокупных затрат на очистку, к попаданию в окружающую среду вторичных отходов, образующихся при обработке стоков;

- высокая биостойкость ряда органических поллютантов;

- невысокие концентрации активных илов и функционирующих биопленок, низкая интенсивность процесса, необходимость регенерации активного ила и, соот-

ветственно, регенератора в аэротенках для восстановления окислительной активности микроорганизмов, что приводит к потере полезного объема аэротенка, снижению его производительности и, как следствие, потребность в больших площадях под очистные сооружения;

- образование вторичных отходов: большого количества избыточной биомассы (активного ила, биопленки), утилизация которой также является экологической проблемой; их складирование на полигонах захоронения ведет к отчуждению площадей, загрязнению почв и грунтовых вод;

- необходимость введения дополнительных количеств биогенных элементов для поддержания активности микроорганизмов очистных сооружений в случае дефицита этих элементов в перерабатываемом потоке; их несбалансированное избыточное внесение в очищаемую среду ведет к дополнительному загрязнению окружающей среды, эвтрофикации водоемов, накоплению нитратов в сельскохозяйственной продукции;

- неоптимальный тепловой баланс и снижение вследствие этого скорости биологического процесса;

- трудности адаптации активного ила к широкому спектру ксенобиотиков при их разложении в составе общих промстоков;

- сложности в обеспечении требуемых нормативов содержания остаточных загрязнений в случае очистки без разбавления сточной воды и необходимость организации стадии доочистки сточных вод в случае повышенных требований к качеству очистки выходных потоков. Так, даже при использовании наиболее передовых биологических очистных сооружений, как правило, не удастся обеспечить требуемые нормативы очистки для сброса в природные водоемы, если ХПК загрязненной воды на входе превышает 1000 мг/л;

- попадание высококонцентрированных стоков в основные очистные сооружения, что приводит к образованию в аэротенках активных илов с высоким иловым индексом, ухудшению работы вторичных отстойников, а с этим к снижению концентрации активного ила и возрастанию продолжительности аэрации.

Таким образом, разработка более чистых, малоотходных, малосточных, высокоинтенсивных и низкзатратных методов микробиологической очистки и обезвреживания сточных вод, шламов, вторичных отходов с высокой концентрацией органических загрязнений имеет важное практическое значение. Применительно к биотехнологическим методам это означает, что биоочистные установки должны быть компактными, биологические агенты выдерживать высокие концентрации токсикантов и других загрязнений, их разложение в биореакторах до безопасных продуктов должно быть близко к 100%, количество вторичных отходов и

загрязнений, образующихся в биореакторе, должно быть незначительным. С точки зрения превентивных экологически чистых методов высококонцентрированные стоки должны перерабатываться и обезвреживаться без разбавления, без внесения дополнительных реагентов и питательных субстратов, с минимизацией энергозатрат, без образования избыточного активного ила.

Один из подходов к переработке и обезвреживанию высококонцентрированных стоков превентивными методами основан на использовании локальных установок биологической очистки, имеющих достаточно узкий набор специфических загрязнений. Как правило, обезвреживание и очистка концентрированных стоков обходится дешевле, чем очистка разбавленных стоков с тем же суммарным количеством загрязнений.

Высококонцентрированные стоки можно очищать с помощью культур микроорганизмов-деструкторов, селекционированных для каждого конкретного случая и устойчивых к повышенным и токсичным концентрациям загрязнений. Снизить биотоксичность загрязнений можно путем дробного внесения обезвреживаемого и разлагаемого материала в среду с микроорганизмами и необходимыми компонентами минерального питания, предобработкой стойких отходов, внесением в ряде случаев косубстратов – аналогов деструктируемых веществ, оптимизацией условий обработки.

Другой вариант переработки высококонцентрированных стоков может быть реализован с использованием вышерассмотренного метода высокоплотностного культивирования. Аналогией высокоплотностного культивирования в биологической очистке сточных вод являются режимы работы аэротенка с полным рециклом ила (с полным самоокислением ила), однако они не позволяют обеспечить существенное увеличение концентрации активного ила в рабочем пространстве и высокое качество очищенной воды. В режиме же высокоплотностного культивирования также возможно уменьшение удельного выхода биомассы активного ила на единицу минерализованных загрязнений, т.е. минимизации образования вторичных отходов. Известно, что в уплотненных ценозах прирост ила уменьшается [1571]. Для еще большего уменьшения количества нарастаемого активного ила биологическую очистку можно проводить в режиме разобщения анаболической и катаболической активности, например, путем ограничения содержания микроэлементов в очищаемой среде или делая перерывы в подпитке субстратом. Развитие такого метода требует разработки путей устранения неблагоприятных эффектов продуктов метаболизма в режиме с подпиткой субстратом-токсикантом.

Еще один вариант заключается в объединении анаэробной предварительной обработки высококонцентрированных стоков с аэробной доочисткой. Он имеет определенные преимущества, среди которых уменьшенное потребление энергии и количество образующегося избыточного ила, высокая производительность и уменьшение площади, занимаемой очистными сооружениями. Такое решение типично для современных энергосберегающих и малоотходных технологий с двухступенчатой анаэробно-аэробной очисткой стоков с высокой концентрацией органических загрязнений ( $X_{ПК} > 3000$  мг/л), в которой на первой стадии основная часть органических загрязнений сбраживается с образованием биогаза, а оставшаяся часть минерализуется аэробно. Комбинирование анаэробной и аэробной очистки способствует существенной экономии эксплуатационных затрат по сравнению с только аэробной очисткой без превышения согласованных норм сброса.

Значительная часть методов анаэробно-аэробной очистки, широко внедряемых в мире в последние 20–25 лет, в том числе в отечественной промышленности с привлечением зарубежных фирм, ориентированы на использование гранулированного анаэробного ила и высокоинтенсивных анаэробных реакторов, в частности UASB-реактора.

В России современные анаэробно-аэробные методы очистки наиболее широко начали внедряться зарубежными фирмами в пивоваренной промышленности [54, 65]. Лидером в области внедрения в промышленность передовых анаэробных методов очистки сточных вод являлась фирма Энви́ро-Хеми (Германия) (<http://www.enviro-chemie.ru>). При использовании построенных этой фирмой многоступенчатых анаэробно-аэробных систем очистки сточных вод пивоварения с  $X_{ПК}$  на входе 5000–7000 мг/л, содержание остаточных загрязнений снижается до 40–100 мг/л, что хотя и не удовлетворяет российским требованиям к стандартам очистки при сбросе сточных вод в естественные водоемы, но существенно снижает затраты на последующую доочистку стоков.

К настоящему времени построены или находятся в стадии проектирования интенсивные анаэробные очистные сооружения для пивоваренной промышленности, производства безалкогольных напитков, чипсов, молокопродуктов. На анаэробной стадии используются UASB, EGSB реакторы, анаэробные биофильтры; на второй, аэробной, – различные модификации аэротенков и биофильтров, SBR систем. На большинстве из построенных очистных сооружений используются UASB-реакторы.

Обследование работы анаэробно-аэробных очистных сооружений филиала ОАО Пивоваренная компания «Балтика» в г. Самара, выполненного нами по инициативе фирмы «Энви́ро-Хеми» (Германия), спроектировавшей данные очистные сооружения, показали, что затраты электроэнергии на 1 кг удаленных органических

загрязнений для анаэробно-аэробного процесса составляют 0,2–0,4 кВт.ч/кг ХПК, что в несколько раз ниже показателей, типичных для аэробных процессов. При этом количество образующегося избыточного ила (сумма анаэробного и аэробного) составляет 0,14–0,18 кг/кг ХПК (по асв), что в 2–3 раза меньше, чем в случае использования только аэробного процесса. Кроме того, не требуется внесения дополнительного количества биогенных элементов, необходимых для обеспечения жизнедеятельности анаэробного ила. ХПК на входе 5000–7000 мг/л после анаэробной стадии снижается до 250–300 мг/л в интервале нагрузок по ХПК 1500–12000 кг/сут.м<sup>3</sup>. Анаэробный реактор обеспечивает удаление основной массы загрязнений (75–95% по ХПК). После стадии аэробной доочистки ХПК в воде на выходе из очистных сооружений составляет 40–100 мг/л, а содержание аммонийного азота 0,2–0,3 мг/л. Вся система очистки обеспечивает удаление загрязнений из сточной воды на 99,0 – 99,5% [54].

Оценочные расчеты показали, что экономия за счет снижения энергозатрат и экологических платежей за 10 лет при эксплуатации анаэробно-аэробной системы очистки сопоставима с затратами на ее строительство по сравнению с аэробной системой.

Наши собственные экспериментальные исследования переработки зерно-спиртовой барды [1206, 1212] и эколого-экономическая оценка, приведенная в нашей книге «Прикладная экобиотехнология» [2] на примере таких отходов, как зерновая барда спиртового производства или молочная сыворотка, также показали, что наиболее рациональным вариантом является их малоотходная и энергосберегающая анаэробная утилизация с получением биогаза. Однако для реализации этого метода обезвреживания традиционные методы сбрасывания в метантенках или септиках не подходят вследствие низкой интенсивности биологического процесса разложения, нестабильности анаэробного брожения и метанообразования, повышенного расхода тепла на обогрев анаэробного реактора, особенно в холодной климатической зоне. В то же время использование высокоэффективных реакторов нового поколения и накопленный за рубежом опыт их промышленной эксплуатации, а также появившийся опыт их внедрения в пищевой и пивоваренной промышленности в России позволяют говорить о возможности использования анаэробно-аэробного метода в отечественной спиртовой отрасли для переработки барды.

### **3.2.2. Модельные и реальные фенолсодержащие стоки**

В работе исследовалась модельная система биоокисления фенола. Фенол для исследований был выбран по той причине, что фенольные соединения составляют

большой класс органических токсикантов; фенольные кольца входят в состав многих природных соединений; расщепление фенола микроорганизмами является центральным звеном в цепи метаболизма ароматических соединений: ксенобиотиков и природных соединений. Особенности метаболизма таких соединений у микроорганизмов были подробно рассмотрены нами ранее [4]. Поскольку закономерности биологического окисления фенола могут быть распространены на широкую группу ксенобиотиков, разработка эффективных экологически дружественных методов биологической очистки в отношении биодеструкции фенола и их положительные результаты могут иметь важное практическое значение.

В незагрязненных или слабозагрязненных речных водах фоновое содержание фенолов обычно не превышает 20 мкг/л. Фенолы, в целом, соединения относительно нестойкие и подвергаются биохимическому и химическому окислению, поэтому в летний период фоновое содержание фенолов в загрязненных водах падает из-за более высоких скоростей распада. Кофактором или сопутствующим продуктом в некоторых из ферментативных реакций может выступать пероксид водорода. Многие амины и фенолы способны окисляться пероксидом водорода естественного происхождения. Реакции окисления фенолов пероксидом водорода протекают эффективно в широком диапазоне температур и концентраций. В качестве продуктов окисления фенола первоначально образуются гидрохиноны и катехины, которые затем окисляются до соответствующих хинонов и далее до дикарбоновых кислот, в конечном итоге до  $\text{CO}_2$ . Важную роль в окислении фенолов пероксидом водорода играет фермент фенолоксидаза. Некоторая часть фенолов может образовывать связанные остатки в результате процессов конденсации и полимеризации с природными соединениями с образованием сложных гумусоподобных и других довольно устойчивых соединений.

Способностью расщеплять фенольные соединения с разрывом ароматического кольца обладают многие бактерии и грибы, в том числе большинство обычных почвенных бактерий и грибов [1572, 1573]. Особенно разностороннюю активность в этом смысле проявляют бактерии, в том числе псевдомонады, микобактерии, спироиллы, кокки и спороносные формы. Согласно литературным данным, высокими возможностями в отношении деструкции фенола обладают штаммы, полученные из сточных вод производства фенолформальдегидных смол, и используемые в анаэробном процессе деструкции, разработанном в Институте коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского АН Украины [1574]. В этом процессе достигается скорость деструкции фенола до 1 г/л·ч. Однако в аэробных условиях разложение фенола наблюдается при концентрациях не более 2–3 г/л в исходной среде. Максимальная скорость протекания процесса в непрерывных условиях – до 0,1–0,3 г/л·ч.

Основной поток загрязнений фенолами связан с образованием фенолсодержащих сточных вод и шламов. В силу хорошей растворимости в воде, содержание фенолов в сточных водах некоторых предприятий может достигать 10–20 г/л. Сточные воды помимо фенола содержат другие биостойкие загрязнения: нефтепродукты, аммиак, альдегиды, смолы и другие вредные вещества. Очистка таких стоков проводится в несколько последовательных стадий с удалением органических поллютантов (нефтепродуктов, фенолов, роданидов и др.) на первых стадиях, неорганического азота (в коксохимическом производстве) на последующих стадиях. Биологическая очистка их часто затруднена из-за токсичного действия загрязнений на биоценозы очистных сооружений. В этом случае перед биологической очисткой стоки разбавляют другими производственными стоками. Однако многие стоки, содержащие фенол, не имеют приемлемых методов очистки и собираются в накопители или обезвреживаются термически (сжиганием).

Важными источниками образования сточных вод, содержащих: фенол, бензол, нафталин, пиридин, роданиды, цианиды, аммиак и др., являются коксохимические предприятия. Содержащиеся в сточных водах фенолы состоят примерно на 60% непосредственно из фенола и на 30–40% из крезолов. В некоторых случаях содержание фенола в них достигает 9–11 г/л. В незначительных количествах в них содержатся также ксиленолы и многоатомные фенолы [1575]. Наряду с фенолами характерным компонентом сточных вод коксохимического производства являются роданиды. Высокое содержание токсичных для биологических систем веществ – фенолов, роданидов и др. в сточных водах требует разбавления последних технической водой. Поступающие на биохимическую очистку фенольные воды со всех источников после их смешивания содержат примерно 0,2–0,4 г/л фенолов [1576].

В промышленности для очистки сточных вод от фенолов в настоящее время используют две группы методов: регенерационные и деструкционные. Первая группа предусматривает выделение и использование фенолов, вторая – их уничтожение с превращением в безвредные вещества. Для предприятий с небольшим количеством фенольных стоков более простым и экономичным может явиться уничтожение фенолов.

Концентрированные сточные воды (>7 г/л) подвергаются обесфеноливанию преимущественно экстракционными методами. После этого они вместе с другими производственными и бытовыми стоками передаются на биохимическую очистку. Извлечение экономически выгодно только при содержании фенола в стоках более 2–3 г/л [1576, 1577]. Содержание фенолов в сточных водах после очистки регенерационными методами находится в пределах 100–500 мг/л. Дальнейшую их очистку проводят одним из деструкционных методов, включая биологический в аэротенках [1576]. В последние поступают стоки с содержанием фенолов не более 100–150 мг/л [1576-1578].

После биологической очистки таких сточных вод содержание фенолов снижается до 0,5–1,5 мг/л. Достаточно глубокая очистка сохраняется и при содержании фенолов в исходных стоках до 1000 мг/л, причем и в этом случае остаточное содержание фенолов в очищенной воде остается достаточно низким: 3–4 мг/л [1579].

При соблюдении оптимального режима – отсутствия в стоках механических примесей, масел и смолообразных веществ, постоянстве состава сточных вод, температуре 25–30 °С, рН 7,0–8,5, наличия необходимого количества биогенных элементов и кислорода, использования адаптированной к окислению фенолов микрофлоры возможно достаточно эффективное обесфеноливание концентрированных фенолсодержащих сточных вод с содержанием фенолов до 500–1000 мг/л. Применение в данном способе бытовых сточных вод не допускается [1580, 1581]. При превышении этих величин возникает задача разработки специальных методов биологической очистки с использованием микроорганизмов, адаптированных к высоким концентрациям фенолов.

Таким образом, проблема обезвреживания фенолов является одной из наиболее актуальных в практике биологической очистки загрязненных сред. Важную роль в решении этой проблемы отводят биологическим методам.

В работе проводились исследования с модельными фенолсодержащими стоками с целью совершенствования схемы биологической очистки с удалением фенолов, в том числе с использованием окислительного воздействия пероксидом водорода.

### **3.2.3. Сточные воды пивоваренной промышленности**

Исследования со стоками пивоварения проводились совместно с представителями фирмы «Энви́ро-Хеми» (Германия) и были инициированы задачей экспертной оценки работы анаэробно-аэробной системы биологической очистки сточных вод предприятий АО Пивоваренная компания «Балтика», а также проблемой нормализации работы очистных сооружений в пусковой период на Вороновском заводе по производству солода.

Сточные воды пивоварения содержат, главным образом, органические загрязнения в высоких концентрациях (ХПК до 5–7 тыс.), 300–2000 мг/л взвешенных веществ, 50–100 мг/л соединений азота, которые представляют собой большей частью соединения органического азота (белок, дрожжи) и только частично азот аммония и нитратов.

Типичные концентрации загрязнений в сточных водах пивоваренного производства: ХПК – 600–1400 мг О<sub>2</sub>/л, взвешенные вещества – 300–2000 мг/л, N<sub>общ</sub> – 50–200 мг/л, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – 10–40 мг/л, P<sub>общ</sub> – 10–60 мг/л., БПК<sub>5</sub> – 1000–5000 мг О<sub>2</sub>/л.

Для сточных вод пивоваренного завода, работающего в нормальном рабочем режиме, характерны значительные колебания потока и резкие перепады концентраций загрязняющих веществ в воде. Значение pH варьирует в широких пределах, причем характерно смещение pH в щелочную область. Сточные воды могут иметь временами значение pH 11.

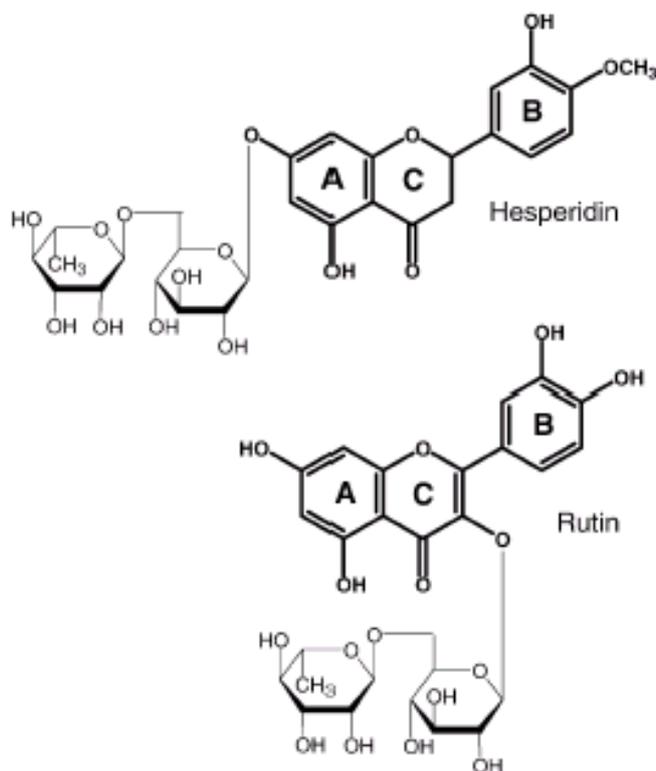


Рисунок 3.1 – Химическая структура флавоноидных гликозидов.

Стоки солодовен, особенно первая вода замачивания, окрашены в желтый цвет даже после стадии биологической очистки. Они характеризуются высоким содержанием рутина, геспередина и квертецина (рис. 3.1) – флавоноидов, придающих желтоватую окраску стокам и весьма стойких к аэробному биологическому разложению [1582]. В фильтрованном пиве основным полифенольным соединением является квертецин. Окраску стокам также могут придавать пектиновые и азотистые красящие вещества (бетаино-подобные и другие), пигменты (каротины, антоцианы), экстрагируемые из зерна в процессе его замачивания.

Для биологической деструкции многих из этих соединений необходимо присутствие микроорганизмов с высокой активностью окислительных ферментов: лакказ, Mn-зависимых пероксидаз, фенолоксидаз и др. Наибольшей активностью перечисленных ферментов обладают микроскопические грибы, однако в активном или очистных сооружениях они развиваются при pH 3–5, т.е. условия очистки сточной воды неблагоприятны для их развития.

На таких стоках тестировалась возможность повышения эффективности биодеструкции органических загрязнений с внесением в очищаемую среду пероксида водорода как варианта апробации гибридного процесса с одновременным совмещением по месту и времени биологического и химического окисления загрязнений.

Также использовались модельные стоки пивоварения, приготовленные на основе безалкогольного пива «Балтика-0». С данными стоками изучалась возможность гранулообразования активного ила в аэробных условиях при внесении в очищаемую среду пероксида водорода, а также в процессе непрерывной аэробной биологической очистки в аэротенке со вторичным отстойником в режиме с полным рециклом ила.

### **3.2.4. Образование гранул ила в аэробных условиях и SB-реакторы**

Гранулообразование наблюдается и гранулированный ил используется во многих современных анаэробных биореакторах (UASB и др.). В настоящее время в области биологической очистки сточных вод предпринимаются определенные попытки по получению, изучению и использованию гранулированного ила в аэробных процессах [33, 1583-1589], в частности, на стадии доочистки сточных вод при удалении соединений азота и фосфора [211, 1590-1602].

В аэробных условиях возможность появления концентрированных агрегатов ила лежит в основе классической технологии очистки сточных вод в системе аэротенк – вторичный отстойник. Свообразные условия существования формируют активный ил и его способность к флокуляции, которая является одной из важнейших характеристик состояния биоценоза. Однако несмотря на флокуляцию, ил во вторичных отстойниках оседает несравнимо хуже, нежели в случае гранулообразования.

Гранулообразование наблюдается с участием относительно медленно растущих аэробных микроорганизмов: при сульфатредукции, нитрификации, окислении сульфидов, при определенном гидродинамическом режиме [1603-1606].

Гранулированный ил обладает хорошими седиментационными свойствами и целевой активностью, не вспухает, легко удерживается в биореакторе, более устойчив к стрессовым воздействиям, что обеспечивает его высокую совокупную концентрацию и содержание активной биомассы в рабочей зоне биореактора [1583, 1587, 1607-1609]. В этой связи использование ила в виде гранул с высокими седиментационными характеристиками позволило бы относительно легко повысить концентрацию ила в аэробных реакторах, а с этим и производительность реакторов, решать проблемы вспухания ила и пенообразования. Благодаря микроразнообразной организации гранул, аналогичной наблюдаемой в биопленках биофильтров [1610-1619], можно

было бы ожидать и повышения эффективности очистки с уменьшением содержания остаточных загрязнений в сточной воде, и получить ил с хорошими фильтрационными свойствами при его обезвоживании, со сниженной адгезионной способностью к мембранам при очистке в мембранных биореакторах [226, 1620-1626].

В анаэробных реакторах образование гранул наблюдается в условиях, создающих селективные преимущества для удерживания более плотных гранул в реакторе и вымывания суспендированных клеток и флокул ила из-за различий в скорости их седиментации, в частности, под действием восходящего потока воды, создаваемого в реакторе [1627-1630]. Первоначально гранулы формируются в результате совместного агрегирования суспендированных частиц и растущих бактерий. Под действием восходящего потока воды более легкие частицы и неагрегированные бактерии вымываются, а агрегаты остаются, и, таким образом, происходит автоселекция их.

Исследования с анаэробными метаногенными гранулами показали, что направление и скорость процесса грануляции, а также характеристики сформированного гранулированного ила зависят от видового состава и соотношения микроорганизмов в гранулах, таких их свойств, как скорость роста и отмирания, морфология, субстратная специфичность, гидрофобность, заряд поверхности, способность синтезировать специфические полимеры [1631-1635]. На эти свойства могут влиять условия окружения: состав питания и загрязнений сточной воды, гидродинамический режим, физико-химические факторы, биологическое окружение, стрессовые воздействия, такие как голодание, ограничение в питательных компонентах, высокие силы сдвига, механические напряжения [1627, 1636-1639]. Среди этих свойств особенно важна скорость роста и отмирания. Медленно растущие микроорганизмы формируют компактные плотные гранулы с хорошей осаждаемостью, по «механической» прочности сравнимые с биопленками на носителе.

Многочисленные исследования подтверждают, что структура гранул подобна структуре биопленок [1610-1619, 1640-1645], в которых важную роль в организации пространственной структуры играют межклеточная коммуникация и мультиклеточная координация. Примером такой коммуникации является кворум сенсинг (QS), участвующий в социальном поведении бактерий, как обменный сигнал между индивидуальными клетками, позволяющий всей популяции выбрать оптимальный путь взаимодействия с окружающей средой и отвечать на стресс [755, 762, 1646-1648]. Выгоды от пространственной организации заключаются в более эффективной пролиферации, доступу к ресурсам и нишам, которые не могут использоваться изолированными клетками.

Несмотря на то что гранулообразование возможно при очистке различных сточных вод, в обычных системах с аэротенками и вторичными отстойниками грануляция не происходит.

Гранулы ила размером 1–5 мм могут образовываться в SB-реакторах (Sequencing Batch Reactor) с циклическим аэробно-анаэробным отъемно-доливным режимом для удаления избытка биогенных элементов на стадии доочистки сточных вод [1590-1598, 1602, 1649-1655], что нашло практическое применение за рубежом при третичной очистке сточных вод с целью удаления из них биогенных элементов.

По принципу действия SBR аналогичен окислительным аэрируемым прудам (лагунам) с меняющимся уровнем – низкочувствительным, но малопродуктивным системам очистки. Этот реактор позволяет проводить нитрификацию (при аэробных условиях) и денитрификацию (в аноксигенных условиях при отстаивании ила) в циклическом режиме: в реактор загружается порция сточной воды, затем она аэрируется несколько часов, но без механического перемешивания, которое может разрушить новообразованные гранулы, после чего аэрация отключается также на несколько часов, перемешивание содержимого реактора прекращается, ил оседает, часть осветленной воды сливается (от 25 до 60% объема SBR), затем вновь добавляется аналогичное количество исходной сточной воды и включается аэрация. Продолжительность цикла составляет от 2 до 12 ч. При циклическом режиме органический субстрат или азот подается порциями и поэтому глубже проникает в гранулу, когда его концентрация резко увеличивается. В непрерывном же режиме концентрация субстрата всегда невысокая. Поэтому плотность гранулы выше, чем биопленки.

Общими проблемами реакторов как с гранулами, так и с биопленкой, являются ограничение скорости биологических процессов транспортом субстратов и продуктов в пленке, осуществляемым в основном за счет диффузии, длительность формирования гранул или пленки, что увеличивает время ввода реактора в эксплуатацию, затрудненность контроля толщины биопленки, возможность выноса частиц из реактора при избыточном росте биомассы, сложность равномерного распределения потоков при больших объемах реакторов, образование застойных зон и заиливание рабочей зоны.

Таким образом, поиск условий для аэробного гранулообразования представляет собой самостоятельную практически важную задачу. Если бы удалось найти и обеспечить условия формирования и поддержания стабильности гранул в аэробном и непрерывном проточном режиме, то можно было бы существенно улучшить показатели работы аэробных биореакторов за счет более высокой плотности биомассы, нежели в пленке биофильтра или в аэротенке (60 г/л в гранулированной среде по сравнению с 2 г/л в аэротенке).

Надо иметь в виду, что в аэробных условиях с илом в виде гранул достаточно большого размера процесс очистки сточных вод может чрезмерно лимитироваться массообменом по кислороду уже при относительно невысокой окислительной мощности из-за низкой растворимости в воде и затрудненной диффузии кислорода внутрь гранулы. В данном случае размер гранул определяется сочетанием трех факторов – скоростью массопередачи субстрата в гранулы, скоростью биоокисления субстрата и скоростью прироста биомассы в гранулах [1586, 1656-1670]. В исследовании [1657] определялось распределение живых и мертвых клеток в аэробных гранулах и оказалось, что мелкие гранулы размером около 600 мкм полностью состоят из живой биомассы. При помощи FISH-анализа было показано наличие анаэробной зоны с отмершими клетками на расстоянии 800–900 мкм от поверхности аэробных гранул. Критическим является радиус гранул 350 мкм, то есть для аэробных гранул диаметром менее 700 мкм микробные реакции не лимитируются диффузией, а для гранул более 700 мкм в диаметре диффузия субстратов и кислорода является лимитирующим фактором. Таким образом, гранулы должны иметь оптимальный радиус, при котором кислород и питательные вещества могли бы проникать внутрь гранул. Низкая растворимость и диффузия кислорода существенно ограничивают применение аэробных систем очистки с гранулированным илом.

В настоящее время отъемно-доливной режим применяют при очистке сточных вод во всем мире. Например, в ФРГ количество таких установок составляет 1,3 % от всех очистных сооружений. Технологии очистки сточных вод с SB реакторами получили в последние 20 лет широкое применение и в странах восточной и центральной Европы, в Китае при модернизации действующих очистных сооружений [1590, 1591, 1595, 1597, 1600, 1649, 1652, 1654, 1655, 1671-1672]. Наряду со строительством новых, технологии очистки сточных вод с SBR позволяют использовать действующие емкостные сооружения: канализационные насосные станции, отстойники, аэротенки и др. в качестве SB реакторов.

Гранулы активного ила намного полнее удаляют загрязнения воды, практически не образуют избыточной биомассы, более устойчивы к воздействию токсических веществ. При использовании SBR на конечной стадии анаэробно-аэробной очистки достигается снижение содержания азота в сточных водах на 65–97%. При очистке бытовых сточных вод SBR обеспечивает снижение концентрации загрязнений до величин менее, чем 10 мг/л – для БПК, 10 мг/л – взвешенных веществ, 5 мг/л – азота и 1 мг/л – фосфора. Активный ил очищает стоки от фосфора и аммонийных производных, но только когда сформированы гранулы, можно добиться полной денитрификации [1591, 1594, 1618].

SBR совмещает функции аэротенка и вторичного отстойника, что экономит площади сооружения, снижает капитальные затраты и уменьшает гидравлические потери. Конструкции SBR относительно простые. Сооружения биологической очистки сточных вод с SB реакторами могут иметь различную конфигурацию с одним и более реакторами и накопительными резервуарами [1590, 1654, 1655]. Однако в них необходимо использовать аэраторы с мембранами, поскольку только они надежно работают в этих системах.

В процессе эксплуатации SBR наряду с низкой производительностью выявились их другие недостатки.

Часто наблюдаются нестабильность образующихся гранул ила, распад их через 2–3 мес. с момента новообразования [1640], приводящая к их вымыванию из реактора.

Имеются сложности с подбором оптимального циклического режима для проведения нитрификации и денитрификации. Для проведения денитрификации и удаления избытка азота (нитратов) в реактор необходимо добавлять дополнительный источник органических веществ, что повышает остаточное ХПК в случае несбалансированности процесса; последнее весьма вероятно на практике из-за сложностей аналитического контроля (отсутствие экспресс или on-line –методов определения ХПК). В ряде случаев необходимо постоянное пополнение реактора новым илом, а следовательно, требуется надежный источник ила. Наконец, при использовании SBR невозможно перестраивать технологические потоки в случае необходимости, в то время как при многоступенчатой непрерывной очистке в аэротенках такая возможность имеется: например, возможен возврат части выходного потока с последней ступени в головную часть аэротенка первой ступени для проведения денитрификации.

Все это ограничивает более широкое применение SB реакторов для доочистки сточных вод. Технологически нерационально сочетать непрерывное удаление загрязнений на первых стадиях очистки и доочистку в реакторе периодического действия. Для работы таких установок в технологии непрерывной очистки необходимо наличие дополнительной емкости – усреднителя расхода, а также двух или более параллельно работающих реакторов. Поэтому SBR преимущественно используются для обработки сточных вод с предприятий и технологических установок, работающих в циклическом производственном режиме с достаточно строгой периодичностью и, как следствие, циклическим накоплением сточных вод. Из-за необходимости вспомогательного емкостного оборудования площадь, занимаемая очистными сооружениями, сопоставима с традиционными. SB-реакторы требуют более высоких затрат на управление, чем проточные аэрационные установки, однако благодаря использованию современной программируемой автоматики могут достаточно гибко эксплуатироваться с изменением продолжительности стадий цикла очистки (стадия

аэрации, стадия перемешивания при денитрификации или этап отстаивания ила) при различных концентрациях загрязнений и технологических условиях.

Предполагается, что механизм гранулообразования в аэробных условиях во многом аналогичен гранулообразованию в анаэробных реакторах. Используемые для образования гранул условия создают селективные преимущества для удерживания наиболее плотных агрегатов в реакторе и вымывания менее плотных из-за различий в скорости их седиментации [1673-1681].

Гранулообразование в SBR начинается через 1–3 недели с начала процесса. По мере формирования и роста гранул в очищаемой среде существуют параллельно гранулы и флокулы в виде смеси, легко разделяемой седиментацией. Рост гранул, их укрупнение происходит в течение двух месяцев. При низком уровне ХПК и наличии в среде ингибирующих веществ гранулообразование начинается позднее, вплоть до 2–3 недель. Затем рост микроорганизмов в гранулах замедляется из-за ограниченной диффузии субстрата, и состояние гранул стабилизируется при диаметре в 1–5 мм. В дальнейшем поверхность гранулы постепенно разрыхляется и увеличивается в результате появления филаментов, а затем гранулы распадаются. Это может происходить спустя 80–100 суток. Высказано предположение, что причиной распада является дефицит кислорода во внутренних зонах, что влияет на эволюцию микроценозов гранул и приводит к их разрушению.

До сих пор неизвестны минимально необходимый микробиологический состав, условия и механизм формирования гранул.

Мишима и Накамура [1682] предположили механизм, аналогичный процессу анаэробного формирования гранул, нитчатые бактерии сцепляются друг с другом и образуют гранулы.

Бьон и коллеги [1650, 1651] в своих работах высказали идею о начале гранулообразования грибами, формирующими нечто вроде каркаса, заполненного бактериями. В их исследованиях гранулы обладали хорошей оседающей способностью, однако при диаметре 5–6 мм они лизировали, частично из-за недостатка кислорода в центре гранулы. После их разрушения оставались агрегаты, достаточно плотные, чтобы оседать. Со временем из них формировались новые гранулы. На нелизированных остатках постепенно иммобилизуются и размножаются клетки бактерий, которые вытесняют грибной мицелий, но обеспечивают дальнейшее поддержание структуры гранул. Если в качестве инокулята используются флокулы или микрогранулы ила, то механизм образования гранул может быть иной. В аналогичных исследованиях, проведенных Вебер с соавт., также была показана важная роль грибов в формировании гранул, так как они были выделены на стадиях хлопьеобразных агломератов, формирования гранул и из зрелых гранул [1617, 1619].

В исследовании Лиу, Тэя и соавторов [1614, 1657, 1663, 1674, 1675] аэробная грануляция рассматривается как процесс самоиммобилизации, подобный росту биопленок. Предложена модель ступенчатого формирования гранул – сначала из заправки ила (фаза адаптации) формируются уплотненные агломераты, затем гранулы ила, и в итоге образуются зрелые гранулы, продолжающие развиваться.

Таким образом, каркас гранулы могут формировать нитчатые бактерии и грибные культуры [1615], к которым прикрепляются остальные микроорганизмы. Часть нитчатых микроорганизмов иммобилизуется на твердых частицах (неорганических или отмерших остатков микроорганизмов) и в дальнейшем уже разрастается с образованием сетчатой структуры, которая затем формирует гранулу. Нельзя исключать и самоиммобилизацию микроорганизмов.

При удалении избытка азота гранулы формируются на основе нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий, взаимодействующих с гетеротрофными бактериями, окисляющими сложные органические субстраты. Показано, что гетеротрофы, нитрификаторы и денитрификаторы могут одновременно сосуществовать в SB-реакторе [1597]. Для одновременного протекания нитрификации и денитрификации необходимо поддерживать  $pO_2$  на уровне 5 мг/л и обеспечивать слабое перемешивание содержимого реактора. Это позволяет реализовать процесс очистки с одновременным удалением органики и азота в SBR. При удалении фосфора в гранулах SBR накапливаются фосфатаккумулялирующие микроорганизмы [1591, 1611, 1613, 1661, 1667].

Стабильность аэробных гранул во многом зависит от микробиологического состава и соотношения микроорганизмов в активном иле, характера стока, а также гидродинамического режима, при котором гранулированный ил функционирует.

Отношения между микроорганизмами важны для формирования гранул, их структуры, морфологии и стабильности. Как заметили Watnick и Kolter [1683], в смешанных биопленках бактерии распределяются сами по себе в соответствии с их способностью лучше выживать в своем отдельном микроокружении, и высокая сложность микробного сообщества выгодна для его стабильности. Соответственно организация различных микробных популяций может влиять и на стабильность аэробных гранул.

Как правило, стабильность аэробных гранул существенно ниже стабильности анаэробных [1607, 1608]. Это обусловлено более высокими скоростями роста аэробов и массообменными ограничениями в переносе кислорода. Аналогичная закономерность наблюдается при образовании биопленок [1684].

На стабильность аэробных гранул большое влияние оказывает аэрация и скорость подачи воздуха. При более интенсивной аэрации гранулы становятся гладкими, устойчивы продолжительное время, и в реакторе формируется большое количе-

ство гранул; при недостаточной аэрации гранулы становятся неустойчивыми и быстрее распадаются.

Ограничение массопереноса субстратов и кислорода в гранулы может повлиять на их структуру, например, когда субстрат слишком медленно проникает в центр аэробной гранулы. В таком случае в центре могут потребляться внеклеточные полимерные вещества или биомасса будет лизировать. В итоге это может привести к пористой и рыхлой структуре аэробных гранул, в результате формируется пустая полость внутри гранул, что приводит к их распаду при очистке сточных вод.

Распад гранул может наблюдаться вследствие изменений в составе сточных вод, особенно когда наблюдаются залповые сбросы. Из-за поступающего несбалансированного стока активный ил, работающий в таком типе реакторов, может самопроизвольно вспухать. При недостаточном количестве азота или его остром дефиците в сточных водах, поступающих в SB реактор, индекс ила остается ниже 150 мл/г, а при недостатке фосфора происходит вспухание и вынос подавляющего количества активного ила [225, 1685].

При запуске SBR возникает задача ускорения гранулообразования различными способами. Долгий начальный период лаг-фазы, необходимый для развития гранул из хлопьеобразных агломератов активного аэробного ила, и вымывание биомассы из очищенной среды в этот период, приводящее к снижению эффективности очистки, сдерживают гранулообразование.

Режим организации цикла работы в SBR важен для скорости образования гранул, но не является критическим фактором. Важное значение в циклическом режиме работы SBR имеет фаза голодания [1657] и время нахождения в фазе осаждения ила с отсутствием аэрации [1650, 1651, 1678]. В ряде случаев, но не всегда, они сильно влияют на физиологическое состояние ила (дыхательную и ферментативную активность), а также на такие параметры как гидрофобность поверхности клеток, что, в свою очередь, облегчает микробную адгезию и агрегацию [1627, 1686].

Имеются единичные сообщения о возможности формирования в условиях непрерывной аэрации гранул ила на основе гетеротрофных бактерий [1650, 1651]. Гранулы образуются в режиме восходящего потока, аналогичном используемому в реакторе или со взвешенным слоем загрузки с фиксированной биопленкой. Показана возможность образования гранул в проточных условиях в реакторе с интенсивным перемешиванием при очистке сточных вод пищевой промышленности с ХПК 2500 мг/л. Однако в таких постоянно строго аэробных условиях гранулированный ил, стабильный на протяжении длительного времени (месяцы и более), не удается получить [1601, 1650, 1651, 1664, 1665, 1687]. Гранулы образуются с полостью внутри, становятся хрупкими и легко распадаются при эксплуатации. Время их существова-

ния может составлять от недели до трех месяцев, и ясно, что на стабильность аэробных гранул влияет множество неучтенных факторов, роль которых необходимо выявить.

Большое влияние на образование гранул оказывает направление потока жидкости в реакторе и его скорость [103, 1656, 1658, 1664, 1665]. Любой фактор, увеличивающий критерий Рейнольдса, ведет к увеличению механического стресса и нарушению целостности гранул. Значение этого фактора, как стресс-фактора доходило до 50%. В то же время увеличение скорости приповерхностного движения жидкости способствует переносу кислорода и потребляемых субстратов. Отбор медленно растущих бактерий или увеличение касательной скорости жидкости вблизи поверхности гранул может способствовать формированию небольших и компактных аэробных гранул с высокой стабильностью [1658, 1664, 1665].

Таким образом, современные аэробные реакторы с гранулированным илом позволяют достаточно эффективно проводить биологическую доочистку сточных вод, удаляя остаточные органические загрязнений и биогенные элементы (азот и фосфор). Вместе с тем, даже при комбинировании аэробных систем с реакторами различных конструкций нормируемые показатели очистки сточных вод с изначально высоким ХПК, которые удовлетворяли бы российским требованиям, во многих случаях остаются труднодостижимыми.

Процессы аэробной очистки с гранулированным илом были исследованы нами на примере ряда модельных стоков пивоваренной промышленности и хозяйственно-бытовых в отъемно-доливном режиме, в непрерывном режиме в аэротенке с полным рециклом активного ила, в мембранном биореакторе и с использованием оксидативного воздействия пероксидом водорода на фоне освещения среды видимым светом во всех трех использованных режимах очистки.

### **3.2.5. Биопленки как объект исследований**

#### **3.2.5.1. Особенности биопленок как гетерогенных систем**

Несмотря на прогрессирующее развитие таких высокоинтенсивных реакторов как МБР, UASBR, EGSR и им подобных, предназначенных для анаэробной и аэробной очистки сточных вод, сооружения с биопленкой остаются по-прежнему наиболее распространенными. Особенности последних были рассмотрены нами ранее [2].

Важным аспектом совершенствования систем с биопленками является выяснение закономерностей, особенностей и механизмов формирования биопленок, под-

держание их стабильности, высокой физиологической и биохимической активности микроорганизмов, входящих в состав биопленок и ответственных за целевые биохимические процессы. Регуляция их образования и функционирования является основой направленного управления микробными сообществами, используемыми при биологической очистке сточных вод на биофильтрах и подобных им сооружениях [1688-1699].

Биоплёнка – это микробное сообщество, образующееся на поверхности раздела фаз; клетки этого сообщества прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матриксе синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. Биопленки являются наиболее распространенными формами местообитания микроорганизмов в природных условиях, в которых микробные сообщества сложно организованы, структурированы и прикреплены к различным поверхностям [1648, 1694, 1695, 1700-1712]. Процесс формирования биопленки часто называют биообрастанием (анг. biofouling).

Способность формировать биопленки является составной частью жизненного цикла большинства микроорганизмов, повышающая их выживаемость в окружающей среде [1704, 1710, 1713].

Клетки в биопленках отличаются от неприкрепленных клеток – у них изменены физиология, параметры роста и экспрессия специфичных генов [1707, 1709, 1714-1716]. Существование в биопленке обеспечивает микроорганизмам более постоянные условия, повышает их устойчивость к действию неблагоприятных факторов, различным видам стресса [754, 1160, 1714, 1709, 1710, 1713, 1714, 1717-1720]. Так, концентрации антибиотиков, требуемых для достижения бактерицидного эффекта для микроорганизмов, обитающих в биопленках, в зависимости от природы антибиотика может быть в 10–1000 раз выше, чем для их неприкрепленных форм [1721, 1722].

Образование биоплёнок представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс, зависящий от множества факторов, включающих генетический контроль регуляции, условия образования (рН, температура, питательные компоненты, химический состав среды, гидродинамический режим), свойства субстрата, к которому прикрепляются биопленки, свойства поверхности микроорганизмов (гидрофобность-гидрофильность, ионный заряд), морфологию, физиологическую активность, видовой состав биоценоза очистных сооружений [1691, 1696, 1697, 1706, 1712, 1723, 1724].

В отличие от обитания в колониях на поверхности питательного субстрата микроорганизмы в составе биопленок показывают значительно более сложную структуру, метаболическую кооперацию и разделение видов деятельности [1648, 1701, 1703-1706, 1720, 1725-1734]. В биопленках возможно существование микро-

ниш с различными условиями и физиологическими потребностями, позволяющими одновременное, но пространственно разделенное протекание окислительно-восстановительных процессов (например, анаэробных/аноксичных/аэробных, сульфидогенных и метаногенных) в одном и том же окружении биопленки. Система каналов, пронизывающих биопленку, обеспечивает доступ к микроколониям и обмен питательных веществ и метаболитов с окружающей средой [1704, 1715, 1724, 1735-1737]. Примером такого структурированного сообщества являются биопленки, содержащие анаммокс-бактерии [1738-1743] – сравнительно недавно открытые хемолитотрофы, осуществляющие анаэробное окисление аммонийных ионов нитритными с образованием газообразного азота. Они не способны существовать в виде монокультуры и существуют лишь в анаэробных зонах в составе сообществ – совместно с аэробными и анаэробными гетеротрофами, нитрификаторами и денитрификаторами.

О’Тул с соавт. и Лемон с соавт. [1706, 1744] выделяют следующие стадии формирования бактериальных биопленок на поверхности твердого субстрата:

1. Первоначальное прикрепление к поверхности
2. Образование монослоя
3. Миграция с образованием мультислойных микроколоний
4. Образование внеклеточного матрикса
5. Созревание биопленки с характерной трехмерной архитектурой.

Первая стадия является определяющей в формировании биопленки и обусловлена, во многом, адгезией клеток первичных колонизаторов к поверхности субстрата, к которым в дальнейшем подселяются микроорганизмы-спутники. У бактерии *Ps. putida* при первичном прикреплении к поверхности экспрессируются более 30 генов и 40 продуктов биосинтеза уже через 6 час. У *E. coli* в адгезии участвуют 1/3 генов [1707, 1709]. После прикрепления к поверхности начинают экспрессироваться и накапливаться продукты других генов, участвующих в созревании зрелой биопленки, и наблюдаются фенотипические изменения. Бактериальному прикреплению способствуют фимбрии, флагеллы, экзополисахариды, которые важны для преодоления отталкивающей электростатической силы между отрицательно заряженными поверхностью субстрата и бактериальной оболочкой [1709]. Адгезии может способствовать коагрегация клеток и коадгезия планктонных клеток к уже прикрепленным. Как полагают [1745], степень гетерогенности формирующейся пленкой определяется балансом между скоростью роста и абразией. Это подтверждается тем, что медленно растущие микроорганизмы, например, нитрификаторы и метаногены, образуют относительно ровные пленки или сферические гранулы, в то время как быстро растущие – более гетерогенные структуры с клеточными кластерами и выростами.

### 3.2.5.2. Регуляция физиологической активности в микробных биопленках

Важную роль в образовании биопленок и межклеточных взаимодействиях выполняют системы регуляции, зависящие от плотности клеточной популяции. Бактерии способны чувствовать повышение плотности популяции и отвечать на него быстро и скоординированно индукцией определенных наборов генов. Этот тип регуляции получил название кворум сенсинга (Quorum Sensing, QS) [439, 1648, 1746-1753]. Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность скоординированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе, что способствует быстрой адаптации их популяций к меняющимся условиям среды и их выживанию.

QS системы играют важную роль в регуляции многих клеточных процессов, в том числе отвечающих за формирование биопленок, синтез экзоферментов, экзополисахаридов, токсинов, бактериоцинов, антибиотиков, устойчивость к антибиотикам и другим антимикробным соединениям, споруляцию, компетентность, взаимодействие с эукариотами, вирулентность патогенных и фитопатогенных бактерий (регулируют синтез факторов вирулентности), в ответе на стресс [448, 763, 1708, 1711, 1750, 1754-1766]. В настоящее время QS-регуляция рассматривается как глобальный фактор регуляции и средство коммуникации между бактериями, относящимися к одному или разным видам, родам или даже семействам [1647, 1759, 1765, 1767-1774]. Эффективные средства подавления QS-системы и образования биопленок (QQ, Quorum Quenching) нашли бы применение, прежде всего, в антимикробной терапии [1749, 1772, 1775-1778]. Средства, стимулирующие или подавляющие QS и образование биопленок, влияющие на их морфологию, управление условиями функционирования QS-системы, позволят управлять свойствами микробоценозов очистных сооружений и других сообществ микроорганизмов, важных в практическом отношении [1626]. Так, для контроля обрастания поверхности очистных сооружений предложено вносить в активный ил QQ-микроорганизмы, подавляющие QS-системы [1779], что особенно актуально для таких очистных систем, как мембранные реакторы [39, 44, 222, 1623-1626].

QS системы бактерий включают низкомолекулярные сигнальные молекулы, аутоиндукторы, которые могут диффундировать через клеточную стенку, а также регуляторные рецепторные белки, с которыми взаимодействуют аутоиндукторы. Одни аутоиндукторы связываются с мембранными рецепторами, расположенными на поверхности бактериальной клетки, в то время как другие способны проникать через мембрану и связываться с внутриклеточными рецепторами [438, 1750, 1752, 1773, 1782, 1781] и специфическими белками, регулирующими транскрипцию определенных генов [1750].

В качестве сигнальных молекул выступают ряд химических соединений, наиболее изученными из которых являются производные *N*-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ), аутоиндукторы 1-го типа, синтезируемые грамотрицательными бактериями [1750, 1752, 1754, 1755, 1761, 1771, 1774, 1781-1784], при этом один вид бактерий может использовать и узнавать более чем один тип сигнальных молекул и содержать QS системы различных типов и, напротив, одни и те же аутоиндукторы могут быть использованы для активации транскрипции у разных бактерий [439, 1749, 1757, 1768, 1785, 1786]. АГЛ содержат лактонное кольцо, образованное из гомосерина, и боковые ацильные цепи [1787]. У грамположительных бактерий роль аутоиндукторов выполняют низкомолекулярные олигопептиды. В качестве химической основы «языка» могут быть использованы также модифицированные пептиды, аминокислоты и сходные с ними аминные соединения [1788, 1789], а также производные тетрагидрокситетрагидрофурана (аутоиндукторы второго типа). Последние найдены и у грамотрицательных, и у грамположительных бактерий [439, 1751, 1752, 1790, 1791]. QS-системы регуляции найдены и у эукариотических организмов, в частности у грибов, у которых роль аутоиндуктора выполняют фарнезол и тирозол (у *Candida albicans*), фенилэтанол и триптофол [1752].

Сигнальные молекулы QS систем накапливаются в бактериальной популяции и автокаталитически воздействуют на бактерии, не принимая прямого участия в бактериальном росте [1761, 1775, 1792, 1793]. При достижении внеклеточной концентрации аутоиндукторов выше определенной пороговой сигнал рецепторных белков, «опознающих» молекулы аутоиндуктора, становится критическим, необходимым для активации (индукции) экспрессии генов-мишеней [1750, 1774, 1794, 1795]. Каждый индивидуальный ген имеет собственный порог активации, который определяется численностью окружающих бактерий. Это означает, что различные гены проявляют повышенную экспрессию при разном количестве бактерий, т.е. на разных стадиях бактериального развития [1750, 1761, 1796]. Это относится и к биопленке. Очевидно, не существует унифицированной плотности бактерий, когда одновременно активируются все QS-зависимые гены [1792]. Наиболее выраженной активности сигнальных молекул QS систем и их влияния на фенотип бактерий следует ожидать на стадии быстрого размножения, которая сопровождается колонизацией субстрата и формированием биопленочного матрикса.

На примере *P. aeruginosa* было показано, что ингибиторы QS систем не влияют на образование ранней биопленки (когда идет процесс обратимого, т.е. временного прикрепления бактерий), но способны подавлять позднюю биопленку, вызывая ее отторжение [1792, 1797]. Подавление функционирования QS систем и роста биопленок может быть достигнуто путем ингибирования синтеза молекул – предшествен-

ников АГЛ или самих АГЛ, контролем транспорта АГЛ из клетки во внеклеточную среду, использования молекул антагонистов аутоиндукторов, мешающих связыванию аутоиндуктора с молекулами рецепторных белков, или применением ферментов, расщепляющих АГЛ [1718, 1750, 1751, 1775, 1777, 1792, 1794, 1795, 1797-1801]. Однако все эти методы скорее применимы к подавлению биопленок в медицинской практике, чем к задачам повышения эффективности биологической очистки сточных вод. В то же время ряд соединений, которые могут присутствовать в сточных водах, могут оказывать стимулирующее или подавляющее действие в отношении роста биопленок или микробных агрегатов активного ила через механизм, влияющий на QS-системы. В качестве примера можно указать на взаимодействие с QS веществ, относящихся к полифенолам, синтезируемыми растениями и встречающимися в некоторых типах сточных вод. Показано, что такие вещества способны взаимодействовать с QS-системами [1751, 1802-1809].

Касательно представленной диссертационной работы образование биопленок было исследовано нами с рядом тестерных штаммов, прежде всего, с целью выяснения влияния оксидативного воздействия пероксидом водорода на фоне освещения среды видимым светом.

### **3.2.6. Удаление биогенных элементов**

В рамках диссертационной работы было уделено внимание удалению биогенных элементов (азота и фосфора), как одной из актуальных задач в современных схемах биологической очистки. Применительно к удалению фосфора исследовалось, в частности, оксидативное воздействие на поглощение фосфатов в модельных стоках при гранулообразовании.

Проблемы удаления биогенных элементов из сточных вод, биохимические, микробиологические основы, технологические принципы были рассмотрены нами ранее в книгах [2, 4]. Поэтому отметим лишь наиболее важные особенности и новые подходы к микробиологическому удалению биогенных элементов по сравнению с традиционными решениями.

Биогенные элементы могут быть удалены непосредственно на очистных сооружениях – до удаления (предочистка) и после удаления основной массы органических загрязнений (глубокая доочистка). С этой целью разработаны и применяются самые разнообразные методы и схемы очистных сооружений.

Для биологического удаления азота и фосфора используются анаэробно-аэробные и аэробные методы. Пример анаэробно-аэробного метода – очистка сточной воды в SB-реакторах, рассмотренная в разделе 3.2.4.

### 3.2.6.1. Биологическое удаление соединений азота

Биологическое удаление азота основано на использовании биохимических процессов аммонификации, нитрификации, денитрификации.

Аммонификация протекает одновременно с разложением органических азотсодержащих соединений. В ходе нее азотсодержащие органические соединения разлагаются грибами, актиномицетами и бактериями с выделением ионов  $\text{NH}_4^+$  или свободного аммиака. Этот процесс может протекать и в анаэробных, и в аэробных условиях.

В анаэробных системах выход биомассы небольшой и, соответственно, количество биогенных элементов (азота и фосфора), связанное с образующимся илом, невысокое. В этом случае анаэробная очистка сопровождается повышенным накоплением аммонийных ионов и фосфатов в очищаемой воде по сравнению с аэробными методами. Последующее применение традиционной схемы аэробной биологической очистки сточных вод после анаэробной позволяет снизить содержание общего азота примерно на 30%, фосфора на 35–40%, сульфаты проходят сооружения транзитом. В результате по показателям содержания азота и фосфора не достигается требуемое значение ПДК для сброса воды в водоем [66]. Таким образом, для более широкого использования передовых анаэробных методов обезвреживания стоков, богатых органикой и биогенными элементами, необходимо решать задачу удаления последних из стоков после разложения основной массы органических загрязнений.

Окисление аммонийных ионов кислородом воздуха с помощью микроорганизмов-нитрификаторов наиболее активно протекает после удаления из сточной воды основной массы органических соединений, поскольку присутствие органических веществ снижает активность нитрификаторов [1742]. В отсутствие кислорода появляющиеся ионы  $\text{NO}_2^-$  до  $\text{NO}_3^-$  восстанавливаются в ходе денитрификации до  $\text{N}_2$  или  $\text{N}_2\text{O}$  присутствующим в среде органическим веществом или другими восстановителями с помощью бактерий-денитрификаторов.

Нитрификация (первая стадия с окислением  $\text{NH}_4^+$  до  $\text{NO}_2^-$  и вторая стадия с окислением  $\text{NO}_2^-$  до  $\text{NO}_3^-$ ) и денитрификация чаще протекают последовательно. Параллельное протекание этих процессов возможно, например, при ограниченном, диффузионном поступлении кислорода внутрь флоккулы активного ила, гранулы или биопленки. В этом случае окисление аммиака происходит вне или на поверхности хлопьев активного ила, гранулы или биопленки, а денитрификация – внутри. Поэтому различные стадии биотрансформации соединений азота могут осуществляться как в многоступенчатых схемах с отдельными биоценозами, так и в одноступенчатой системе с общим биоценозом. В первом случае окисление органических веществ, нитрифика-

ция и денитрификация протекают в изолированных сооружениях со специфическим активным илом или биопленкой. Системы с общим биоценозом состоят из одного или двух смежных реакторов с одним и тем же рециркулирующим илом [66].

Во всех схемах очистки скорость-лимитирующей стадией в совокупном процессе является обычно первая стадия нитрификации, поэтому нитриты в среде не накапливаются.

На эффективность нитрификации влияют численность нитрифицирующих микроорганизмов, время пребывания ила и, соответственно, возраст ила в очистном сооружении, нагрузка на очистные сооружения, степень аэрации среды, содержание  $\text{CO}_2$ , pH, температура, окислительно-восстановительные условия среды, наличие органического субстрата, концентрация  $\text{NH}_4^+$  и нитратного азота.

Значение окислительно-восстановительного потенциала в большей степени определяет условия процесса денитрификации при очистке сточных вод, чем отсутствие кислорода. Этот процесс может протекать при концентрации растворенного кислорода в иловой смеси более 4 мг/л при условии поддержания оптимального значения окислительно-восстановительного потенциала.

Можно создать условия, при которых будет идти только первая фаза нитрификации. При удалении азота из загрязненных стоков в этом случае можно достичь увеличения скорости денитрификации (образование  $\text{N}_2$  из  $\text{NO}_2^-$  идет быстрее, чем из  $\text{NO}_3^-$ ), сокращая потребности в  $\text{O}_2$  для нитрификации в 1,4 раза и уменьшая количество органического субстрата, требуемого для денитрификации (в 1,5 раза на стадии денитрификации) и прирост ила [30].

Время пребывания ила (возраст ила) важно для протекания нитрификации. Поскольку рост нитрификаторов более медленный, чем гетеротрофных бактерий, время пребывания ила в сооружениях, работающих на нитрификацию, должно быть существенно больше времени, когда требуется только удалить БПК. Время пребывания ила может быть увеличено или путем повышения концентрации активного ила его рециклом из вторичного отстойника, или удерживанием в аэротенке, как в биотенках или в мембранных биореакторах с погружным модулем, или путем увеличения объема биологического сооружения.

Чередование процессов нитрификации–денитрификации в ходе биохимической очистки позволяет уменьшить содержание в сточных водах соединений азота на 97–99%.

Общее потребление кислорода обычно на 50–100% больше в системе с удалением азота по сравнению с обычной системой с удалением только БПК.

При удалении соединений азота из сточных вод могут применяться различные схемы очистки: одностадийные, двух- и трехстадийные [26, 66, 1599, 1810-1812].

Выбор зависит от качества исходной воды и требований, предъявляемых к очищенному стоку. В каждой схеме процесс денитрификации может осуществляться в начале, середине или конце сооружения, с проведением процесса денитрификации в аэробных или анаэробных условиях, с дополнительной рециркуляцией иловой смеси в начало резервуара из его конца или из вторичного отстойника, а также из одной ступени в другую. Во всех схемах на завершающей стадии устраивают, как правило, аэрацию иловой смеси продолжительностью 1–2 часа для отдувки газообразного азота и более глубокого окисления аммонийного азота [30].

В большинстве сооружений с активным илом по удалению азота биотрансформацию его соединений проводят последовательно в отдельных реакторах – нитрификаторах и денитрификаторах с обеспечением аэробных условий на стадии нитрификации и анаэробных (аноксичных, с поддержанием концентрации растворенного кислорода в воде  $<0,5$  мг/л) на стадии денитрификации [66]. Такие последовательные многоступенчатые системы с отдельным окислением органических загрязнений, нитрификацией и денитрификацией обеспечивают стабильность работы и высокую степень очистки от соединений азота – 90% и более. Однако они зачастую требуют внесения в денитрификатор дополнительного органического вещества, необходимого для протекания денитрификации. Наилучшим источником углерода для денитрификации считается метанол, наиболее полно подвергающийся распаду. Могут использоваться этанол, ацетат, углеводы, а также избыточный ил или исходные сточные воды [1813-1816]. В последнем случае часть исходного потока с высоким содержанием загрязнений направляется непосредственно в денитрификатор, минуя нитрификатор, для того чтобы установить необходимое соотношение ХПК и азота.

В качестве примера укажем две схемы очистки: пост-денитрификация и пре-денитрификация [26, 66].

Пост-денитрификация обычно используется, когда требуется высокая степень удаления азота ( $>80\%$ ). В этом случае оформление процесса удаления включает следующие зоны: зону смешения, окислительную зону, аноксичную зону, аэрационную зону. Смысл в установлении аэрационной зоны после аноксичной заключается в удалении маленьких пузырьков азота, образующихся в ходе денитрификации, для того, чтобы избежать флотирования ила во вторичном осветлителе. Кроме того, аэрирование предотвращает развитие анаэробной ситуации во вторичном отстойнике.

В пост-денитрификаторе органическое вещество неочищенных вод не может быть использовано как источник углерода, поскольку оно уже было удалено до требуемых стандартов на выходе на стадии нитрификации. Это влечет большее потребление источника углерода, кислорода и соответствующих энергозатрат по сравнению с вариантом пре-денитрификации.

При пре-денитрификации очистка включает следующие этапы: зона смешения и деоксигенации, аноксичная зона, зона окисления. Стадия денитрификации размещается перед окислительной зоной. Более того, часто зона деоксигенации и зона смешения устанавливаются перед аноксичной зоной.

В зоне деоксигенации кислород в жидкости после смешения восстанавливается прежде чем входящая вода успеет смешаться с ним. В этом способе некоторые легко деградируемые вещества входных вод сохраняются для денитрификации. При этом обеспечивается уменьшение затрат на источник углерода и аэрацию, поэтому этот вариант стал наиболее распространенным способом удаления азота. Недостаток этой схемы заключается в том, что таким путем не может быть удалено 100% азота, поскольку денитрификация сильно зависит от степени рециркуляции ила внутри системы. Для получения режима денитрификации необходимо обеспечить рециркуляцию воды из окислительной зоны в аноксичную зону. Аноксичная зона и зона окисления обычно равны по объему.

При использовании одного сооружения для очистки в нем выделяются анаэробные зоны для проведения процесса денитрификации. Чередование аэробных и анаэробных зон можно осуществить в любом порядке, в зависимости от качественного состава исходной сточной воды. В варианте очистки в SB-реакторе применяют последовательное чередование аэробных и анаэробных условий путем включения и выключения подачи воздуха [1815]. Последовательность и продолжительность этих фаз производится либо по временному графику, либо по соотношению фактических концентраций аммонийного и нитратного азота в биореакторе. В этих режимах возможно одновременное удаление азота и фосфора из сточных вод [1810, 1812, 1816, 1817]. Преимущества таких систем – биологическую очистку можно реализовать на базе существующих сооружений с относительно небольшими затратами, отсутствие промежуточных отстойников и насосных станций для перекачивания циркулирующего ила, использование в качестве органического субстрата для денитрификации загрязнений, содержащихся в исходной сточной воде, снижение энергозатрат на подачу кислорода, снижение количества химических реагентов для поддержания рН, меньший прирост активного ила или биопленки. Однако в этом случае суммарный объем сооружений увеличивается (или уменьшается допустимая нагрузка по воде) не менее чем на 15–20%, управлять процессом очистки с общим, циркулирующим в сооружении биоценозом сложнее.

Лабораторией технологических схем НИИ ВОДГЕО разработана циклическая циркуляционная схема очистки в аэротенках нитри-денитрификаторах, сочетающая анаэробную и аэробную зоны [1810, 1818]. Схема обеспечивает параллельное удаление органических загрязнений и соединений азота с одновременным биологическим

удалением соединений фосфора. Высокий эффект изъятия соединений азота и фосфора достигается за счет рационального использования имеющегося органического субстрата исходной сточной жидкости.

Принцип работы схемы основан на рециркуляции части иловой смеси между аэробной и анаэробной зонами. При этом окисление органического субстрата, окисление и восстановление соединений азота происходят циклически, небольшими порциями, в зависимости от степени рециркуляции. В результате процессы нитрификации протекают практически одновременно, что позволяет удалять соединения азота без использования дополнительного источника органического субстрата на 85–98%. В этой схеме учитывается, что процесс денитрификации может протекать не только в строго анаэробных, но и в аэробных условиях. Эта схема в отличие от традиционных позволяет наряду с эффективным удалением соединений азота повысить эффективность изъятия соединений фосфора. За счет оптимального чередования аэробных и анаэробных (аноксичных) условий в 5–6 раз возрастает способность активного ила аккумулировать соединения фосфора. Соответственно возрастает и эффективность его удаления.

Существенным преимуществом данной технологии является и то, что ее реализация возможна путем переоборудования существующих аэротенков в аэротенки нитри-денитрификаторы с рециркуляцией иловой смеси без строительства дополнительных сооружений. Рециркуляция иловой смеси может осуществляться из конца аэробного реактора в начало денитрификатора насосами или эрлифтами.

При благоприятном соотношении БПК к общему азоту (более 4:1) использование циклических схем позволяет исключить добавку дополнительного субстрата и специальную корректировку pH. Стабильность и надежность технологического процесса при такой системе очистки обеспечиваются созданием в сооружениях условий, одновременно благоприятствующих процессу окисления органических веществ, нитрификации и денитрификации. Разработанный вариант очистки в нашей стране впервые был реализован на очистных сооружениях г. Подольск (Московская обл.).

Выбор той или иной схемы во многом зависит от соотношения органического углерода и азота в сточных водах. Если соотношение С : N высоко, то основную часть БПК (органический углерод) удаляют на первом этапе, а удаление азота проводится на втором этапе по одно- или многоступенчатой схеме.

При низком значении С : N удаление азота осуществляется без предварительного удаления органических веществ, и содержание нитритов и нитратов может достигать значительных концентраций (если содержание азота высокое). Органические соединения углерода и образующийся активный ил используются для денитрифика-

ции, однако при избытке нитритов и нитратов для удаления их путем денитрификации требуется введение дополнительного источника углерода.

Определенное развитие получили системы с фильтрацией (мембранный реактор) для задержки биомассы нитрификаторов-денитрификаторов и увеличения производительности биореактора. В мембранном реакторе с полной задержкой биомассы [1819] была достигнута плотность нитрификаторов  $2 \cdot 10^{10}$  кл/мл и максимальная скорость нитрификации  $4000 \text{ мг NH}_4^+/\text{л.сут.}$ , что в несколько десятков раз превышает скорости, наблюдающиеся в обычном проточном процессе нитрификации.

В последние десятилетия были показаны возможности организации процессов нитрификации-денитрификации, отличные от классических. Среди них можно отметить следующие [190, 1738, 1741, 1742, 1820-1823]:

- автотрофная денитрификация;
- гетеротрофная нитрификация;
- аэробная денитрификация;
- процесс «ANAMMOX» (Anaerobic AMMonium Oxidation) – анаэробное окисление аммония).

Методы удаления азота, разрабатываемые на основе обнаруженных процессов, позволяют существенно расширить арсенал систем биологической очистки сточных вод. Из этих процессов наибольшую перспективу и промышленное использование имеет «Анаммокс» [1822, 1823].

Процесс «Анаммокс», обнаруженный первоначально голландскими исследователями в 1992 г. при работе реактора-денитрификатора со взвешенным слоем носителя [1673, 1738, 1741, 1742, 1821, 1824-1828], представляет собой прямую реакцию между ионами аммония и нитратными ионами в биологическом процессе, приводящей к образованию молекулярного азота [1826]. Здесь, в анаэробных условиях теоретически возможно протекание следующих реакций:



В аэробных условиях:



Реакция проходит с освобождением энергии и требует, чтобы окисление аммония происходило в присутствии бактерий, использующих аммиак как донор электронов для его биотрансформации в молекулярный азот. При этом на 1 моль ионов аммония, 0,2 моль нитритов образуется около 20 мг биомассы [1827]. Процесс протекает в полностью анаэробных условиях и обратимо угнетается в микроаэрофиль-

ных, т.е. выдерживает присутствие следов кислорода. Эффективность этого процесса зависит от величины рН (оптимальное значение рН от 7 до 8), температуры, концентрации растворенного кислорода и окислительно-восстановительного потенциала среды. Регулирование также возможно путем изменения возраста активного ила и продолжительности обработки воды в биореакторе. Скорость окисления пропорциональна количеству изначально добавленного ила. Газообразный азот является конечным продуктом окисления, он образуется из эквимольных количеств аммония и нитрита.

Процесс чувствителен к концентрациям нитритов 70–180 мг N/л, токсичным для анаммокс-бактерий [1738]. Кроме того, из-за низкой скорости роста бактерий время, требуемое для запуска очистного сооружения в процессе «Анаммокс» составляет 100–150 сут. [1742].

Для протекания анаммокс-процесса необходимо соотношение аммония и нитрита 1:1,3, а не 1:1, как можно было бы ожидать из уравнения материального баланса. Избыток нитрита (0,3 моль  $\text{NO}_2^-$  на моль  $\text{NH}_4^+$ ) окисляется до нитрата. Остаток восстановительных эквивалентов, по-видимому, используется для фиксации  $\text{CO}_2$ . Поэтому «Анаммокс» в сочетании с классической нитрификацией позволяет удалить полностью  $\text{NH}_4^+$ , однако образующиеся или изначально присутствующие в среде нитриты вовлекаются в реакцию не полностью, около 25% от их количества окисляется до нитратов. Таким образом, только за счет анаммокс-процесса нельзя обеспечить полное удаление азота из среды – некоторая, меньшая, часть азота будет присутствовать в виде нитратов в воде после очистки [1742, 1828, 1829]. Было показано, что при проведении данного процесса в одну стадию в проточном режиме при поддержании возраста ила, близкого к 40 суткам, можно достичь эффективности нитрификации почти 100 % и денитрификации около 70 %.

Похожий процесс был обнаружен нами в 1998 г. [1830-1835] в ходе экспериментальных исследований с реальными стоками коксохимического производства Череповецкого металлургического комбината (АО «Северсталь»), где впервые в металлургической отрасли России была предусмотрена биологическая очистка сточных вод не только от органических загрязнений, но и от соединений азота. Исследования были инициированы задачей выяснения причин неудовлетворительной по сравнению с проектными значениями работы стадии нитрификации-денитрификации линии очистки сточных вод.

Было показано, что в изучаемой системе протекает последовательно не только аммонификация (на более ранних стадиях очистки во время удаления органических загрязнений), нитрификация и денитрификация, но и возможна как трансформация аммонийных ионов в аноксигенных условиях (наряду с классическим процессом ав-

тотрофной аэробной нитрификации), так и денитрификации в аэробных условиях (наряду с классическим процессом анаэробной нитратредукции). В аноксигенных условиях при начальной концентрации  $\text{NH}_4^+$  100–500 мг/л окисление аммонийных ионов происходило примерно на 90% за 5–7 сут. Граница, при которой аммонийные ионы перестают окисляться, составляет около 100 мг/л. Окисление ионов  $\text{NH}_4^+$  ионами  $\text{NO}_3^-$  увеличивало общую скорость удаления азота из сточных вод, протекало, в отличие от вышеупомянутых альтернативных процессов, при аэробных условиях при pH 6,5–8,5, в отсутствие дополнительных органических субстратов, без накопления в среде нитритов и нитратов и стимулировалось добавлением в среду нитратов в концентрации 20–100 мг/л. При этом окисление аммонийных ионов было сопряжено с протеканием денитрификации, которая не являлась чувствительной к присутствию кислорода в среде.

На основе проведенных исследований была рекомендована отдельная подача потоков сточных вод (фенольных, ГОС-воды, рециркулирующего активного ила) и последовательная схема очистки сточных вод от соединений азота на стадии нитрификации и денитрификации с уменьшением потока рециркулируемого из вторичного отстойника ила.

Эксплуатация очистных сооружений по рекомендованной схеме позволила поднять нагрузку по сточной воде на очистные сооружения со 115 до 160 м<sup>3</sup>/ч. (т.е. на 40%) при времени пребывания сточной воды в очистных сооружениях около 5 сут. и содержании аммонийных ионов в исходной сточной воде около 200 мг/л с повышением скорости удаления азота из сточных вод, снижением эксплуатационных затрат на очистку, количества образующегося избыточного активного ила; улучшением степени очистки сточных вод от ионов аммония и нитрат-ионов.

Возникновение альтернативных процессов удаления избыточного азота из сточной воды коксохимического и других производств может быть объяснено тем, что микробиота загрязненных сред эволюционирует в идеальном случае в сторону максимально эффективного использования протекающих в системе круговоротов веществ. В случае стоков коксохимического производства, содержащих повышенные количества азота, очистные сооружения позволяют удалять из воды более 90% и органических компонентов, и азота без внесения дополнительных количеств органического субстрата, как это обычно требуется в существующих промышленных системах нитрификации-денитрификации. Очевидно, в рассматриваемом случае основная причина нормализации работы очистных сооружений обусловлена, по видимому, не столько другой более рациональной схемой организации распределения и рециркуляции загрязненных потоков (это не приводит к устранению дисбаланса в соотношении биогенных компонентов), сколько наличием побочного стока

азота из системы, обусловленного протеканием альтернативных процессов удаления азота, не требующих участия органических субстратов. Одним из таких процессов может быть прямая реакция между  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_3^-$  ионами.

Бактерии, ответственные за протекание анаэробного аммонийного окисления, были изолированы и исследователями из Нидерландов и другими и предварительно отнесены к порядку *Planctomycetales* как кандидаты *Brocardia anammoxidans* и *Kuenenia stuttgartiensis* [1836-1839]. В анаэробных условиях они окисляют аммоний до нитрита в мембраносвязанных внутрицитоплазматических анаммоксосомах [1741, 1840], которые составляют до 30% клеточного объема. В дальнейшем в различных очистных системах с биореакторами и в природных средах были найдены таксономически близкие бактерии *Candidatus "Scalindua wagneri"*, *Candidatus "Scalindua brodae"* и другие [1839, 1841-1849]. Было показано, что бактерия *Candidatus "Scalindua sorokinii"* ответственна за конверсию 50% азота в аноксичной зоне Черного моря, что говорит о важности анаммокс-бактерий в трансформации соединений азота в природе [1839, 1842, 1847, 1850-1854].

Анаммокс-бактерии растут очень медленно – типичная удельная скорость роста  $0,003 \text{ ч}^{-1}$ , время удвоения 10,6 сут. [1741, 1847], с типичным выходом биомассы 0,13 г асб/г  $\text{NH}_3\text{-N}$  [1673], могут быть обнаружены в достаточном количестве и проявлять свою активность лишь в виде скоплений в составе гранул или биопленок, развивающихся на поверхности твердых субстратов.

Несмотря на то, что они обнаруживаются во многих очистных системах [1578, 1605, 1673, 1741, 1838, 1847, 1855-1862], их эффективное использование возможно лишь в биореакторах с биопленкой и в системах с гранулами, в SBR [1598, 1673, 1740, 1741, 1863-1886] и UASBR [1605, 1606]. В составе биопленки Еттеном с соавт. была достигнута суммарная активность анаммокс-бактерий – до 30 мг/(г асв. сут.) [1828]. Впоследствии были достигнуты намного более высокие скорости анаэробного окисления – 8,9 г N/л.сут. [1842], 15 г N/л.сут. [1742].

Разработаны различные модификации процесса с участием анаммокс-бактерий, в основе которых лежит удаление аммонийного азота через реакцию с нитритом [1741, 1742]. К ним относятся:

- OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification) – автотрофная нитрификация-денитрификация в условиях лимитирования по кислороду, реализуемая в SBR [1867]; биохимическая основа процесса – взаимодействие между аммонийными и нитритными ионами, что также используется и в процессе «Анаммокс»;

- SHARON (Single reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite) – конвертация аммония в нитрит в присутствии кислорода [1868-1870];

- CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite) – полностью автотрофный процесс удаления азота на основе комбинирования частичной нитрификации и процесса «Анаммокс» в едином аэрируемом реакторе. Нитрификаторы окисляют аммоний до нитрита и потребляют кислород, что приводит к анаэробным условиям, необходимым для развития анаммокс-бактерий [1742, 1871-1873], осуществляющими прямую реакцию между аммонийными и нитритными ионами с образованием молекулярного азота.

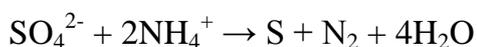
- SURAMMOX (Sulfate reduction via ammonia oxidation) – восстановление сульфатов за счет окисления аммонийных ионов [1874].

Отличия в этих процессах заключаются в концентрациях, соотношении органических соединений и аммонийных ионов на входе в систему очистки, полноты окисления  $\text{NH}_4^+$  в  $\text{NO}_2^-$ , наличием или отсутствием кислорода в сточной воде [1741, 1874].

Некоторые виды *Nitrosomonas* могут использовать нитраты в качестве конечного акцептора электронов с образованием закиси азота или молекулярного азота [1875, 1876]. То есть, в принципе, классические автотрофные нитрифицирующие бактерии могут одновременно окислять аммоний и восстанавливать нитраты или нитриты [1867, 1876, 1877].

Процесс «Анаммокс» может оказаться перспективным при решении задач удаления азота из загрязненных сред, поскольку не требует добавления органического субстрата для нитратредукции, как при использовании классической анаэробной денитрификации [1741, 1742, 1867]. То есть биологическая очистка сточных вод без введения дополнительных субстратов в систему может рассматриваться как пример экологически чистых технологий, при которых проблема загрязнений решается «в начале трубы» и которая в настоящее время относится к наилучшим доступным технологиям [26]. В данном случае отсутствие дополнительно вводимых субстратов приводит не только к экономии затрат, но и к уменьшению вторичных загрязнений. Экономические расчеты показывают, что затраты на очистку комбинированным способом SHARON-Anammox в несколько раз ниже по сравнению с традиционным способом удаления азота [29, 1870].

Расчет свободной энергии показывает, что теоретически допустимо окисление аммонийных ионов сульфат-ионами [1740]. Имеются сведения об экспериментальном обнаружении такого микробиологического процесса с образованием молекулярного азота и серы в окислительно-восстановительной реакции ионов аммония с сульфатами:



$$\Delta G^\circ = - 47,8 \text{ КДж/моль,}$$

протекающей при переработке барды (винассы), остающейся после получения и отгонки этанола на свекловичной мелассе [1878]. Однако эти результаты пока еще не получили убедительного подтверждения, несмотря на сообщения о разработке процесса SURAMMOX, в основе которого лежит микробиологическое окисление аммонийных ионов сульфат-ионами [1874].

### 3.2.6.2. Биологическое удаление соединений фосфора

Наиболее распространенный подход к удалению фосфора основан на его химическом осаждении из сточных вод, прошедших биологическую очистку, в виде нерастворимых фосфатов железа или алюминия. Чтобы осадить фосфаты, очень часто реагент добавляют непосредственно в аэротенк. В данном случае осаждение обычно проводится хлорным железом, сульфатом железа (II), часто с добавлением извести для предотвращения снижения pH, обусловленным внесением солей железа. В условиях аэрации или в присутствии нитратов  $Fe^{2+}$  окисляется до  $Fe^{3+}$ , фосфор осаждается в виде  $FePO_4$ , аккумулируется и выводится из очистных сооружений вместе с активным илом. Вместо солей железа иногда вносятся соединения алюминия (в виде хлорида или оксихлорида), особенно если возможно возникновение анаэробных условий, например, при перегрузке очистных сооружений. В отличие от фосфатов железа (III), в анаэробных условиях фосфаты  $Al^{3+}$  не восстанавливаются и фосфор не высвобождается из осадков. Химическое осаждение позволяет снизить содержание фосфора в обработанном стоке до 0,5–3 мг/л.

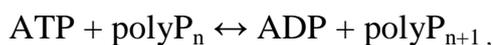
Возможно извлечение фосфора из сточной воды в виде кристаллов струвита  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$  или фосфатов кальция, неконтролируемое образование которых и осаждение на поверхностях приводит к забивке водопроводных труб, теплообменников [1879-1881]. Такие бактерии как *Mucococcus xanthus* могут катализировать образование струвита вне клеток и использоваться для осаждения фосфора. Этот процесс был обнаружен в 1989 г., но не стал основой для широкой практической реализации. Также возможно осаждение фосфора в виде нерастворимых фосфатов кальция при микробиологическом защелачивании среды [190, 1879].

Фосфор можно также удалять в симбиотенках и симбиофилтрах с водорослями, в биопрудах, на гидрботанических площадках на завершающих стадиях глубокой очистки сточных вод. Водоросли и растения аккумулируют фосфор в относительно больших количествах.

Современный безреагентный высокоинтенсивный метод биологического удаления фосфора из сточных вод (EBPR – Enhanced Biological Phosphorus Removal) основан на способности некоторых бактерий аккумулировать фосфаты в клетках в

количествах, превышающих ростовые физиологические потребности, – 5–10% и более от массы клеточного вещества [26].

При аэрации сточных вод, в слегка щелочных условиях (рН 7,0–8,5), при наличии в достаточном количестве органического субстрата и фосфатов типичные гетеротрофные микроорганизмы поглощают фосфаты из окружающей среды с образованием внутриклеточных полифосфатов как запасное депо фосфора и источник энергии [1882, 1883]. Содержание фосфатов в клетках таких микроорганизмов – 1–3% от сухой массы клеточного вещества [1884]. Однако некоторые бактерии (рр. *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Accumulibacter*, *Rhodocyclus*, *Nocardia*, *Citrobacter* и др.) – так называемые фосфатаккумулялирующие организмы (ФАО), или Р-бактерии – извлекают фосфаты из воды в повышенных количествах для построения клеток и синтеза полифосфатов как резервных энергозапасяющих веществ [190, 1611, 1885-1891]. Этот процесс протекает в присутствии легко утилизируемых растворимых органических веществ, прежде всего ацетата, а также глюкозы, спиртов, других летучих органических кислот, используемых в качестве источника энергии для роста ФАО. Одновременно потребляются углеродсодержащие резервные вещества клеток: полимерные насыщенные оксикислоты (ПНО), главным образом полиоксибутират и полиоксивалерат (ПОВ) и синтезируется гликоген [190, 1812, 1892-1894]. Энергия, выделяющаяся при потреблении ПНО, используется для синтеза АТФ и запасных, богатых энергией полифосфатов. Последние синтезируются с помощью фермента – полифосфаткиназы, катализирующей синтез длинноцепочечных полифосфатов примерно с 1000 остатками фосфата:



и запасаются в клетках в виде гранул, что и обеспечивает высокое потребление фосфора из среды (сточной воды) – до 180 мг/г сухой биомассы при оптимальном соотношении ХПК : Р = 20 : 1. Максимальная удельная скорость роста ФАО в аэробных условиях довольно низкая, около 0,04 ч<sup>-1</sup>. Минимальное соотношение ХПК : Р должно быть 2 : 1 [1895].

В анаэробных условиях нефосфорные гетеротрофные бактерии сбрасывают органические вещества с образованием летучих жирных кислот, главным образом ацетата, являющегося субстратом фосфатаккумулялирующих бактерий. ФАО потребляют внеклеточный ацетат и расщепляют внутриклеточный гликоген до ацетата, синтезируя из ацетата полимерные насыщенные оксикислоты и используя для синтеза энергию, выделяющуюся при гидролизе клеточных полифосфатов. При этом гранулы полифосфатов уменьшаются в размерах, а образующиеся при гидролизе полифосфатов ортофосфаты Р<sub>1</sub> выделяются во внеклеточную среду. Последние вновь могут извлекаться из среды в аэробных условиях для синтеза полифосфатов, при этом бакте-

риальный рост и пополнение полифосфата и гликогена вновь происходит за счет потребления запасенных полиоксиалканоатов. В аэробных условиях полифосфаты могут сохраняться в течение долгого времени, и гидролизуются лишь при лизисе клеток [190, 1896, 1897].

К числу наиболее активных ФАО относятся бактерии р. *Acinetobacter*: *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*. Некоторые из них способны накапливать фосфор при культивировании в аэробных условиях без предварительной анаэробной стадии. *Acinetobacter* обычно присутствует в активном иле, но в незначительных количествах из-за низкой скорости роста [190, 1895]. Многие из этих микроорганизмов способны к накоплению фосфора в аноксигенных условиях при использовании нитратов вместо кислорода как акцепторов электронов [190, 1591, 1596, 1613, 1898-1900].

При эксплуатации системы аэротенк – вторичный отстойник в традиционном режиме доля фосфора, перешедшего в биомассу, повышается с увеличением прироста избыточного ила. Это достигается уменьшением концентрации и возраста ила. Однако в этом случае снижается эффективность удаления органических веществ и азота. Поэтому в традиционном режиме эксплуатации очистных сооружений не удастся достичь значительного изъятия фосфатов без ухудшения очистки по остальным показателям.

Применяя определенные режимы циклического попеременного пребывания активного ила в аэробных и анаэробных условиях, что реализуется в SB-реакторах, можно создать селективное давление для развития фосфатаккумулирующих бактерий, относящихся к факультативным анаэробам, и повысить накопление избыточного количества фосфора в цитоплазме бактериальных клеток [1591, 1593-1595, 1901]. При удалении фосфора анаэробно-аэробным методом и в случае недостатка органического вещества в сточной воде для этой цели подходит ацидогенный реактор, который к тому же может быть использован как денитрификатор [190, 1596, 1897, 1902, 1903].

При использовании SB-реактора наряду с удалением азота можно извлечь из сточной воды 60–93% фосфора [190, 1592, 1596, 1874]. Циклы повторяются до требуемого уровня накопления фосфора в биомассе, после чего он выводится из реактора с избыточной биомассой в конце аэробной фазы цикла.

В целом, применение анаэробно-аэробной технологии позволяет повысить степень изъятия фосфатов до 80–95% и снизить в очищенной воде концентрацию фосфатов до 0,1–1,0 мг/л [190, 1895].

### 3.2.7. Альгобактериальные и цианобактериальные сообщества как объекты исследований при биологической очистке загрязненной воды

Исследования с альгобактериальными и цианобактериальными сообществами проводились применительно к очистке модельных стоков пивоварения, оценке роли автотрофных компонентов сообщества, спонтанно сформированного в лабораторном биореакторе в условиях его освещения видимым светом, в ухудшении качества очистки и возможности целенаправленного воздействия на антагонистические и симбиотические взаимоотношения в альгобактериальных и цианобактериальных сообществах при использовании контролируемого оксидативного воздействия.

Для сравнительного анализа возможностей управления автотрофным сообществом на основе оксидативного воздействия также использовались:

1) Цианобактериальные маты, отобранные в районе дельты Волги (г. Астрахань). Из отобранных образцов были выбраны два варианта, обладающие наиболее богатой микрофлорой. Из них методом накопительных культур и рассевов были выделены отдельные компоненты и ассоциаты микроорганизмов, из которых в дальнейшем использовались три штамма бактерий под условными обозначениями «жёлтый», «кремовый» и «белый»;

2) Образцы сообществ водорослей и цианобактерий из эвтрофицированного озера Диян Чи на юге Китая (г. Куньмин). Озеро Диян Чи находится на территории г. Куньмин и по площади занимает 6-е место среди китайских пресноводных озер. Площадь озера составляет 297 км<sup>2</sup>. В последние годы эвтрофикация озера существенно усилилась. Работы с данными образцами проводились в рамках сотрудничества между РХТУ им. Д.И. Менделеева и Университетом Тонгзи (г. Шанхай);

3) Три штамма бактерий, предоставленных Институтом молекулярной генетики РАН: *Pseudomonas chlororaphis* 62, *Pseudomonas chlororaphis* 464, *Pseudomonas putida* 146. Эти три штамма были выделены Т.А. Сорокиной из ризосфер высших покрытосеменных растений и для автотрофных сообществ являются аллохтонными микроорганизмами. Все штаммы, предоставленные проф. И.А. Хмель, содержатся в коллекции Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН.

Цианобактерии обладают исключительной приспособляемостью к изменяющимся условиям окружающей среды вследствие наличия у них ряда физиологических особенностей: способностью осуществлять кислородный и анаэробный фотосинтез, гетеротрофную фотоассимиляцию, фиксировать молекулярный азот, окислять соединения серы, разрушать многие органические субстраты. Кроме того, внеклеточные метаболиты цианобактерий (полисахариды, витамины и т.д.) и их

нитчатое строение способствуют созданию благоприятной среды для развития в симбиозе с ними различных групп микроорганизмов. Цианобактериальные маты состоят обычно из двух-трех доминирующих представителей цианобактерий и бактериальной составляющей [1904, 1905], представленной обычно десятком видов. Попутно встречаются одноклеточные водоросли и те виды цианобактерий, которые при изменении условий получают доминирующую роль. Бактериальная составляющая меняется в период таких изменений слабо. Выяснить условия оптимальности для каждого состояния представляется достаточно сложной задачей. В основном исследуется видовое разнообразие, но не регулирование сообществ [1905-1908], а также методы борьбы с цветением водоемов, включая бактериальные [1906, 1908-1911]. Основным методом исследования влияния различных составляющих цианобактериальных матов является метод диализного культивирования [1912, 1913], в котором культуры разделены полупроницаемой мембраной.

Диализная мембрана разделяет внеклеточные метаболиты на высокомолекулярные, которые накапливаются в диализном мешке, и низкомолекулярные, накапливающиеся во внешнем объеме. Клетки, сконцентрированные в диализном мешке, находятся в стерильных условиях, но они обмениваются метаболитами с внешней средой, что позволяет использовать их для изучения взаимодействия культур на уровне метаболизма (смешанных отдельных культур) и наблюдать изменения в ростовых параметрах каждой культуры. Диализная культура характеризуется увеличенной продолжительностью стационарной фазы и увеличенным уровнем некоторых физиологических параметров, таких как интенсивность фотосинтеза и концентрация пигментов у фототрофов, которые не изменяются в ходе эксперимента. Скорость роста в диализной культуре обычно значительно выше, нежели в периодической культуре.

Вариантом метода диализного культивирования может быть многосекционный мембранный реактор, в секции которого помещаются или отдельные культуры или сообщества, на которые необходимо проверить влияние антагонистов/симбионтов.

Другие особенности объектов культивирования и исследования при биологической очистке сточных вод описаны в главах 4 и 6.

## ГЛАВА 4. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА

### 4.1. Описание лабораторных методов и установок для культивирования

В работе использовались как стандартные установки и методы культивирования в планшетах, пробирках, колбах, ферментерах, так и модифицированные варианты, включающие высокоплотностное культивирование, реакторы с иммобилизацией, с рециклом биомассы, мембранные биореакторы, диализную культуру, адсорбционную культуру, реакторы с гранулами ила и с биопленкой, а также предложенные нами варианты (гибридные системы, «солнечный» биореактор, «искусственная пероксисома», контролируемый оксидативный стресс) на основе анализа особенностей и закономерностей протекания процессов в природных экосистемах и апробированные с описанными в главе 3 микробиологическими объектами культивирования. Стандартными методами получали накопительные культуры (изоляты), готовили посевной материал.

#### 4.1.1. Методики культивирования в планшетах, пробирках, колбах и лабораторных сосудах

Культивирование дрожжей и бактерий на чашках Петри проводилось стандартными методами на сусло-агаре, мясо-пептонном агаре, других агаризованных селективных средах. Посевной материал типично хранили на холоду при  $+2 - +4^{\circ}\text{C}$ .

Культивирование галобактерий проводилось на агаризованной среде с высоким содержанием NaCl, органических и минеральных компонентов.

Культивирование музейных культур молочнокислых бактерий типично проводилось на агаризованной среде MRS. При скрининге штаммов на способность накапливать молочную кислоту среда содержала в своем составе 20 г/л  $\text{CaCO}_3$ .

В случае культивирования трансформантов *B. subtilis* в среду с расплавленным агаром вносили эритромицин (в среде  $C_{Em} = 20$  мкг/мл).

Особенности культивирования других микроорганизмов на чашках Петри указаны при описании результатов экспериментов.

Культивирование в плоскодонных планшетах на 96 лунок проводили при исследовании биосинтеза молочной кислоты. Планшеты накрывали крышкой или затягивали газонепроницаемой пленкой и помещали в термошейкер PST-60HL-4 с частотой вращения платформы 500 об/мин.

Культивирование в пробирках использовали при изучении биосинтеза рибофлавина, выращивании микроводорослей и цианобактерий. Объем пробирок типично составлял 20 мл, объем среды – 5 мл. Пробирки засеивались с чашек Петри либо аликвотами предварительно выращенной суспензионной культуры и помещались в термостат (при культивировании в анаэробных или микроаэрофильных условиях) или на термостатируемый шейкер (при культивировании в аэробных условиях).

Культивирование в колбах использовали для подготовки посевного материала и проведения экспериментов с исследованием воздействия условий культивирования на микроорганизмы.

В случае подготовки посевного материала колбы засеивали с агаризованных твердых питательных сред с пробирок или чашек Петри или суспензионной культурой, полученной в пробирках или колбах, соблюдая, где необходимо, правила асептики.

При изучении биосинтеза и получении ростовых характеристик на среде в колбах и лабораторных сосудах проводили культивирование дрожжей, бактерий, галобактерий, микроводорослей, цианобактерий в асептических условиях. Типичный объем конических колб составлял 250 мл, объем питательной среды 50–150 мл, объем посевного материала – 2–10%. При получении накопительных культур, изолятов, культивировании цианобактериальных матов, активного ила асептические условия целенаправленно не поддерживались при соблюдении общих правил работы с микроорганизмами и их выращивания на селективных средах.

Стандартизованные инокуляты для культивирования молочнокислых бактерий готовили следующим образом: выращивали культуры в течение ночи до наступления стационарной фазы, клетки отделяли центрифугированием (12000 g, 5 мин, 37 °C) и дважды промывали фосфатным буфером (0,1 М  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$  0,15 М NaCl, pH 7,0). Процесс ферментации в стандартных условиях с начальной концентрацией клеток  $10^7$  КОЕ/мл осуществлялся путем добавления соответствующего количества инокулята в среду MRS.

Условия культивирования молочнокислых бактерий в колбах: базовая среда для молочнокислых бактерий с содержанием глюкозы 20 г/л, дрожжевого экстракта 5 г/л, температура 30–41 °C (в зависимости от штамма), pH 6,0–6,5, микроаэрофильные условия (ватно-марлевая пробка, отсутствие перемешивания, заполнение колбы более 50%). Засев осуществлялся отдельной колонией с чашки Петри или суточной культурой, выращенной на стандартной среде MRS. Колбы инкубируются в термостате в зависимости от условий эксперимента в течение 20–70 ч.

Молочнокислые бактерии помимо культивирования в колбах также выращивали в анаэробном периодическом режиме в предварительно простерилизованных лабораторных сосудах общим объемом 0,9 л, рабочим объемом простерилизованной

среды 0,7 л с датчиками рН (простерилизованы обработкой пероксидом водорода и этанолом), закрытых ватными пробками и помещенных в термостат при 30–41 °С в зависимости от штамма с соблюдением условий асептики. В отличие от культивирования в колбах, среда периодически подтитровывалась в ручном режиме концентрированным р-ром  $\text{NH}_4\text{OH}$  до рН 6,0–6,5 (ночью подтитровка не проводилась). Инокулятом служила суточная культура в объеме 10% от рабочего объема среды в сосудах, выращенная в колбе на среде аналогичного состава. По окончании ферментации (от 20 до 100 ч) сосуды извлекали из термостата и определяли показатели роста и накопления молочной кислоты.

Для изучения брожения сахаромикетами в анаэробных условиях также использовались колбы объемом 0,5 л и 1 л с отводом для  $\text{CO}_2$  при малых оборотах (40 об/мин) мешалки с магнитным приводом. Условия культивирования дрожжей-сахаромикетов в колбах: базовая среда для дрожжей-сахаромикетов с сахарозой или зерновым сусликом, температура 28–36 °С (в зависимости от штамма), рН среды 3,5–5,5.

В опытах с аэрацией питательной среды культивирование дрожжей и бактерий, как правило, велось в колбах объемом 250 мл (объем среды 20–100 мл) на термостатируемом шейкере (качалке) с числом оборотов 150–200 об/мин при заданных температуре, рН, при сульфитном числе, обеспечивающем требуемые массообменные характеристики. Уровень аэрации регулировался частотой оборотов шейкера и степенью заполнения колб питательной средой. Для аэрации среды в колбах использовались шейкеры New Brunswick Scientific (США), Ш8 с термостатом Т8 (НПФ «Флоби», г. Москва), Heidolph Unimax 2010. В шейкере Ш8 перемешивание среды осуществляется за счет сложного орбитального движения платформы с колбами в горизонтальной и вертикальной плоскости. В шейкере Heidolph Unimax 2010 перемешивание среды осуществляется за счет орбитального движения платформы только в горизонтальной плоскости.

При исследовании воздействия света на микроорганизмы шейкеры с колбами освещались люминесцентными лампами дневного света, закрепленными на поверхности термостата шейкера. Интенсивность освещения составляла в зависимости от условий эксперимента от 100 до 5000 Лк на поверхности колб. При необходимости колбы, которые необходимо было защитить от света, тщательно заворачивали в алюминиевую фольгу.

При культивировании дрожжей и бактерий в пробирках и колбах за ходом процесса следили по изменению оптической плотности суспензии, микроскопированию проб, измерением текущей концентрации субстрата и значения рН.

Культивирование галобактерий проводили в стерильных периодических условиях в 100 мл колбах на качалке G10 (New Brunswick) при 150 об/мин, температуре

37–38 °С, объеме среды в колбах 50 мл, средней освещенности на качалочной платформе 3000 Лк, естественной аэрации через ватные пробки. Объем посевного материала, находящегося в стационарной фазе роста, составлял 4%об. Объем среды в колбах и режим перемешивания обеспечивали относительно невысокий уровень аэрации питательной среды, что положительно влияет на индукцию синтеза бактериородопсина в поздние фазы ростового цикла. Время культивирования 7–8 суток.

При культивировании галобактерий в колбах с аэрацией на шейкерах в ряде случаев использовалось внесение в питательную среду адсорбента (активированного угля марки АГ-3) или того же адсорбента, но инкапсулированного в агар<sup>1</sup>. В предварительных экспериментах было обнаружено, что в такой форме уголь удаляет из культуральной жидкости компоненты среды культивирования, которые препятствуют росту галобактерий и выработки ими бактериородопсина. В то же время слой агаризованной среды изолирует клетки галобактерий от поверхности активированного угля АГ-3. При непосредственном контакте клетки галобактерий лизируют, возможно из-за сорбции клеток в порах угля, в которых в то же время концентрируются извлеченные из среды ингибиторы. Кроме того, активированный уголь механически непрочен, а носитель придает ему нужные прочностные характеристики. Соответственно, были подобраны дозировки активированного угля АГ-3, консистенция агара как носителя. Другие апробированные в нижеописанных опытах адсорбенты вносились в неинкапсулированном виде.

В вариантах культивирования в колбах с инкапсулированным углем последний в количестве 1,0–1,5 г занимал равномерно все дно колбы. Затем он заливался минеральной средой с агаром (4%) и стерилизовался в автоклаве (30 мин. при 0,5 ати). Питательная среда, содержащая триптон, дрожжевой экстракт, глицерин, стерилизовалась отдельно при тех же условиях. После затвердевания агара в колбу стерильно вносилась питательная среда (50 мл) и засеивался используемый штамм галобактерий. Культивирование происходило при следующих условиях: обороты качалки 150 об/мин, температура 37–38 °С, средняя освещенность на качалочной платформе 3000 Лк, при естественной аэрации через ватные пробки. Содержание клеток определялось по оптической плотности суспензии.

Эксперименты с культивированием трансформантов *B. subtilis* по рибофлавиновому оперону проводили в пробирках ( $V_{\text{среды}}/V_{\text{емкости}}$ ): 1/10 мл/мл, 3/20 мл/мл, 5/20 мл/мл и в конических колбах: 20/100 мл/мл, 40/100 мл/мл, 60/100 мл/мл, в которые заливали питательную среду LB и добавляли эритромицин в той же концентрации 10 мкг/мл, что и при культивировании на твердой среде.

---

<sup>1</sup>Культивирование с активированным углем, включенным в агар, было предложено сотрудником кафедры биотехнологии РХТУ Калёновым С.В. [1934].

Микроводоросли и цианобактерии культивировали в периодическом режиме в колбах на шейкерах без обогрева, при комнатной температуре (20–25 °С). При проведении исследований помещение лаборатории и соответственно колбы с альгобактериальным микроценозом большую часть суток освещалось через естественное боковое оконное освещение, а также искусственным светом люминесцентных ламп. Освещенность на поверхности колб составляла, в среднем, 1000 Лк. При исследовании воздействия света на микроводоросли, колбы, которые необходимо было защитить от света, тщательно заворачивали в фольгу, остальные колбы оставляли на шейкере при дневном либо искусственном освещении.

Диализное культивирование в колбах проводили при изучении взаимоотношений между штаммами бактерий и микроводорослями и бактериями и цианобактериями, выделенными из альгобактериальных и цианобактериальных сообществ [1913]. В качалочные колбы вносили по 50–70 мл цианобактериальной или водорослевой суспензии. В целлофановые диализные мешки вносили одинаковое количество стерильно отцентрифугированной биомассы исследуемых бактериальных культур. Диализные мешки помещали в колбы с цианобактериальной/водорослевой суспензией и выдерживали в течение полутора-двух недель при комнатной температуре и освещении лампами дневного света. По истечении времени эксперимента оценивали содержание в пробах биомассы и хлорофилла по методике, описанной ниже.

Опыты по биологической очистке сточных вод с активным илом проводили в неасептических условиях с аэрацией среды в режиме периодического культивирования в колбах на качалке при 170–200 об/мин, комнатной температуре 20–25 °С, рН 5,7–8,5. Использовали колбы на 100 мл с объемом среды в колбах от 20 до 80 мл или колбы на 250 мл с объемом среды в колбах от 40 до 100 мл. Объем посевного материала, находящегося в стационарной фазе роста, обычно составлял 5–10% об. В случае внесения в сточные воды изолятов или исходных образцов активного ила последние отбирались из различных экологических ниш (загрязненные участки почвы, городская канализационная система, эвтро- и неэвтрофицированные озера, речной ил, активный ил из аэротенка городских очистных сооружений и т.п.). Также для получения исходных образцов ила в качестве инокулята использовались илы, взятые из образцов, хранившихся на кафедре биотехнологии РХТУ им. Менделеева, а также смеси образцов ила с очистных сооружений солодовни (пос. Вороново, Моск. обл.). Все илы заблаговременно собирали и хранили при +4 °С. Адаптация ила к загрязненным стокам и его активность постоянно поддерживались путем пересевов и аэрирования ила со стоком в колбах на шейкере.

Использовались следующие модельные стоки:

1) Модельные фенолсодержащие стоки коксохимического производства (АО «Северсталь»).

2) Модельный сток пивоварения, приготовленный разбавлением пива «Балтика 0» в 40–300 раз, ХПК – 600–5000 мг/л,  $N-NH_4^+$  – 8–70 мг/л,  $N_{общ.}$  – 30–250 мг/л,  $P_{общ.}$  – 1,5–12 мг/л, углеводы (моносахара в пересчете на глюкозу) – 50–400 мг/л, сухие вещества – 700–6000 мг/л, pH 4–7. Для неразбавленного пива: ХПК 152 г/л, pH 6,2.

3) Сток лабораторного анаэробного UASB-реактора, на вход которого подавалась сброженная барда зерно-спиртового производства, ХПК – 2100–3000 мг/л,  $N-NH_4^+$  – 14–33 мг/л,  $N_{общ.}$  – 110–150 мг/л,  $P_{общ.}$  – 40–50 мг/л, углеводы (моносахара в пересчете на глюкозу) – 200–250 мг/л, сухие вещества – 3500–4000 мг/л, pH 6,2–6,5.

4) Модельный хозяйственно-бытовой сток, полученный смешением отвара водных вытяжек из отмеренных количеств продуктов питания с ХПК 400–1000 мг/л,  $N_{общ.}$  25–60 мг/л,  $PO_4^{3-}$  10–25 мг/л, pH 5–8.

В колбах также изучалось формирование гранул аэробного ила в периодических условиях с циклическим режимом очистки – подобно тому, как это осуществляется в SB-реакторах. Аэробный ил культивировали при аэрации на шейкере Heidolph Unimax 2010 при 170–200 об./мин в конических колбах объемом 250 мл при рабочем объеме иловой взвеси 100 мл, температуре 20–25 °С, pH 6,8–8,5. По ходу опыта проводился пересев активного ила переносом определенного количества выросшего ила (в виде флокул или гранул) на новую порцию сточных вод. В ходе посева содержащую ил среду переносили в мерный цилиндр, отстаивали в течение 5–10 мин., затем сливали 60–70 мл надосадочной жидкости. Осевший ил заливали новой порцией сточной воды до объема 100 мл, переносили обратно в коническую колбу и ставили на шейкер. Пересев проводился один раз в 3–7 суток в зависимости от ХПК модельного стока. При необходимости, активный ил хранился на холоду (4 °С). В качестве субстрата использовались модельные или промышленные стоки с ХПК от 300 до 5000 мг/л,  $N_{общ.}$  – 10–100 мг/л,  $PO_4^{3-}$  – 3–20 мг/л, pH 5–8. Данный состав стоков во многом близок к составу стоков, выясненному по результатам обследования очистных сооружений предприятия Балтика-Самара, для которых в эффлюенте анаэробного реактора содержание загрязнений составляет в среднем: ХПК – 244 мг/л,  $N-NH_4$  – 47 мг/л,  $P-PO_4$  – 5,5 мг/л, т.е. наблюдается избыток азота (в 5 раз) и незначительный фосфора (в 2 раза) относительно оптимального соотношения  $XPK : N : P = 100 : 2-6 : 0,6-1,2$ .

Эксперименты по изучению аэробно-анаэробного процесса очистки сточных вод в режиме SB-реактора также проводились на установке с четырьмя независимо функционирующими модельными SB-реакторами в виде трехгорлых плоскодонных колб объемом по 1 л, размещенных на магнитной мешалке (МБМ-4) с медленным

перемешиванием среды. Объем очищаемой среды в колбах составлял 500 мл. Воздух подавался двумя микрокомпрессорами, его расход, определенный по ротаметру, приводился к одинаковому значению с помощью зажимов на шлангах. Выходные шланги погружены в воду для предотвращения попадания через них воздуха во время анаэробной стадии процесса. Первоначально в колбы было загружено по 500 мл суспензии активного ила из слива лабораторного ферментера. В ходе эксперимента в колбы с загруженной суспензией дополнительно вносилось в качестве загрязнений пиво «Балтика 0»,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  в различных концентрациях.

За ходом процесса очистки в колбах следили по измерению показателей pH, ХПК, содержания ионов  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_{\text{общ.}}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , микроскопированием проб, а также в отдельных случаях определением дегидрогеназной активности АИ.

Об изменении концентрации АИ судили по изменению оптической плотности суспензии или АСВ в пересчете на отобранную аликвоту. Наличие и состояние аэробного гранулированного активного ила (ГАИ) оценивали визуально и световой микроскопией. В качестве характеристики гранул использовался диаметр гранул и их цвет. Также исследовался микробиологический профиль биоценоза путем высевов на твердые агаризованные среды.

#### **4.1.2. Культивирование в лабораторных биореакторах стандартными методами**

Лабораторные системы культивирования в биореакторах включали:

1) Лабораторный биореактор «Фермус–3» (изготовитель НИЦ «Биоавтоматика», г. Н. Новгород) с обечайкой из стекла, общим объемом 4,5 л, рабочим объемом – 1,5–2,5 л с автоматической регистрацией и контролем расхода воздуха, показателей pH,  $\text{pO}_2$ , Eh, с аэрирующим устройством барботажного типа с диффузором или механической мешалкой, с исходно поставляемыми блоками управления и программным обеспечением.

2) Биореактор Minifors (INFORS, Швейцария) с обечайкой из стекла, общим объемом 5 л с автоматической регистрацией и контролем расхода воздуха и показателей pH,  $\text{pO}_2$ , расхода титранта, с аэрирующим устройством барботажного типа с механической мешалкой, с программным обеспечением Iris V5.

3) Модифицированный лабораторный биореактор «Фермус–3» с замененными блоками управления и контроля и программным обеспечением BioDrome-1<sup>1</sup>, разработанным на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева на базе программ-

---

<sup>1</sup>Программное обеспечение разработано на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Калёновым С.В. [1914] с участием автора диссертационной работы.

ной оболочки (среды графического программирования) LabView 7.0 фирмы National Instruments (США), работающей в среде Windows. Реактор был дополнительно оборудован циркуляционным контуром, в который интегрировалась либо колонка с адсорбентом для поглощения продуктов метаболизма – ингибиторов биосинтеза (адсорбционная культура, см. рис. 4.2), либо модуль с полым волокном (мембранный биореактор, см. рис. 4.1) для вывода продуктов метаболизма, либо кварцевая кювета для облучения среды с микроорганизмами мягким ультрафиолетом УФА-диапазона. При последующем изложении результатов экспериментов часть графиков приведена в формате ПО «BioDrome-1».

Опыты в биореакторах проводили, как правило, в режиме глубинного культивирования, при необходимости в стерильных условиях. Оборудование и питательные среды стерилизовали общепринятыми методами термической стерилизации, термочувствительные материалы, в частности, мембранные модули, датчики рН и  $pO_2$  стерилизовали химически (типично с помощью раствора  $H_2O_2$ ). Для мойки оборудования использовали общепринятые реагенты ( $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$  и др.).

Величина рН поддерживалась в заданном диапазоне и при необходимости регулировалась подтитровкой раствором 2 н  $NaOH$ ,  $NH_4OH$  или  $H_2SO_4$ . В аэробных условиях содержание кислорода поддерживалось в зависимости от характера эксперимента на уровне 1–100% от равновесного путем изменения расхода подаваемого воздуха и/или интенсивности перемешивания (механической мешалкой). Засев проводился 2–20% об. посевного материала, находящегося, как правило, в стационарной фазе роста.

При необходимости, в случае образования значительного количества пены, в среду по ходу эксперимента вносили пеногаситель (лапрол или его аналоги в количестве 2–10 капель за 1 раз).

В указанных биореакторах изучали процессы культивирования в периодических условиях – без подпитки и с подпиткой субстратом. Режим с подпиткой субстратом является вариантом высокоплотностного культивирования. В этих условиях контролировали заданный объем среды в биореакторе, расход воздуха на аэрацию, число оборотов мешалки, температуру, рН,  $pO_2$  и Eh в ферментационной среде. Концентрацию биомассы в ферментационной среде определяли, как правило, по показанию оптической плотности или сухому весу биомассы. Состояние культуры микроорганизмов анализировали под микроскопом (наличие посторонней микрофлоры, соотношение живых и мертвых клеток после окрашивания метиленовым синим – для дрожжей).

Косвенно интенсивность роста биомассы в биореакторах определяли по скорости изменения рН (если среду не подтитровывали), расходу титрующего агента (при поддержании рН в заданных пределах), изменению дыхательной активности.

Дыхательную активность измеряли по величине угла наклона кривой падения концентрации растворенного кислорода (по показаниям датчика  $pO_2$ ) в ферментационной среде при отключении аэрации и слабом минимально возможном перемешивании среды (около 20 об/мин). Кроме того, по показателю  $pO_2$  определялись время потребления и момент исчерпания субстрата в ферментационной среде (при исчерпании субстрата показатель  $pO_2$  резко возрастает), время голодания популяции микроорганизмов.

#### **4.1.3. Эксперименты с освещением ферментационной среды видимым светом и облучением мягким ультрафиолетом**

Важной особенностью во многих вариантах культивирования было целенаправленное экранирование или, наоборот, освещение среды видимым светом содержимого колб и биореакторов, в которых выращивались микроорганизмы. Как уже было отмечено в главе 2 диссертации, для микроорганизмов, находящихся в состоянии стресса, не исключено появление чувствительности к видимому свету, что может быть связано с функционированием, например, фоторепарации. В этом случае необходимо учитывать даже фактор освещения содержимого колб и биореакторов фоновым светом лабораторного помещения. Освещенность на поверхности стола, на котором стояли шейкеры с колбами, составляла в среднем 500 Лк.

При целенаправленных исследованиях освещение содержимого биореактора видимым светом производилось через его стеклянную обечайку. Колбы в шейкере освещались лампами дневного света или светодиодными матрицами. Интенсивность облучения (энергетическая облученность в пересчете на длину волны  $\lambda$  555 нм<sup>1</sup>) составляла 0,01–1 Вт/л (в зависимости от варианта постановки опыта). Так, при освещении биореакторов светом лабораторного помещения (люминесцентные лампы дневного света), средняя энергетическая облученность по видимому свету на поверхности обечайки биореактора после пересчета в энергетическую облученность на 1 л среды в реакторе составляла 40 мВт/л.

---

<sup>1</sup>Энергетической облученности (плотности светового потока) 1,0 Вт/м<sup>2</sup> соответствует световая освещенность 683 Лк при  $\lambda = 555$  нм. В экспериментах световая освещенность и соответственно энергетическая облученность несколько варьировались – в зависимости от времени суток, окружения биореактора и т.п.

При необходимости экранирования биореакторов и колб от света, их тщательно обортывали светонепроницаемым материалом (двумя слоями черной ткани, фольгой).

Также использовалось облучение колб и биореактора мягким ультрафиолетом УФА диапазона. Работы с облучением микроорганизмов ультрафиолетом проводились в рамках совместных исследований с ФГУП НПО «Астрофизика».

При исследовании воздействия оксидативного стресса, индуцированного облучением мягким ультрафиолетом, и проведении экспериментов с дрожжами р. *Candida* в колбах в качестве стресс-фактора использовалось мягкое УФА-излучение УФ-лампы TL 20W/05 фирмы «Филипс», основной диапазон излучения которой лежит в области  $\lambda$  320–450 нм,  $\lambda_{\max} = 370$  нм, с мощностью излучения УФА 2,8 Вт. Дрожжи облучали ультрафиолетом в стерильном ламинарном боксе в чашках Петри с открытой крышкой.

При проведении экспериментов в биореакторе и облучении его содержимого ультрафиолетом в качестве источника УФ-излучения использовалась отечественная ртутная лампа ДРШ-100 с диапазоном излучения в области  $\lambda$  350–450 нм,  $\lambda_{\max} = 360$  нм, мощностью излучения 100 Вт. Облучение ультрафиолетом проводили сфокусированным и направленным потоком ультрафиолета через выносную проточную кварцевую кювету с полированными кварцевыми стеклами, через которую постоянно циркулировала дрожжевая суспензия. Интенсивность освещения и УФ-излучения определяли с помощью люксметра – УФ-радиометра ТКА-01/3.

О результатах воздействия УФ-излучения на микроорганизмы судили по изменению хода кривых зависимости концентрации растворенного кислорода  $pO_2$ , рН, Eh от времени, выводимых непосредственно на монитор компьютера, а также путем сравнения кривых роста биомассы. Эксперименты проводились в двух вариантах: с подсветкой (освещением) биореактора видимым светом и с экранированием (затемнением) его содержимого от света лаборатории.

Предварительно были определены подходящие условия для выявления отклика системы на действие УФ-излучения по показаниям изменения концентрации растворенного кислорода:

- концентрация биомассы – 0,3–3,0 ед. оптической плотности (0,2–2,0 г/л по абсолютно сухой биомассе),
- интенсивность облучения ультрафиолетом – 0,5–2 Вт/л,
- скорость вращения мешалки – 150–370 об/мин.

При невысокой интенсивности перемешивания и высокой концентрации биомассы величина  $pO_2$  невелика (несколько процентов), а при высокой интенсивности перемешивания и невысоком содержании биомассы – близка к уровню насыщения, что затрудняет выявление возможных изменений в характере кривой  $pO_2$ .

#### 4.1.4 Культивирование в лабораторных биореакторах модифицированными методами

В табл. 4.1. представлен перечень вариантов культивирования, модифицированных по отношению к стандартным методам периодической и непрерывной ферментации, используемые объекты культивирования и соответствующие разделы описания объектов и полученных с ними результатов экспериментов, а на рис. 4.1–4.5 схематично представлены модифицированные варианты культивирования в биореакторах различного типа, использованные в работе.

Таблица 4.1 – Сопоставление модифицированных вариантов культивирования в биореакторах с объектами культивирования и целями исследований

Вариант культивирования	Объекты культивирования	Цели и результаты исследований	Разделы диссертации
Высокоплотностное культивирование с подпиткой субстратом, замкнутая высокоинтенсивная система биологической очистки.	Дрожжи р. <i>Candida</i> .	Снижение расходов на выделение биомассы и объема сточных вод.	3.1.1 5.2.1
	Микроорганизмы-фенолдеградаторы.	Повышение окислительной мощности, снижение объема вторичных отходов.	3.2.2 6.2
Культивирование в мембранном биореакторе с выведением продуктов биосинтеза.	Молочнокислые бактерии р. <i>Lactobacillus</i> .	Повышение продуктивности, выхода молочной кислоты, снижение количества образующихся побочных продуктов и твердых отходов, экономия затрат.	3.1.3 5.1.3
Адсорбционная культура.	Галобактерии <i>Halobacterium salinarum</i> .	Повышение выхода биомассы и содержания бактериородопсина.	3.1.4 5.3

Биологическая очистка в аэротенке с полным реци-лом активного ила.	Активный ил, модельные стоки.	Снижение количества избыточного активного ила. Апробация возможности гранулообразования аэробного ила.	3.2.3 6.3
Биологическая очистка с гранулированным илом, SB-реактор.	Активный ил, модельные стоки.	Повышение эффективности удаления фосфора из сточных вод.	3.2.4 3.2.6.2 6.3.3
Гибридный процесс с одновременным химическим и биологическим окислением.	Дрожжи и бактерии – деструкторы фенола.	Повышение скорости и качества биологической очистки сточных вод.	3.2.2 6.2
Контролируемый окислительный стресс с одновременным воздействием видимого света и ультрафиолета УФА-диапазона – «Солнечный» биореактор	Дрожжи pp. <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> .	Повышение целевых выходных показателей.	3.1.1 5.2
Контролируемый окислительный стресс с одновременным воздействием видимого света и активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , анолит электрохимического разложения), в том числе в мембранном биореакторе («Искусственная пероксисома»)	Дрожжи pp. <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , бактерии pp. <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> . Активные илы очистных сооружений, микроводоросли.	Повышение продуктивности биореактора, выхода целевого продукта. Повышение степени очистки.	3.1 5.1 5.2 6.1.2 6.1.3 6.2.3 6.2.4 6.4, 6.5
Культивирование с подавлением абиотических реакций, сопровождающих ферментационный процесс	Галобактерии <i>Halobacterium salinarum</i> . Штаммы-трансформанты продуцента рибофлавина р. <i>Bacillus</i> .	Повышение содержания бактериородопсина. Повышение устойчивости биосинтеза и выхода рибофлавина.	3.1.4 5.3 3.1.5 5.4

В режиме культивирования в мембранном биореакторе изучали биосинтез молочной кислоты молочнокислыми бактериями. На рис. 4.1 представлена схема одного из вариантов установки с выносным полуволоконным модулем, включающая ферментер с механическим перемешивающим устройством, рубашку для термостатирования, выносной мембранный модуль, насос подачи свежей питательной среды, насос, прокачивающий ферментационную среду через мембранный модуль, контрольно-измерительные приборы и регулируемые вентили. При прохождении ультрафильтрационного модуля часть культуральной жидкости фильтруется, при этом продукты метаболизма и, в частности, молочная кислота в виде лактата аммония выводятся из системы, клетки продуцента полностью задерживаются в надмембранном пространстве и вместе с частью культуральной жидкости возвращаются в биореактор.

Для концентрирования биомассы использовался полуволоконный модуль с мембранами из полисульфона с пределом отсечения 40 кДа, длиной 0,8 м, с рабочей поверхностью 0,25 м<sup>2</sup>, скоростью прокачки среды через модуль 0,65–1,3 л/мин (скорость движения среды над поверхностью мембран 0,12–0,24 м/с). Параметры модуля были подобраны по результатам предварительных экспериментов.

В использованном нами основном варианте культивирование молочнокислых бактерий в мембранном биореакторе вели в отъемно-доливном режиме с отводом части бесклеточной культуральной жидкости из биореактора и внесением аналогичного количества свежей питательной среды. В ходе культивирования контролировали Т, рН, скорость перемешивания среды в биореакторе, расход NH<sub>4</sub>ОН. Момент начала отъема культуральной жидкости определяли по окончании автоматического титрования питательной среды 2 н NH<sub>4</sub>ОН. По ходу культивирования определяли основные показатели ферментации: концентрацию биомассы, глюкозы, молочной кислоты; рассчитывались продуктивность реактора, бродильная активность; фиксировались морфологические изменения клеток молочнокислых бактерий и колоний, получаемых высевом на агаризованную среду. Отклик популяции на изменение условий культивирования анализировали по скорости расхода титранта, изменению содержания биомассы в ферментере, остаточной концентрации глюкозы, концентрации накопленной молочной кислоты в пробах из ферментера и в фильтрате.

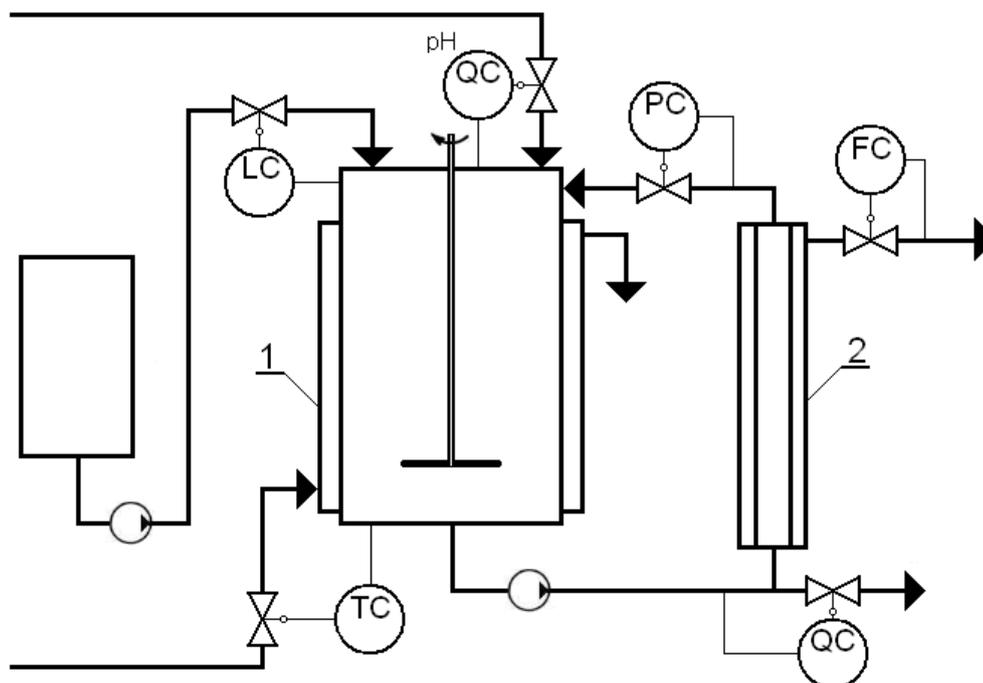


Рисунок 4.1 – Технологическая схема установки мембранного биореактора с выносным полуволоконным модулем.

1 – ферментер, 2 – вынесенный мембранный модуль.

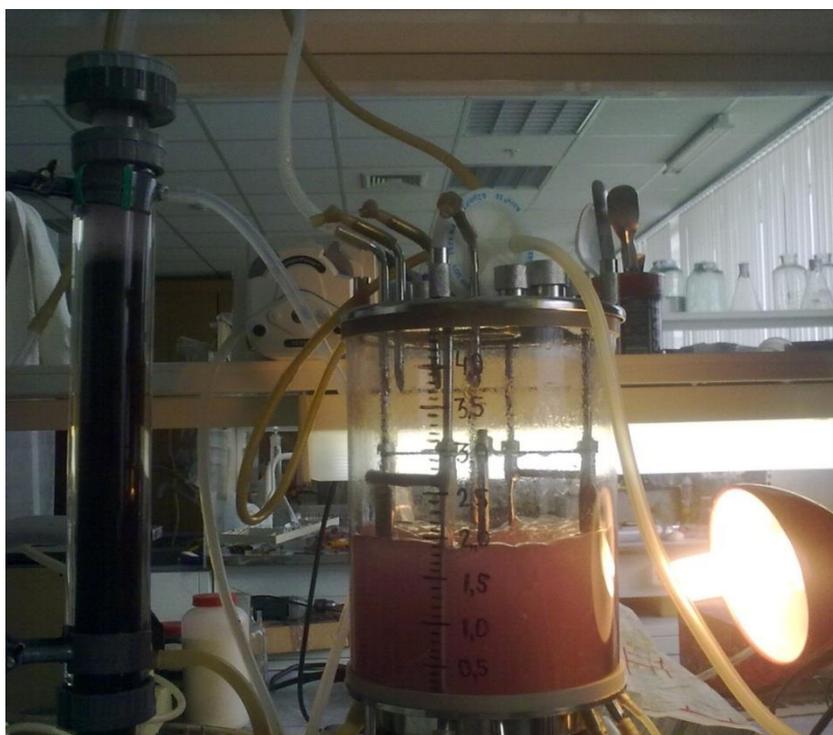


Рисунок 4.2 – Культивирование галобактерий с адсорбционной колонкой и адсорбентом Purolite MN-500.

На рис. 4.2 представлен общий вид установки для культивирования галобактерий с целью получения бактериородопсина. В данном случае в систему ферментации была введена колонка с адсорбентом Purolite MN-500. Содержание кислорода поддерживалось на уровне 10–20% от равновесного путем изменения расхода подаваемого воздуха и/или интенсивности перемешивания (механической мешалкой), температура – 36–38 °С. Засев проводился 5–20% об. посевного материала, находящегося в предстационарной фазе роста. При необходимости биореактор освещался лампами дневного света или светодиодными матрицами с интенсивностью 10–150 мВт/л (в пересчете на длину волны  $\lambda$  555 нм).

При адсорбционном культивировании галобактерий включали прокачку насосом содержимого биореактора через колонку или емкость с адсорбентом, в которой извлекались ингибиторы биосинтеза, образующиеся в питательной среде. Для повышения выхода биомассы галобактерий и содержания бактериородопсина в реактор вносили субстратную подпитку, представляющую концентрированный раствор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и глицерин (однократная подпитка включала 2 г дрожжевого экстракта, 5 г триптона, растворенного в 50 мл минеральной основы, 0,5 мл глицерина). Контроль и регулирование процесса осуществляли с помощью программного обеспечения «BioDrome-1». В ходе культивирования контролировали Т, рН, освещенность рабочего объема биореактора, определяли содержание клеток галобактерий в среде культивирования (турбидиметрически) с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочной кривой. Дополнительно определяли цветовой оттенок ферментационной среды с помощью разработанной экспресс-методики.

На рис. 4.3 представлена схема установки для проведения аэробной биологической очистки модельных сточных вод в проточном режиме в мембранном биореакторе с погружным микрофльтрационным модулем.

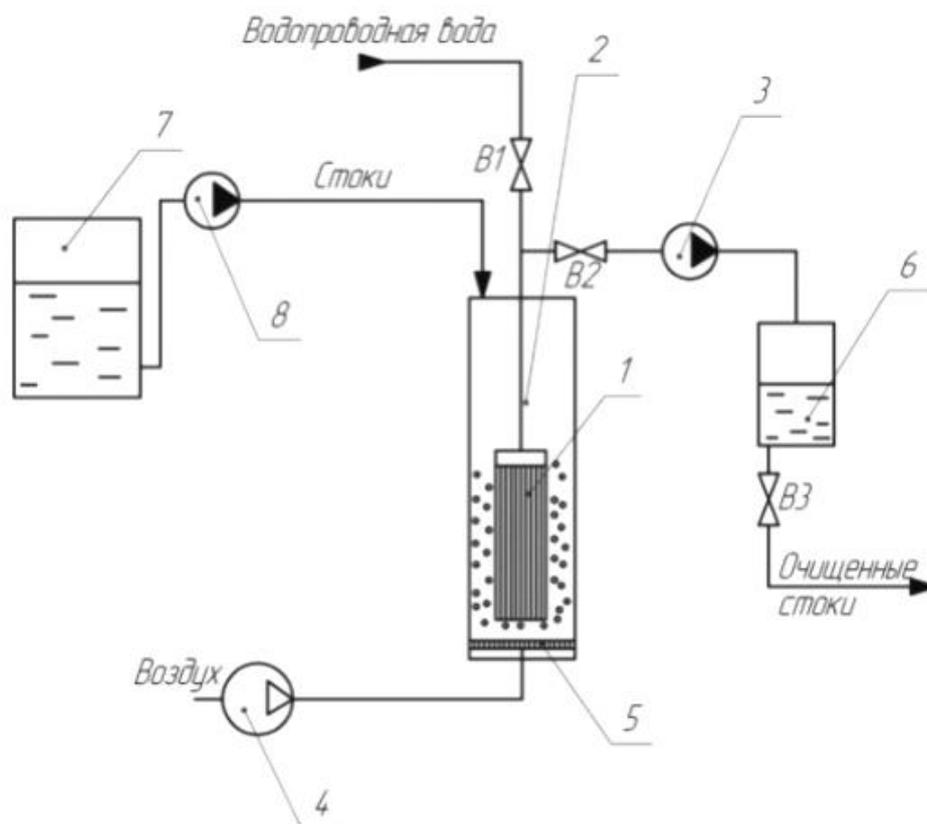


Рисунок 4.3 – Принципиальная схема установки для проведения аэробной биологической очистки модельных сточных вод в мембранном биореакторе с погружным микрофильтрационным модулем.

1 – мембранный модуль, 2 – биореактор с рабочим объемом 3,75 л, 3 – насос, создающий необходимое разрежение, 4 – компрессор, 5 – мембранный мелкопузырчатый аэратор, 6 – приемная емкость, 7 – исходная емкость, 8 – питающий насос.

Конструкция биореактора и установки была разработана фирмой ООО «НПФ ТЭКО» и использована нами для исследований процесса биологической очистки модельных сточных вод. Сам реактор был изготовлен в НПФ «ТЭКО»; контрольно-измерительные приборы и средства автоматизации изготовлены и смонтированы своими силами. Реактор имел рабочий объём 3,75 л, мелкопузырчатая аэрация воздухом осуществлялась путем его подачи снизу аппарата через эластичную полимерную мембрану с лазерной перфорацией. Погружной мембранный модуль состоял из 41 керамических трубок со средним размером пор 0,85 мкм с общей рабочей поверхностью 0,157 см<sup>2</sup>. Мембрана сформирована на внешней стороне трубок. Трубки имеют длину 125 мм и внешний диаметр 10 мм. Трубки крепились на фланце, необходимом для герметизации дренажного канала и сбора фильтрата в единый канал отвода очищенной сточной воды.

Для контроля очистки использовали датчики  $pO_2$ , pH, Eh, T. Установка была оснащена блоком контроля и управления, включающим: усилитель-нормализатор и плату ЦАП/АЦП, функционирующих на базе программного обеспечения «BioDrome-1», адаптированная под комплекс МБР. Для контролирования уровня жидкости в реакторе была разработана система контроля, основанная на использовании герконов.

В число контрольно-измерительных приборов входили манометр, вакуумметр, расходомер воздуха.

При необходимости мембраны очищались обратным током воды или моющего раствора (3% раствор NaOH, или лимонной кислоты), для чего использовался насос на линии откачки фильтрата, переключенный на реверсивную подачу жидкости при давлении 1,3 атм. В ходе предварительных исследований был выбран режим очистки с подачей обратного тока жидкости каждые 15 мин в объеме 100 мл в течение 10 сек. Такой режим повышает производительность модуля из-за уменьшения количества загрязнений на поверхности и в порах мембраны, но в то же время не снижает значительно производительность всей установки. Также в ходе экспериментов осуществлялась подача пероксида водорода в среду либо напрямую в аэрируемую зону биореактора, либо через керамические мембраны с обратным током жидкости.

Предварительные замеры показали, что проницаемость мембранного модуля по чистой воде может достигать 60 л/ч. При фильтрации с суспензией силикагеля проницаемость мембран за 6 ч падала на 9%. При фильтрации модельных суспензий лигнина с размером частиц 0,4–1,4 мм при максимальном расходе воздуха проницаемость мембран по сравнению с вариантом фильтрации чистой воды уменьшалась примерно в 10 раз. Использование интенсивной аэрации увеличивало проницаемость мембран незначительно – лишь на 15%. Увеличение количества более мелких частиц приводило к снижению проницаемости мембран и незначительному ухудшению качества фильтрата. Испытания с внесением в МБР гранул с иммобилизованным в альгинатные гранулы красителем показали, что интенсивная аэрация в МБР не влияла существенно на целостность и морфологию гранул в процессе эксплуатации в течение 15 дней, что косвенно указывает на щадящее воздействие вызываемых аэрацией гидродинамических сил на загружаемый активный ил.

По результатам предварительных исследований с загрузкой активного ила в мембранный биореактор были выбраны следующие типичные режимы очистки:

- рабочий объем реактора – 3 л;
- концентрация ила – 10–13 г/л;
- обратная промывка по 10 сек. каждые 15 мин;
- разряжение в мембранах – 0,2 атм.;

- расход модельного стока – 1,5 л/ч;
- исходный ХПК – около 400 мг/л.

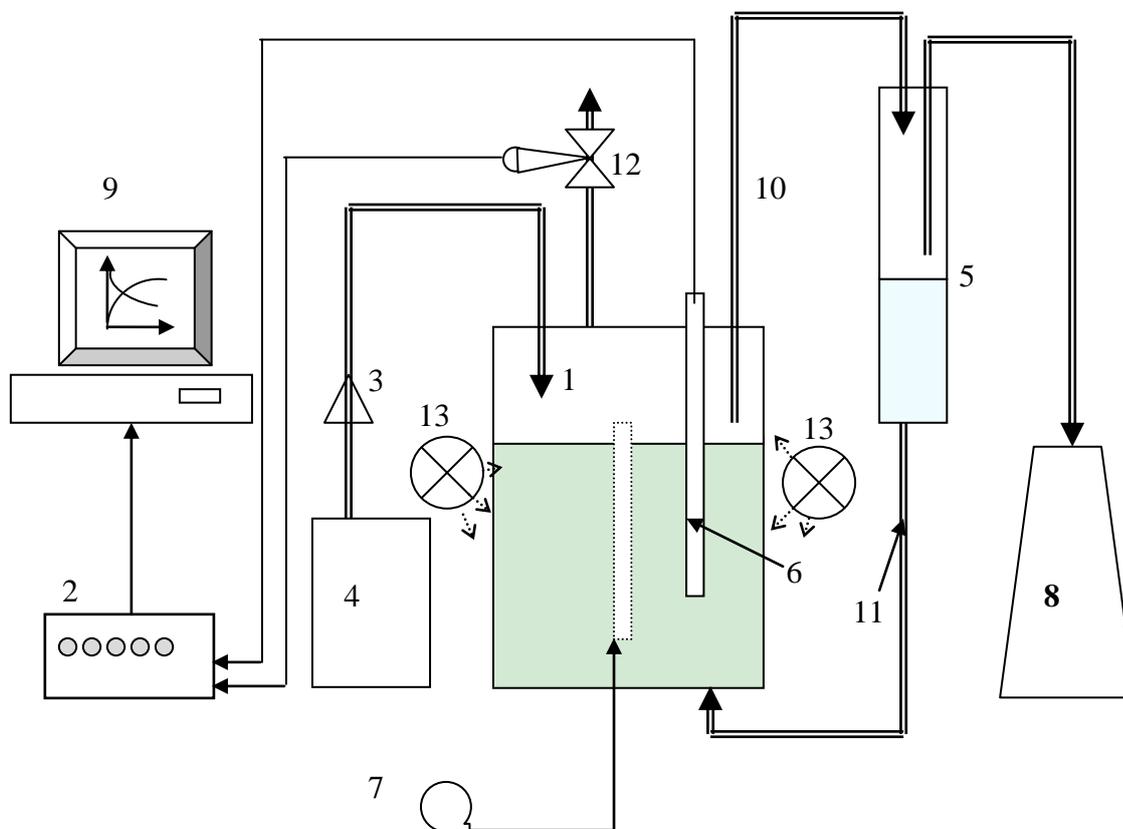


Рисунок 4.4 – Схема установки для аэробной очистки модельных сточных вод в проточном режиме с полным рециклом ила.

1 – реактор; 2 – блок управления; 3 – насос подачи исходной сточной воды; 4 – емкость с очищаемой средой; 5 – вторичный отстойник; 6 – датчики  $pO_2$ , pH, T; 7 – компрессор подачи воздуха; 8 – емкость для приема очищенной среды; 9 – персональный компьютер; 10 – линия перелива среды из реактора во вторичный отстойник; 11 – линия возврата ила; 12 – клапан воздуха; 13 – осветительные лампы

На рис. 4.4 представлена схема разработанной нами лабораторной установки с аэротенком и вторичным отстойником для проведения экспериментов в непрерывном режиме аэробной очистки сточной воды с полным рециклом активного ила, т.е. без отвода избыточного ила из системы. Система состоит из реактора общим объемом 4,5 л (на базе биореактора «Фермус-3»), рабочим объемом 1,5–3,0 л с аэрирующим устройством барботажного типа с диффузором или механической мешалкой, и блока регистрации показаний датчиков T, pH,  $pO_2$ . Система регистрации данных и контроля параметров использует программное обеспечение «BioDrome-1», модифи-

цированное с учетом требований к экспериментальным работам по проведению биологической очистки сточной воды.

При работе установки все штуцера в биореакторе закрываются герметично заглушками и сам биореактор находится под небольшим избыточным давлением, обеспечиваемым компрессором при нагнетании воздуха. Биореактор соединен со вторичным отстойником, в который периодически по заданному режиму поступает избыток сточной воды через переливной шланг по мере ее поступления в биореактор. В отстойнике ил осаждается и возвращается обратно в биореактор, а избыток осветленной сточной воды сливается через шланг в приемную емкость. Циркуляция воды и ила в системе происходит при открытии и закрытии клапана воздуха.

При необходимости содержимое реактора освещается двумя лампами дневного света Philips мощностью по 20 Вт каждая при средней освещенности на поверхности обечайки от 150 до 3500 Лк (определено по замерам с использованием люксметра-УФ-радиометра ТКА-01/3), что в пересчете на удельную энергетическую освещенность 1 л среды биореактора составляет от 10 до 250 мВт/л.

В процессе очистки контролируются расход среды на входе и выходе из очистного биореактора, расход воздуха, подаваемого для аэрации содержимого биореактора, а также измеряется дыхательная активность по изменению показаний датчика растворенного кислорода ( $pO_2$ ) при отключении подачи воздуха в реактор. Наряду с показаниями Т, рН,  $pO_2$  микроскопируются пробы, измеряются оптическая плотность в биореакторе и на выходе сточной воды из вторичного отстойника, текущие концентрации субстрата (загрязнений) на входе и выходе из реактора (по ХПК), контролируются расход среды на входе и выходе из биореактора, расход воздуха, подаваемого для аэрации содержимого биореактора, а также измеряется дыхательная активность по изменению показаний датчика  $pO_2$  при отключении подачи воздуха в биореактор.

В процессе эксплуатации лабораторной установки с биореактором и вторичным отстойником в случае использования для аэрации среды барботажа и диффузора, но без механической мешалки, на поверхности стенок биореактора, отбойников, смонтированных датчиков, диффузора формировалась преимущественно биопленка. Также в этих условиях наблюдалось формирование зачатков гранулированного ила. Периодически проводили рассевы микроорганизмов из аэротенка и исходной питательной среды (разбавленное пиво «Балтика 0») на твердые питательные среды МПА и сусло-агар для выделения и предварительной идентификации микроорганизмов активного ила. Конкретные режимы очистки описаны в экспериментальной части работы.

## 4.2. Получение изолятов (накопительных культур) и процедура адаптации микроорганизмов к удаляемым загрязнениям и воздействию стрессоров

Важным методическим приемом в работе было получение культур микроорганизмов, адаптированных (преадаптированных) к удаляемым загрязнениям и воздействию стрессоров.

Преадаптация происходит при последовательном пассировании (пересеве) микроорганизмов на среды с трудноутилизуемыми соединениями или при воздействии стресс-факторов. По мере адаптации повышается способность утилизировать соединения или повышается устойчивость микроорганизмов к стрессу [1915].

Прибегали к ступенчатой адаптации, постепенно повышая концентрацию биостойкого и/или токсичного субстрата или дозу стрессора, в частности,  $H_2O_2$ . При этом учитывали состояние, фазу роста, плотность микробной популяции, подвергаемой стрессорному воздействию.

Методом последовательного пассирования с последующим рассевом на твердые среды или без посева были получены:

- бактериальные и дрожжевые консорциумы, способные окислять фенол при повышенных концентрациях последнего (до 5 г/л) с высокой скоростью;
- консорциумы микроорганизмов, составляющие основу активных илов, для исследования процессов биологического окисления сточных вод;
- сообщества микроорганизмов, способные к образованию гранулированного активного ила при биологической очистке сточных вод;
- изоляты микроводорослей и цианобактерий, входящих в состав отобранных образцов альгобактериальных и цианобактериальных консорциумов;
- микроорганизмы и их консорциумы, устойчивые к повышенным дозам пероксида водорода (при изучении контролируемого окислительного воздействия).

Вместе с тем, при работе с рекомбинантными штаммами микроорганизмов процедура последовательных пересевов может привести к быстрой утрате изначальных свойств продуцента.

При адаптации микроорганизмов к окислительному стрессу осуществляли серию последовательных пересевов культуры на фоне воздействия стресс-факторов, среди которых наиболее часто применяли пероксид водорода, и антистресс-факторов, наиболее часто – видимый свет относительно низкой интенсивности (см. разделы 2.7, 4.1.3). Такое целенаправленное воздействие проводили при культивировании дрожжей р. *Candida* как продуцента кормового белка, *Saccharomyces cerevisiae* – продуцентов этанола, молочнокислых бактерий р. *Lactobacillus* – продуцентов молочной кислоты, бактерий р. *Bacillus* – рекомбинантных трансформантов по

рибофлавиновому оперону, при изучении процессов аэробной биологической очистки и образования гранулированного активного ила в аэробно-анаэробном отъемно-доливном режиме.

Преадаптация микроорганизмов активного ила к оксидативному стрессу при изучении процессов гранулообразования в типовом случае проводилась при культивировании при комнатной температуре в периодическом режиме в конических колбах объемом 250 мл, с рабочим объемом 100 мл на шейкерах при освещенности от 100 до 1400 Лк на поверхности колб, а также в затемненных колбах. Одновременно вели контрольные линии активного ила – без добавления  $H_2O_2$ . Количество посевного материала обеспечивало начальную концентрацию активного ила (в виде хлопьев) 2–4 г/л (по сухим веществам ила). Пероксид водорода первоначально добавляли в дозах 100–200 мг/л в различные фазы роста (типично в момент пересева ила, через 1–4 ч после пересева, в середине экспоненциальной фазы роста), постепенно повышая дозу  $H_2O_2$  от пассажа к пассажи. Через определенное количество пересевов получали активный ил, более устойчивый к внесению пероксида водорода по сравнению с контрольным, непассированным илом и выдерживающий внесение  $H_2O_2$  в дозах до 1–5 г/л. Пробы с илом для измерений отбирались до внесения  $H_2O_2$ . По результатам измерений сравнивали скорость снижения уровня остаточного ХПК при внесении  $H_2O_2$  в сточную воду с гранулированным илом на фоне воздействия и без воздействия света.

Другие особенности процедуры адаптации для каждого конкретного варианта культивирования описаны при изложении результатов экспериментов в главах 5 и 6.

### 4.3. Основные среды культивирования

#### 4.3.1. Агаризованные среды

**Сусло-агар** – для дрожжей и грибов.

**Мясо-пептонный агар (МПА)** – для выделения сапрофитных гетеротрофных бактерий.

**Агаризованная среда MRS** (для выращивания молочнокислых бактерий), г/л: гидролизат казеина – 10, пептон – 10, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 5,  $K_2HPO_4$  – 2, ацетат Na – 5, цитрат триаммония – 2,  $MgSO_4$  – 0,2,  $MnSO_4$  – 0,05, агар – 15.

**Агаризованная среда для культивирования галобактерий**, г/л: NaCl – 250,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 20, KCl – 2, цитрат Na – 3, вода – водопроводная, агар – 15.

#### 4.3.2. Жидкие питательные среды

**Среда Лурия-Бертани, LB-бульон**, г/л: бактотриптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10.

**Бактериальная среда LA**, г/л: триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, сахара – 10.

**Модифицированные среды для культивирования дрожжей р. *Candida*** (на основе среды 9M), г/л:

Среда 1:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 5,8,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 3,7,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,7, сахара или этанол – 10 (при культивировании в колбах в аэробных условиях), вода – водопроводная, pH – 5,8–6,0. Стерилизация в течение 30 мин. при 0,5 ати.

Среда 2:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,4; микроэлементы (1:100):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 50 мг,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 30 мг,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 30 мг,  $\text{NaCl}$  – 20 мг,  $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  10мг.

**Среда с зерновым сусликом** для культивирования дрожжей-сахаромицетов – продуцентов этанола.

В лабораторных экспериментах в качестве питательной среды использовалось зерновое суслико, приготовленное из зерна в производственных условиях (ФГУП «Биотехнологический завод», пос. Серебряные Пруды, Моск. обл.), а также модельные среды с сахарозой или сусликом в качестве органического субстрата и минеральными компонентами – источниками азота, фосфора, калия, магния.

Характеристика суслика: концентрация сухих веществ, % – от 17,5 до 18,0; титруемая кислотность,  $^{\circ}$  – от 0,1 до 0,3 (до подкисления) и от 0,6 до 0,8 (после подкисления), pH 3,6–3,8 (после подкисления).

Состав среды с зерновым сусликом, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,03,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,01,  $\text{NaCl}$  – 0,02,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  конц – 2 мл/л, зерновое суслико – 30 мл/л, вода – водопроводная, pH – 5,4.

**Модифицированная среда для культивирования дрожжей-сахаромицетов** (на основе среды 9M), г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0,  $\text{KCl}$  – 0,15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2,  $\text{CaCl}_2$  – 0,05, дрожжевой экстракт – 0,5, сахара – 30 при культивировании в колбах в аэробных условиях для роста биомассы, или 150 для процесса брожения, вода – водопроводная, pH – 5,8.

**Базовая среда для галобактерий** [1405], г/л:  $\text{NaCl}$  – 250,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 20,  $\text{KCl}$  – 2,  $\text{CaCl}_2$  – 0,2, цитрат натрия – 0,5, пептон (триптон) – 7, дрожжевой экстракт – 2, глицерин – 4 мл/л, вода – водопроводная. При необходимости pH среды доводится до 6,8–7,2 2 н NaOH. Стерилизация в течение 30 мин. при 0,5 ати. Использовались пептоны (триптоны) Serva, Hispanlab, Difco, дрожжевые экстракты Hispanlab, Organotechnie, Difco.

**Среда MRS** (для молочнокислых бактерий), г/л: гидролизат казеина – 10, пептон – 10, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 5,  $K_2HPO_4$  – 2, ацетат Na – 5, цитрат триаммония – 2,  $MgSO_4$  – 0,2,  $MnSO_4$  – 0,05.

**Базовая среда для проведения ферментации с молочнокислыми бактериями**, г/л: глюкоза – 10 (в опытах в планшетах), 20–30 (в опытах на колбах) или 100–110 (в опытах в ферментерах), дрожжевой экстракт – 15,  $K_2HPO_4$  – 2,  $MgSO_4$  – 0,1,  $MnSO_4$  – 0,05, pH 6,0–6,5 (доводят концентрированным р-ром  $NH_4OH$  или 1 н р-ром  $H_2SO_4$ ).

**Среда для культивирования штаммов *B. subtilis***, г/л:

1) посевная: сахароза – 20; дрожжевой экстракт – 10;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1, pH 7,1–7,2;

2) посевная среда модифицированная: сахароза – 50; дрожжевой экстракт – 10; мочевины – 3;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1, pH 7,1–7,2;

3) ферментационная: сахароза – 80, мальтоза – 40,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,  $K_2HPO_4$  – 9,  $KH_2PO_4$  – 3, мочевины – 30, дрожжевой экстракт – 10.

Подпитка (г/л): сахароза – 450; мальтоза – 250,  $(NH_4)_2SO_4$  – 10, триптон – 10, дрожжевой экстракт – 15.

Компоненты среды стерилизовали отдельно при 0,5 ати в автоклаве в течение 30 мин. Во все среды после стерилизации и охлаждения добавлялся фосфат эритромицина в количестве 10 мг/л.

При необходимости посевную среду хранили на холоду при +2 – +4°C не более 7 сут.

**Базовая среда для изучения микробиологического окисления фенола.**

Состав среды, г/л:  $Na_2HPO_4$  – 10,0,  $(NH_4)_2SO_4$  – 1,0,  $KH_2PO_4$  – 2,7,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2,  $MnSO_4$  – 0,01;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05,  $Ca(NO_3)_2$  – 0,03, фенол – 0,5–5,0, pH 7,0 – при выделении и проведении биодеструкции бактериями, pH 5,0 – при выделении и проведении биодеструкции дрожжами.

Для выделения и культивирования **цианобактерий** использовалась **среда BG-11**. Среда BG-11 без источника азота использована для выделения азотфиксирующих цианобактерий.

Для выделения и культивирования **микроводорослей** использовалась **среда Тамия**.

#### 4.4. Методы анализа

##### 4.4.1. Физико-химические и химические методы анализа

Значения pH измерялись pH-метрами pH-340, ЭВ-74 (Россия) – с использованием стеклянного измерительного и хлорсеребряного электрода сравнения; Seven-

Compact pH/Ion S220 (Mettler Toledo) и аналогичных марок – с использованием комбинированного электрода.

Концентрация растворенного кислорода ( $pO_2$ ) – датчиками полярографического типа с использованием анализаторов растворенного кислорода (Tap4000e, Mettler Toledo или аналогичных марок).

Уровень **освещенности среды** измерялся люксметром/УФ-радиометром ТКА–01/3 (г. Санкт-Петербург).

Содержание **биомассы** бактерий и дрожжей типично определяли по оптической плотности (турбодиметрически) на фотоэлектроколориметре КФК-3 ( $\lambda$  540 нм, толщина кюветы  $l=3$  мм, или  $l=5$  мм) или «Экотест 2020» ( $\lambda$  505 нм,  $l=1$  см) или спектрофотометрически при  $\lambda$  510 нм, непосредственным измерением сухого веса клеток микроорганизмов с последующим использованием калибровочных кривых для пересчета показаний с единиц оптической плотности на сухой вес (1 ед. оптической плотности при длине оптического пути 3 мм и  $\lambda$  540 нм соответствует 0,7 г/л асб), а также по колониеобразующим единицам, подсчетом клеток в камере Горяева. При определении сухого веса дрожжей и бактерий суспензию клеток отфильтровывали и промывали на мембранном фильтре и в дальнейшем высушивали при 105 °С до постоянного веса.

При культивировании **молочнокислых бактерий в планшетах** оптическую плотность измеряли на ИФА-фотометре iMark, BioRad при длине волны 505 нм.

Накопление **биомассы галобактерий** и **биомассы бактерий – продуцентов рибофлавина** определяли по изменению оптической плотности на КФК-3.01 (толщина кювет – 3 мм,  $\lambda$  670 нм), а также на спектрофотометре Specord M40, с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочной кривой.

**Сухой вес биомассы галобактерий** и калибровочную кривую пересчета в единицы оптической плотности определяли путем аккуратного отбора некоторого количества биомассы с чашек Петри. Определяли вес отобранной влажной биомассы, ее сухой вес после высушивания при 105 °С и долю влаги в биомассе. Полученное значение влажности использовали для пересчета в асб на основе результатов сопоставления массы влажной биомассы с чашки Петри и ее оптической плотности после суспендирования в стандартном объеме среды.

Содержание **сахаров**: глюкозы, редуцирующих веществ – эбулиостатическим модифицированным методом Бертрана, фенол-серным и антроновым методами; редуцирующих олигосахаридов и полисахаридов – с предварительным гидролизом соляной кислотой (метод Бертрана-Шарля); сахарозы – модифицированным методом Бертрана-Шарля [1916-1918], а также рефрактометрически (при культивировании дрожжей на сусле и сахарозе) с использованием рефрактометра RL 2 (Польша).

Содержание **молочной кислоты** определяли:

- потенциометрическим титрованием в изопропанолем;
- методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Измерения проводились в Международном учебно-научном центре трансфера фармацевтических и биотехнологий РХТУ им. Д.И. Менделеева. Этим же методом определяли в культуральной жидкости **остаточное содержание** глюкозы, побочных органических кислот и других **органических примесей**.

**Оптическую чистоту молочной кислоты** (L-форма) определяли на универсальном сахариметре СУ-5 с поляриметрической кюветой.

Содержание **этанола** определяли методом ГЖХ. Измерения проводились на газовых хроматографах Хром-5 и Цвет-500М с детектором теплопроводности и колонкой с насадкой Полисорб – 1 (размер частиц 0,1–0,3 мм по ТУ 6-09-10-1834).

Определение **общего** и **аминного азота** проводили по ГОСТ 32044.1-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Часть I. Метод Кьельдаля».

**Содержание белка:**

- биуретовым реактивом;
- методом Лоури.

Накопление **рибофлавина** контролировали по изменению оптической плотности. При измерении содержания рибофлавина аликвота культуральной жидкости смешивалась с 6 н HCl в соотношении 1:4, встряхивалась, оставлялась в покое 10 мин. при комнатной температуре, центрифугировалась 10 минут при 5000 об/мин; оптическая плотность супернатанта измерялась на КФК-3.01 ( $\lambda$  440 нм, толщина кювет – 3 мм) после построения калибровочного графика. Аналогично определяли содержание рибофлавина в клетках продуцента после экстракции 6 н HCl.

Концентрацию **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** определяли:

- амперометрически – по датчику рO<sub>2</sub>;
- спектрофотометрически – на УФ-спектрофотометре с кварцевой кюветой при длине волны 240 нм, используя коэффициент экстинкции  $\varepsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [1919].

Содержание **хлорофилла** в суспензии микроводорослей и цианобактерий определяли после предварительного замораживания отфугованных или отфильтрованных клеток для их разрушения с последующей экстракцией хлорофилла смесью хлороформ : этанол в соотношении 2:1 до полного обесцвечивания экстракта [1920]. После отфильтровывания экстракта измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 665 и 750 нм (показание E). Далее добавляли 1 каплю 1М HCl и также измеряли оптическую плотность при двух длинах волн (показание A). Концентрация хлорофилла (мг/мл) рассчитывали по формуле:

$$\text{ChI}_a = 27,9 \cdot V \cdot [(E_{665} - E_{750}) - (A_{665} - A_{750})] / V_{\text{образца}},$$

где  $V$  – объем экстрагента, пошедший на доведение объема (10 мл);

$V_{\text{образца}}$  – объем отобранной суспензии.

Концентрацию **фенола** определяли спектрофотометрическим методом при  $\lambda$  270 нм.

Химическое потребление кислорода (**ХПК**) определяли бихроматным методом по РД 52.24.421-2007 с применением в качестве индикатора N-фенилантраниловой кислоты.

Определение содержания **аммонийного азота** (аммиака) определяли по его взаимодействию с реактивом Несслера.

Содержание **нитратов, нитритов, аммонийных ионов** определялось готовыми тест-системами фирмы НИЛПА согласно ТУ 2642-010-23112380-2003, ТУ 2642-009-23112380-2003, ТУ 2642-011-23112380-2003, а также тест-системами производства фирмы Sera (Германия). Концентрация нитратов дополнительно измерялась иономером рХ-150.1МИ фирмы «Измерительная техника» с ионоселективным электродом.

Концентрация **неорганических фосфат-ионов**  $\text{PO}_4^{3-}$  измерялась по ПНД Ф 14.1:2:4.112-97.

Определение общего фосфора ( **$P_{\text{общ.}}$** ) в биомассе активного ила определяли путем гидролиза образца активного ила в 6 н HCl с последующим центрифугированием, промывкой фугата водой, повторным центрифугированием, добавлением 2 мл дистиллированной воды и 1 мл соляной кислоты, выдерживанием на водяной бане 40 мин и далее анализом на содержание фосфат-ионов по ГОСТ 18309-72.

**Содержание полифосфатов** определялось по ГОСТ 18309-72 путем их гидролиза в кислой среде, при котором полифосфаты переходят в растворенные ортофосфаты, определяемые колориметрическим методом в виде фосфорно-молибденового комплекса, окрашенного в синий цвет.

Содержания ионов  **$\text{Ca}^{2+}$**  в свекловичной мелассе и других субстратах и питательных средах определяли комплексонометрическим титрованием с ЭДТА с предварительным осаждением или без осаждения оксалатом – в зависимости от степени окрашенности исходного раствора.

**Анализ химического состава компонентов исходной среды и культуральной жидкости** методом ВЭЖХ – проводился в лаборатории хроматографических методов анализа ИНЭОС РАН.

#### 4.4.2. Микробиологические методы анализа

**Микроскопирование** проводилось стандартными методами с использованием препаратов типа «раздавленная капля» и «фиксированная капля» при увеличении от 160х до 1600х. Использовали микроскопы Микромед-2 (вариант 2-20), Laboval-4 и аналогичных марок, Primo Star Carl Zeiss (Германия), IX51, Olympus Co, Ltd. (Япония).

Микроскопированием определяли:

- наличие посторонней микрофлоры;
- число клеток (подсчет в камере Горяева);
- морфологию клеток (форма клеток, их взаимное расположение, размер клеток, подвижность), морфологию активного ила, в том числе с использованием видеоприставки к микроскопу;
- окраску фуксином для контрастирования фиксированных препаратов;
- окраску по Граму фиксированных препаратов;
- число живых и мертвых клеток после окрашивания метиленовым синим, а также выявления микроводорослей, которые не прокрашиваются метиленовым синим вследствие его окисления (обесцвечивания);
- наличие гранул углеводной природы;
- наличие полифосфатов (волутинов по способу Омелянского);
- наличие спор по методу Пешкова;
- наличие слизистых оболочек микроорганизмов путем окраски тушью;
- первичную идентификацию простейших путем фиксации раствором люголя.

**Высевы на твердые питательные среды** в чашках Петри проводили с целью:

- определения (обнаружения) посторонней микрофлоры в образцах питательных сред, из биореакторов и в других образцах;
- определения титра колониеобразующих единиц;
- описания микробного профиля и морфологии колоний (форма, размер, поверхность, профиль, блеск и прозрачность, цвет, край, структура, консистенция) и первичной идентификации объектов культивирования;
- определения антагонистической активности дисковым методом или методом штрихов.

Для цианобактерий антагонистическую активность определяли пробирочным методом. В этом случае в пробирки заливали стерильную питательную среду для цианобактерий по 9 мл, вносили по 1 мл культуры. Выдерживали в термостате при 30 °С при постоянном освещении в течение 5 суток. Затем в пробирки с выросшей культурой цианобактерий вносили по 0,5 мл культуральной жидкости предполагаемых бактерий-антагонистов и вновь выдерживали в термостате при 30 °С 24 часа.

Проводили измерение концентрации цианобактерий в пробирках и оценивали антагонистическую активность по убыли численности цианобактерий.

#### 4.4.3. Оценка и контроль морфологического, физиолого-биохимического состояния популяций микроорганизмов и их сообществ

**Характеристика процесса гранулообразования при исследовании аэробной биологической очистки.** Оценивались:

- количество и размер образующихся гранул;
- морфология гранул;
- микробный состав – путем посева образцов проб ила с различных зон гранул (наружной, средней, внутренней) на твердые селективные питательные среды. Через 3–14 суток визуально оценивали рост на чашках Петри. По разнообразию морфологии колоний оценивали количество культур, характерных для данной среды. В случае, если колонии были схожи, проводили дополнительное исследование микрофотографированием;
- таксономическая принадлежность выделенных изолятов на основе анализа последовательностей 16S и 18SrRNA (в Центре биоинженерии РАН).

#### **Определение количества образующейся биопленки.<sup>1</sup>**

Интенсивность образования биопленок можно оценить с помощью специального красителя (кристалл-виолет) [419, 1921]. Клетки микроорганизмов выращивали в планшетах в течение 24 ч, при этом на стенках лунок образовывалась биопленка. Затем планктонные клетки (т.е. свободно плавающие, не прикрепленные) из лунки удаляли, лунку промывали дистиллированной водой и добавляли раствор красителя, окрашивающего биопленку. После этого лунку отмывали от избытка красителя и добавляли в лунку 96% этанола для десорбции красителя. Замеряли интенсивность окрашивания содержимого лунки по оптической плотности, которая пропорциональна интенсивности образования биопленки.

**Дыхательная активность** определялась по изменению концентрации растворенного кислорода в ферментационной среде после отключения аэрации и при минимальном перемешивании. Кроме того, по показателю  $pO_2$  определялись: **момент истощения субстрата** в ферментационной среде и **время распада  $H_2O_2$** .

<sup>1</sup>Исследование образования биопленок проводилось сотрудниками Института молекулярной генетики РАН (проф. Хмель И.А., аспирант Плюта В.А.). Автор диссертационной работы участвовал в данных исследованиях применительно к воздействию оксидативного стресса, индуцируемого внесением  $H_2O_2$  в среду культивирования, на систему кворум-сенсинг и образование биопленок.

**Бродильная активность** определялась методом вытеснения путем измерения объема выделяемого  $\text{CO}_2$  в стандартной аликвоте, отобранной из ферментера без разбавления суспензии микроорганизмов. Для этого в колбу на 50 мл, помещенную на водяную баню (температура 30–33 °С) вносили 20 мл суспензии дрожжей сразу же после отбора непосредственно во время процесса роста микроорганизмов. Колбу закрывали резиновой пробкой с приемной трубкой для отвода газа. Выделившийся газ ( $\text{CO}_2$ ) собирали в мерный сосуд с подкисленной водой для определения объема.

**Индекс активного ила** – согласно общепринятому определению как объем активного ила на 1 г сухого вещества ила в исходной суспензии после тридцатиминутного отстаивания.

**Качественная оценка характера биосинтеза при культивировании галобактерий** основывалась на изменении цвета бактериальной суспензии по ходу протекания ферментации. Для более детальной оценки динамики накопления бактериородопсина (БР) без его непосредственного выделения разработали экспресс-метод, основанный на фиксации цвета суспензии в кювете со стандартной толщиной слоя суспензии при помощи фотосканера [1922, 1923]. Отсканированные изображения анализируются на содержание цветовых компонентов (RGB – шкала – красный, зеленый, синий) при помощи графического редактора Photoshop. Цвет с большей долей синей составляющей (темно-сиреневый) свидетельствует о более высоком содержании бактериородопсина в клетках галобактерий. Оранжевый оттенок суспензии свидетельствует о высоком содержании каротиноидов и малом – бактериородопсина (рис. 4.5).

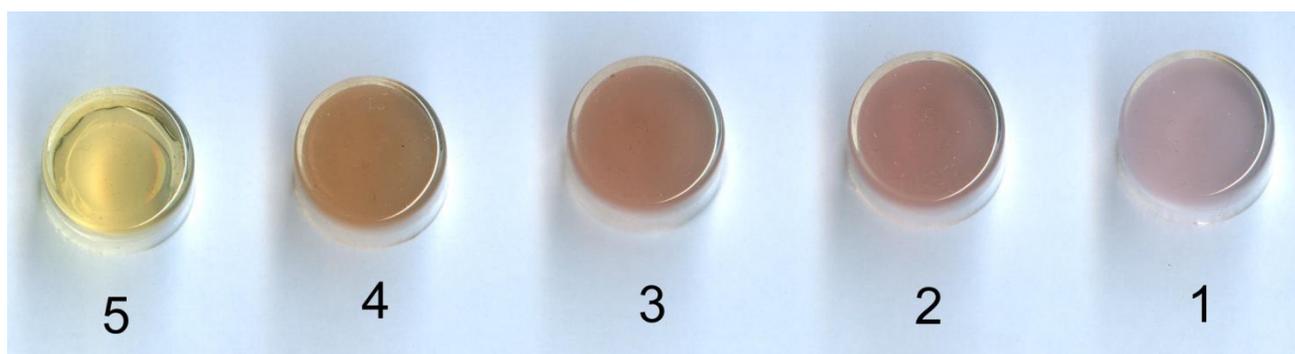


Рисунок 4.5 – Изменение цветовой окраски суспензии галобактерий по ходу культивирования при среднем уровне накопления БР.

Для анализа направленности биосинтеза у галобактерий (содержание бактериородопсина и каротиноидов) строится фазовый портрет (карта цвета): концентрация биомассы (г/л или оптическая плотность суспензии) – цветовая характеристика (соотношение красного R – синего B – зеленого G цвета) для количественной оценки

выработки бактериородопсина в процессе роста (рис. 4.6А, Б). В фазовом пространстве рост и изменение цвета суспензии можно отобразить в виде кривой.

По оси ординат (возрастание снизу вверх) фиксируется концентрация биомассы, а по оси абсцисс (возрастание справа налево) – окраска суспензии клеток. За максимум окраски взят цвет суспензии с пурпурными мембранами с бактериородопсином. Окраска фиксируется в относительных единицах (0–10). Изменение цвета в сторону уменьшения В-составляющей спектра и, соответственно, возрастания R и/или G указывает на начало выработки галобактериями каротиноидов.

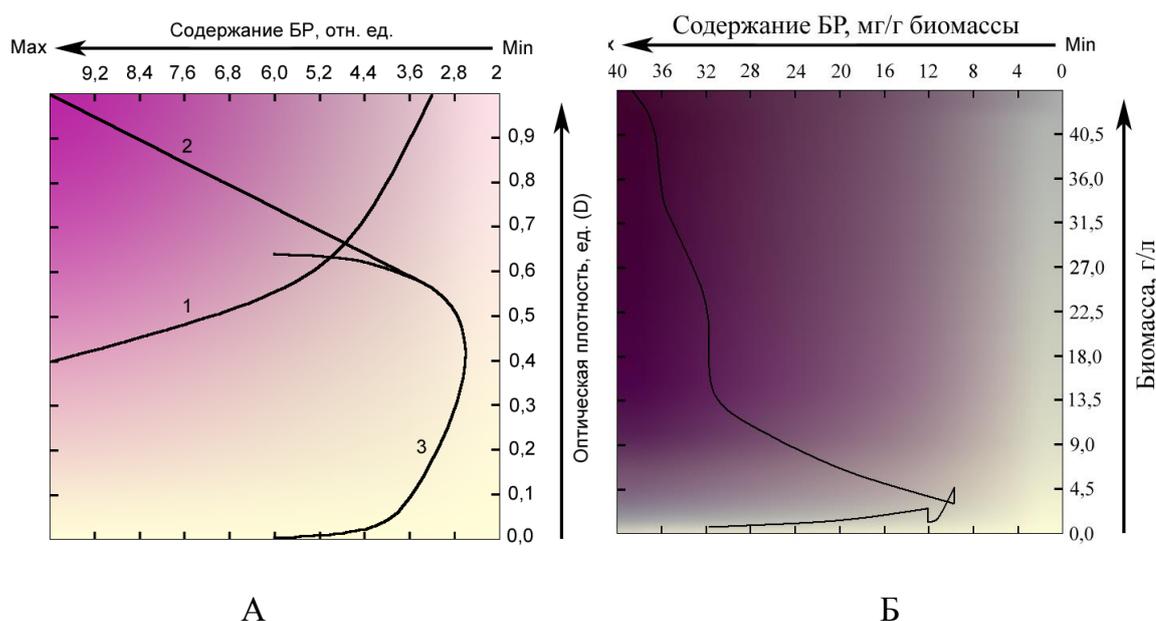


Рисунок 4.6 – Градиентная карта цвета для определения содержания БР. Кривая – изменение цвета суспензии по ходу культивирования.

А – при незначительном накоплении биомассы.

Б – при высоком конечном уровне накопления биомассы и бактериородопсина в реальном эксперименте при культивировании с адсорбентом (гранулированный активированный уголь).

Гипотетическая кривая (1), приведенная на рис. 4.6А, соответствует неизменному суммарному содержанию БР при разной оптической плотности суспензии (т.е.  $D \times BR_{уд} = const.$ ;  $D$  – оптическая плотность суспензии,  $BR_{уд}$  – удельное содержание бактериородопсина в клетках галобактерий, мг/г), при этом с увеличением уровня накопления биомассы в среде падает удельное содержание БР в клеточной массе. Линия (2), исходящая из левого верхнего угла до точки кривой, построена для случая накопления БР, пропорционального накоплению биомассы, т.е. при неизменном удельном содержании БР в клеточной массе ( $B = const$ ). В реальном эксперименте

(кривая 3) при определенном уровне накопления биомассы наблюдается уменьшение удельного содержания БР при повышении суммарного уровня накопления его в ферментационной среде. Для сравнения на градиентной карте (рис. 4.6Б) показана линия изменения цвета суспензии в реальном процессе культивирования галобактерий с внесением инкапсулированного угля (см. раздел 5.3.5.5).

Такая карта позволяет оперативно анализировать содержание БР в суспензии и, в некоторой степени, предсказывать дальнейшее поведение культуры. Имея карту цвета, можно достаточно надежно оценить эволюцию цвета по ходу ферментации и наличие в клетках бактериородопсина визуально, «на глаз».

В реальных условиях кривые эволюции цвета будут находиться в определенном коридоре разброса. Поэтому в управляющую систему должна закладываться область цветов для каждого момента времени, соответствующая оптимальному и минимально допустимому течению процесса с определенным допуском на точность экспресс-методики. Погрешность градиентной карты цвета при уровне биомассы  $>5$  г/л находится на уровне 7–8%. Следует отметить, что карта показывает несколько заниженное содержание БР для определенного цвета и уровня биомассы, однако, принимая, что потери всегда примерно одинаковы, разработанный способ дает возможность определить выход БР уже с учетом потерь стандартного метода выделения.

#### **4.4.4. Биохимические и молекулярно-генетические методы анализа и контроля**

**Общая дегидрогеназная активность** определялась с использованием индикатора 2.3.5–трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) и замером количества образованной восстановленной формы ТТХ (трифенилформазана) по методике, описанной в «Правилах приема производственных сточных вод в системы канализации населенных пунктов 1984-03-02 00:00:00», модифицированной нами для определения физиологической (биохимической) активности микроорганизмов и их консорциумов. Дегидрогеназная активность характеризует физиологическую активность ила в отношении окисления загрязнений сточных вод. Принято считать, что чем выше активность фермента дегидрогеназы, тем выше биохимическая активность ила и интенсивнее красный цвет исследуемой пробы, тем лучше протекает деструкция загрязнений в сточной воде микроорганизмами [1924]. Дегидрогеназная активность изменяется пропорционально общей численности микроорганизмов, которая, в свою очередь, пропорциональна общему количеству потребленных этими микроорганизмами питательных веществ (в случае очистки сточных вод активным илом – загряз-

няющих веществ). При этом окрашиваются только клетки микроорганизмов, хлопья активного ила, а жидкость остается бесцветной.

Для определения дегидрогеназной активности в пробирку с 5 мл сточной воды, содержащей очищаемый субстрат и активный ил, или с суспензией изучаемых микроорганизмов, добавляли 1 мл 0,03%-ного водного раствора ТТХ (в контрольной пробе 1 мл дистиллированной воды) и, в случае изучения активности отдельных культур, – 1 мл раствора с использовавшимся питательным субстратом. Пробирки закрывали резиновыми пробками, перемешивали содержимое и оставляли в покое при температуре 30 °С в течение 1 часа, после чего центрифугировали в течение 15 мин при 7000 об/мин, сливали фугат. К осадку добавляли 5 мл 98% этанола, перемешивали и оставляли до полной элюции (30–60 минут), центрифугировали и измеряли интенсивность окраски фугата на ФЭКе при длине волны 540 нм относительно дистиллированной воды. Отсутствие окраски свидетельствовало об отсутствии дегидрогеназной активности.

**Каталазная активность** определялась:

- по скорости выделения  $O_2$  в реакционном сосуде с резиновой пробкой и приемной трубкой для отвода газа после внесения отобранных и разбавленных в 10 или 100 раз (в зависимости от концентрации биомассы) 2 мл аликвот проб в 20 мл 2,5%  $H_2O_2$  при температуре 30–33°С. Выделившийся газ собирают в мерный сосуд для определения объема;

- в тесте на каталазу при выявлении попадания посторонней микрофлоры при культивировании молочнокислых бактерий; положительная реакция на каталазу в культуре молочнокислых бактерий свидетельствует о наличии посторонней микрофлоры (грибной или бактериальной).

**Анализ содержания и выделение бактериородопсина в составе пурпурных мембран.**

В исследованиях с галобактериями использовали модифицированную методику для анализа содержания БР в клетках спектрофотометрическим методом и последующей его очистки и выделения. За основу была взята методика, описанная Остерхельдом и Стохениусом [1405].

В общем случае модифицированная методика анализа содержания БР включает следующие этапы:

- 1) Осаждение биомассы галобактерий на центрифуге; биомасса сохраняется при температуре –18°С и не меняет своих свойств в течение длительного промежутка времени;
- 2) Отмывка 25% раствором NaCl от компонентов среды;
- 3) Повторное центрифугирование;

4) Лизис биомассы дистиллятом 10:1 с добавлением 10 мг/л ДНКазы (Sigma) в течение 1 ч при комнатной температуре для устранения вязкости, создаваемой комплексами ДНК с белками, при перемешивании и освещении;

5) Центрифугирование 10 мин. при 7000 об./мин, отбор супернатанта. Отобранный супернатант анализируется на спектрофотометре (Specord M40) со снятием спектра в диапазоне видимого света в интервале длин волн 400–620 нм.

Концентрация бактериородопсина  $C_{БР}$  в лизате после отмывки определяется по формуле:

$$C_{БР} \text{ (г/л)} = L * A_{568} * 26000 / 63000 ,$$

где L (см) – толщина кюветы (1 см);  $A_{568}$  – оптическая плотность при 568 нм; 26000 – молекулярная масса БР; 63000 – коэффициент экстинкции при 568 нм.

Очистка и выделение БР в составе пурпурных мембран (ПМ) включает следующие этапы, дополнительные к этапам 1–5 на стадии определения содержания БР:

6) Ультрацентрифугирование в течение 30 мин при 20000 об/мин (центрифуга 5131 «Eppendorff», ФРГ);

7) Отделение слоя ПМ от каротиноидов (находятся в супернатанте и отличаются цветом), слив супернатанта и ресуспендирование осадка ПМ в 25% растворе NaCl;

8) Диализ в течение 6–12 ч против 0,1 н NaCl с добавлением небольшого количества фосфатного буфера (при диализе против дистиллированной воды ПМ превращаются в нефункциональные «синие» мембраны);

9) Повторное ультрацентрифугирование и отделение ПМ от каротиноидов, однако при высоком содержании БР и низком содержании каротиноидов (супернатант бесцветный) достаточно одного ультрацентрифугирования;

10) Получение спектра препарата ПМ в УФ и видимой области. В качественных препаратах пурпурных мембран отсутствуют пики каротиноидов, отношение оптической плотности раствора БР при длине волны 280 нм к оптической плотности раствора при длине волны 570 нм ( $D_{280}/D_{568}$ ) менее 2,4, отношение  $D_{568}/D_{400}$  более 2,5. Полученные препараты использовались для калибровки эталонов для экспресс-методики определения содержания БР;

11) Получение стерильного препарата фильтрацией в стерильные флаконы через микрофильтрационную мембрану;

12) Хранение препарата при 4 °С с концентрацией белка около 10 мг/мл.

**Лизис клеток молочнокислых бактерий для проведения электрофореза внутриклеточного пула белков.**

Отбирали 10 мл суточной клеточной суспензии молочнокислых бактерий, центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин с охлаждением ротора (4°C), удаляли надосадочную жидкость. Отмывали дважды с использованием PBS – буфера и центрифугировали (12000 об/мин, 10 минут, 4°C) один раз с использованием лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>), затем ресуспендировали в 10 мл лизирующего буфера, содержащего 5 мг/мл лизоцима. После чего инкубировали при 37 °С 30 минут. После инкубации клеточный дебрис удаляли при помощи центрифугирования в течение 15 мин при 12000 об/мин и 4°C.

#### **Идентификация выделенных изолятов микроорганизмов.**

В ряде случаев выделенные изоляты микроорганизмов идентифицировались методом анализа последовательности генов 16S рРНК (бактерии, цианобактерии) и 18S рРНК (эукариотические клетки дрожжей и микроводорослей). Идентификация проводилась на базе центра Биоинженерии РАН.

## ГЛАВА 5. СОВМЕЩЕННЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПРОДУКТОВ БИОСИНТЕЗА

Идея совмещения биосинтеза с селективным извлечением внеклеточных ингибиторов и продуктов непосредственно в ходе ферментации была предложена нами в начале 1980-х гг. [125, 127]. В качестве наиболее перспективного варианта рассматривался мембранный биореактор (МБР), который на тот момент уже был апробирован за рубежом в лабораторных условиях (см. раздел 1.2.2), и была показана возможность резкого увеличения продуктивности биореактора в режиме непрерывного проточного биосинтеза за счет увеличения плотности популяции и снижения ингибирования процесса накапливаемыми метаболитами.

Эксперименты как с использованием дрожжевых, так и бактериальных культур показали, что резкое падение проницаемости мембран (в разы и десятки раз), сложности стерилизации мембранных модулей, ограничения в площади мембран, сводят на нет его преимущества. Для высокоинтенсивного аэробного биосинтеза, например, аминокислот МБР неэффективен вследствие массообменных ограничений в обеспечении кислородом, возникающих при возрастании плотности популяции клеток микроорганизмов. Поэтому МБР оказался относительно эффективным лишь при получении продуктов брожения, в частности, этанола, молочной кислоты [126].

Как вариант реализации процесса с селективным отводом метаболитов нами было предложено исследовать ферментацию с рециклом определенных фракций культуральной жидкости, образуемых попутно с выделением и очисткой целевого продукта биосинтеза. Исследования, проведенные нами в период с 1985 по 1993 гг. с микробными продуцентами аминокислот *Corynebacterium glutamicum* 95, кормовых дрожжей *Candida utilis*, сточных вод гидролизно-дрожжевых производств показали, что возврат некоторых фракций культуральных жидкостей, полученных с помощью их разделения на ультрафильтрационных мембранах или на ионитах, и сбрасываемых в качестве побочных стоков, позволяет не только уменьшить объем стоков, но и повысить скорость роста и биосинтеза, выход целевого продукта с единицы основного (углеродного) субстрата в ферментационном процессе на 10–15% [19-23]. Это повышение может с избытком компенсировать затраты на дополнительную обработку потока отработанной культуральной жидкости.

Фракции культуральной жидкости, стимулирующие биосинтез, содержали термолabile и термостабильные вещества гликопротеиновой природы с молекулярной массой 9 кД и 39 кД у *C. utilis* и 14 кД и 45 кД – у *C. glutamicum*. Стимулирующий эффект экзометаболитов зависел от концентрации вносимых ауторегулято-

ров, условий культивирования, состава среды роста и количества вносимого инокулята.

В общем случае фракции, стимулирующие рост и биосинтез, могут содержать половые феромоны, факторы спорообразования, дифференциации, лектины (факторы агглютинации), автолиза и другие ауторегуляторы, играющие определенную роль в жизненном цикле микроорганизмов [1925].

В последующих подразделах данной главы приводятся результаты исследований двух вариантов совмещенных процессов: 1) с одновременным протеканием микробиологического синтеза и селективным извлечением внеклеточных ингибиторов и продуктов в мембранном биореакторе непосредственно в ходе ферментации; 2) с одновременным протеканием микробиологического синтеза и оксидативным воздействием активных форм кислорода, а именно  $H_2O_2$  или ультрафиолета ближнего диапазона спектра.

### **5.1. Культивирование молочнокислых бактерий в МБР с целью получения молочной кислоты**

В данном разделе приводятся в обобщенном виде результаты исследований процесса микробиологического синтеза молочной кислоты с использованием мембранного биореактора. Исследования были проведены в период с 2010 по 2018 гг. в связи с возрождающимся интересом отечественной биотехнологии к продуктам «зеленой химии» и промышленному получению органических кислот (молочной и других) и биodeградируемых полимеров (в первую очередь полилактида). Работы проводились в рамках проекта Минобрнауки № 14.577.21.0037. Разрабатываемая в составе группы соисполнителей технология предусматривала получение нативного раствора (бесклеточной культуральной жидкости) лактата аммония из различных видов сахаросодержащего сырья (глюкозы, ее сиропов, глюкозно-фруктозных сиропов, гидролизатов крахмала, гидролизатов мелассы) для последующего получения полилактида и/или других продуктов на основе молочной кислоты с максимальным выходом конечного продукта.

Для разработки первой технологической стадии – микробиологического синтеза молочной кислоты был проведен цикл исследований, включающих как традиционные подходы в подборе более рациональных условий культивирования продуцентов, так и апробацию инновационных решений с использованием мембранного биореактора и контролируемого оксидативного воздействия. Было важно выяснить основные факторы, влияющие на показатели микробиологического синтеза при культивировании молочнокислых бактерий, отработать приемы поддержания высокой

физиологической активности культуры и режимы высокопроизводительного культивирования.

Надо отметить, что культивирование в МБР не снижает объема сточных вод и поэтому непосредственно не может быть отнесено к экологически чистым решениям. Однако, в рамках проведения процесса получения молочной кислоты с использованием МБР экологически чистыми решениями могут быть: 1) культивирование в МБР без отвода избыточной биомассы продуцента, полностью удерживаемой в рабочей зоне биореактора, что приводит к устранению количества твердых отходов в виде избыточной биомассы; 2) замена классической технологии с использованием  $\text{CaCO}_3$  на  $\text{NH}_4\text{OH}$  для нейтрализации молочной кислоты и поддержания оптимального pH среды, что приводит к устранению большого количества образуемых твердых отходов; 3) снижение расхода ростовых факторов, что может понизить содержание остаточных компонентов питательной среды в отработанной культуральной жидкости, последующие затраты на выделение молочной кислоты и очистку сточных вод.

Конкретные задачи исследований с продуцентами молочной кислоты включали:

- выбор штаммов, отвечающих общим требованиям, предъявляемым к промышленным штаммам-продуцентам молочной кислоты, и специфическим требованиям, связанным с длительным культивированием в мембранном реакторе (отсутствие синтеза вязких полисахаридов, отсутствие падения бродильной активности, расщепления штамма на варианты и лизиса культуры при длительной ферментации, способность противостоять контаминации в реальных условиях крупнотоннажного биотехнологического производства); общими в любом случае остаются требования гомоферментативности осуществляемого бактериями сбраживания углеводов, высокая степень конверсии субстрата, высокий выход молочной кислоты, высокая продуктивность биореактора, способность образовывать конкретный оптический изомер молочной кислоты (в данном случае L-молочной кислоты) и непатогенность штамма-продуцента;

- исследование влияния на показатели биосинтеза молочной кислоты таких факторов, как природа углеводного субстрата и его концентрация, концентрация биомассы, молочной кислоты, содержание минеральных компонентов питательной среды, источник и концентрация ростовых факторов, физико-химические параметры окружения (pH, температура, микроаэрация, скорость перемешивания, возможное воздействие активных форм кислорода, в частности пероксида водорода), способ подготовки инокулята, условия голодания продуцента, условия предобработки углеводного субстрата;

- сравнительный анализ изменения ростовых характеристик и биосинтетической активности отобранных штаммов-продуцентов в различных режимах ферментации;
- апробация культивирования с контролируемым оксидативным воздействием;
- подбор конструкции мембранного биореактора и условий работы мембранного модуля (тип мембран, надмембранное давление, скорость прокачки ферментационной среды, требования к асептике, режимы мойки и промывки) и режимов культивирования (непрерывный или отъемно доливной, поддержание необходимого агрегатного состояния клеток штамма-продуцента для снижения забиваемости мембран микробными клетками и повышения рабочей проницаемости мембран);
- отработка методов культивирования и управления состоянием популяции молочнокислых бактерий, поддержания стабильности процесса биосинтеза и продуктивности биореактора на основе выявленных закономерностей;
- оценка количества образуемых отходов.

Для исследования в мембранном биореакторе был выбран тип установки с выносным половолоконным ультрафильтрационным мембранным модулем, как наиболее универсальный и позволяющий, при необходимости, увеличить размеры половолоконного модуля или подключить в систему дополнительный модуль (см. раздел 4.1.4). Данная конструкция установки позволяет вести как непрерывное культивирование с постоянным отбором пермеата, так и простое периодическое культивирование и культивирование с отъемом-доливом среды в условиях высокой концентрации биомассы. В последних случаях промывку ультрафильтрационного модуля возможно осуществлять без остановки брожения в реакторе.

### 5.1.1. Выбор штаммов-продуцентов

Выбор штаммов проводился из набора лактобацилл на основе способности максимально полно использовать субстрат и накапливать существенные количества молочной кислоты на среде с глюкозой с высокой скоростью, быть устойчивыми к высоким концентрациям как глюкозы, так и молочной кислоты.

Были протестированы 9 штаммов – потенциальных продуцентов молочной кислоты, приобретенных из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов: *L. lactis subsp. lactis* В-3123, *L. lactis subsp. lactis* В-4421, *Lactobacillus sp.* В-6242, *Lactobacillus sp.* В- 4488, *Lactobacillus plantarum* В-4174, *Lactobacillus plantarum* В-4175, *Lactobacillus casei* В-4486, *Lactobacillus casei* В-3489, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В-4079. Все выбранные штаммы молочнокислых бактерий не являются патогенами человека и домашних животных.

По результатам скрининга штаммов на способность молочнокислых микроорганизмов к кислотообразованию в качестве наиболее перспективных были отобраны *Lactococcus lactis subsp. lactis* В 3123, *Lactobacillus plantarum* В 4174, *Lactococcus lactis* В 4236 (*Streptococcus lactis* 3905), *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В-4079.

Оценка ростовых и биосинтетических характеристик отобранных штаммов в микроаэрофильных условиях в лабораторных сосудах на базовой питательной среде с глюкозой с подтитровкой питательной среды показала преимущество штамма *L. paracasei subsp. paracasei* В-4079 по совокупности показателей. Данный штамм обладал наибольшей удельной биосинтетической (бродильной) активностью, синтезировал L-молочную кислоту с уровнем накопления не менее 100 г/л на среде с глюкозой с выходом до 95–97% от субстрата и продуктивностью биореактора в режиме периодического культивирования 3–5 г/л.ч, с минимальным накоплением побочных продуктов. Последнее важно на последующей стадии выделения молочной кислоты из культуральной жидкости. Штамм показал относительно невысокую чувствительность к снижению содержания ростовых факторов в питательной среде. При уменьшении в 1,5–2 раза содержания дрожжевого экстракта в питательной среде для выбранного штамма *L. paracasei* В-4079 значительных изменений в содержании побочных продуктов не происходило. По продуктивности штамм В-4079 не менее чем в 2 раза превосходил остальные штаммы.

Согласно паспортным характеристикам ВКПМ данный штамм был выделен из забродившего сока ботвы сахарной свеклы, обладает высокой устойчивостью (15%) к этанолу, не является генетически модифицированным. Штамм относится к микроорганизмам, непатогенным для человека, согласно классификации микроорганизмов по Санитарным правилам СП 1.3.2322-08. Работа со штаммом *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В4079 не требует специальных мер предосторожности.

Стабильность выбранного штамма, высокий выход целевого продукта (молочной кислоты) от субстрата, низкое содержание примесей, оптическая чистота молочной кислоты подтвердились в последующем результатами длительных пробегов в мембранном биореакторе.

С отобранным штаммом *L. paracasei subsp. paracasei* В4079 была проведена серия экспериментов по подбору наиболее подходящих условий роста и синтеза МК, прежде всего таких наиболее очевидных для ферментации, как физико-химические параметры окружения, условия аэрации, состав питательной среды. Также в ряде случаев для сравнительной оценки использовались штаммы *Lactococcus lactis* В 3123 и *Lactobacillus plantarum* В 4174, *Lactococcus lactis subsp. lactis* В 4236.

### 5.1.2. Влияние условий культивирования на рост штамма-продуцента и синтез молочной кислоты

#### *Влияние температуры на ростовые характеристики*

Согласно паспортным данным, оптимальной температурой роста для *L. paracasei* В4079 является 30°C. Однако по данным экспериментов, проведенных в колбах и планшетах на базовой питательной среде оптимальная температура роста для выбранного штамма – 37°C. Снижение температуры культивирования с 37 до 30 °С приводит к падению скорости биосинтеза в среднем в 2 раза. Температура 40 °С является критической верхней.

#### *Влияние pH на ростовые характеристики и биосинтез молочной кислоты*

Наибольшая продуктивность биореактора по молочной кислоте и хороший рост культуры в лабораторном ферментере в периодическом режиме культивирования и с подтитровкой питательной среды наблюдаются при pH 6,0–6,5. Снижение pH до 5,6 и повышение до 7,9 приводит к существенному падению скорости накопления МК.

#### *Влияние аэрации на ростовые характеристики и биосинтез молочной кислоты*

Результаты культивирования, проведенного в колбах с варьированием объема питательной среды и скорости оборотов платформы шейкера, а также в ферментере, показали, что наличие в среде кислорода не оказывает существенного влияния на рост продуцента: длительность лаг-фазы и начало экспоненциальной фазы для аэробных и анаэробных условий при росте на глюкозе совпадают, при этом в аэробных условиях накопление биомассы превышает накопление в анаэробных приблизительно в 1,7 раз. С другой стороны, скорость потребления глюкозы выше в анаэробных условиях. Наличие аэрации мало влияет на динамику роста культуры, но несколько снижает скорость брожения и выход молочной кислоты.

*Скорость перемешивания среды* в биореакторе должна обеспечивать пребывание культуры во взвешенном состоянии. Однако с технической точки зрения скорость перемешивания более важна для быстрого равномерного распределения титранта в среде при подтитровке. Время перемешивания титранта не должно превышать 1–2 мин, чтобы избежать чрезмерного накопления титрующего реагента и превышения предельного значения pH вблизи точки ввода титранта в среду.

#### *Влияние концентрации глюкозы*

При культивировании *L. paracasei* В4079 при увеличении концентрации глюкозы в среде со 110 до 200 г/л продуктивность биореактора снижается более чем в два раза, при этом выход молочной кислоты снижается с 91,8% до 84%.

#### *Влияние концентрации молочной кислоты*

Отобранный штамм *L. paracasei* В4079 может расти при содержании молочной кислоты в среде до 170 г/л. Существенный прирост биомассы наблюдается вплоть до концентраций молочной кислоты 130–140 г/л, однако уже начиная с 30 г/л и выше молочная кислота угнетает рост биомассы. В среде с содержанием молочной кислоты 185 г/л роста культуры практически не наблюдалось.

Таким образом, учитывая падение продуктивности с ростом концентрации глюкозы и накоплением молочной кислоты в питательной среде и затраты на последующее выделение молочной кислоты, целесообразно использовать питательную среду с исходной концентрацией глюкозы в интервале 100–120 г/л.

#### *Влияние концентрации биомассы*

В мембранном биореакторе продуктивность молочнокислого брожения должна увеличиваться с ростом содержания биомассы в среде. С целью проверки этого предположения были проведены эксперименты с культивированием *L. paracasei* В4079 в условиях различной плотности бактериальной популяции.

Суспензия биомассы отбиралась непосредственно из ферментера с экспоненциальной фазы роста, центрифугировалась в течение не более 10 мин. при 7000 об/мин. и ресуспендировалась в питательной среде. После ресуспендирования концентрация биомассы составляла от 20 до 60 ед. опт. плотности. Ресуспендированная биомасса помещалась в термостатируемый микробиореактор с подтитровкой питательной среды, и по ходу брожения отбирались пробы. По результатам определения накопленного количества молочной кислоты вычисляли продуктивность микробиореактора. Концентрирование клеток в 7 раз приводило к повышению средней продуктивности по молочной кислоте примерно в 7,3 раза. По мере потребления субстрата продуктивность снижалась. Так, в первые 15 мин. продуктивность составила 151,2 г/л\*ч. По окончании брожения выход молочной кислоты составил 93,7% при 99% степени использования субстрата (глюкозы).

Таким образом, высокая продуктивность биореактора (80 г/л\*ч и более) может быть достигнута при поддержании в биореакторе повышенной концентрации физиологически активной биомассы (60–65 г/л). Такая возможность может быть обеспечена отводом бесклеточной среды с образующейся молочной кислотой из биореактора. Использование фильтрационного модуля для этих целей может быть ограничено в связи с тем, что образующаяся суспензия клеток достаточно густая и содержит повышенное количество высокомолекулярных внеклеточных продуктов. Альтернативой мембранному концентрированию может служить сепарация или центрифугирование в проточной центрифуге.

#### *Влияние источника углеводного субстрата и его предобработки*

Глюкоза и глюкозосодержащие субстраты наиболее легко сбраживаются молочнокислыми бактериями, и в базовом варианте, разработанным нами, рассматриваются как основное сырье для получения молочной кислоты. Вместе с тем, стоимость глюкозы существенно выше сахарозосодержащих субстратов, таких как свекловичная меласса.

Эксперименты, проведенные со штаммами *L. paracasei* B4079 и *L. plantarum* B4174 на базовой среде с заменой глюкозы на сахарозу показали, что оба штамма могут сбраживать сахарозу в молочную кислоту, однако с гораздо меньшей скоростью. У *L. paracasei* B 4079 скорость роста снижается более чем в 7 раз, длительность культивирования возрастает в 5 раз, соответственно продуктивность процесса молочнокислого брожения снижается приблизительно в 5 раз, а удельная активность биомассы снижается приблизительно в 14 раз. В среднем на 10% снижается выход молочной кислоты и повышается содержание остаточных сахаров в культуральной жидкости. Накопление биомассы для *L. paracasei* B 4079 существенно не падало по сравнению с ростом на среде с глюкозой. Аналогичные показатели биосинтеза наблюдались при культивировании на свекловичной мелассе.

На питательной среде, содержащей смесь глюкозы и мелассы, глюкоза, как более доступный субстрат, потреблялась в первую очередь. На кривой титрования была заметна диауксия – результат остановки процесса брожения из-за перехода с одного субстрата на другой. Наиболее вероятной причиной ухудшения продуктивности при росте на сахарозе или мелассе по сравнению с процессом на глюкозе является низкая сахаразная активность культуры-продуцента.

Тестовое культивирование с гидролизованной сахарозой или мелассой после предварительного химического высокотемпературного гидролиза в оптимальных условиях серной кислотой (0,2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 112 °С, 60 мин, концентрация сахарозы в среде 250 г/л) привело к повышению скорости потребления редуцирующих веществ культурой молочнокислых бактерий. Смесь глюкозы и фруктозы, образующаяся из сахарозы в ходе химического гидролиза, потреблялась даже интенсивнее, чем при наличии в среде только чистой глюкозы.

Результаты экспериментов показали, что химически гидролизованную мелассу можно использовать в качестве субстратов для штамма *L. paracasei* B4079 для получения молочной кислоты без значительного снижения основных показателей ферментации и без внесения минеральных компонентов питания (солей калия и магния, фосфатов). Однако, подготовка питательной среды на основе мелассы потребует дополнительных операций – химического высокотемпературного гидролиза, нейтрализации аммиаком или гашеной известью серной кислоты в гидролизате, отфильтровывания образующегося осадка CaSO<sub>4</sub>, а также его утилизации. Наличие красящих

веществ в мелассе может затруднить последующую очистку молочной кислоты. Остаточное содержание кальция в питательной среде может оказывать негативное влияние на работу оборудования из-за отложения осадка на его внутренней поверхности при дальнейшей обработке культуральной жидкости. В случае применения мембранного биореактора важно убедиться, что соли кальция не отлагаются на поверхности мембран. Все это может свести на нет преимущества мелассы как более дешевого сырья для получения молочной кислоты.

#### *Влияние концентрации и состава ростовых факторов*

Эксперименты показали, что по сравнению с дорогостоящим дрожжевым экстрактом использование иных источников органического азота и факторов роста, таких как кукурузный экстракт, кислотный гидролизат рисовых отрубей, гидролизатов сои, соевого белка, подсолнечного шрота, менее эффективно для биосинтеза молочной кислоты. Однако по сравнению с базовой прописью питательной среды использование отобранного штамма *L. paracasei* В4079 позволяет снизить содержание дрожжевого экстракта с 15 г/л до 10 г/л без существенных потерь в активности. Ферментация при концентрации дрожжевого экстракта 5 г/л также возможна, но с существенно меньшей скоростью.

Анализ культуральной жидкости на содержание в ней органических кислот показал, что для штамма *L. paracasei* В4079 значительных изменений при снижении содержания дрожжевого экстракта не происходит, в то время как при аналогичных условиях культивирования штамма *L. plantarum* В 4174 на среде с содержанием ДЭ 10 г/л в культуральной жидкости обнаруживается уксусная кислота – до 3,3 г/л, что может неблагоприятно отразиться на последующей стадии выделения молочной кислоты из культуральной жидкости.

Поскольку повышение количества ростовых факторов (концентрации дрожжевого экстракта) с 5 г/л до 15 г/л влияет в большей степени на скорость накопления биомассы, а не на ее выход или продуктивность биореактора, то снижение концентрации ростовых факторов в подаваемой среде при проведении молочнокислого брожения в мембранном биореакторе по меньшей мере в 3 раза от рекомендованного количества (с 15 г/л до 5 г/л) не должно существенно сказываться на продуктивности МБР. Данное обстоятельство важно для уменьшения расхода ростовых факторов, а также содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, и, как следствие, – для улучшения экономических показателей процесса.

Качество дрожжевого экстракта существенно влияет на показатели биосинтеза. Так, при использовании вместо дрожжевого экстракта Springer 0251 (107, тип Д, ориентировочная цена при мелкотоннажной поставке около 20 евро/кг) более деше-

вого дрожжевого экстракта китайского производства Mosinter Group Limited (ориентировочная цена при мелкотоннажной поставке около 10 евро/кг) существенный прирост биомассы наблюдается лишь при концентрации последнего выше 12–15 г/л, что сводит на нет его ценовые преимущества.

Молочнокислые бактерии могут использовать и пептон, что позволяет снизить себестоимость молочной кислоты, поскольку обычно пептон дешевле дрожжевого экстракта. Для продуцента *L. paracasei* В4079 приемлемый рост наблюдался уже при концентрации пептона в среде около 4 г/л. В сравнении с дрожжевым экстрактом, рост культуры на пептоне несколько хуже, тем не менее пептон вполне может заменить дрожжевой экстракт в среде культивирования при сопоставимых расходах.

По сравнению с использованием дрожжевого экстракта показатели роста и биосинтеза при использовании других источников ростовых факторов (гидролизаты соевой текстурированной муки и белков соевой муки, смесь соевых пептидов, соевый соус, смесь кукурузных пептидов, куриный пептон, пептон рыбьей чешуи, подсолнечный шрот, кормовые дрожжи) ниже. Из них наилучшие значения наблюдаются на среде с гидролизатом соевой текстурированной муки, гидролизатом концентрата белков и куриным пептоном.

Сравнение хроматограмм образцов культуральной жидкости штамма *L. paracasei* В4079 при культивировании с использованием в качестве источника азота дрожжевого экстракта, гидролизата соевой текстурированной муки и гидролизата соевого белкового концентрата показало, что при использовании соевых источников культуральная жидкость имеет тот же компонентный состав, что и при использовании дрожжевого экстракта, однако в первом случае нецелевые компоненты содержатся в существенно меньших количествах, что важно для последующего выделения молочной кислоты. Кроме того, соевый гидролизат существенно дешевле, чем дрожжевой экстракт – рыночная стоимость соевого гидролизата находится в диапазоне от 1 до 3 долл. США/кг, в то время как рыночная стоимость качественного дрожжевого экстракта – от 10 до 30 долл. США/кг.

Таким образом, наиболее подходящим источником аминного азота для роста молочнокислых бактерий является высококачественный дрожжевой экстракт, однако более дешевые соевые гидролизаты: гидролизат соевой текстурированной муки, полученной термобаромеханическим способом, и гидролизат концентрата белка сои, высушенный с использованием распылительной сушки, могут оказаться эффективной альтернативой. Использование соевых гидролизатов вместо дрожжевого экстракта позволяет при несущественном снижении технологических показателей биосинтеза снизить в несколько раз затраты на ростовые факторы, вносимые в питательную среду, и обеспечить конкурентное преимущество с точки зрения качества

получаемой молочной кислоты и себестоимости продукта. Поскольку продуктивность мембранного биореактора может поддерживаться за счет механического повышения концентрации биомассы, то замена дрожжевого экстракта на другие источники ростовых факторов в составе комплексных сред не должна сказываться критически на показателях ферментации.

Использование более дешевого углеводсодержащего сырья, источников азота и ростовых факторов служат основой для улучшения технико-экономических показателей стадии микробиологического синтеза при реализации технологии получения молочной кислоты в опытно-промышленном и промышленном масштабах.

### **5.1.3. Непрерывное и отъемно-доливное культивирование штамма-продуцента в мембранном биореакторе**

Целенаправленно поставленные эксперименты с измерением удельной физиологической активности и жизнеспособности клеток продуцента показали, что максимум физиологической и биохимической активности культуры микроорганизмов в периодическом режиме ферментации приходится на середину экспоненциальной фазы<sup>1</sup>, тогда как максимальный титр клеток (КОЕ) достигается в начале стационарной фазы. После исчерпания субстрата в среде наблюдается медленный лизис культуры с постепенным снижением оптической плотности биомассы на протяжении, как минимум, 290 часов голодания, при этом показатель КОЕ падает существенно быстрее и снижается на несколько порядков. Самое быстрое падение наблюдается в отношении удельной бродильной активности биомассы. Критическим является голодание клеток продуцента после исчерпания субстрата в течение 4 ч, после которого бродильная активность лактобацилл начинает быстро падать. То, что удельная активность биомассы снижается значительно раньше падения титра клеток, свидетельствует об изменении физиологического и биохимического состояния культуры микроорганизмов задолго до начала лизиса.

В экспериментах с проточным культивированием продуцента *L. paracasei* В4079 в хемостатных условиях в лабораторном ферментере (рабочий объем 200 мл) при низкой скорости подачи среды (0,083 л/ч) степень конверсии глюкозы была

---

<sup>1</sup>При измерении бродильной активности биомассу перед анализом центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин, отмывали, разводили в трис-глициновом буфере, содержащем глюкозу и факторы роста, помещали в лабораторный микробиореактор с перемешиванием среды при 37°C и далее определяли количество потребляемых углеводов в единицу времени, отнесенное к единице оптической плотности биомассы. Общее время подготовки биомассы при этом составляло не более 60 мин.

близка к 100% и соответствовала варианту периодического культивирования, при этом выход по молочной кислоте в среднем составлял 91% (рис. 5.1). При увеличении скорости подачи среды до 0,328 л/ч продуктивность реактора возрастала, однако при этом наблюдалось снижение степени потребления глюкозы до 61,2%, содержания молочной кислоты в культуральной жидкости на выходе из биореактора и повышение остаточного содержания глюкозы. По мере повышения скорости подачи питательной среды продуктивность биореактора возрастала с замедлением с предположительным достижением предельного максимального значения около 12 г/л·ч. Кроме того, в хемотатных условиях наблюдалось инфицирование содержимого биореактора, в основном дрожжами.

Надо учесть, что в условиях хемотата с низкой скоростью разбавления среды, с одной стороны, наблюдается лимитирование скорости биосинтеза текущей концентрацией субстрата, с другой, ингибирование биосинтеза накапливаемой молочной кислотой. Повышение же скорости разбавления приводит к снижению степени конверсии субстрата в молочную кислоту.

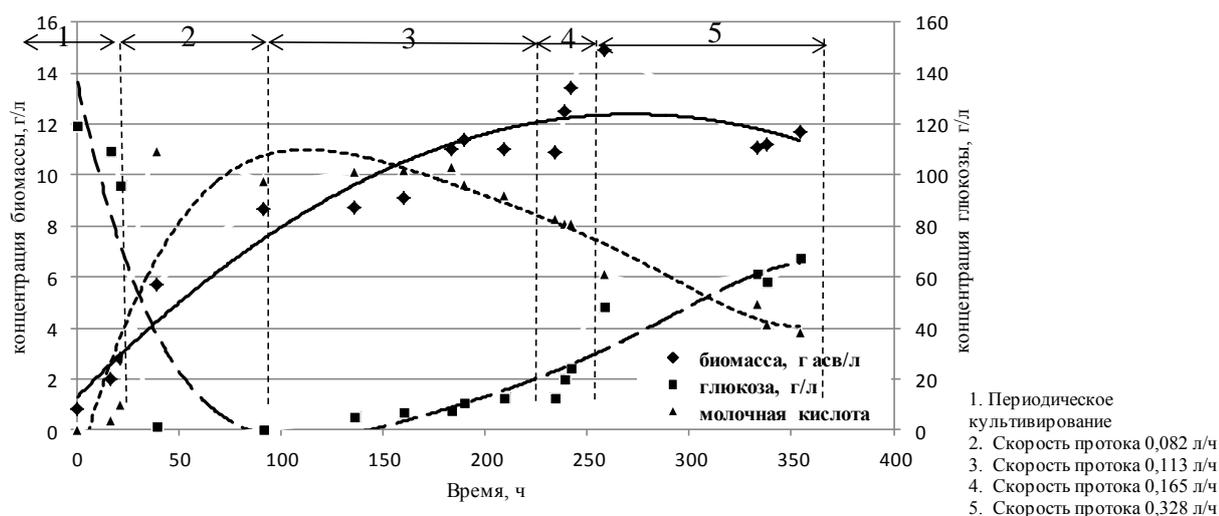


Рисунок 5.1 – Влияние скорости подачи (протока) питательной среды на показатели ферментации в режиме непрерывного хемотатного культивирования молочнокислых бактерий *L. paracasei* B4079.

Вышеописанные опыты с быстрым концентрированием активно растущей биомассы путем центрифугирования с последующим быстрым определением ее бродильной активности показали возможность достижения продуктивности 60–70 г/л·ч по молочной кислоте, поэтому в режиме с удержанием или рециклом клеток продуцента, как это реализуется в МБР, можно было ожидать существенного повышения суммарной скорости молочнокислого брожения по сравнению с хемотатным культиви-

рованием. Однако для гарантированного обеспечения высокой продуктивности биореакторов необходимо поддерживать высокую физиологическую активность культуры. С этой точки зрения существенные преимущества имеет мембранный биореактор, работающий в циклическом отъемно-доливном режиме.

Отъемно-доливной режим культивирования в МБР позволяет организовать непрерывный циклический процесс таким образом, чтобы избежать и лимитирования скорости биосинтеза субстратом, и ингибирования биосинтеза накапливаемой молочной кислотой. При циклическом порционном внесении исходной питательной среды голодание по субстрату и ингибирование высокой концентрацией молочной кислоты может наблюдаться лишь в течение короткого времени – непосредственно в конце цикла. Таким образом, при проведении биосинтеза в МБР в циклическом отъемно-доливном режиме возможно не только достижение максимального содержания клеток продуцента, но и поддержание оптимального физиологического состояния, характеризующегося максимальной активностью популяции. Важно лишь исключить длительное голодание культуры, не допуская резкого отмирания бактериальных клеток в популяции. Субстратное голодание, превышающее 3–4 час, приводит к резкому необратимому снижению физиологической активности популяции, для восстановления которой необходимо «перезапустить» процесс, многократно снизив плотность клеток в популяции.

Отмеченные особенности обосновали целесообразность использования циклического отъемно-доливного режима культивирования в МБР, включающего следующие технологические этапы:

- накопление биомассы в периодическом режиме в анаэробных условиях до момента исчерпания субстрата;
- концентрирование биомассы с использованием ультрафильтрационного модуля в течение времени, не превышающего 2-х час, с отбором 60–75% внеклеточной ферментационной среды (пермеата мембранного разделения);
- долив в реактор со сконцентрированной суспензией свежей питательной среды в объеме, эквивалентном отобранному фильтрату;
- продолжение процесса в мембранном биореакторе в рабочем режиме с циклическим концентрированием бактериальных клеток в реакторе сразу же после полного сбраживания глюкозы (определяется после прекращения подтитровки среды раствором аммиака) и последующим доливом свежей средой, в течение времени, при котором бродильная активность биомассы сохраняется на достаточно высоком уровне.

Результаты предварительных экспериментов показали, что при концентрировании биомассы в течение 3 циклов сбраживания ее удельная активность меняется незначительно.

Последующие эксперименты в режиме циклического отъемно-доливного культивирования в мембранном биореакторе показали, что:

– при длительном отъемно-доливном культивировании в режиме с полным циклом биомассы наблюдается рост концентрации жизнеспособных клеток от цикла к циклу, при этом для первых циклов культивирования продуктивность биореактора возрастает пропорционально. По мере увеличения количества циклов наступает динамическое равновесие между приростом биомассы и лизисом уже накопленных клеток, при котором содержание клеток в ферментационной среде достигает максимальной величины 35–40 г асб/л, и, как следствие, продуктивность биореактора. Равновесие нестабильно, обратимо и зависит от скорости подачи питательной среды в реактор, частоты циклов, длительности интервалов без подачи субстрата между циклами, доли отводимой бесклеточной среды в виде фильтрата в каждом цикле, состава питательной среды и физиологического состояния клеток продуцента. Решающим в обеспечении высокой продуктивности биореактора является достижение высокой концентрации биомассы в биореакторе при поддержании ее физиологической активности; невозможно достичь высокого равновесного уровня биомассы в реакторе с низкой физиологической активностью клеток;

– перерывы в обеспечении микробной культуры питательным субстратом должны быть не более 1 часа, в течение которого культуральная жидкость с микробной суспензией фильтруется; в этом случае, не наблюдается падения физиологической активности клеток продуцента;

– продуктивность реактора растет с повышением концентрации глюкозы в подаваемой среде с 30 до 120 г/л. При низких (30–40 г/л) и значительных (185 г/л) концентрациях глюкозы в подпитке продуктивность биореактора снижается (рис. 5.2). Оптимальными в подпитке концентрациями глюкозы являются значения в интервале 45–100 г/л. При концентрации глюкозы в подпитке 45 г/л, а дрожжевого экстракта 5 г/л средняя продуктивность по молочной кислоте составляет 18,5 г/л\*ч при выходе по молочной кислоте около 96 % и степени конверсии глюкозы около 100%;

– при росте на глюкозе возможно достижение уровня накопления молочной кислоты 130–140 г/л, однако при существенно более низкой продуктивности мембранного биореактора из-за ингибирования роста молочнокислых бактерий повышенными концентрациями молочной кислоты;

– процесс ферментации в отъемно-доливном режиме в МБР менее чувствителен, по сравнению с периодическим процессом, к отклонениям в параметрах культивирования, в частности, к содержанию ростовых факторов. Так, не наблюдается снижения равновесной концентрации биомассы, биохимической активности культуры и КОЕ, а также выхода МК и продуктивности биореактора после снижения кон-

центрации дрожжевого экстракта в подпитке с 10 г/л до 5 г/л (рис. 5.2). Напротив, выход молочной кислоты и удельная продуктивность несколько увеличиваются, что свидетельствует в пользу достаточности 5 г/л ростовых факторов в среде в режиме культивирования в МБР и является одним из наиболее существенных его преимуществ. Снижение содержания ростовых факторов по меньшей мере в 3 раза от количества в стандартной питательной среде (с 15 г/л до 5 г/л) важно для уменьшения содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, и, как следствие, – для улучшения экономических показателей процесса. Критичным является содержание дрожжевого экстракта в подаваемой среде 2,5 г/л;

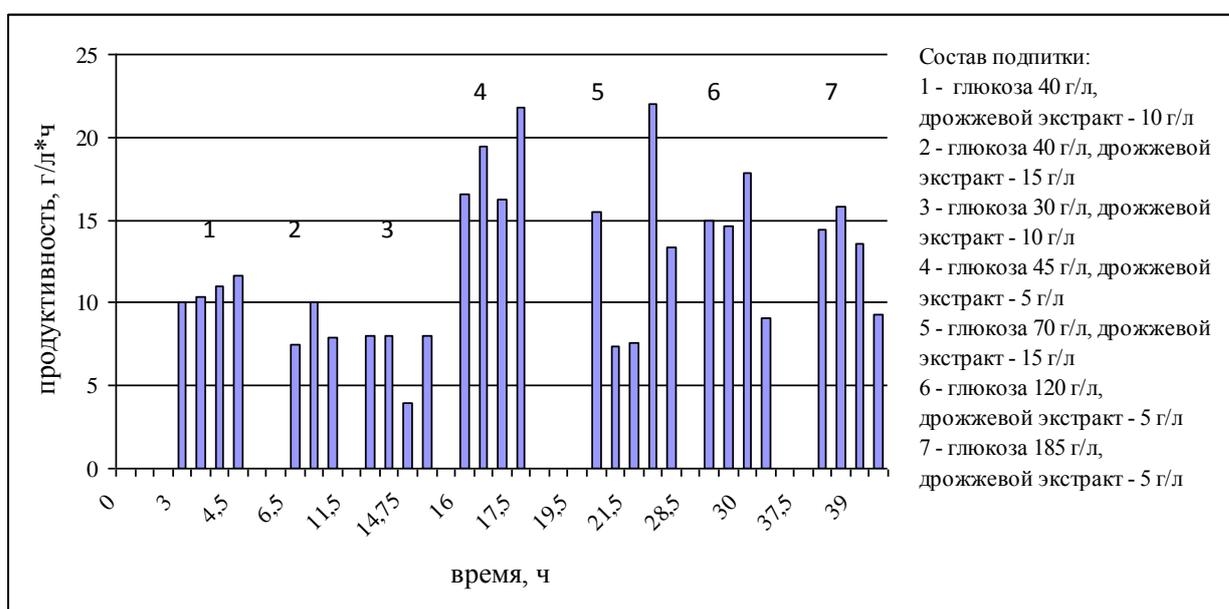


Рисунок 5.2 – Продуктивность молочнокислого брожения в МБР при различном составе подаваемой питательной среды.

– не наблюдается явных признаков инфицирования культуры посторонней микрофлорой, культура остается морфологически однородной. Таким образом, молочнокислые бактерии *L. paracasei* в разрабатываемых условиях культивирования довольно устойчивы к инфицированию процесса посторонней микрофлорой, особенно в условиях высокой концентрации углеводного субстрата и образуемой молочной кислоты;

– при отклонении выше предельных значений последующий возврат к оптимальным параметрам не приводит к восстановлению высокой физиологической активности популяции. Для ее восстановления необходимо запускать весь процесс культивирования заново, уменьшая содержание биомассы до начальных значений, соответствующих таковым при исходном засеве биореактора;

– при старте процесса штамм *L. paracasei* B4079 может синтезировать внеклеточные полимеры, затрудняющие эксплуатацию мембранного фильтра, однако уже после первых 5–10 циклов отъема-долива среды синтез экзополимеров прекращается и стабильность процесса фильтрации восстанавливается.

Продуктивность биореактора может снижаться с увеличением возраста культуры. Одним из вариантов решения этой проблемы может быть обновление популяции продуцента за счет удаления части культуральной жидкости, содержащей в своем составе клетки и продукты их метаболизма. Эксперименты показали, что «омолаживание» культуры путем удаления 1/14 и менее рабочего объема культуральной жидкости вместе с клетками в сутки при концентрации последних в питательной среде не более 10 г/л не приводит к изменению показателей процесса. Удаление же 1/7 части рабочего объема культуральной жидкости вместе с клетками в сутки временно снижает продуктивность вследствие уменьшения содержания биомассы в рабочей зоне биореактора, при этом часть глюкозы, по-видимому, тратится на конструктивный обмен для возмещения убыли биомассы.

Когда биомасса «молодая» и регулярно снабжается субстратом, она имеет достаточно высокую удельную физиологическую активность, при этом продуктивность биореактора повышается с возрастанием ее концентрации в биореакторе. После длительного голодания начинает наблюдаться лизис клеток, культура стареет, поэтому механическое увеличение концентрации биомассы в биореакторе не приводит к повышению продуктивности. Таким образом, очень важно исключить в режиме отъемно-доливного культивирования длительное голодание культуры, не допуская резкого отмирания бактериальных клеток в популяции.

Важным моментом при проведении культивирования в МБР является конструкция мембранного модуля, выбор мембран и режимы фильтрации.

Наиболее значимыми параметрами, влияющими на показатели работы мембран, являются: тип мембран, материал мембран, размер пор мембран, условия фильтрации: давление, температура, рН, концентрация биомассы в фильтруемой среде, скорость прокачки жидкости в надмембранном пространстве, режимы мойки и промывки мембранного модуля в составе МБР.

Имеется ряд рекомендаций по выбору типа мембран и режимов эксплуатации мембранных модулей.

Конструкция модуля и тип мембран должны обеспечивать достаточную и стабильную проницаемость мембран, невысокую забиваемость их поверхности, полное удержание бактериальных клеток. Режим фильтрации должен быть периодическим при работе в составе МБР, что обусловлено отъемно-доливым культивированием. Поскольку мембраны работают в составе мембранного биореактора, они должны

подвергаться регулярной мойке щелочными и кислыми растворами и выдерживать химическую стерилизацию во избежание появления посторонней микрофлоры и контаминации ферментационного пространства. Это обуславливает с учетом требований компактности, невысокой доли свободного пространства в рабочей зоне модуля, удобства в эксплуатации в сочетании с биореактором выбор в пользу выносного модуля с полуволоконными мембранными элементами.

Согласно общепринятым рекомендациям для стабильной работы мембран скорость потока в надмембранном пространстве в зависимости от конкретных условий должна поддерживаться в диапазоне от 0,2 до 2 м/с. Однако слишком высокие скорости циркуляции жидкости и надмембранного потока могут повреждать клетки микроорганизмов и снижать их физиологическую активность. Ввиду данного ограничения целесообразно поддерживать скорости движения жидкости в надмембранном пространстве не выше 0,5 м/с.

Наиболее распространенным материалом полуволоконных мембран, присутствующих на зарубежном и отечественном рынке, является полисульфон. Отечественные мембраны из полисульфона ВПУ-ПС имеют пределы отсекаемого 50, 100, 300 и 500 кДа (ВПУ-50ПС, ВПУ-100ПС, ВПУ-300ПС, ВПУ-500ПС).

С точки зрения производительности в наибольшей степени подходят мембраны ВПУ-500ПС, однако учитывая, что уменьшение предела отсекаемого количества задерживаемых мембраной высокомолекулярных примесей, что важно для последующей очистки молочной кислоты, в экспериментальных исследованиях нами были использованы мембраны ВПУ-300ПС. С этими мембранами были изготовлены полуволоконные модули оптимального размера и подобраны режимы фильтрации культуральной жидкости с молочнокислыми бактериями. При средней проницаемости фильтра 15 л/м<sup>2</sup>.ч, рабочей поверхности мембран 0,1 м<sup>2</sup> время фильтрации 50% культуральной жидкости в составе МБР с рабочим объемом 3 л составило не более 60 мин, в среднем 30 мин.

В отъемно-доливном режиме в ходе цикла фильтрации концентрация клеток в ферментационной среде может достигать 40 г/л по сухой бактериальной биомассе и повышаться в 2–3 раза в процессе отъема бесклеточной среды. При этом по мере повышения концентрации клеток, проницаемость мембран падает. Ввиду чрезмерного повышения вязкости бактериальной суспензии при концентрации выше 100 г/л и возможности забивки полуволоконного модуля бактериальными клетками, целесообразно ограничиться фильтрацией до концентрации биомассы в суспензии 100 г/л.

Для регенерации мембран 1%-ным р-ром NaOH достаточно 1 часа. После химической мойки регенерации мембран обработкой 1%-ым раствором NaOH не требуется по меньшей мере в течение 40 циклов культивирования. Апробация режимов

мойки и регенерации показала, что цикл регенерации вода – 1%-ый раствор щелочи – вода – 3%-ый раствор перексид водорода – вода позволяет длительно эксплуатировать фильтр.

Оценочные расчеты требуемой площади рабочей поверхности мембран, выполненные на основе полученных данных, показали, что при работе МБР в режиме ферментация-фильтрация, содержания молочной кислоты на выходе 100 г/л, времени сбраживания субстрата – 3 ч, времени фильтрации – 1 ч, откачивании за цикл фильтрации 80% бесклеточной культуральной жидкости, и, таким образом, средней продуктивности биореактора 20 г/л.ч, для производства молочной кислоты мощностью 1300 т по потребляемой глюкозе потребуется 10 мембранных модулей с мембранами типа ВПУ-300ПС, каждый с поверхностью мембран 50 м<sup>2</sup>, с суммарной поверхностью 500 м<sup>2</sup>. На отечественном рынке модули с такими характеристиками предлагаются зарубежными фирмами, в частности, типа Агіа АР-2 фирмы Pall с поверхностью мембран 50 м<sup>2</sup> с габаритными размерами – диаметр 15 см, длина 200 см, однако они предназначены, главным образом, для системы водоочистки.

С учетом полученных данных по биосинтезу молочной кислоты в мембранном биореакторе был подготовлен и проведен длительный пробег с культивированием *L. paracasei* В4079 в лабораторном биореакторе Minifors (INFORS, Швейцария) с рабочим объемом среды 1,5–3 л, оснащенный мембранным проловолоконным модулем с мембранами ВПУ-300ПС с рабочей поверхностью мембран 0,1 м<sup>2</sup>. Культивирование велось без остановки процесса при принудительном концентрировании биомассы и без ее отвода из биореактора.

Лабораторный пробег подразделялся на три этапа.

ЭТАП 1. На первом этапе в ферментер внесли 2600 мл стерильной питательной среды с концентрацией глюкозы 50 г/л, дрожжевого экстракта 10 г/л, минеральных солей – в соответствии со стандартной прописью, а также 300 мл инокулята односуточной культуры, полученной на качалочных колбах. Подтитровку вели раствором концентрированного аммиака, величину рН поддерживали близкой к 6,5, температуру культивирования – близкой к 37 °С. Скорость перемешивания содержимого биореактора – 150 об/мин. Процесс велся в периодическом режиме. В конце этого этапа концентрация клеток в среде достигла 5,5 г/л, продуктивность возросла до 9,1 г/л\*ч при 98,7%-ой степени конверсии глюкозы и выходом 94,5% по молочной кислоте.

ЭТАП 2. На втором этапе вели непрерывное культивирование *L. paracasei* с отбором фильтрата через мембрану с постепенным увеличением скорости потока (содержание глюкозы в подаваемой среде – 40 г/л, содержание дрожжевого экстракта 5 г/л). Рабочий объем среды в биореакторе поддерживался на уровне 2700 мл. Эти условия позволили увеличить длительность экспоненциальной фазы, при которой

наблюдается максимальная продуктивность. Общее количество поданной в биореактор среды в данном режиме культивирования составило около 6000 мл. К концу второго этапа на выходе установилась концентрация биомассы около 7,3 г/л, а молочной кислоты 38,2 г/л. Степень конверсии глюкозы в молочную кислоту составила 95–98%.

ЭТАП 3. На третьем этапе лабораторный пробег вели в циклическом отъемно-доливном режиме с концентрированием биомассы через мембраны, внесением подпитки до рабочего объема среды в ферментере, последующим культивированием до момента окончания титрования концентрированным раствором аммиака. По окончании титрования вновь проводили концентрирование биомассы фильтрацией через мембрану, вносили подпитку с последующей ферментацией и т.д.

Для концентрирования биомассы использовался тот же половолоконный модуль, промытый дистиллированной водой от остатков среды с клетками после завершения второго этапа лабораторного пробега.

По ходу пробега варьировали входные параметры для изучения влияния условий культивирования на показатели ферментации и нахождения наиболее подходящих условий ферментации. Типичный рабочий объем среды в биореакторе до концентрирования биомассы составлял 1500 мл, степень концентрирования суспензии биомассы в составе культуральной жидкости в процессе фильтрации в конце каждого цикла –  $4 \pm 1$ . Типичная концентрация глюкозы в подпитке составляла от 10,0% масс. до 12,5% масс., содержание дрожжевого экстракта – от 5 до 15 г/л,  $K_2HPO_4$  – 2 г/л,  $MgSO_4$  – 0,1 г/л,  $MnSO_4$  – 0,05 г/л, рН поддерживался на уровне 6,3–6,5. Перерывы в подаче субстрата в отъемно-доливном режиме культивирования, а именно во время фильтрации культуральной жидкости через мембранный модуль на всем протяжении пробега не превышали 2 ч.

Весь безостановочный пробег был проведен в течение 18 суток.

На рис. 5.3 и 5.4 приведены суммарные данные по изменению продуктивности (по накоплению молочной кислоты), концентрации биомассы и молочной кислоты на протяжении всех 18 сут опытного пробега, в течение которых был проведен 131 цикл отъема-долива. Варьирование входных параметров биосинтеза в течение пробега показало следующее:

- мембранный биореактор в режиме отъема-долива питательной среды функционировал стабильно и позволил в данном режиме изучить влияние на биосинтез молочной кислоты отклонений условий культивирования от оптимальных;

- концентрация биомассы в биореакторе держалась на определенном равновесном уровне, при этом снижение физиологической активности клеток приводило к их частичному лизису, поэтому решающим в обеспечении высокой продуктивности

биореактора является достижение высокой концентрации биомассы в биореакторе, что тесно связано с повышением удельной физиологической активности биомассы, т.е. невозможно достичь высокого равновесного уровня биомассы в реакторе с низкой физиологической активностью клеток;

– увеличение концентрации глюкозы в подпитке до 125 г/л, т.е. выше оптимальной 100–110 г/л, приводит к некоторому снижению продуктивности реактора, уровня накопления молочной кислоты и повышению содержания глюкозы в выходном потоке; выход МК от количества потребленного субстрата при этом практически не меняется;

– снижение содержания дрожжевого экстракта в составе подпитки с 15 г/л до 5 г/л не приводит к существенному изменению концентрации биомассы и продуктивности реактора; снижение концентрации ростовых факторов до 2,5 г/л в конце лабораторного пробега привело к повышению выхода молочной кислоты от глюкозы почти до 100%, однако одновременно резко понизилась продуктивность биореактора, которую, в дальнейшем, уже не удалось восстановить при повторном увеличении концентрации ростовых факторов;

– повышение температуры с 30 °С (поддерживалась в начале лабораторного пробега) до 37 °С не привело к значительному увеличению концентрации биомассы, однако продуктивность реактора увеличилась в 1,9 раз. Средняя удельная продуктивность увеличилась в 1,5 раз и составила 1,0 г/ед.опт.пл.\*ч; выход молочной кислоты от глюкозы при этом повысился в среднем до 95,7%. При повышении температуры до 41 °С продуктивность биореактора падает;

– снижение рН среды в реакторе с 6,5 до 5,5 привело к резкому снижению его продуктивности;

– разовое внесение пероксида водорода в ферментационную среду в концентрации 200 мг/л не привело к изменению продуктивности биореактора;

– в максимально благоприятных условиях (концентрация глюкозы 100 г/л, дрожжевого экстракта 5 г/л, температура 37 °С) в равновесном состоянии оптическая плотность суспензии достигает 35–40 опт. ед. (25–28 г асб/л), средняя удельная продуктивность по молочной кислоте – 1,2–1,3 г/ед.опт.пл.\*ч, суммарная продуктивность по молочной кислоте 45–48 г/л\*ч;

– дальнейшее повышение продуктивности биореактора ограничивается техническими препятствиями из-за ограничения в скорости фильтрации. Увеличение скорости фильтрации за счет увеличения поверхности мембран в мембранном модуле может привести к существенному повышению мертвой, нерабочей зоны установки, некоторому снижению физиологической активности клеток продуцента за счет увеличения габаритов модуля и межмембранного пространства в модуле. Поэтому пре-

дельным для установки является поддержание скорости потока среды в мембранном биореакторе не выше  $0,67 \text{ ч}^{-1}$ , при которой может быть достигнута продуктивность биореактора до  $50 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$ ;

- какого-либо существенного падения производительности мембран в фазе фильтрации не наблюдалось, поэтому регенерировать мембраны не потребовалось;
- инфицирования ферментационной среды посторонней микрофлорой не наблюдалось, культура была морфологически однородна.

Среднее содержание молочной кислоты в полученном пермеате по результатам лабораторного пробега составило  $102,1 \text{ г/л}$ , выход молочной кислоты с единицы субстрата  $95\%$ , оптическая чистота молочной кислоты во всех образцах – не менее  $98\%$ . Остаточное содержание глюкозы в фильтрате по окончании цикла, как правило, не превышало  $1 \text{ г/л}$ , что важно для обеспечения высокой степени конверсии глюкозы в молочную кислоту и для последующего ее выделения. В качестве основных побочных продуктов были идентифицированы органические кислоты (лимонная, уксусная) – не более  $1,2 \text{ г/л}$ , аминный азот – не более  $0,07 \text{ г/л}$ . При таком количестве вышеуказанных побочных продуктов обеспечивается высокий выход молочной кислоты на последующих стадиях ее очистки и синтеза полилактида, а суммарное количество загрязнений, образующихся на стадии биосинтеза при оптимальных условиях культивирования ( $5 \text{ г/л ДЭ}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) по содержанию азота, поступающего в сточные воды (в пересчете на аммонийный азот), не превысит  $0,3 \text{ г/кг}$  получаемой молочной кислоты.

Таким образом, отъемно-доливной режим позволяет существенно увеличить продуктивность биореактора по сравнению с обычным одноступенчатым периодическим процессом, периодическим культивированием с подпиткой, непрерывным хемостатным или проточным в мембранном биореакторе, культивированием с иммобилизованными клетками. Процесс можно вести без отвода накапливаемой избыточной биомассы – несколько недель и более при условии поддержания высокой концентрации физиологически активной биомассы, отсутствия голодания культуры при остановках длительностью более 2 час на фильтрацию и отвод молочной кислоты из биореактора вместе с бесклеточной культуральной жидкостью, при продуктивности до  $50 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$ , превышающей продуктивность обычных реакторов в  $5\text{--}10$  раз, при содержании молочной кислоты  $100 \text{ г/л}$ , степени конверсии глюкозы в молочную кислоту  $95\text{--}97\%$ , снижении расходов на ростовые факторы в 3 раза по сравнению со стандартными прописями. Снижение концентрации дорогостоящих ростовых факторов в подаваемой питательной среде с  $15 \text{ г/л}$  до  $5 \text{ г/л}$  особенно важно для уменьшения затрат на биосинтез МК, снижения содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, и, как следствие, – для улучшения экономических показателей процесса и достижения конкурентоспособной цены – не выше  $400\text{--}500 \text{ EUR}$  за тонну МК.

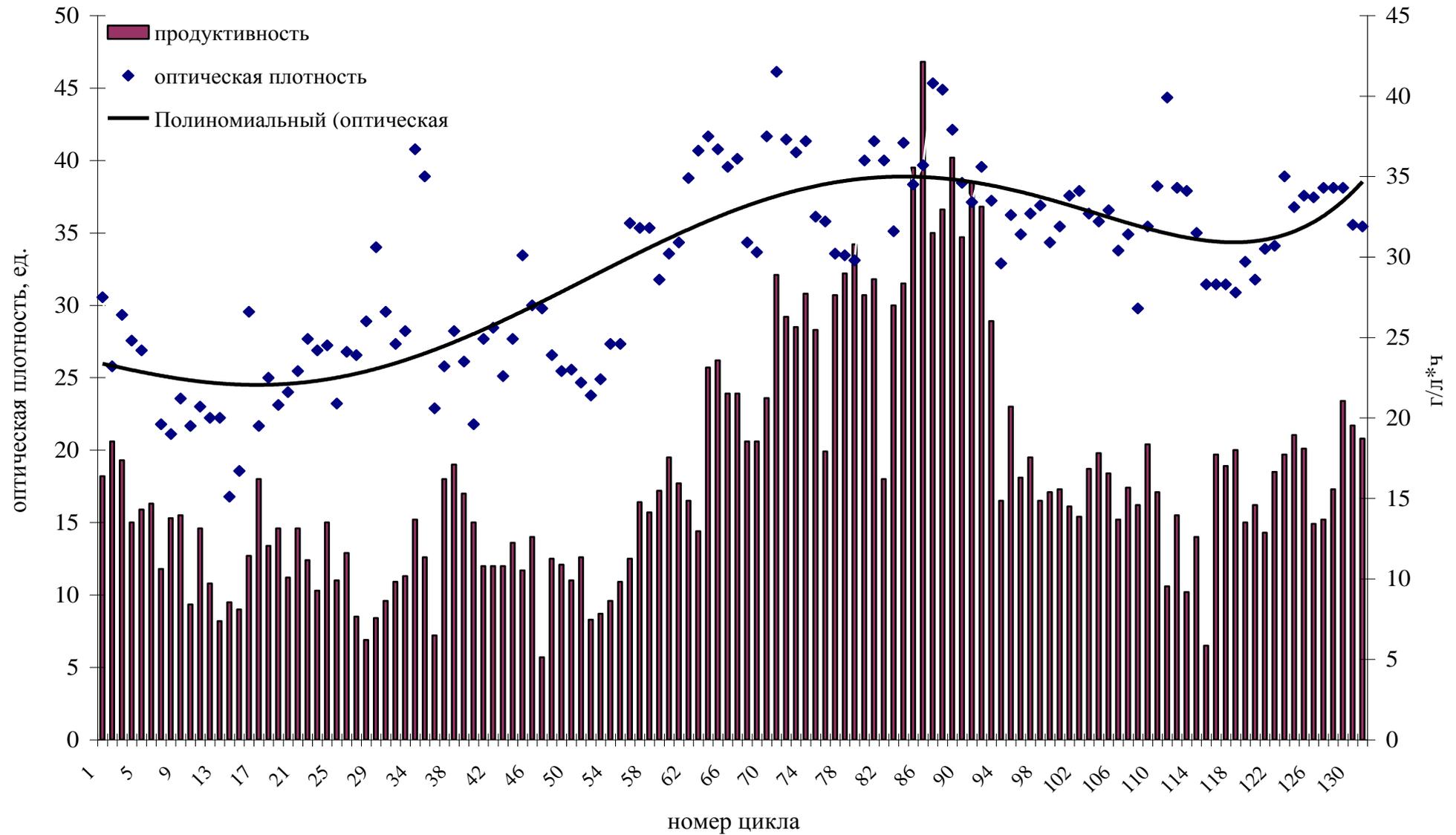


Рисунок 5.3 – Изменение продуктивности биореактора (по накоплению молочной кислоты) и концентрации биомассы (по ОП) в процессе отъемно доливного культивирования в течение 18 сут.

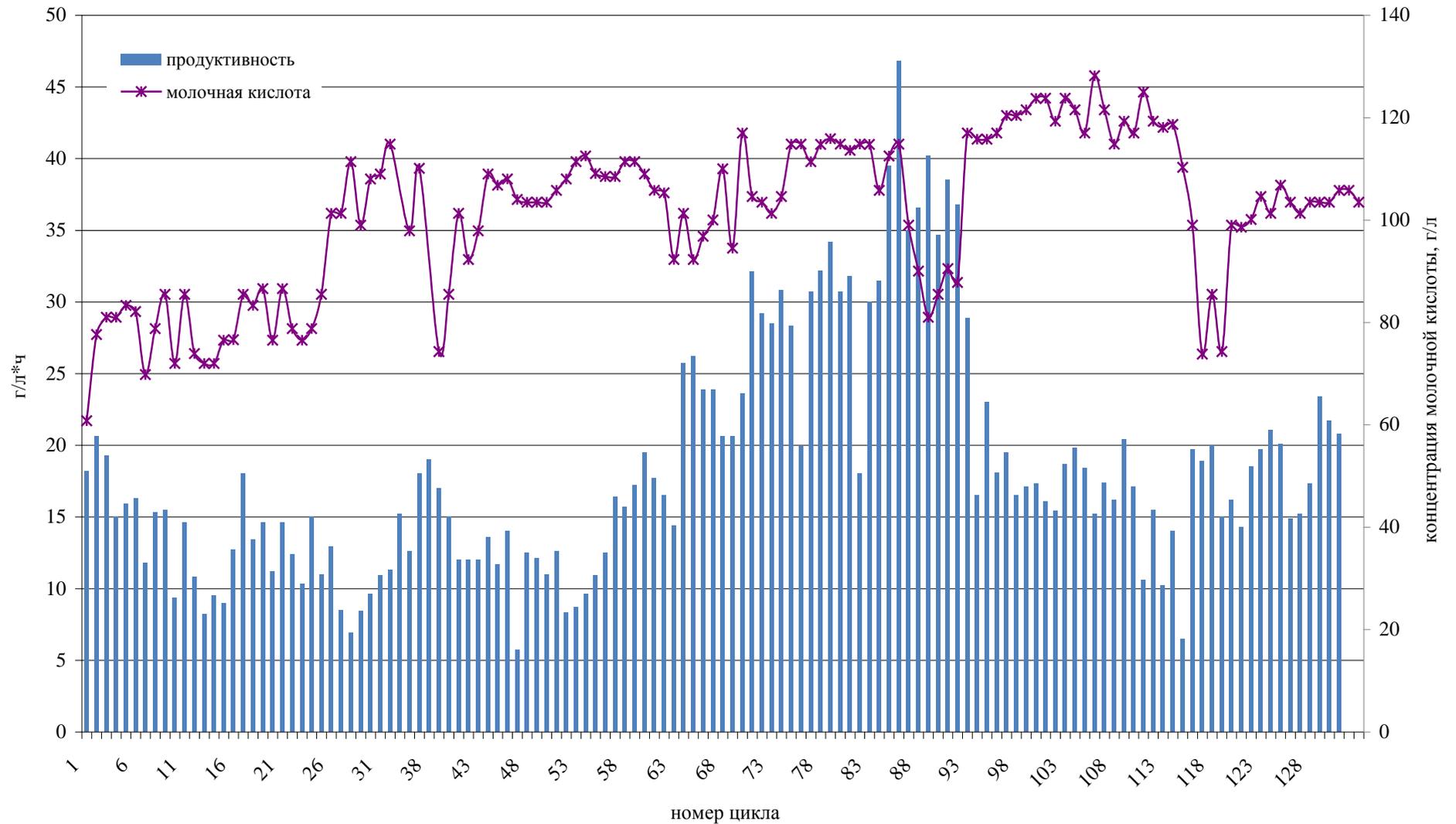


Рисунок 5.4 – Изменение продуктивности биореактора (по накоплению молочной кислоты) и концентрации молочной кислоты в фильтрате по окончании цикла в процессе отъемно доливного культивирования в течение 18 сут.

Таблица 5.1 – Сравнение показателей биосинтеза с использованием различных методов культивирования

Режим ферментации	Длительность культивирования или гидравлическое время пребывания среды, час	Концентрация глюкозы в подаваемой питательной среде, г/л	Концентрация молочной кислоты, г/л	Накопление биомассы, г/л	Остаточное содержание глюкозы в выходной среде, г/л	Степень потребления глюкозы, %	Конверсия глюкозы в молочную кислоту, %	Продуктивность, г/л/ч	Содержание и тип ростовых факторов в питательной среде, г/л	Источник литературы
Периодический процесс, <i>L. paracasei</i>	17–20	100	93–95	4.0–4.3	1.0–3.0	97–99	93–95	5.0–5.9	15 дэ*	Показатели по результатам работы
	33	110	108	3.5	0.5	99.5	98.2	3.3	5 дэ	
	250	200	166.5	5.0	1.7	99.2	83.3	0.67	15 дэ	
Непрерывный в мембранном биореакторе с полным рециклом клеток продуцента <i>L. paracasei</i>	33	120	97.9	8.7	<0.1	99.9	81.6	3.0	15 дэ	Показатели по результатам работы
	25	120	103	9.0	6.5	94.6	85.8	4.1	15 дэ	
	8	120	48.3	11.0	61.8	48.5	40.3	6.0	15 дэ	
Циклический объемно-доливной в мембранном биореакторе с полным рециклом клеток продуцента <i>L. paracasei</i>	<b>3.6 (средняя) 2.2 (минимальная)</b>	<b>110</b>	<b>104.2 (средняя)</b>	<b>29.0 (средняя)</b>	<b>&lt;1</b>	<b>99.1</b>	<b>94.7</b>	<b>32.1 (средняя) 46,8 (максимальная по молочной к-те)</b>	<b>5 дэ</b>	<b>Показатели по результатам работы</b>
UASB-реактор, консорциум микроорганизмов	8	22	20.5		0.5	97.7	93	2.6	3 дэ	[1354]
	0.5	22	19		2	90.9	86	38	3 дэ	
	0.17	22	11.5		8	63.6	52	67	3 дэ	
Непрерывный в мембранном биореакторе с полным рециклом клеток продуцента <i>L. paracasei</i>	2.5	100	79		5	95	79	31.5	13.3 дэ + 13.3 пеп**	[139]
Периодический процесс, <i>L. paracasei</i>	50	180	179				99.5	3.85	15 дэ + 10 пеп	[1309]

\* – дрожжевой экстракт; \*\* – пептон

По сравнению с обычным периодическим процессом отъемно-доливной биосинтез в мембранном биореакторе приводит к снижению установленного объема оборудования, снижению потерь субстрата, увеличению выхода молочной кислоты, упрощает поддержание асептических условий и доминирование культуры в мембранном биореакторе, поскольку используется уже накопленная биомасса. Устойчивость процесса к инфицированию посторонней микрофлорой обусловлена также высокими концентрациями субстрата, поддерживаемыми в начале каждого цикла, и высокими концентрациями молочной кислоты, достигаемыми в конце каждого цикла.

Разработанный метод отъемно-доливного культивирования имеет важные экологические преимущества. Количество образуемой избыточной биомассы составляет не более 4,5 г/кг молочной кислоты, что ниже в 10 раз по сравнению с традиционным методом периодического культивирования при полном отсутствии гипса как отхода. В оптимальных условиях в образующейся культуральной жидкости с молочной кислотой содержится суммарно не более 2,5 г/л побочных продуктов биосинтеза. Единственными существенными отходами стадии ферментации будут отработанные моющие и промывные растворы, образуемые с периодичностью не чаще 1 раза в 2–4 недели в объеме не более 5 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup> объема ферментера или ориентировочно не более 0,5 м<sup>3</sup> сточной воды в виде отработанных моющих и промывных растворов на 1 т молочной кислоты.

Суммарное количество загрязнений, образуемых на стадии биосинтеза, оценочно составляет:

- по ХПК – не более 30 г/кг получаемой молочной кислоты;
- по азоту (в пересчете на аммонийный азот) – 0,3 г/кг получаемой молочной кислоты.

По сравнению с традиционным в разработанном методе количество образуемых отходов на стадии биосинтеза ниже:

- по твердым отходам – в 170 раз;
- по образуемой избыточной биомассе – в 10 раз;
- по аммонийному азоту, фосфатам, ХПК, минеральным солям – в 25–30 раз.

В мембранном биореакторе в устойчивом режиме отъемно-доливного культивирования и при полном рецикле биомассы микроэволюция в популяции молочно-кислых бактерий идет в сторону повышения продуктивности биореактора и увеличения конечного уровня накопления молочной кислоты, повышения степени конверсии глюкозы в молочную кислоту при существенной экономии ростовых факторов, без явной контаминации оборудования и без образования вторичных отходов в виде избыточной биомассы на стадии ферментации. Также следует отметить,

что при длительном отъемно-доливном культивировании не наблюдалось увеличения вязкости культуральной жидкости. Напротив, длительное нахождение популяции при таком режиме культивирования привело к снижению вязкости суспензии, мембраны не забивались клетками и высокомолекулярными продуктами их жизнедеятельности, а проницаемость мембран оставалась на стабильном рабочем уровне. Такие микроэволюционные процессы крайне благоприятны для достижения высоких выходных показателей культивирования, однако важно при этом все время поддерживать популяцию в относительно устойчивом состоянии.

Недостатками процесса ферментации в отъемно-доливном режиме в МБР являются более высокие требования к системе регулирования и автоматизации для соблюдения режима отъема-долива, относительная чувствительность к предельным отклонениям в параметрах культивирования, в частности, к содержанию ростовых факторов, а также к перерывам в культивировании из-за наличия процедуры фильтрации, которые не должны превышать 2–3 час. При отклонении выше предельных значений последующий возврат к оптимальным параметрам не приводит к восстановлению высокой физиологической активности популяции, т.е., выражаясь языком теории бифуркаций, в режиме высокой физиологической активности система находится в относительно устойчивом состоянии, при выходе из которого она уже неспособна обратимо вернуться в это состояние. Для ее восстановления необходимо запускать весь процесс культивирования заново, уменьшая содержание биомассы до начальных значений, соответствующих таковым при исходном засеве биореактора.

В табл. 1 приведено сопоставление достигнутых по разработанному варианту культивирования показателей биосинтеза с наилучшими показателями, найденными по зарубежным литературным источникам.

По данным зарубежных источников, наиболее высокое содержание молочной кислоты в постферментационной среде достигнуто в периодическом процессе на глюкозе с использованием штамма *L. paracasei* – до 179 г/л [1309]. Однако по таким показателям, как продуктивность и расход ростовых факторов он существенно уступает разработанному нами. В непрерывном процессе культивирования *L. paracasei* на глюкозе в мембранном биореакторе с полным рециклом клеток, разработанным Xu G-Q и др. [139], достигнута продуктивность 31,5 г/л\*ч, близкая к продуктивности процесса, разработанного нами. Однако в первом случае наблюдаются существенно меньшие концентрации молочной кислоты в постферментационной среде (79 г/л), меньший выход молочной кислоты с единицы субстрата при более высоком содержании ростовых факторов в исходной питательной среде. В перспективном процессе с использованием UASB реактора, разработанном Kim D-H и др. [1354], достигнута высокая продуктивность (67 г/л) при низком расходе росто-

вых факторов, однако в этом случае концентрация молочной кислоты в постферментационной среде невысокая (11,5 г/л), выход молочной кислоты от субстрата около 52% и высоко остаточное содержание глюкозы (до 8 г/л).

Таким образом, по совокупности показателей разработанный отъемно-доливной метод культивирования в мембранном биореакторе для получения молочной кислоты из глюкозы превышает существующие решения.

В сводной табл. 5.2 приведены возможные пути совершенствования технологии микробиологического получения молочной кислоты, вытекающие из результатов работы с учетом результатов, изложенных ниже в разделе 5.2.4.

На основе достигнутых результатов были разработаны:

1. Лабораторный регламент на процесс микробиологического (биокаталитического) получения молочной кислоты в виде раствора лактата аммония для последующего получения полилактида. Регламент составлен на производство лабораторных партий и образцов молочной кислоты в виде раствора лактата аммония из сахаросодержащего сырья на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева на лабораторной установке «Мембранный биокаталитический реактор» РХТУ.066659.681.000. Молочная кислота в виде постферментационной среды (бесклеточной культуральной жидкости), произведенная по настоящему регламенту, предназначена для последующего проведения лабораторных испытаний, стадий очистки и выделения молочной кислоты в виде бутиллактата и получения полилактида.

2. Проект технического задания на проведение ОКР по теме: «Создание опытного образца установки производства полилактида (мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе) по комплексной технологии, базирующейся на молочной кислоте (в виде лактата аммония), полученной биокаталитической переработкой сахаросодержащего сырья».

3. Разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты в виде лактата аммония в составе постферментационной среды (бесклеточной культуральной жидкости, КЖ) методом микробиологического синтеза с использованием бактериального штамма *Lactobacillus casei subsp. paracasei* ВКПМ В 4079 из различных видов глюкозосодержащего сырья для последующего производства L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе. Получаемая бесклеточная КЖ предназначена для последующего выделения молочной кислоты (в виде бутиллактата), получения лактида и полилактида в количестве 500 т/год по полилактиду.

Таблица 5.2 – Пути повышения экономической и экологической эффективности микробиологического получения молочной кислоты

Пути достижения	Достигнутые показатели	За счет чего может быть достигнуто
Увеличение выхода молочной кислоты	Повышение с 85–90% до 90–95%	Снижение расхода субстрата на синтез биомассы, использование контролируемого оксидативного стресса.
Увеличение продуктивности биореактора	Повышение продуктивности с 4–5 г/л.ч до 40–60 г/л.ч	– подобран перспективный штамм-продуцент ( <i>L. paracasei</i> В4079); – повышение плотности популяции в рабочем пространстве биореактора в 4–6 раз; – подобраны оптимальные и устойчивые режимы культивирования в МБР; – повышена рабочая концентрация субстрата (углеводов) в питательной среде до 110 г/л.
Повышение и обеспечение стабильности проницаемости мембран в МБР	Поддержание рабочей проницаемости мембран на уровне 20–30 л/м <sup>2</sup> .ч	– подобраны мембраны (полное волокно, материал полисульфон, предел отсечения 100–300 кДа); – поддержание надмембранной скорости фильтруемой культуральной жидкости не менее 0,1 м/с; – снижение синтеза внеклеточных полисахаридов штаммом-продуцентом.
Снижение затрат на углеводное сырье	Определяется текущей стоимостью зерна и других источников углеводов	Использование вместо глюкозы гидролизатов мелассы, глюкозно-фруктозных сиропов, крахмальных гидролизатов, сусла спиртового производства.
Снижение затрат на ростовые факторы, минеральные компоненты	Снижение затрат с 1000–1500 Eur/т МК до 900 Eur/т МК с перспективой снижения до 600–800 Eur/т МК	– оптимизация состава питательной среды; – снижение расхода ростовых факторов на синтез биомассы в мембранном биореакторе; – замена дорогостоящих компонентов (дрожжевого экстракта) на другие источники (гидролизаты растительного белка сои, ржи, подсолнечника и др.; синтетические аминокислоты).
Снижение совокупных затрат	Повышение устойчивости процесса ферментации к отклонениям в параметрах культивирования	Наличие перекрестной устойчивости к различным видам стресса, использование контролируемого оксидативного воздействия.
Снижение количества отходов	Отсутствие отходов в виде избыточной биомассы, отсутствие гипса	Клетки биомассы удерживаются и не выводятся из рабочего объема мембранного биореактора. Получение молочной кислоты в виде лактата аммония.
Снижение затрат на биологическую очистку сточных вод	Рационализация процесса биологической очистки сточных вод	Использование технологии анаэробно-аэробной двухстадийной биологической очистки сточных вод производства молочной кислоты.

Разовый технологический регламент составлен в соответствии с «Положением о технологических регламентах производства продукции на предприятиях химического комплекса», утвержденным Заместителем министра экономики Российской Федерации 6 мая 2000 г. и Приказом Ростехнадзора от 31.12.2014 N 631 «Об утверждении Федеральных норм и правил в области промышленной безопасности «Требования к технологическим регламентам химико-технологических производств», зарегистрированным в Минюсте России 28.05.2015 N 37426.

За основу технологического процесса взято отъемно-доливное культивирование в мембранном биореакторе. Схема включает вспомогательные стадии подготовки питательной среды, очищенной и стерильной воды, моющих и дезинфицирующих растворов, раствора титранта, оборудования и основные стадии технологического процесса, включающие подготовку и последовательную наработку посевного материала и основную ферментацию в мембранном биореакторе. Нарботка посевного материала предусмотрена в соответствии с общепринятой практикой обеспечения микробиологического культивирования в асептическом промышленном производстве.

По результатам полученных данных выполнены оценочные расчеты затрат на получение молочной кислоты по разработанному отъемно-доливному культивированию в мембранном биореакторе.

В базовом варианте при использовании опытной установки мощностью 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе себестоимость получения молочной кислоты на стадии биосинтеза в виде фильтрата культуральной жидкости составит около 900 евро/т МК, себестоимость получаемого полилактида с учетом амортизации – около 1500 евро/т. Капитальные затраты на оборудование для стадии биосинтеза молочной кислоты, включая вспомогательное оборудование, оценены в 4,5 млн. евро.

## **5.2. Культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий с оксидативным воздействием**

С проверкой идеи совершенствования методов культивирования микроорганизмов с точки зрения методологии экологически чистого производства путем совмещения по месту и времени протекания микробиологического синтеза и абиотических процессов, как это происходит в природных экосистемах, была связана большая часть представленной диссертационной работы с объектами исследований, описанных в главе 3.

Основной подход заключался в использовании оксидативного воздействия активных форм кислорода, а именно  $H_2O_2$  на ферментационную среду с микроорганизмами.

В частности, первоначально предполагалось, что внесение пероксида водорода в среду культивирования может привести к снижению количества накапливаемых в культуральной жидкости возможных ингибиторов биосинтеза. Такое решение, как уже отмечалось выше, до некоторой степени моделирует процессы самоочищения в водных природных средах, протекающих с участием  $H_2O_2$ , что было более подробно рассмотрено нами в книге «Научные основы экобиотехнологии» [4]. При наличии таких эффектов самоочищения с удалением внеклеточных метаболитов – ингибиторов биосинтеза при проведении ферментационных процессов в биореакторе внесение разумных доз  $H_2O_2$ , например, в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом привело бы к улучшению выходных показатели биосинтеза и снизило не только количество жидкого стока, образующегося в виде культуральной жидкости после выделения целевого продукта, но и уровень его загрязненности остаточными компонентами питания и внеклеточными метаболитами. Ниже представлены результаты экспериментов с воздействием АФК на дрожжи и молочнокислые бактерии, выращиваемые в режимах периодического культивирования с подпиткой субстратом (высокоплотностное культивирование) и без подпитки субстратом (обычное периодическое культивирование).

### **5.2.1. Высокоплотностное культивирование дрожжей *Candida tropicalis* в периодических условиях с подпиткой субстратом и использованием оксидативного воздействия**

В экспериментах с дрожжами *Candida tropicalis* СК4 – продуцента кормовой биомассы – был апробирован режим высокоплотностного культивирования как превентивная мера экологически чистых решений для снижения энергозатрат на последующее концентрирование биомассы, расхода минеральных солей, количества сточных вод. Такой режим может считаться эффективным, если он не будет приводить к снижению качества целевого продукта, в данном случае характеризуемого по содержанию белка в получаемой дрожжевой биомассе.

Культивирование в режиме с подпиткой сахарозой показало, что в этом случае наблюдается не только увеличение общего уровня накопления биомассы дрожжей в ферментере, но и удельного выхода биомассы с единицы субстрата – с 0,5 до 0,6 без изменения содержания сырого протеина в дрожжах. Продуктивность биореактора по биомассе дрожжей увеличилась с 2,5–3 г асд/л.ч до 3–4 г асд/л.ч (в

зависимости от режима подпитки). При подпитке субстратом небольшими дробными порциями и поддержании концентрации растворенного кислорода на уровне 10–20% от насыщения удалось получить концентрацию биомассы дрожжей в конце ферментации, длившейся в общей сложности 25 ч, около 100 г асд/л.

При высокоплотном культивировании возможно снижение содержания азота, вносимого в исходную питательную среду с минеральными солями, до уровня в 2–3 раза ниже необходимого, исходя из материального баланса. Остальное количество азота можно вводить с аммиачной водой, используемой в качестве титрующего реагента. Такой режим позволяет снизить общий расход азота на ферментацию. Кроме того, в этом режиме наблюдалось некоторое увеличение суммарного выхода биомассы. Возможно, это связано с тем, что при избытке азота наблюдается известная для дрожжей р. *Candida* азотная репрессия, при которой, по аналогии с катаболитной репрессией избытком углеводного субстрата, действует менее экономичная система транспорта азота в клетку.

Для такого процесса высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом были оценены суммарные эколого-экономические затраты для варианта проведения технологического процесса по схеме ферментация – сушка, т.е. без сепарации и вакуум-выпарки. Данный вариант процесса вполне применим при получении кормовых дрожжей на небольших установках с переработкой различных углеводсодержащих отходов сельского хозяйства и агропромышленного комплекса.

В ходе расчетов с использованием экспериментальных данных были оценены:

- материальный баланс ферментации;
- тепловой баланс ферментера;
- затраты электроэнергии на аэрацию;
- затраты на углеродный субстрат, соли и титрующий агент;
- затраты на охлаждающую воду;
- затраты на сушку полученной суспензии микроорганизмов;
- суммарные эколого-экономические затраты.

Расчеты показали, что режим высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом позволяет снизить суммарные затраты на сырье и энергию при выращивании и выделении биомассы дрожжей на 15–20% на 1 т асд или сырого протеина по сравнению с периодическим режимом культивирования без подпитки. Если учесть, что в расчетах не учитывались затраты на очистку сточных вод, то эколого-экономическая эффективность высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом становится еще более очевидной.

Разработанное высокоплотное культивирование дрожжей *C. tropicalis* СК4 на среде с сахарозой было первым объектом исследований, применительно к

которому апробировалось культивирование с оксидативным воздействием перексидом водорода.

Поскольку внесение  $H_2O_2$ , как агента оксидативного стресса, угнетает развитие микробной популяции, то предварительно было необходимо найти критические сублетальные дозы  $H_2O_2$ , оценить влияние условий культивирования на устойчивость популяции дрожжей к воздействию  $H_2O_2$ , и отработать процедуру адаптации к этому стресс-агенту.

На первом этапе исследований с воздействием  $H_2O_2$  была проведена адаптация дрожжей к  $H_2O_2$  с постепенным внесением пероксида водорода в возрастающих количествах. Одновременно вели контрольную линию дрожжей без внесения  $H_2O_2$ .

Схема адаптации представлена на рис. 5.5.



Рисунок 5.5 – Схема адаптации дрожжей *C. tropicalis* к  $H_2O_2$ .

Адаптацию дрожжей к  $H_2O_2$  проводили в периодических условиях методом накопительной культуры – в колбах (объем колб 250 мл, объем среды 30–60 мл) на термостатируемой качалке с числом оборотов 160–220 об/мин при температуре 32–34 °С, при значениях рН среды 3,0–6,0. Объем посевного материала при пересевах составлял в зависимости от постановки опыта от 1 до 10% от объема среды.

После 22 пассажей получили культуру дрожжей *C. tropicalis*, выдерживающих внесение до 3%  $H_2O_2$  и активно растущих в среде с внесением 0,5–2,0 г/л  $H_2O_2$ .

В экспериментах, параллельно проводимых с адаптацией в колбах на качалке, определяли чувствительность популяции дрожжей к пероксиду водорода, зависимость чувствительности от плотности популяции, фазы роста.

На рис. 5.6 приведены данные об удельном приросте биомассы неадаптированных дрожжей за первые 6 ч культивирования при разной дозе пероксида водорода, вносимого сразу же после засева культуры.

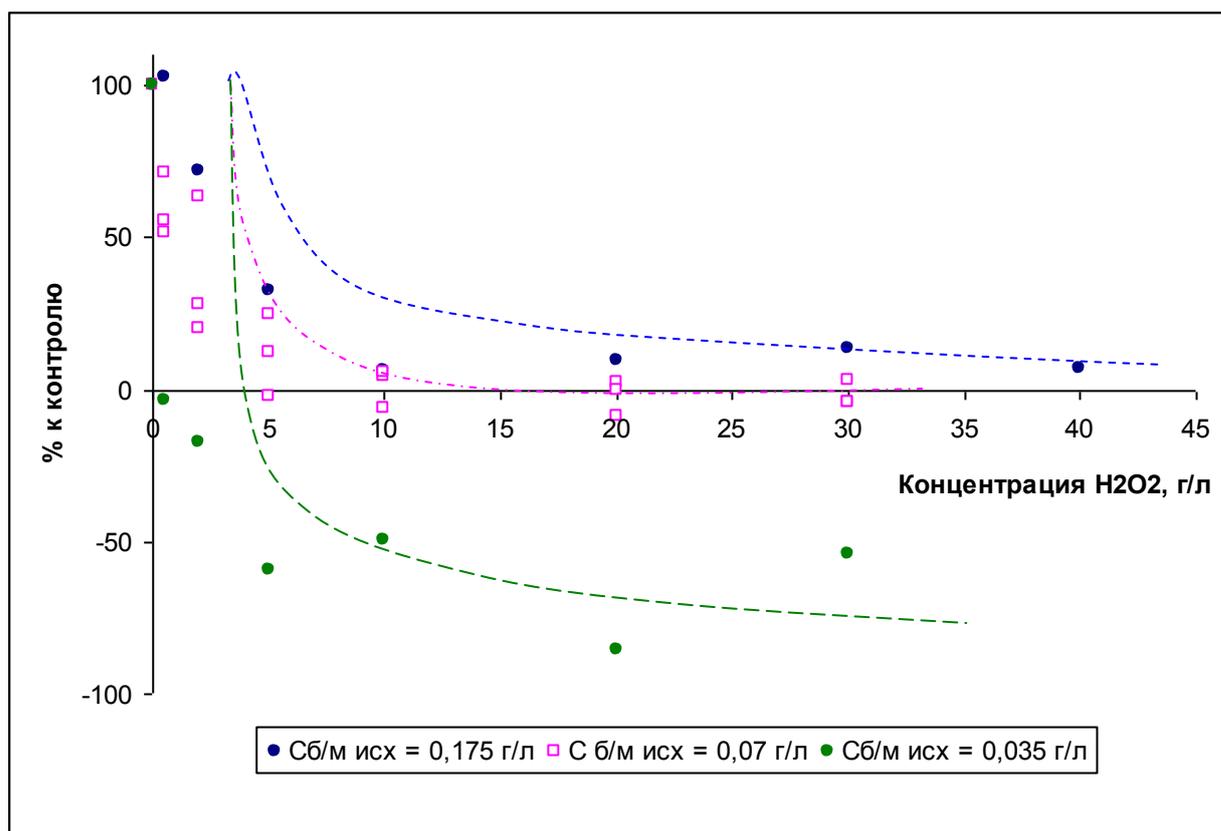


Рисунок 5.6 – Удельный прирост биомассы неадаптированных дрожжей (% к контролю без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) за первые 6 ч культивирования при разной дозе внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и разной концентрации посевного материала.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли сразу же после внесения посевного материала.

Видно, что при повышении дозы посевного материала чувствительность дрожжей к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> снижается.

Чувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдается и для адаптированных дрожжей при низких дозах посевного материала, однако с повышением плотности популяции дрожжей в момент внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> чувствительность адаптированной популяции к пероксиду водорода становится ниже, чем у неадаптированной линии при относительно высоких плотностях популяции – более 0,2–0,3 г/л.

Таким образом, эффект внесения  $H_2O_2$  зависит от плотности и фазы роста популяции. Наибольшей устойчивостью к  $H_2O_2$  обладает популяция в экспоненциальной фазе роста, наименьшей – в лаг-фазе. При плотности клеток в популяции  $>1$  г/л внесение  $H_2O_2$  вплоть до концентраций 10 г/л не приводит к угнетению роста дрожжей, преадаптированных к  $H_2O_2$ . При плотности активно растущих клеток  $<0,2$  г/л внесение  $H_2O_2$  в концентрациях более 0,5 г/л приводит к торможению роста культуры.

Неадаптированная к действию  $H_2O_2$  культура дрожжей выдерживает внесение не более 0,5 г/л  $H_2O_2$  в среду культивирования. Напротив, адаптированная к действию пероксида водорода культура дрожжей намного лучше развивается на среде с 0,1–2 г/л  $H_2O_2$ , даже по сравнению с контролем без внесения  $H_2O_2$ .

Рост неадаптированной и полученной преадаптированной к действию пероксида водорода культуры дрожжей *S. tropicalis* СК4 на сахарозе был исследован в режиме периодического культивирования с дробной подпиткой субстратом без внесения и при внесении  $H_2O_2$ . В ходе эксперимента сахароза добавлялась в сухом виде порциями от 2–5 г/л – в начале эксперимента до 5–50 г/л – при дальнейшем проведении культивирования. Момент внесения очередной порции сахарозы определялся по возрастанию концентрации растворенного кислорода, фиксируемого датчиком  $pO_2$ . Пероксид водорода также вносился порциями от 5 до 90 мл 30%  $H_2O_2$  на 1 л среды (от 1,5 до 30 г/л в пересчете на 100%  $H_2O_2$ ) после внесения углеродного субстрата и при концентрации биомассы в биореакторе  $>5$  г/л. По ходу опыта в ферментер вносили минеральные соли (фосфор, калий, магний, микроэлементы) для компенсации их убыли в результате потребления клетками дрожжей. Их количество рассчитывалось исходя из материального баланса ферментации. Результаты исследований представлены на рис. 5.7.

К концу контрольного эксперимента без внесения  $H_2O_2$  в ферментационной среде было суммарно потреблено около 0,5 кг/л сахарозы при конечной концентрации биомассы дрожжей 130 г асв/л (170 усл. ед. опт. пл-ти, рис. 5.7, вариант II). Процесс был прекращен из-за ухудшения реологических свойств суспензии, при этом доля мертвых клеток в конце процесса достигла 10–30%.

В эксперименте с внесением  $H_2O_2$  сначала было использовано 0,5 кг/л сахарозы, при этом доля мертвых клеток составляла не более 2–5% при концентрации биомассы в среде 140 г асв/л (183 усл. ед. опт. пл-ти, рис. 5.7, вариант I). При последующем добавлении сахарозы до суммарного количества 1 кг/л, но уже при прекращении внесения  $H_2O_2$  не наблюдалось угасания окислительной активности дрожжей, концентрация биомассы при этом составила 160 г асв/л, т. е. достигла практически максимально возможного предела, при котором все клетки плотно

упакованы в среде. Доля мертвых клеток по-прежнему не превышала 2–5%. Культура в этом состоянии без каких-либо неблагоприятных последствий выдерживала разовое внесение 3%  $H_2O_2$ , который при этом быстро разлагался вследствие высокой каталазной активности в ферментационной среде, а клетки с концентрацией более 50 г асв/л даже выдерживали внесение в 16,5%  $H_2O_2$ , (пергидроль, разбавленный в 2 раза и вызывающий ожог кожи человека!) в соотношении: 5% суспензия дрожжей : 16,5%  $H_2O_2$  ~ 1 : 3.

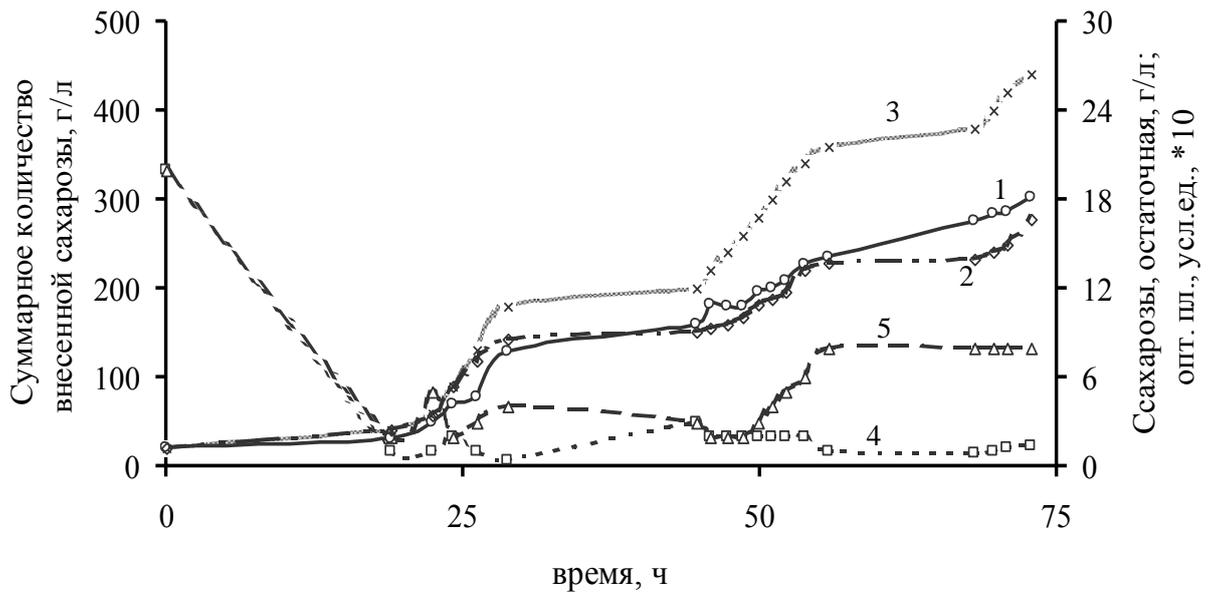


Рисунок 5.7 – Рост преадаптированных к  $H_2O_2$  дрожжей *C. tropicalis* на сахарозе с подпиткой субстратом и с внесением  $H_2O_2$  в ходе культивирования ( I ) в сравнении с ростом неадаптированных к  $H_2O_2$  дрожжей без внесения  $H_2O_2$  в среду культивирования ( II ).

1 – концентрация биомассы, г/л, I; 2 – концентрация биомассы, г/л, II; 3 – суммарное количество внесенной сахарозы, г/л, I, II; 4 – концентрация сахарозы, остаточная, г/л, I; 5 – концентрация сахарозы, остаточная, г/л, II.

Другим явным отличием результатов опыта с внесением  $H_2O_2$  были существенно меньшие текущие остаточные концентрации сахарозы в среде культивирования. После субстратного голодания (10–14 ч в течение ночного периода) в опыте с внесением  $H_2O_2$  клетки быстрее «откликнулись» на внесение сахарозы, что привело к увеличению скорости ее окисления. Удельная каталазная активность практически не изменялась.

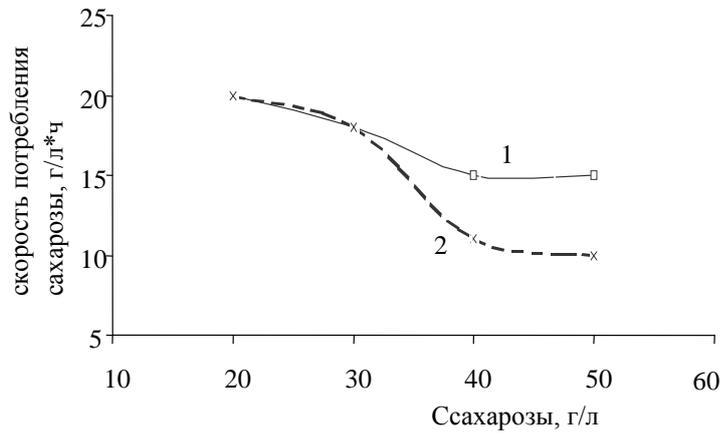


Рисунок 5.8 – Зависимость скорости потребления сахарозы от количества ее одномоментного внесения.

1 – дрожжи *C. tropicalis*, преадаптированные к внесению  $H_2O_2$ , с внесением  $H_2O_2$  в ходе культивирования

2 – дрожжи *C. tropicalis*, неадаптированные к внесению  $H_2O_2$ , без внесения  $H_2O_2$  в среду культивирования

Популяция дрожжей адаптированного к  $H_2O_2$  варианта, в отличие от варианта без внесения  $H_2O_2$ , была менее чувствительной к внесению больших доз сахарозы (свыше 50 г/л) по сравнению с неадаптированной к  $H_2O_2$  популяцией (рис. 5.8) и потребляла сахарозу без проявления явной диауксии в протреблении кислорода, связанной с образованием этанола с последующим его вовлечением в дыхание. Дополнительные эксперименты показали, что такая преадаптированная к  $H_2O_2$  популяция растет без снижения выхода биомассы от потребленного субстрата вплоть до единовременных концентраций внесенной сахарозы до 100 г/л, т.е. без репрессии аэробного дыхания высокими концентрациями сахарозы, способна активно развиваться на среде с содержанием сахарозы до 50–60%, т.е. приобретает повышенную осмоустойчивость, выдерживает внесение больших количеств  $H_2O_2$ ; падение ее физиологической активности происходит медленнее в условиях голодания по субстрату. Лимитирование роста углеродным субстратом или кислородом или голодание клеток в течение суток не вызывает качественных изменений в физиологическом состоянии таких преадаптированных популяций.

Таким образом, при пассировании дрожжей на среде с сахарозой и с внесением пероксида водорода происходит адаптация клеток к этому биологически агрессивному окислителю, т.е. в условиях постоянного селективного давления на популяцию дрожжей, вызываемого пероксидом водорода, возможен отбор популяций, устойчивых к относительно большим дозам вносимого  $H_2O_2$ . В режиме высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом внесение  $H_2O_2$  в среду, ве-

роятно, способствует поддержанию и восстановлению активного состояния клеток дрожжей *S. tropicalis* без проявления каких-либо признаков старения популяции и угасания их физиологической активности. Они более полно и с большей эффективностью утилизируют субстрат, нечувствительны к катаболитной репрессии субстратом, более устойчивы к таким стрессам, как голодание, высокая плотность популяции, осмотическое действие. Эти обстоятельства могут свидетельствовать в пользу предположения о сдвиге метаболизма дрожжей под действием  $H_2O_2$  и определенных регуляторных функций  $H_2O_2$ .

Оценки показывают, что высокоплотностное глубинное культивирование дрожжей в совокупности с оксидативным воздействием небольшими дозами пероксида водорода позволяет повысить интенсивность биосинтеза, конечную концентрацию биомассы дрожжей до 120–160 г/л по сухому весу, выход биомассы дрожжей на 10–15%, содержание белка в биомассе на 7–10%, обеспечить 30–50%-ю экономию питательных солей, снизить количество сточных вод и концентрацию остаточных загрязнений в них в 5–10 раз, затраты на сырье и энергию на 15–20%.

Таким образом, опыты с высокоплотностным культивированием дрожжей *S. tropicalis* показали, что умеренное воздействие оксидативного стресса на популяцию микроорганизмов может выступать в качестве фактора, управляющего биосинтезом (анаболизмом и катаболизмом), позитивно сказываться на биосинтезе и улучшать экологические показатели процесса ферментации. Для получения положительного эффекта важно использовать оптимальные дозы стрессора; популяция должна быть преадаптирована к его воздействию; численность популяции, подвергаемой стрессорному воздействию, должна быть достаточно высокой; существенно физиологическое состояние популяции, концентрация субстрата, доза стрессора.

Эти результаты, в совокупности с результатами по биодеструкции фенола в аналогичных условиях проведения ферментационного процесса в режиме с подпиткой субстратом и внесением  $H_2O_2$  (см. раздел 6.2.4), в последующем обусловили проведение целенаправленных исследований с изучением культивирования микроорганизмов с контролируемым оксидативным воздействием.

### **5.2.2. Возникновение фоточувствительности у дрожжей в условиях оксидативного стресса**

Как вариант ферментации с оксидативным воздействием были проведены эксперименты с дрожжами *S. tropicalis* СК4 с заменой воздействия  $H_2O_2$  на облучение ультрафиолетом ближнего УФА-диапазона. Как уже отмечалось в разделах

1.2.4 и 2.4, УФ-облучение во многом аналогично воздействию различных активных форм кислорода, включая  $H_2O_2$ .

Эксперименты проводились совместно с ФГУП НПО «Астрофизика». Описание методического и инструментального обеспечения этих экспериментов приведено в разделе 4.1.3.

В предварительных тестовых экспериментах, выполненных с культурой дрожжей *S. tropicalis*, выращиваемых в качалочных колбах на среде с сахарозой, в качестве стресс-фактора использовалось мягкое УФ-излучение лампового источника (УФ-лампа TL 20W/05 фирмы «Филипс»). Перед культивированием суспензия дрожжей, помещенная в чашку Петри, экспонировалась под УФ-лампой заданное время при фоновом освещении лаборатории, затем переносилась в качалочную колбу и выращивалась. В ряде вариантов наблюдалось положительное действие УФ-облучения на скорость роста и выход дрожжей. Эффект при этом зависел от активности роста и плотности дрожжевой популяции. Заметное положительное действие УФ-излучения проявлялось только для активно растущих культур микроорганизмов – в фазе экспоненциального роста, а также, когда плотность клеточной популяции превышала величины 0,5–1,0 г/л (по сухому веществу биомассы). Оптимальный режим облучения, найденный при использовании УФ-лампы «Филипс»: 1 мин при облучении слоя суспензии толщиной 4 мм с концентрацией активно растущих клеток дрожжей 0,5–0,7 г/л при дозе излучения около 1000 Дж/м<sup>2</sup> (250 Дж/л).

На следующем этапе исследований провели серию экспериментов с ферментацией в биореакторе на среде с сахарозой ( $C_{\text{сах.исх.}} = 8$  г/л) с облучением ультрафиолетом (лампа ДРШ-100, мощность облучения по УФ-излучению – 1 Вт/л) через кварцевую кювету, расположенную на линии циркуляции среды с клетками через выносной контур на протяжении всего ферментационного цикла (подробное описание – см. раздел 4.1.3). Ход процесса ферментации отслеживали, в частности, по показанию датчика растворенного кислорода ( $pO_2$ ). При постоянной скорости подачи воздуха в биореактор повышение концентрации клеток в среде по мере роста и увеличения суммарной физиологической активности популяции дрожжей приводит к понижению текущего динамически равновесного уровня  $pO_2$ . Поскольку действие УФ-облучения может индуцировать у микроорганизмов повреждение ДНК, а действие видимого света на стрессированную культуру активизировать фоторепарацию, то эксперименты проводили с затемнением ферментера (черной тканью, оборачиваемой вокруг обечайки) и без затемнения. При затемнении содержимого ферментера включение УФ-излучения вызывало у культуры переходное состояние, проявляющееся в преломлении хода кривой  $pO_2$ : в замедлении падения  $pO_2$ , смены

падения  $pO_2$  на рост, колебания в показаниях  $pO_2$  (рис. 5.9), т.е. отрицательно влияло на дыхательную активность. Переходный процесс длился 1–2,5 ч.

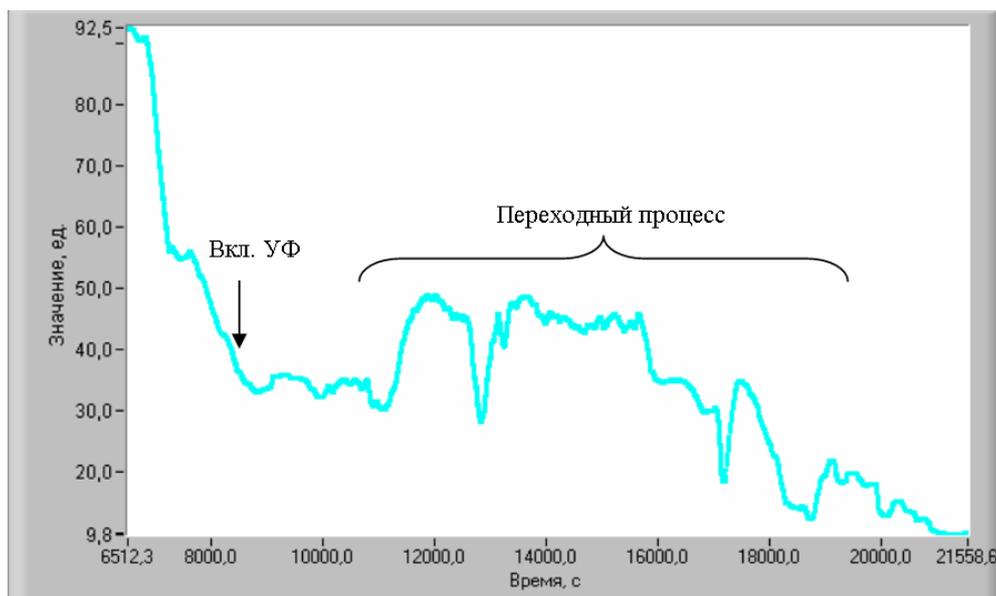


Рисунок 5.9 – Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение УФ-излучения в темноте.

Условия опыта: рост в периодическом режиме; скорость вращения мешалки 200 об/мин; концентрация биомассы в момент включения УФ-лампы – 0,7 опт. ед.

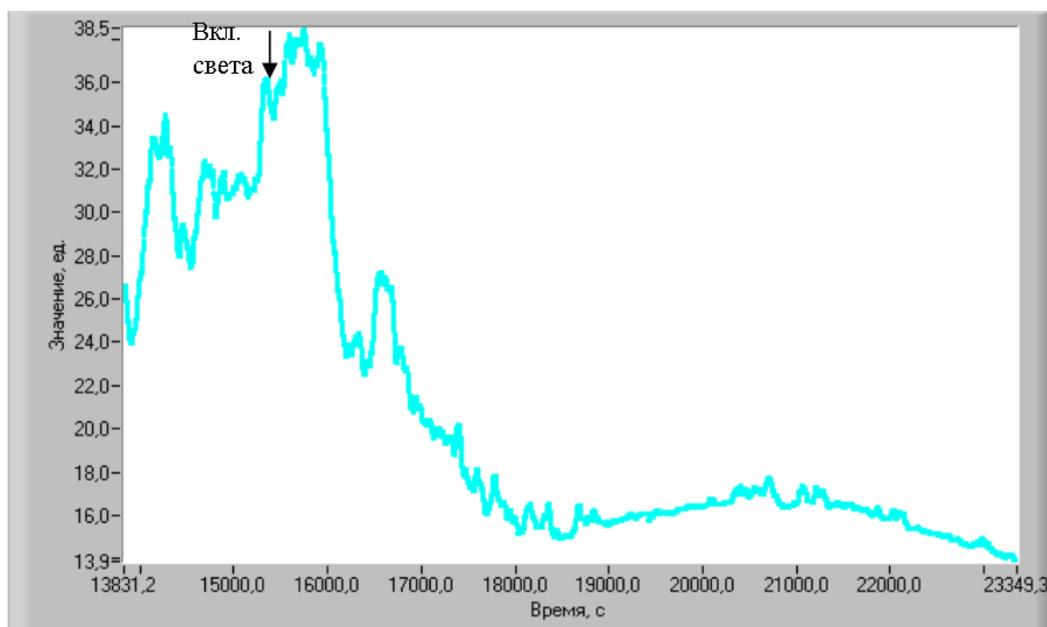


Рисунок 5.10 – Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение света при УФ-облучении суспензии биореактора.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент включения света в лаборатории – 1,6 опт. ед.

Изменение условий освещения видимым светом также вызывало у культуры переходное состояние, противоположное действию УФ-облучения (рис. 5.10, 5.11). На фоне облучения среды ультрафиолетом включение видимого света ускорило падение  $pO_2$ , т.е. положительно влияло на дыхательную активность суспензии дрожжей и скорость потребления кислорода (рис. 5.10). Напротив, отключение освещения видимым светом на фоне облучения среды ультрафиолетом приводило к замедлению дыхательной активности (рис. 5.11). Когда же УФ-облучение включали на фоне освещения среды видимым светом, замедления в скорости падения  $pO_2$  не наблюдалось (рис. 5.12), и наоборот, отключение УФ-облучения в условиях освещения содержимого ферментера видимым светом приводило к замедлению дыхательной активности (рис. 5.13). В отсутствие УФ-облучения дрожжи были нечувствительны к воздействию видимого света.



Рисунок 5.11 – Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение света при УФ-облучении суспензии биореактора.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 300 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения света в лаборатории – 3,0 опт. ед.

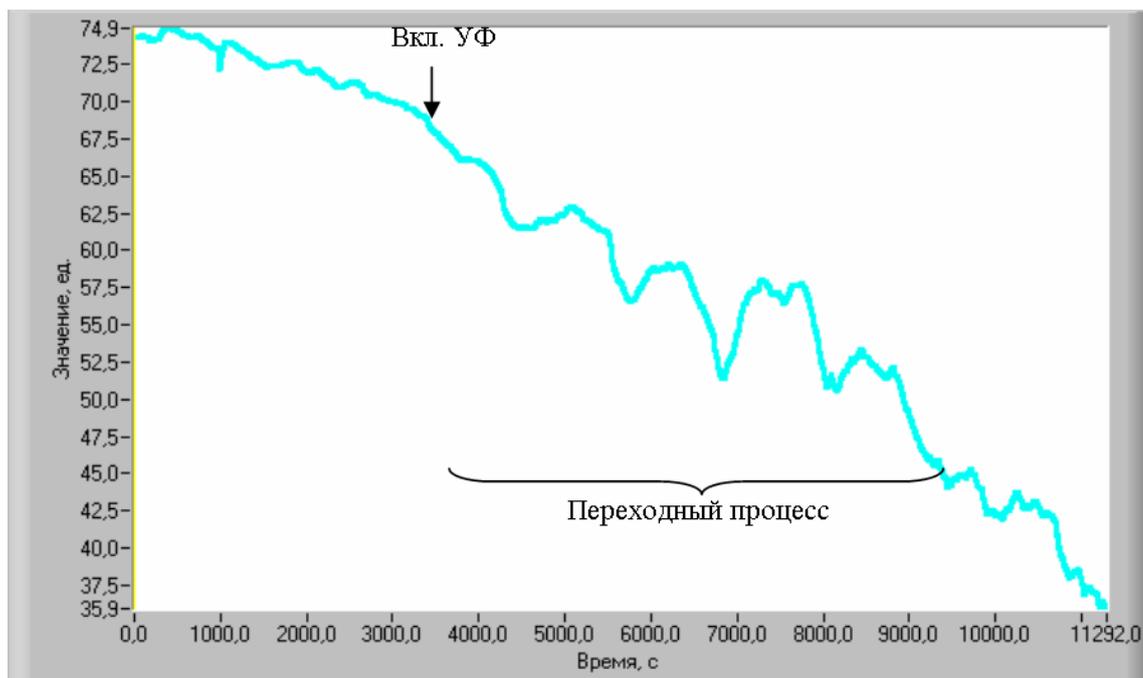


Рисунок 5.12 – Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на включение УФ-излучения при освещении светом лаборатории.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент включения УФ-лампы – 0,45 опт. ед.

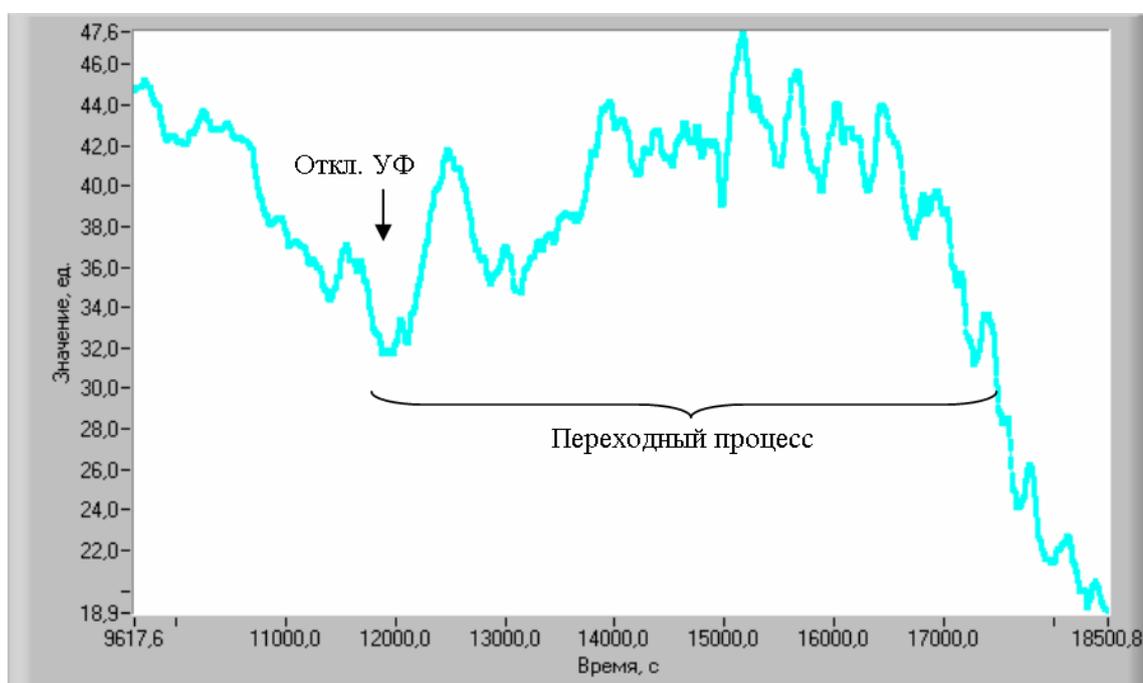


Рисунок 5.13 – Отклик датчика растворенного кислорода в биореакторе на отключение УФ-излучения при освещении светом лаборатории.

Условия опыта: рост в периодических условиях; скорость вращения мешалки 150 об/мин; концентрация биомассы в момент отключения УФ-лампы – 0,7 опт. ед.

Отклик дрожжевой популяции на режимы и изменение облучения, определяемый непосредственно из кривой роста биомассы, в целом, коррелировал с характером изменения хода величины  $pO_2$ . В моменты, когда наблюдалось ускорение падения величины  $pO_2$ , наблюдался более интенсивный рост дрожжей. При выращивании дрожжей с затемнением биореактора включение УФ-облучения в темноте замедляло рост биомассы. Напротив, включение освещения в лаборатории на фоне действия УФ-излучения ускоряло рост биомассы, что также коррелирует с данными, полученными на основании анализа кривых  $pO_2$ , и подтверждает вывод о влиянии УФ-облучения и света, полученный на основании отклика датчика растворенного кислорода на включение-выключение ультрафиолета и света.

Полученные данные указывают, что рост дрожжей при совместном действии УФ-излучения и видимого света на дрожжи не только не ингибируется, но может и стимулироваться. Для подтверждения такого стимулирования был поставлен ряд экспериментов по выращиванию дрожжей при постоянном действии ультрафиолета и/или света на всем протяжении цикла выращивания.

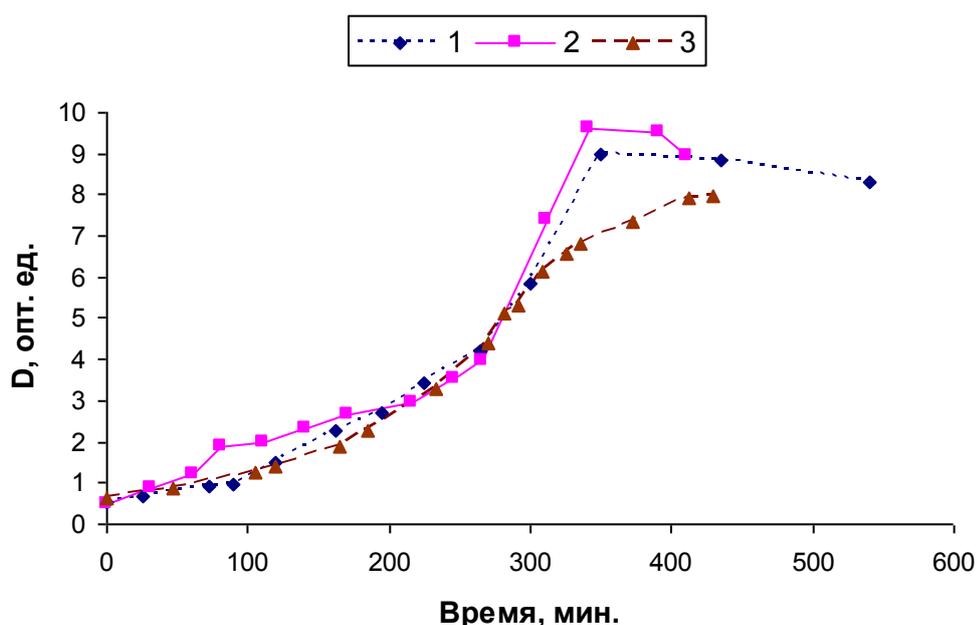


Рисунок 5.14 – Рост дрожжей *C. tropicalis* при облучении УФА-излучением умеренной интенсивности и видимым светом.

1 – контроль (без УФ облучения, рост при включенном освещении лаборатории).

2 – с УФ-облучением (лампа ДРШ-100, 1 Вт/л) с освещением лаборатории.

3 – с УФ-облучением в темноте.

УФ-облучение через проточную кювету – с момента внесения инокулята. Исходная концентрация субстрата (сахарозы) 16 г/л; исходная концентрация биомассы – 0,6 опт. ед.

Результаты экспериментов (рис. 5.14) показали, что явно наихудший рост наблюдается при облучении суспензии ультрафиолетом и затемнении биореактора. Для варианта выращивания дрожжей с облучением ультрафиолетом и светом рост более интенсивный с превышением удельной скорости роста над вариантом без облучения (контроль) к моменту завершения экспоненциальной фазы (т.е. до момента исчерпания субстрата) и повышением конечного уровня накопления биомассы на 5–20%.

Изучение влияния таких факторов как концентрация посевного материала и субстрата, состояние посевного материала, интенсивность облучения, наличие светофильтров, отсекающих определенную часть спектра ультрафиолетового излучения, на рост и выход дрожжей показало, что положительный эффект совместного действия субингибиторных доз ультрафиолета и видимого света более явно выражен при уменьшении дозы инокулята, не зависит от состояния инокулята и интенсивности света выше порогового значения и сохраняется при повышении концентрации субстрата в среде. Интенсивное надпороговое воздействие УФ-излучения лампы ДРШ на суспензию дрожжей – порядка 5–10 Вт/л – вызывает репрессию роста дрожжей независимо от того, освещается ли содержимое биореактора видимым светом или нет.

В экспериментах с замораживанием дрожжевой суспензии с последующим размораживанием отклик дрожжей на видимый свет после такого стрессового воздействия был во многом аналогичен отклику на воздействие УФ и видимого света. При этом замороженные-размороженные клетки (без УФ-облучения) становятся чувствительными к видимому свету и на свету растут лучше. Однако для замороженных-размороженных клеток положительное совместное действие ультрафиолета и видимого света не проявляется по сравнению с нестрессированной культурой.

Полученные данные показали, что **для того, чтобы гетеротрофные микроорганизмы (дрожжи) стали чувствительными к видимому свету, в том числе низкой интенсивности, они должны быть подвергнуты стрессовым воздействиям или находиться в состоянии стресса.** При этом стрессовое состояние не обязательно должно быть вызвано воздействием ультрафиолета, а например, такими факторами, как пероксид водорода, механическое действие (замораживание-размораживание) и, возможно, тепловой шок, ультразвук и др. Такая перекрестная адаптация к  $H_2O_2$ , УФ и рН наблюдалась ранее, в частности, для сахарометов [941], когда преадаптация дрожжей к рН и пероксиду водорода позволяла культуре выдержать облучение большей, чем в контроле дозой ультрафиолета или гамма излучения.

Одновременное действие ультрафиолета и видимого света благоприятно для физиологической активности клеток. В частности, при облучении ультрафиолетом с интенсивностью 1 Вт/л – при культивировании в биореакторе в периодическом режиме при исходной концентрации дрожжей 0,1–0,3 г/л – или с дозой от 100 до 1000 Дж/м<sup>2</sup> (0,1–1 Вт/л) – при облучении в чашках Петри слоя суспензии с концентрацией активно растущих клеток дрожжей 0,5–0,7 г/л на фоне подсветки видимым светом незначительной интенсивности (40 мВт/л) наблюдается ускорение роста популяции и увеличение выхода биомассы на 10–15%. С увеличением интенсивности освещения выращиваемой суспензии дрожжей видимым светом выше 40 мВт/л при постоянной дозе УФ-облучения эффект ускорения роста популяции и увеличения выхода биомассы в количественном отношении существенно не меняется. Без видимого света ультрафиолет даже умеренной интенсивности (1 Вт/л) репрессирует рост дрожжей. Видимый свет без действия ультрафиолета не действует на рост дрожжей.

Таким образом, **видимый свет на фоне действия ультрафиолета может выступать в качестве фактора, управляющего ростом клеток.**

Полученные данные позволяют предложить новый метод воздействия на микроорганизмы для улучшения показателей ферментационного процесса. Метод предполагает одновременное воздействие на выращиваемую культуру видимого света и оптимальных доз ультрафиолета. Учитывая, что природное солнечное излучение, достигающее поверхности земли, имеет не только видимую, но и УФА и УФВ-составляющую, нами предложено назвать такой метод воздействия «солнечный» биореактор.

Возникновение чувствительности к видимому свету интенсивности 40 мВт/л, которое принято относить к низкоэнергетическим воздействиям (10–100 мВт/л), у дрожжей, облучаемых мягким ультрафиолетом, можно объяснить действием фоторепарации с фотолизой в качестве ключевого фермента, протекающей в дрожжевых клетках как один из механизмов противодействия стрессу. Как уже было подробно рассмотрено в разделе 2.5, фотолиаза является ключевым компонентом системы фоторепарации, реагирующей на свет в диапазонах 370–390 нм – для фотолиазы 1-го типа и 430–450 нм – для фотолиазы 2-го типа [1057, 1067, 1069].

Нужно отметить, что реакция популяции дрожжей на действие мягкого УФА излучения и видимого света или пероксида водорода и видимого света во многом аналогична. Наряду с этим, возможно тесное пересечение стресс-ответов на определенных путях метаболизма и регуляции физиологического состояния клеток (см. раздел 2.6), подвергнутых воздействиям разных стрессов. Поскольку в клетках прокариот и эукариот возможно одновременное функционирование нескольких си-

стем репарации, то этим можно объяснить чувствительность стрессированных клеток к видимому свету. Поэтому для целей практического применения метода культивирования гетеротрофных микроорганизмов с использованием комбинированных воздействий АФК (стрессор) и видимого света (антистрессор) целесообразно использовать микроорганизмы с активно функционирующей системой фоторепарации. Однако данное предположение нуждается в верификации.

Дополнительно проведенные эксперименты показали, что аналогичные позитивные эффекты совместного действия видимого света и мягкого ультрафиолета могут наблюдаться и после пребывания клеток в состоянии покоя. В данном случае действие УФ-излучения, похоже, может приводить к замедлению процесса перехода популяции из состояния аэробноза (при наличии в среде достаточно высоких концентраций кислорода, не лимитирующих рост микроорганизмов в аэробных условиях) в состояние анаэробноза (при отсутствии кислорода в среде). Это заключение вытекает из зафиксированного нами влияния УФ-излучения на рост дрожжей *C. tropicalis* на сахарозе, в случае, когда клетки микроорганизмов после облучения некоторое время (1 час) пребывают в состоянии покоя. Облученные микроорганизмы при оптимальных условиях (УФ-лампа «Филипс», 1 мин при облучении с дозой около  $1000 \text{ Дж/м}^2$  или  $250 \text{ Дж/л}$ , слой суспензии толщиной 4 мм с концентрацией активно растущих клеток дрожжей  $0,5\text{--}0,7 \text{ г/л}$ ), выращиваемые лишь спустя 1 час после облучения, на 20–50% быстрее растут по сравнению с необлученными клетками, также пребывавшими такое же время в состоянии покоя. Выращивание же микроорганизмов сразу после облучения ультрафиолетом не приводит к появлению положительного эффекта в отношении скорости роста микроорганизмов.

Позитивное комбинированное воздействие факторов оксидативного стресса и видимого света на дрожжи р. *Candida* можно в определенной мере рассматривать как следствие экологических условий обитания дрожжей в среде. В частности, на поверхности растений, плодов типичны ситуации избытка углеводного субстрата и кислорода и одновременно освещенности солнечным светом. В такой ситуации селективное преимущество будут получать те микроорганизмы, которые наиболее эффективным образом адаптируются к сочетанию отмеченных факторов, что должно отражаться и в способах регуляции их метаболизма. При этом сочетание таких факторов, как ультрафиолет и видимый свет, может служить сигналом о благоприятной погоде – в солнечную погоду температура поверхности быстрее прогревается, чем в пасмурную, когда УФ-излучение Солнца не доходит до поверхности земли. Прогрев способствует размножению микроорганизмов, поэтому те варианты, которые быстрее реагируют на погодные изменения, на одновременное воздей-

ствие ультрафиолета и видимого света, получают адаптивное и селективное преимущество. Все это позволяет объяснить, почему важным условием для получения положительных результатов является **совместное действие стресс- и антистресс-факторов**.

Обнаруженная нами новая возможность улучшения показателей микробной ферментации при одновременном воздействии на выращиваемую культуру стресс-фактора, в частности, оптимальных доз пероксида водорода или мягкого ультрафиолета, и антистресс-фактора, в частности, видимого света, послужила основой для более широкого и целенаправленного исследования комбинированного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов, воздействия факторов с оксидантной, прооксидантной и антиоксидантной активностями на различные системы биосинтеза и биологической очистки. Такой подход, в основе которого лежит совместное и целенаправленное действие оптимальных доз факторов оксидативного стресса и антистрессоров при оптимальном физиологическом состоянии популяции микроорганизмов, т.е. управляемый или **контролируемый оксидативный стресс**, предоставляет новые возможности для совершенствования ферментации. В частности, в уже отмеченном варианте культивирования в «солнечном» биореакторе моделируются условия освещаемых солнечным светом природных поверхностей, на которые одновременно падают видимое и ультрафиолетовое (УФА и УФБ поддиапазоны) излучение Солнца, когда при поглощении УФА и УФБ излучения в тонком поверхностном слое воды образуются активные формы кислорода ( $O_3$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  радикалы и другие АФК). При этом УФ-излучение и образующиеся АФК действуют на клетки обитающих на поверхности микроорганизмов одновременно (сопряженно) с видимым светом.

В дальнейшем в исследованиях с микроорганизмами апробировались варианты контролируемого оксидативного воздействия с учетом различных сочетаний стрессорных и антистрессорных факторов с избирательным усилением или подавлением действия их на клетки микроорганизмов, а также выведения из ферментационной среды питательных компонентов и метаболитов с оксидантными и прооксидантными свойствами. Воздействие малых доз пероксида водорода (фактор с оксидантной активностью) и низких доз видимого света (может выступать как фактор с прооксидантной и одновременно с антиоксидантной активностью, в последнем случае действующий, предположительно, через механизм фоторепарации) является удобным, универсальным и эффективным технологическим приемом, который может послужить основой для разработки новых ресурсосберегающих, экономически и экологически эффективных технологий биосинтеза и биодеструкции.

### 5.2.3. Культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с оксидативным воздействием

Эксперименты с дрожжами-сахаромицетами целенаправленно проводили в условиях контролируемого оксидативного стресса. Для этого изучалось воздействие пероксида водорода и мягкого ультрафиолета на рост дрожжей в ходе культивирования при освещении и без освещения среды видимым светом. Как и для дрожжей р. *Candida* ожидали, что целенаправленное комбинированное действие стрессоров ( $H_2O_2$ , УФ) и антистрессоров (видимого света) при культивировании сахаромицетов обеспечит устойчивое воспроизводимое улучшение показателей роста и жизнедеятельности дрожжей. Важным обстоятельством является то, что природные условия обитания многих видов дрожжей-сахаромицетов и дрожжей р. *Candida* схожи, однако в отличие от первых, представители р. *Candida*, в частности *C. tropicalis* не являются истинными бродильщиками – при исчезновении кислорода в среде их бродильная активность, определяемая по выделению  $CO_2$ , быстро падает. В то же время в наших экспериментах наблюдалось повышение их бродильной активности после воздействия оптимальных доз факторов оксидативного стресса, что послужило дополнительным аргументом в пользу проведения опытов с дрожжами-сахаромицетами. Результаты исследований с сахаромицетами важны с практической точки зрения, а именно для крупнотаннажного получения биоэтанола.

В исследованиях с сахаромицетами использовались штаммы дрожжей: *S. cerevisiae* SL-100 и промышленный штамм дрожжей *S. cerevisiae* Meyen T 985 с морфологическими признаками и физиологическими свойствами штамма по ТУ 9182-400-00008064-2000, сбраживающего глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу и на 1/3 рафинозу. Дрожжи расы T 985 использовались в крупномасштабном процессе биосинтеза этанола из зерносырья, в частности, на ФГУП «Биотехнологический завод» (пос. Серебряные Пруды, Московская обл., см. раздел 3.1.2).

Исследования проводили с адаптацией дрожжей *S. cerevisiae* к пероксиду водорода по той же процедуре, что и в опытах с дрожжами *C. tropicalis*, с той лишь разницей, что для некоторых вариантов пассирование велось при целенаправленном освещении содержимого колб видимым светом. Во всех случаях интенсивность освещения составляла около 40 мВт/л среды. Для освещения использовались лампы дневного света. Пассирование к  $H_2O_2$  и ферментацию дрожжей в аэробных условиях вели в колбах на качалке, пассирование и проведение ферментации в анаэробных условиях вели в колбах с гидрозатвором, в микроаэрофильных – в колбах с ватной пробкой, которые стояли в покое. Все варианты термостатировались.

Преадаптация дрожжей *S. cerevisiae* T 985 к  $H_2O_2$  велась при росте на минеральной среде с зерновым сусликом или сахарозой, преадаптация *S. cerevisiae* SL-100

– на модифицированной минеральной среде 9М с сахарозой. Одновременно определялись наиболее подходящие условия внесения  $H_2O_2$ : фаза роста и плотность популяции дрожжевой культуры, концентрация вносимого пероксида водорода.

В предварительных экспериментах, проведенных со штаммом Т 985, были найдены летальные концентрации пероксида водорода и сублетальные дозы внесения пероксида, не приводящие к инактивированию большей части клеток дрожжей в условиях освещения содержимого колб и аэрации. Для неадаптированной популяции внесение  $H_2O_2$  в концентрациях 1,2–1,8 г/л приводило к полному отмиранию дрожжевых клеток.

С внесением найденных сублетальных доз  $H_2O_2$  были проведены предварительные эксперименты с серией пассажей с ведением 5 линий дрожжей штамма Т 985 в аэробных условиях и при освещении среды при концентрации сахарозы в исходной среде 5 г/л и 30 г/л и разной концентрации вносимого  $H_2O_2$  и дрожжей, а также 3 линий дрожжей штамма Т 985 в анаэробных условиях при освещении и концентрации сахарозы в исходной среде 100 г/л. Следом за этими опытами провели аналогичные исследования со штаммом SL-100 при концентрации сахарозы в исходной среде 150 г/л с внесением  $H_2O_2$  в дозах 0,6 г/л и культивированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях.

Каждый раз доза засеваемых дрожжей при пересеве составляла 10% об. Во всех пассажах через 3 ч после внесения  $H_2O_2$  определялась доля мертвых клеток в дрожжевой суспензии. Результаты этих экспериментов показали, что с повышением концентрации субстрата растет устойчивость и способность к адаптации популяции дрожжей к  $H_2O_2$ . Так, при содержании сахарозы в питательной среде 5 г/л доля мертвых клеток при добавлении  $H_2O_2$  составляла 70–80%, в то время как в контроле – не более 15%. При этой концентрации субстрата не наблюдалось снижения доли мертвых клеток по мере возрастания числа пересевов. Напротив, при содержании сахарозы в питательной среде 30 г/л устойчивость к  $H_2O_2$  росла, а доля мертвых клеток снижалась по мере пассирования (рис. 5.15).

Для штамма SL-100 (рис. 5.16) доля мертвых клеток была существенно выше (при большей начальной концентрации субстрата – 150 г/л), чем для штамма Т 985. Однако как и в случае дрожжей штамма Т 985, в аэробных условиях штамм SL-100 адаптировался к воздействию пероксида водорода по мере увеличения числа пассажей. Аналогичные изменения наблюдались и в микроаэрофильном режиме. В то же время в анаэробных условиях дрожжевые клетки не адаптировались к внесению пероксида: доля мертвых клеток оставалась на одном и том же уровне (рис. 5.16).

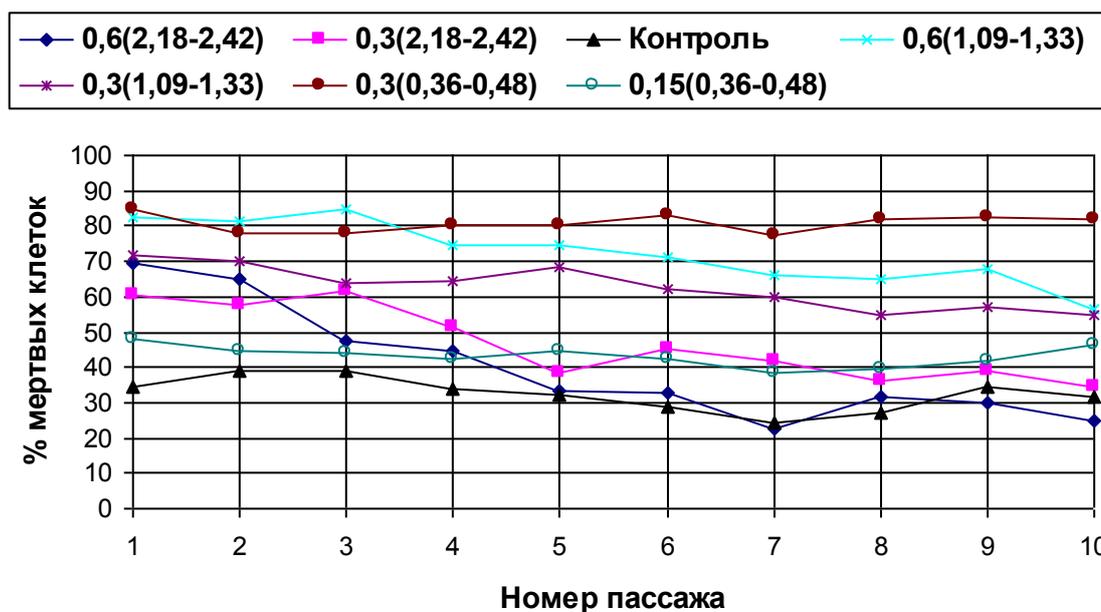


Рисунок 5.15 – Изменение доли мертвых клеток штамма Т 985 по мере увеличения количества пассажей при внесении  $H_2O_2$  при начальной концентрации субстрата 30 г/л и культивировании в аэробных условиях с освещением среды.

Первая цифра в надрисуночной подписи – доза вносимого  $H_2O_2$ , г/л; значения в скобках – концентрация биомассы в момент внесения, г/л (приведен интервал изменения с учетом варьирования в пассажах).

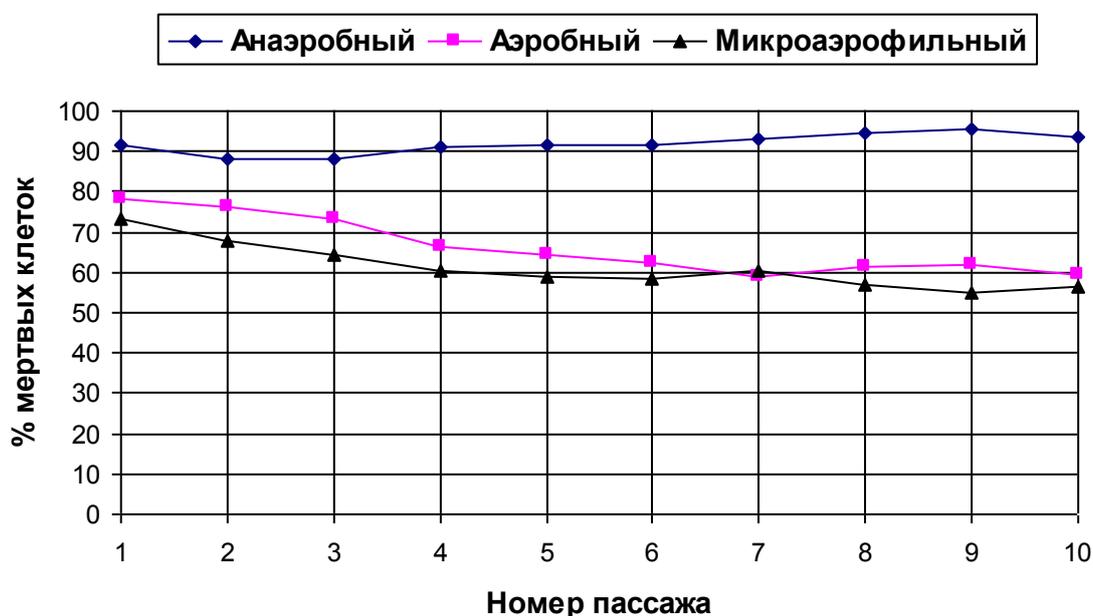


Рисунок 5.16 – Изменение доли мертвых клеток штамма SL-100 в пассажах по мере адаптации к воздействию  $H_2O_2$  при различных условиях аэрации с освещением среды.

Исходная концентрация сахарозы в среде – 150 г/л.

Пересев дрожжей 5-го и 10-го пассажей, адаптированных к  $H_2O_2$ , на ту же среду, но без внесения пероксида водорода, показал, что устойчивость клеток к стрессовым воздействиям сохраняется лишь после первого пересева, на 2-ом пересеве она ухудшается и к 3-му пересеву без внесения  $H_2O_2$  культура возвращается практически на уровень контроля.

Таким образом, наблюдается довольно быстрая деадаптация после прекращения внесения  $H_2O_2$  с возвратом культуры к исходному состоянию. Это может свидетельствовать о том, что в процессе адаптации изменения обусловлены откликом культуры на воздействие стрессового агента, а именно, индукцией и поддержанием в течение некоторого времени систем репарации, помогающим клеткам преодолевать неблагоприятное воздействие стрессоров, при этом скорее всего не происходит отбора относительно устойчивых субклонов на генетическом уровне, что согласуется с литературными данными [863].

С учетом наблюдаемых закономерностей для анализа изменений в показателях роста была проведена дополнительная серия экспериментов, в которых по мере пассирования определялись конечный уровень накопления биомассы в среде, а также конечный рН по окончании культивирования. Результаты этих исследований приведены для штамма Т 985 на рис. 5.17.

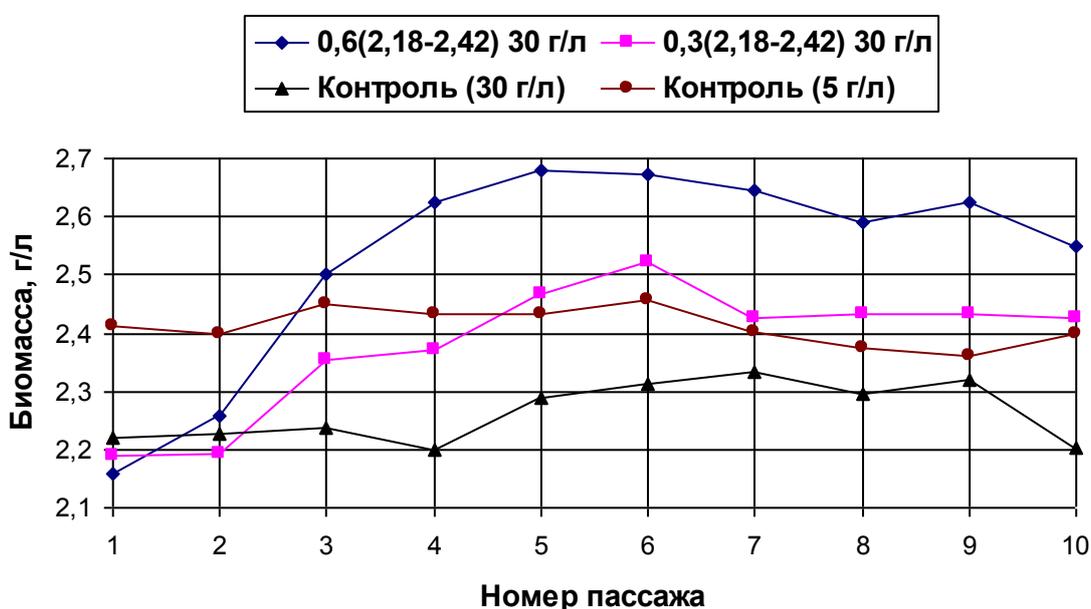


Рисунок 5.17 – Изменение конечного уровня накопления биомассы штаммом Т 985 в аэробных условиях с освещением среды по мере увеличения количества пассажей при внесении  $H_2O_2$  и содержании сахарозы в исходной среде 30 г/л.

Обозначения – см. рис. 5.15.

При исходном содержании сахарозы в среде 30 г/л при использовании в качестве инокулята линий дрожжей Т 985 с оптимальными условиями внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  уровень накопления биомассы в конце культивирования начал превышать контрольный уже после 2-го пассажа (рис. 5.17). При этом в пятом пассаже уровень биомассы составлял 2,7 г/л по сравнению с 2,2 г/л в первом пассаже. Для вариантов с начальной концентрацией субстрата 5 г/л содержание биомассы существенно не отличалось от содержания в контрольном варианте.

В аэробных условиях ввиду отсутствия подтитровки по ходу культивирования рН сильно менялся. При исходных рН среды 5,8 и концентрации сахарозы 5 г/л конечный рН при культивировании штамма Т 985 понижался до 2,75 и не отличался существенно для всех линий. В вариантах с начальной концентрацией субстрата 30 г/л при использовании инокулята контрольной линии рН снижался до 2,32–2,38 и не зависел существенно от количества пассажей. Однако в линиях с оптимальными условиями внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  по мере возрастания числа пассажей достигаемый конечный рН снижался: в линии с внесением 0,3 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  в суспензию с 2,18–2,42 г/л биомассы конечный рН в первом пассаже понизился до 2,35, а в десятом – до 2,12; в варианте с внесением 0,6 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  в суспензию с 2,18–2,42 г/л биомассы конечный рН в первом пассаже понизился до 2,35, а в десятом – до 2,05.

Таким образом, наблюдается явная корреляция между падением доли мертвых клеток, возрастанием уровня накопления биомассы и устойчивостью к рН по мере пересевов в линиях с оптимальными условиями внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , т.е. наблюдается адаптация популяции в пероксиду водорода с изменением показателей культивирования в благоприятную сторону, при этом повышается и устойчивость клеток к внесению повышенных доз  $\text{H}_2\text{O}_2$ : адаптированные клетки выдерживают внесение 1,8–2,4 г/л пероксида, тогда как в контрольном варианте клетки полностью погибают при внесении 1,2 г/л пероксида. Одновременно с приобретением устойчивости к  $\text{H}_2\text{O}_2$  клетки становятся устойчивыми к более низкому рН, т.е. наблюдается перекрестная адаптация к рН шоку и оксидативному стрессу.

Адаптированные к  $\text{H}_2\text{O}_2$  линии дрожжей при последующем пересеве в свежую среду и культивировании без внесения пероксида имеют более высокие показатели физиологической активности при повышении уровня накопления биомассы, устойчивости к низким рН. Однако, как уже отмечалось, при втором и последующих пассированиях без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  их физиологическая активность уже мало отличается от контрольного уровня и клетки вновь становятся нечувствительными к видимому свету.

С повышением концентрации биомассы в момент внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  устойчивость популяции дрожжей к пероксиду также повышается. Очевидно, этот эффект обусловлен более высокой суммарной каталазной активностью при высокой концентрации биомассы, поэтому скорость разложения пероксида, наблюдаемого сразу после внесения в среду с дрожжами, выше, и при одних и тех же дозах внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  клетки подвергаются воздействию пероксида в течение более короткого времени.

Дальнейшие эксперименты провели с преадаптацией дрожжей *S. cerevisiae* Т 985, взятых непосредственно из бродильного чана с определением их бродильной активности. Адаптация велась в двух вариантах: 1) использовалась обсемененная производственная культура; 2) использовалась чистая линия дрожжей, выделенная из производственной путем рассева на чашки Петри с сусло-агаром, с последующим пересевом отдельных колоний дрожжей в пробирки со скошенным агаром. Отобранные линии дрожжей проверялись на бродильную активность. Для дальнейшей адаптации к  $\text{H}_2\text{O}_2$  была взята линия дрожжей с наибольшей бродильной активностью.

При проведении адаптации в обоих вариантах отобранные линии пересеивались в асептических условиях на минеральную среду с внесением сусла 30 мл/л в качестве источника углерода, 1–10% инокулята (в зависимости от варианта опыта), и дрожжи выращивались в колбах на качалке при аэрации и освещении колб видимым светом. Использовались относительно невысокие концентрации сахаров сусла, чтобы избежать сильного закисления среды, наблюдаемого при выращивании дрожжей в колбах, при этом рН среды не корректировался по ходу эксперимента. При пассировании одновременно вели линию с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  (опытная линия) и без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  (контрольная линия). При ведении опытной линии в среду с дрожжами вносилось расчетное количество пероксида водорода в различные фазы роста дрожжей в возрастающей концентрации, от 0,2 мл/л до 5 мл/л (вносили в виде 33%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) по мере увеличения числа пассажей. По окончании роста в качестве посевного материала для последующих пассажей отбирали варианты, где наблюдался наиболее активный рост дрожжей (дрожжи, наиболее устойчивые к  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Пересев проводился, как правило, один раз в сутки. По ходу пассирования по окончании роста в каждом пассаже отбирались аликвоты суспензии дрожжей, которые помещались в анаэробные условия в колбы с минеральной средой и содержанием сахарозы 100 г/л вместо зернового сусла и определялась бродильная активность дрожжей по скорости потребления сахарозы и объему выделяемого  $\text{CO}_2$ .

В первом варианте, при адаптации обсемененной производственной культуры дрожжей *S. cerevisiae* Т 985 по мере увеличения числа пассажей в контроле происходило увеличение бактериальной обсемененности и уменьшение прироста био-

массы, обусловленное вытеснением культуры дрожжей дикой микрофлорой и развитием сукцессии. При пересеве же дрожжей на среду в условиях добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  по мере увеличения числа пассажей культура адаптировалась к возрастающим концентрациям пероксида, при этом дрожжи оставались доминирующими в микроценозе, а уровень бактериальной обсемененности оставался в пределах 1–10 клеток бактерий в поле зрения микроскопа. К 10–13 пассажам дрожжи могли выдерживать разовое внесение 15–30 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  без существенного замедления скорости роста (рис. 5.18). Устойчивость популяции дрожжей возрастала при увеличении количества посевного материала и была наибольшей в экспоненциальной фазе роста, при этом конечный выход биомассы повышался на 10–17%. Эффект повышения уровня накопления биомассы сохранялся и после прекращения добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  в среду культивирования на протяжении не менее 4-х пассажей (табл. 5.3).

Таблица 5.3 – Прирост биомассы адаптированных к 2 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  дрожжей 4-го пассажа при пересеве на среду без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

	№ пассажа				
	0	1	2	3	4
Прирост неадаптированных дрожжей (контроль)	2,79	2,97	2,97	2,91	2,07
Прирост адаптированных дрожжей (контроль)	3,22	3,29	3,33	3,06	3,21
% прироста адаптированных дрожжей к приросту неадаптированных	115,4	110,8	112,1	105,4	155,1

Результаты, представленные в табл. 5.3 и на рис. 5.18, показали, что в неасептических условиях при постоянном селективном давлении на популяцию дрожжей-сахаромицетов, вызываемым пероксидом водорода на фоне освещения среды культивирования видимым светом, возможен отбор популяций дрожжей, доминирующих в ценозе, устойчивых к относительно большим дозам вносимого  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Популяция преадаптированных дрожжей имеет высокую удельную активность каталазы, достаточную для сравнительно быстрого распада  $\text{H}_2\text{O}_2$  и преодоления последствий оксидативного стресса, индуцированного его внесением. При этом, чем больше плотность дрожжевой популяции и активнее ее рост, тем выше суммарная активность каталазы и быстрее происходит распад  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

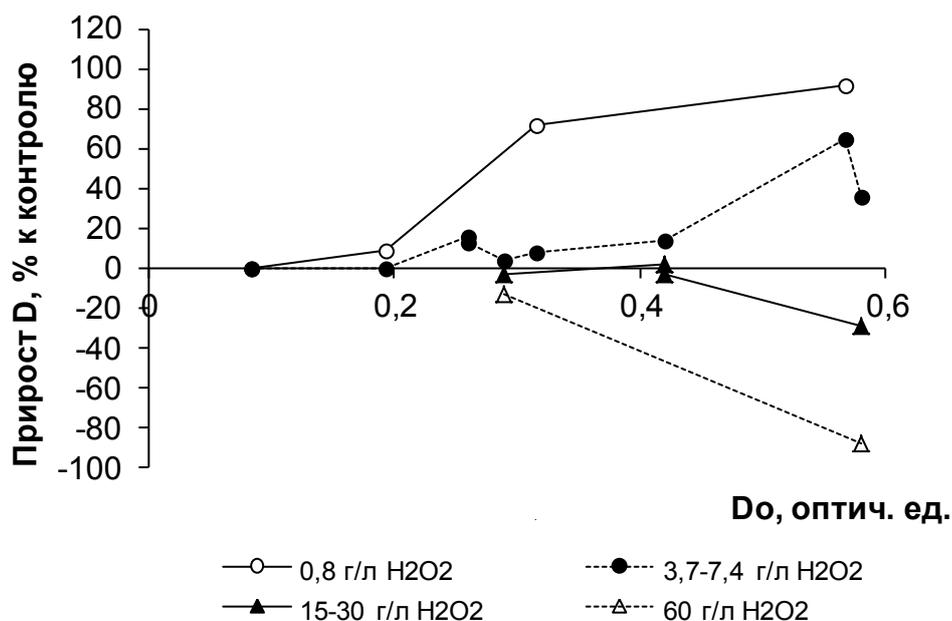


Рисунок 5.18 – Влияние дозы внесенного  $\text{H}_2\text{O}_2$  на прирост дрожжевой массы после 5 ч культивирования. Использовались дрожжи 10–13 пассажей.

По результатам экспериментов оптимальная разовая доза внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  при выращивании посевного материала в аэробных периодических условиях составляла не более 1 г/л, при этом выяснили, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  лучше всего вносить на стадии активного роста при концентрации клеток дрожжей не менее 0,2–0,5 г асд/л.

Во втором варианте провели эксперименты с адаптацией к перексиду водорода чистой линии дрожжей, выделенной из производственной культуры в отсутствие посторонней микрофлоры. Ввели 4 линии дрожжей *S. cerevisiae* Meyen T 985 в аэробных условиях на свету на среде с сахарозой (100 г/л):

Линия 1 – без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  с дрожжами, адаптированными к  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Линия 2 – с внесением 40–200 мг/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ходе пассажей.

Линия 3 – с внесением 20–120 мг/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ходе пассажей.

Линия 4 – контроль без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  и с неадаптированными к  $\text{H}_2\text{O}_2$  дрожжами.

Результаты исследований представлены на рис. 5.19–5.21.

Видно, что в аэробных условиях также наблюдается адаптация производственной линии дрожжевых клеток к  $\text{H}_2\text{O}_2$  после 8–9 пассажей. Это проявляется в уменьшении числа мертвых клеток в конце фазы брожения (рис. 5.19), снижении остаточной концентрации сахара (рис. 5.20), повышении бродильной активности (рис. 5.21). Одновременно снижается бактериальная обсемененность дрожжевой популяции.

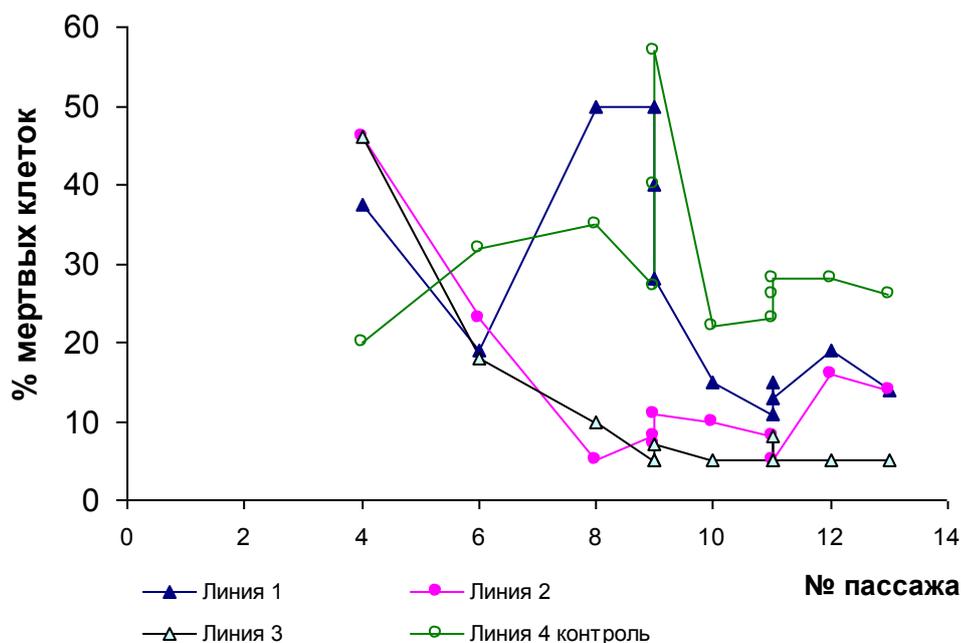


Рисунок 5.19 – Изменение % мертвых клеток по мере адаптации дрожжей к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в аэробных условиях.

Линия 1 – без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с дрожжами, адаптированными к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Линия 2 – с внесением 40–200 мг/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ходе пассажей

Линия 3 – с внесением 20–120 мг/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ходе пассажей

Линия 4 – контроль без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и с неадаптированными к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> дрожжами

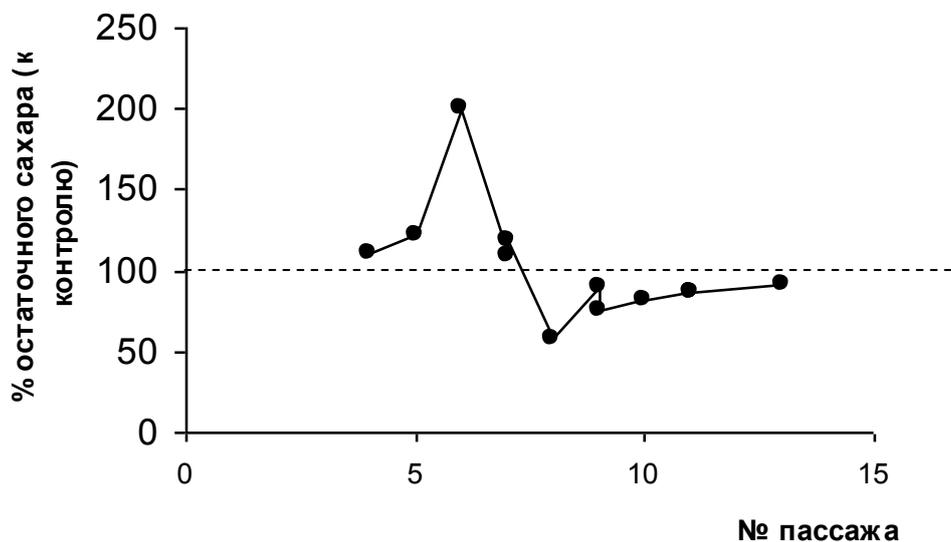


Рисунок 5.20 – % остаточного сахара в середине фазы брожения по мере адаптации клеток линии 3 к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в аэробных условиях в сравнении с клетками линии 4 (без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – контроль).

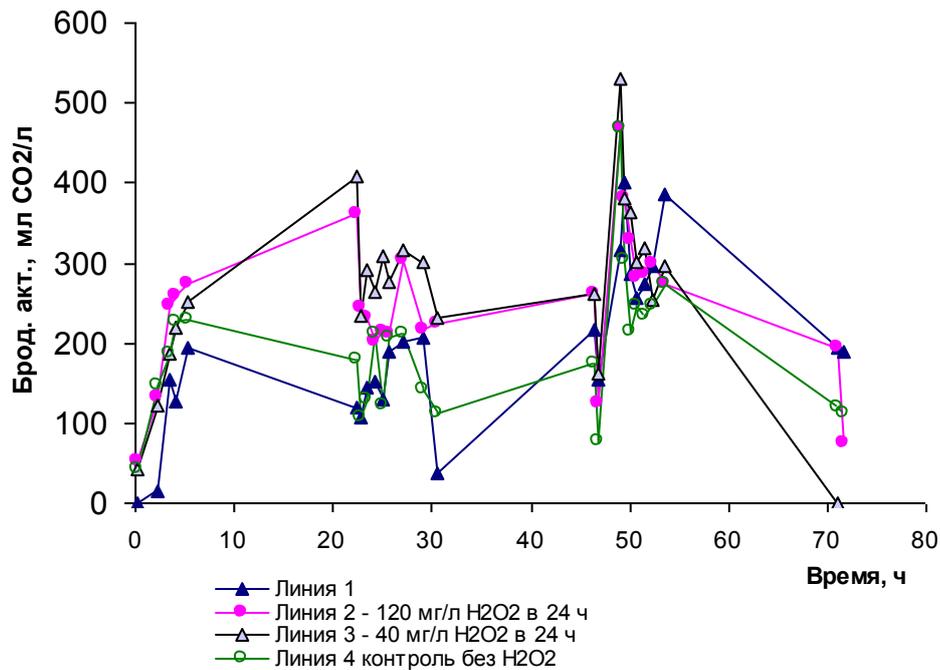


Рисунок 5.21 – Изменение бродильной активности дрожжей 9-го пассажа по ходу брожения.

Линия 1 – без внесения  $H_2O_2$  с дрожжами, адаптированными к  $H_2O_2$ .

Линия 2 – с внесением 120 мг/л  $H_2O_2$  в ходе пассажей

Линия 3 – с внесением 40 мг/л  $H_2O_2$  в ходе пассажей

Линия 4 – контроль без внесения  $H_2O_2$  и с неадаптированными к  $H_2O_2$  дрожжами

Таким образом, эффект улучшения показателей биосинтеза (выхода биомассы, бродильной активности) при добавлении  $H_2O_2$  может быть обусловлен как снижением обсемененности культуры, так и физиологическими изменениями, которые приводят, в частности, к уменьшению доли мертвых клеток в популяции (рис. 5.19).

Как следует из данных, приведенных на рис. 5.22 и 5.23, действие мягкого ультрафиолета во многом аналогично действию пероксида водорода, при этом решающее значение для адаптации имеет фактор освещения. Доля мертвых клеток, подвергнутых действию одной и той же дозы пероксида либо УФ-излучения, при последующем нахождении в темноте составляет около 90% и 80% соответственно для 1-го пассажа. Без освещения доля мертвых остается высокой и к 10-ому пассажу: примерно 70% при воздействия пероксида (рис. 5.22) и 60% при воздействии УФ (рис. 5.23).

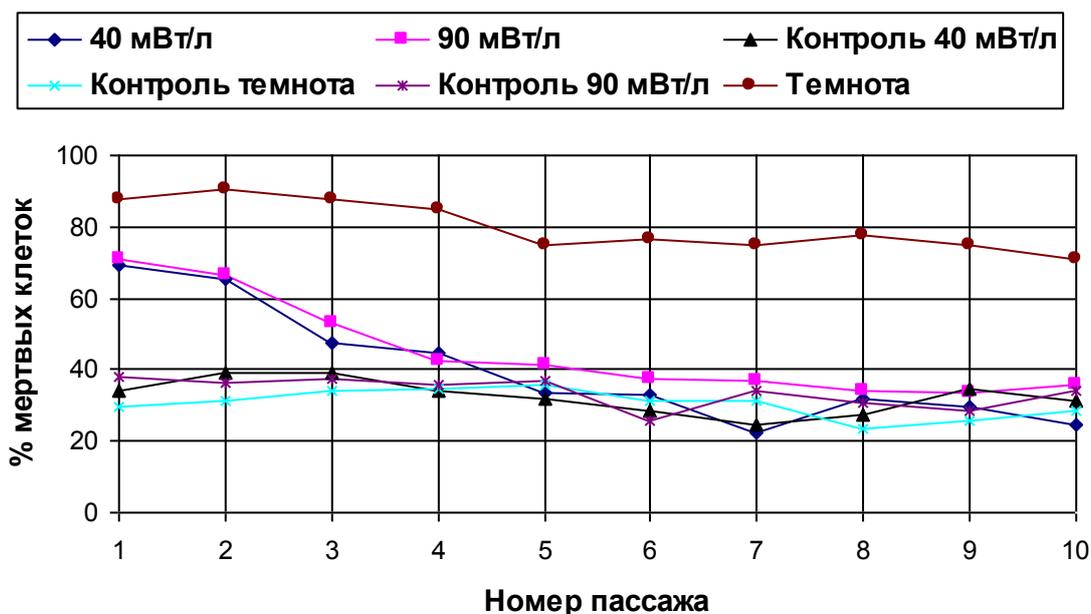


Рисунок 5.22 – Изменение доли мертвых клеток в пассажирах штамма Т 985 по мере адаптации к оптимальным дозам пероксида водорода при различном уровне освещенности среды.

Культивирование в колбах в аэробных условиях, начальная концентрация субстрата 30 г/л. Измерение доли мертвых клеток проводилось через 3 часа после воздействия пероксида.

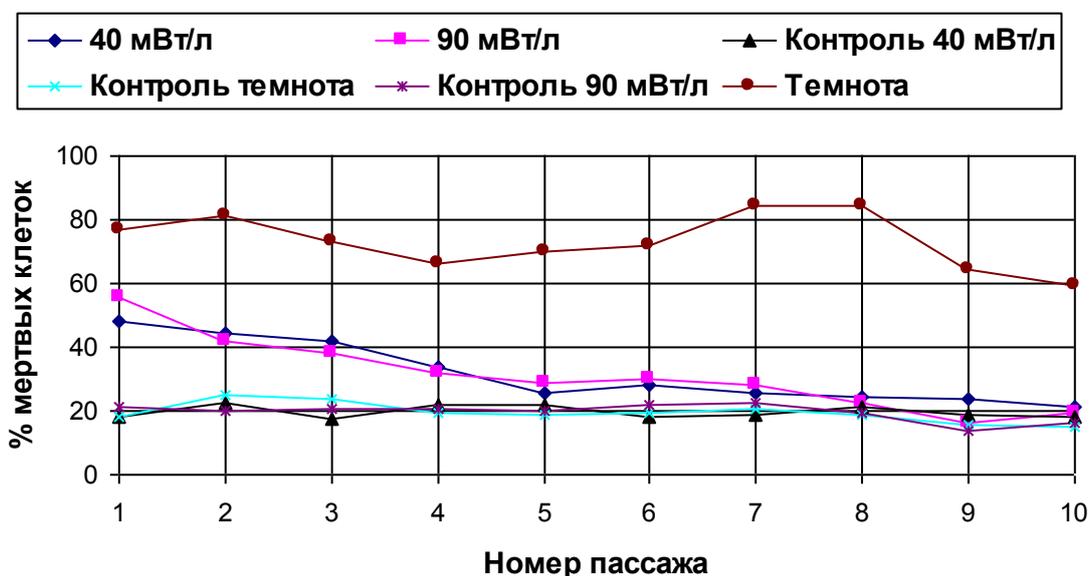


Рисунок 5.23 – Изменение доли мертвых клеток в пассажирах штамма Т 985 по мере адаптации к воздействию мягкого УФ при различном уровне освещенности среды.

Условия культивирования и измерения аналогичны рис. 5.22.

При освещении же среды доля мертвых клеток падает до уровня в контроле (без воздействия стресс-фактора) уже к 5-му пассажу. При этом возрастание интенсивности освещения с 40 мВт/л до 90 мВт/л не сказывается существенно на выживаемости и скорости адаптации клеток. Таким образом, достаточно рассеянного света с интенсивностью 40 мВт/л, чтобы восстановить жизнеспособность клеток. В полной темноте клетки не адаптируются ни к УФ, ни к  $H_2O_2$  и погибают. Свет в данном случае, также как и для дрожжей р. *Candida*, выступает как антистрессор, помогающий клеткам преодолевать последствия оксидативного воздействия, вероятно, через механизм фоторепарации.

Адаптационные изменения и улучшение показателей биосинтеза при контролируемом оксидативном стрессе, различия результатов культивирования на свету и в темноте подтвердились при проведении ферментации в биореакторе в контролируемых условиях.

Эксперименты проводились в лабораторном биореакторе с контролем и поддержанием рН (4–4,5), при достатке кислорода в среде, или в анаэробном режиме, при уровне освещенности содержимого биореактора не менее 40 мВт/л (освещение лампами дневного света через стеклянную обечайку биореактора) или в темноте, и отслеживанием динамики накопления биомассы, потребления субстрата, изменения сопутствующих показателей при использовании в качестве инокулята (объем внесения 6% от объема ферментационной среды) неадаптированных и адаптированных к пероксиду (5-й и 10-й пассажи) дрожжей.

На рис. 5.24 представлены результаты культивирования неадаптированных и адаптированных дрожжей штамма Т 985 в аэробных условиях в лабораторном биореакторе на среде с исходным содержанием сахарозы 30 г/л и освещением биореактора.

При использовании дрожжей 5-го пассажа конечный уровень накопления биомассы в аэробных условиях культивирования увеличивается на 11% по сравнению с неадаптированным (контрольным вариантом), а при использовании 10-го пассажа – на 18%, при этом экономический коэффициент потребления субстрата  $Y$  в контроле составляет 0,087, а при использовании линии десятого пассажа увеличивается до 0,103.

Для линии 10-го пассажа, полученной с внесением  $H_2O_2$ , доля мертвых клеток на всем протяжении роста ниже, чем в контрольной линии. Добавление пероксида водорода (0,6 г/л, момент внесения показан на рис. 5.24) в предстационарную фазу приводит к лизису клеток в контрольном варианте (рис. 5.24А): на момент окончания опыта после внесения  $H_2O_2$  доля мертвых клеток достигает 68,3%, уровень биомассы падает на 37% по сравнению с тем же вариантом без внесения пероксида.

При культивировании же адаптированных дрожжей наблюдается даже некоторое увеличение выхода биомассы после добавления пероксида по сравнению с вариантами без внесения  $H_2O_2$ . К концу опыта после внесения пероксида водорода при культивировании дрожжей 5-го пассажа на свету доля мертвых клеток составляет 33%, а 10-го пассажа – 20,9% (рис. 5.24В, 5.24С).

Как и при культивировании в колбах, при выращивании адаптированных к пероксиду линий дрожжей для возникновения физиологически благоприятных изменений важно освещение содержимого ферментационной среды видимым светом. В темноте после внесения  $H_2O_2$  в предстационарной фазе культивирования через 10 ч доля мертвых клеток составляла 73,4%, а на свету 33%, при этом для адаптированной линии на свету внесение  $H_2O_2$  не приводило к лизису клеток (рис. 5.24В). В контрольной же, неадаптированной линии на свету наблюдался лизис клеток (рис. 5.24А).

Положительные изменения у адаптированных линий дрожжей сказываются и на уменьшении лаг-фазы (рис. 5.25). По сравнению с контролем, продолжительность лаг-фазы при засеве дрожжей 10-го пассажа снижается более чем в 2 раза. При культивировании дрожжей неадаптированных, 5-го и 10-го пассажей значения удельных скоростей роста в экспоненциальной фазе изменялись незначительно и составляли около  $0,26 \text{ ч}^{-1}$ . Однако скорость потребления субстрата в контроле выше, чем при использовании преадаптированных линий, что можно объяснить менее экономным потреблением субстрата дрожжами контрольной линии.

Сразу же после внесения  $H_2O_2$  наблюдается кратковременное (продолжительность 1–2 мин) резкое увеличение содержания кислорода в среде, обусловленное выделением его при разложении пероксида. Однако в варианте с адаптированной к  $H_2O_2$  культуры затем происходит резкое падение величины  $pO_2$  (рис. 5.26), что свидетельствует об усилении ее дыхательной активности по сравнению с неадаптированным вариантом.

Положительные изменения у адаптированных к  $H_2O_2$  линий наблюдаются и в изменении бродильной активности после переноса из аэробных условий в анаэробные. В целенаправленно проведенных экспериментах дрожжи вносились в среду в биореакторе и выращивались в течении 27 ч в аэробных условиях на среде с 30 г/л сахарозы при освещении биореактора или в темноте. Затем содержимое биореактора сливалось до объема 1 л, добавлялся 1 л свежей стерильной среды, при этом после добавления свежей среды концентрация сахарозы в среде составляла 150 г/л, и процесс ферментации продолжался в анаэробных условиях без внесения  $H_2O_2$ , при освещении биореактора или в темноте.

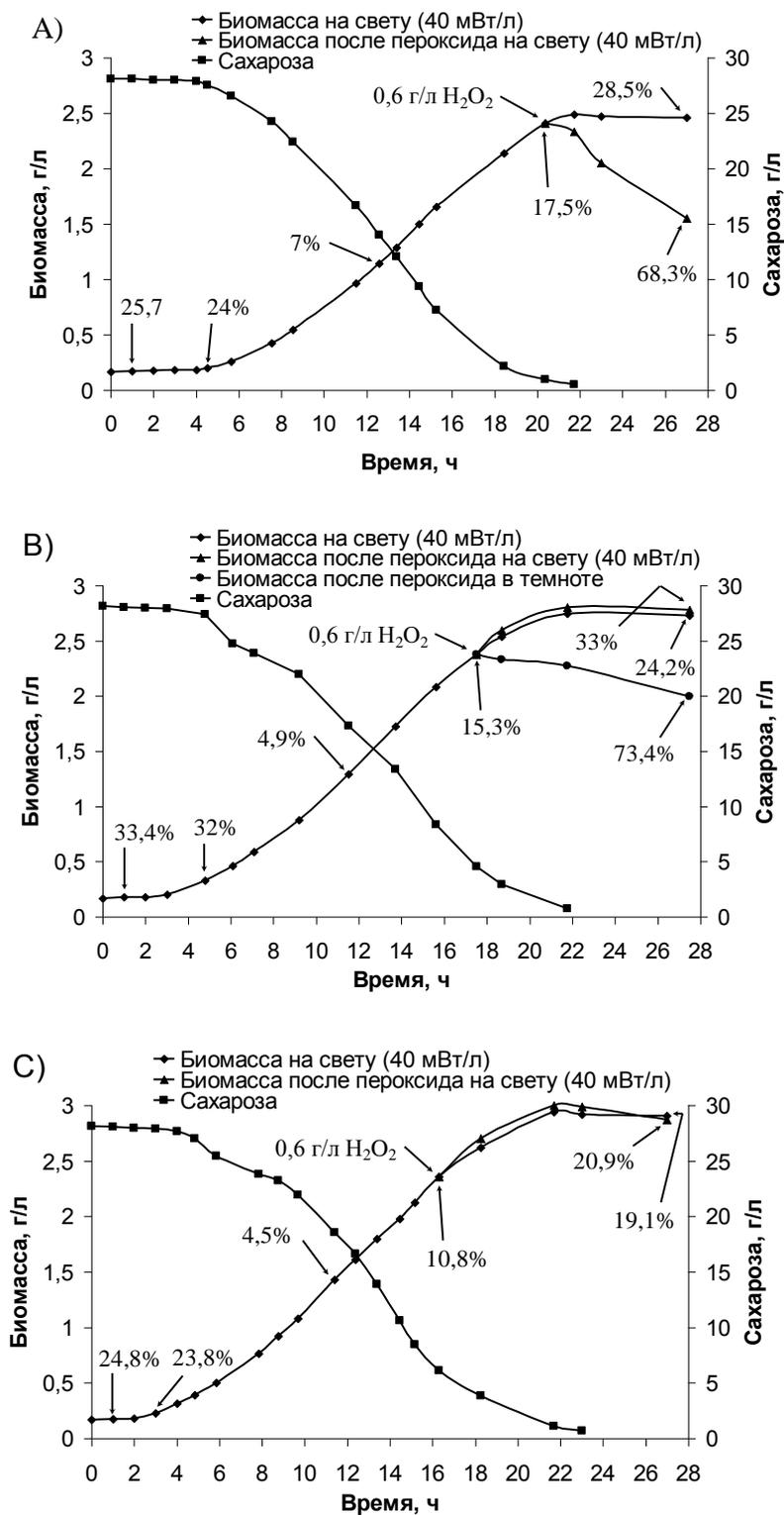


Рисунок 5.24 – Накопление биомассы и потребление субстрата штаммом сахаромицетов *Meuен T 985* при росте в аэробных условиях в биореакторе (сахароза 30 г/л).

А – неадаптированная к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> культура (контроль); В – адаптированная к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> линия 5-го пассажа; С – адаптированная к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> линия 10-го пассажа.

Цифрами у стрелок указана доля мертвых клеток.

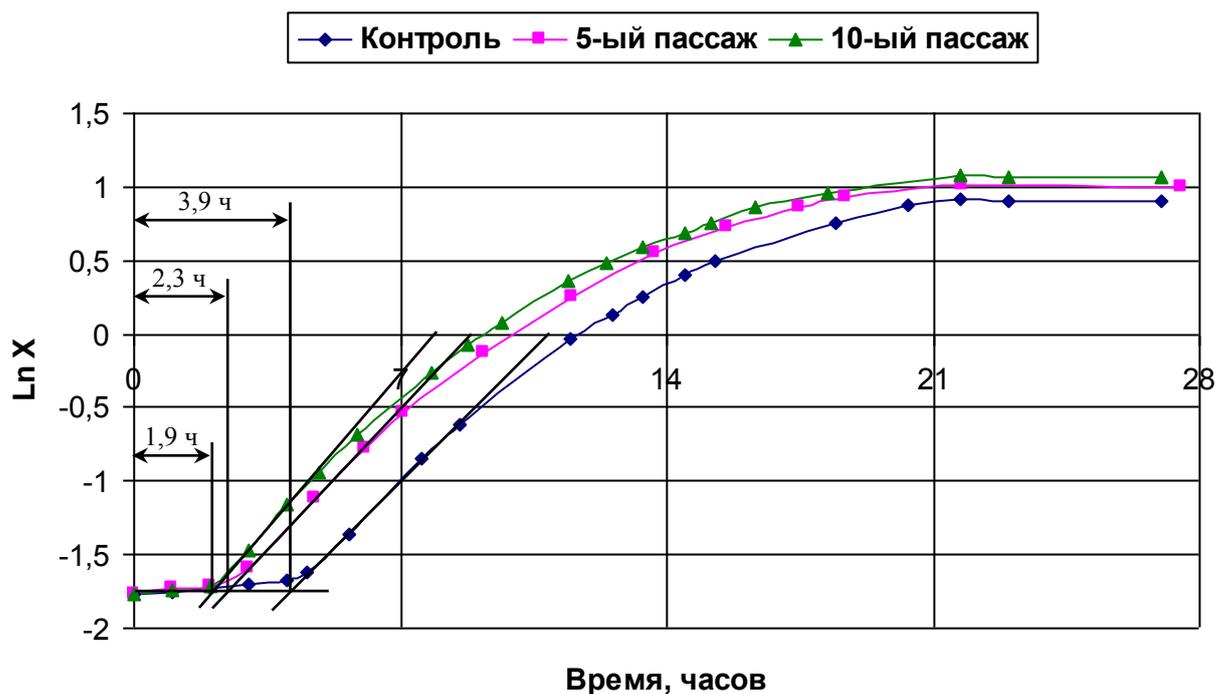


Рисунок 5.25 – Определение лаг-фазы при культивировании дрожжей штамма Т 985 неадаптированных, 5-го и 10-го пассажей.

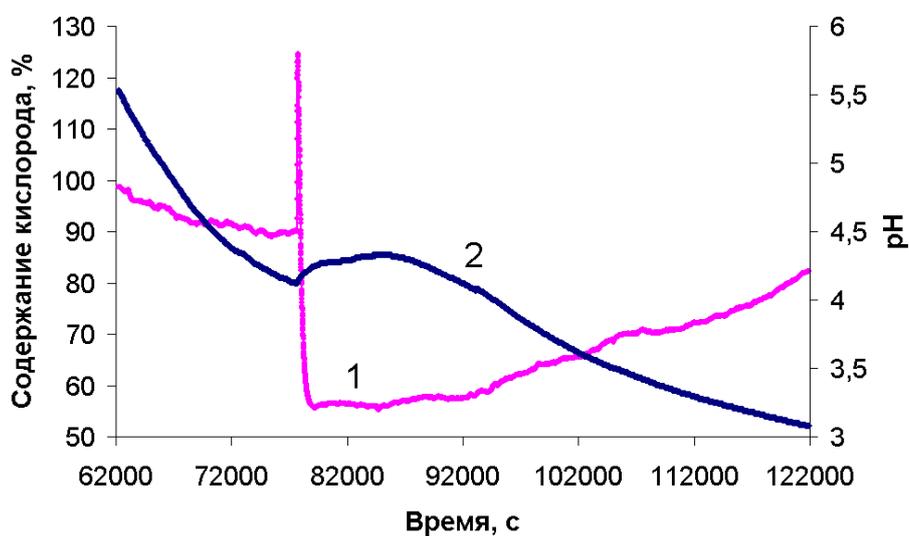


Рисунок 5.26 – Изменение дыхательной активности при культивировании после внесения  $H_2O_2$ .

1 - адаптированный 10-ый пассаж; 2 – контрольный, неадаптированный вариант

На рис. 5.27А–5.27D представлены результаты культивирования дрожжей штамма Т 985 неадаптированной и 5-го и 10-го пассажей адаптированных к  $H_2O_2$  линий в анаэробных условиях при освещении биореактора.

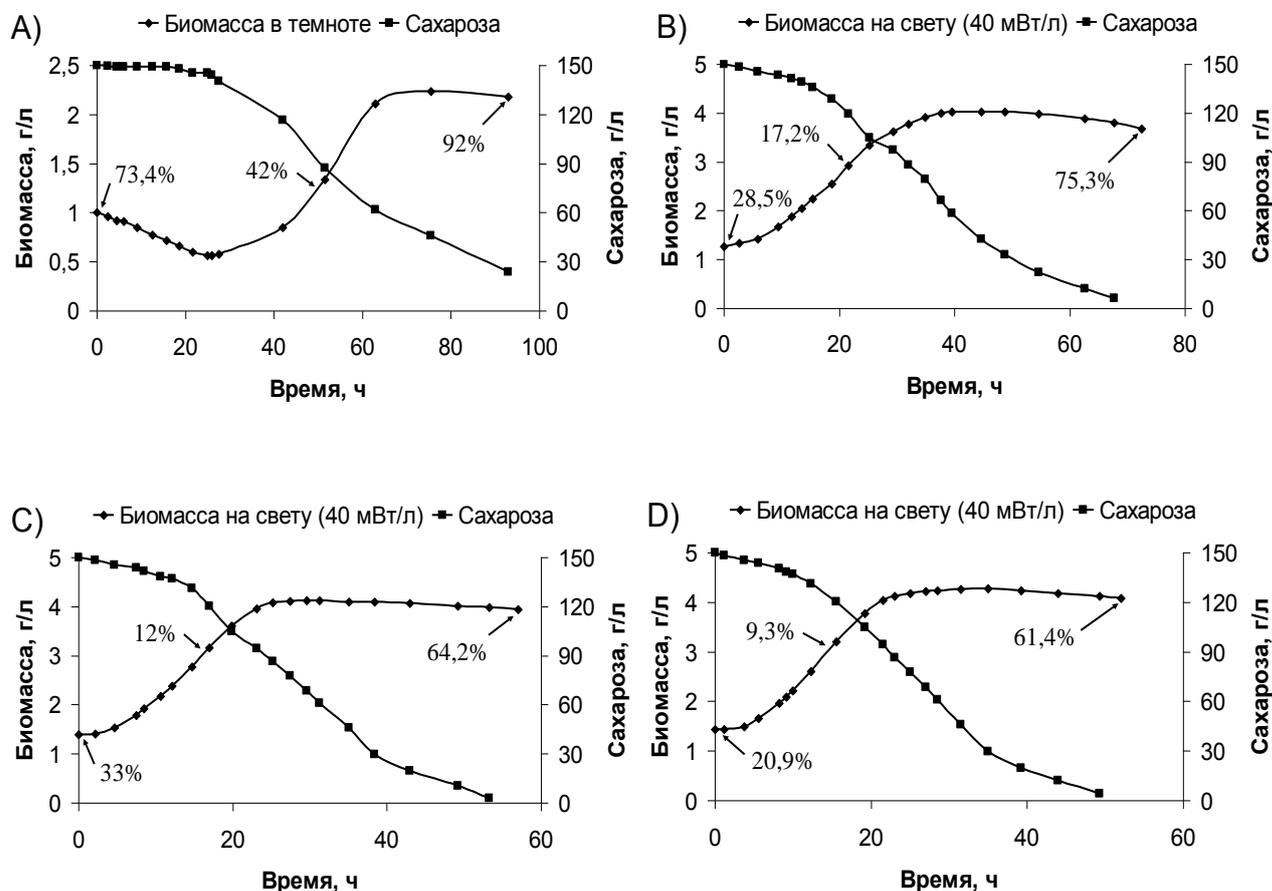


Рисунок 5.27 – Динамика накопления биомассы и потребления субстрата клетками штамма Меуен Т 985 при анаэробном культивировании в биореакторе.

А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост в темноте; В – неадаптированная культура (контроль), рост на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), рост на свету.

Цифрами у стрелок указана доля мертвых клеток.

Во всех вариантах лаг-фаза роста была примерно одинаковая (около 3 ч). Однако удельные скорости роста биомассы в экспоненциальной фазе были у адаптированных линий выше и составляли  $0,067 \text{ ч}^{-1}$  – для линии 10-го пассажа,  $0,059 \text{ ч}^{-1}$  – для линии 5-го пассажа и  $0,046 \text{ ч}^{-1}$  – для неадаптированных дрожжей.

В темновых условиях ферментации использование пероксида водорода на стадии подготовки посевного материала и адаптированных линий дрожжей приводило к резкому ухудшению показателей брожения (рис. 5.27, вариант А). Лаг-фаза

в этом случае составляла 47 ч, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе –  $0,044 \text{ ч}^{-1}$ , а конечный выход биомассы снизился на 40%. Резко выросла и доля мертвых клеток: в середине экспоненциальной фазы роста – до 42%, к концу культивирования – до 92%. При этом бродильная активность была невелика, продолжительность брожения составила более 93 ч, а выход спирта – всего 4,1%.

По окончании брожения концентрация сахарозы во всех вариантах не превышала 1 г/л. Доля мертвых клеток в экспоненциальной и стационарной фазах роста в вариантах с адаптированными дрожжами была ниже.

Выделение углекислого газа во всех вариантах начиналось примерно через 20 мин. после долива свежей среды и перехода в анаэробный режим культивирования. Однако в культурах, растущих при освещении и засеянных клетками линий, адаптированных к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , брожение было существенно интенсивнее (рис. 5.28С, D) по сравнению как с темновым вариантом (рис. 5.28А), так и с контрольной культурой, засеянной клетками, не подвергавшимися воздействию пероксида водорода (рис. 5.28В). Наибольшая скорость сбраживания субстрата наблюдалась при использовании адаптированных дрожжей 10-го пассажа, несколько ниже, но тем не менее превышающая уровень контроля – при использовании дрожжей 5-го пассажа. 10-ый преадаптированный пассаж завершал брожение через 52 ч, 5-ый – через 57 ч, а контроль с неадаптированной линией на свету – через 72,5 ч.

Содержание этанола во всех вариантах было практически одинаково и составляло 6,2–6,4%.

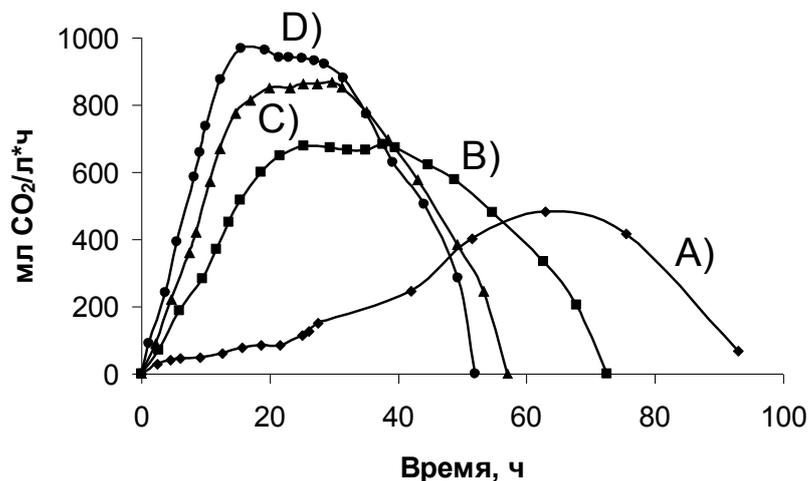


Рисунок 5.28 – Бродильная активность при анаэробном культивировании штамма сахаромицетов Meуen T 985 в биореакторе.

А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), брожение в темноте; В – неадаптированная культура (контроль), брожение на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), брожение на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), брожение на свету.

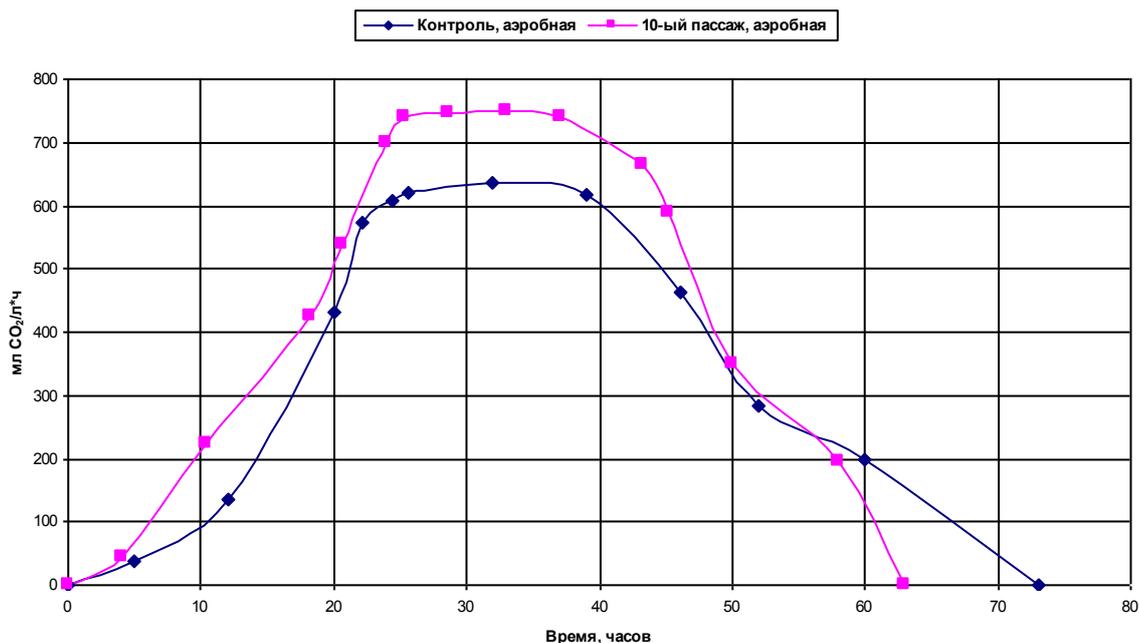


Рисунок 5.29 – Сопоставление изменения бродильной активности неадаптированной и адаптированной линий дрожжей штамма SL-100 при культивировании в анаэробных условиях при освещении среды и подготовке посевного материала в аэробных условиях.

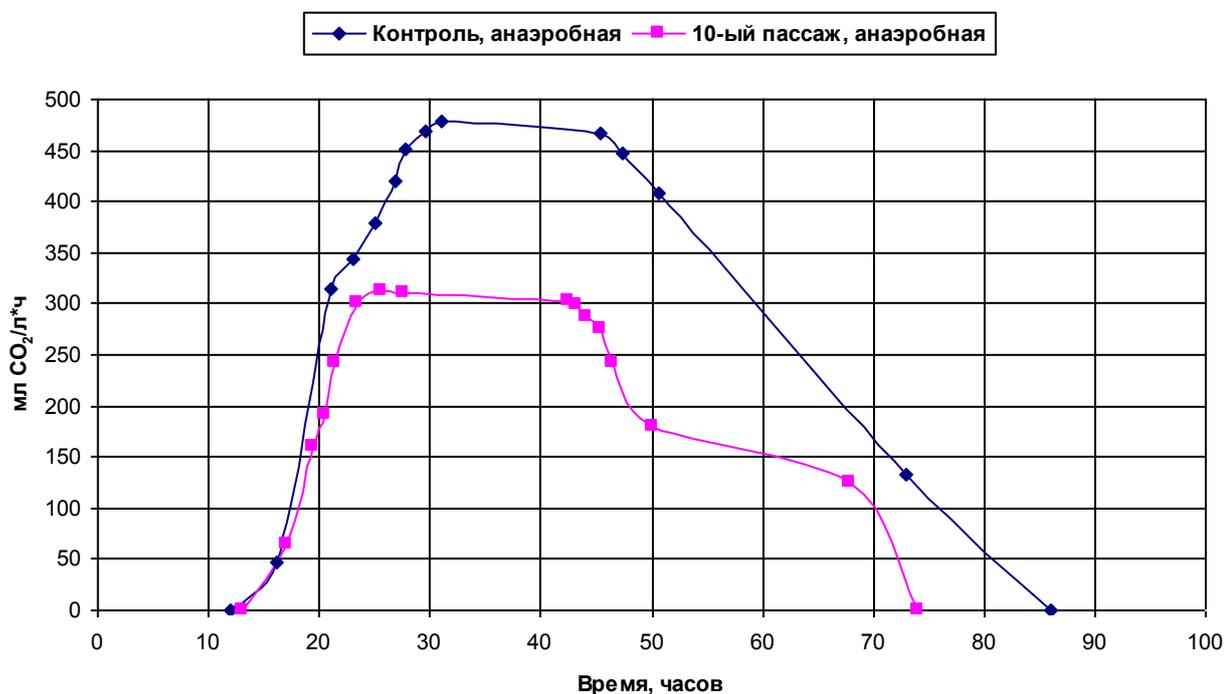


Рисунок 5.30 – Сопоставление изменения бродильной активности неадаптированной и адаптированной линий дрожжей штамма SL-100 при культивировании в анаэробных условиях при освещении среды и подготовке посевного материала в анаэробных условиях.

Аналогичные закономерности наблюдались для штамма SL-100. Доля мертвых клеток на протяжении всех стадий роста и брожения была ниже при использовании адаптированной линии по сравнению с долей в случае использования контрольной, неадаптированной линии дрожжей. Такие изменения вели к повышению бродильной активности (рис. 5.29) и выхода этанола. Выход спирта при выращивании посевного материала в аэробных или микроаэрофильных условиях в контрольном варианте составил 4,1–4,4%, а при использовании адаптированных дрожжей 10%-го пассажа – 4,7–5,1%. Остаточная концентрация сахарозы во всех случаях была ниже 1 г/л.

В то же время при использовании линии дрожжей, которую пытались адаптировать к  $H_2O_2$  путем пересевов в анаэробных условиях, показатели роста и брожения резко ухудшались (рис. 5.30). Доля мертвых клеток была высокая и превышала уровень в контроле на протяжении всех фаз культивирования. Лаг-фаза в контроле составила 7,5 ч, а при использовании «адаптированной» линии 10-го пассажа – 9 ч. Несмотря на то, что во втором случае уровень накопления биомассы был существенно выше, бродильная активность штамма, обработанного пероксидом водорода, была ниже. Выход спирта в контроле составил 3,7%, а при использовании «адаптированной» линии – всего 1,9%. Во всех случаях в среде к концу брожения остаточное содержание сахарозы было высоким.

Полученные результаты подтверждают факт отсутствия адаптации дрожжей штамма SL-100 к пероксиду в анаэробных условиях (см. рис. 5.16).

Закономерен вопрос, чем может быть обусловлено благоприятное воздействие пероксида водорода на скорость накопления и выход биомассы, бродильную активность. Можно было бы предположить, что при культивировании в колбах без рН-статирования повышение выхода биомассы при адаптации к  $H_2O_2$  следует из способности дрожжей развиваться при более низких рН, поскольку благоприятные эффекты не наблюдаются при невысоких концентрациях сахарозы в среде (5 г/л). В последнем случае рН не успевает понизиться до достаточно низких значений к концу культивирования. Однако такому предположению противоречат результаты экспериментов, проведенные в биореакторе с поддержанием оптимального рН.

Другое объяснение может быть основано на стимулировании синтеза стерина и ненасыщенных жирных кислот при действии окислительных стрессоров. У дрожжей-сахаромицетов особую роль в поддержании функций клеточных мембран, высокой бродильной активности, жизнеспособности клеток и устойчивости их к этанолу играет эргостерин (провитамин  $D_2$ ). Внесение, например, эргостерина во время брожения усиливает бродильную активность, ауксотрофы по эргостерину начинают бродить в анаэробных условиях только после внесения эргостерина. Эр-

гостерин не синтезируется в строго анаэробных условиях, но уже микроаэрофильного окружения достаточно для синтеза его в микроколичествах, необходимых для клетки и для поддержания бродильной активности [1144]. Поэтому на производстве подготовку посевного материала проводят в микроаэрофильных условиях в присутствии небольших количеств молекулярного кислорода в среде культивирования, которые необходимы для синтеза ими стерина, в частности, эргостерина, и ненасыщенных жирных кислот [917, 1145].

Также известно, что синтез эргостерина усиливается при обработке клеток УФ излучением, что используется при его получении в реальном промышленном процессе [1146], т.е. воздействие стрессовых факторов на дрожжевые клетки может вести к адаптационным изменениям, сопровождающимися накоплением эргостерина. Стимулирующее действие на образование стерина дрожжами оказывают ингибиторы гликолиза, в качестве которых могут выступать различные химические окислители, УФ- и рентгеновское излучение. Таким образом, воздействие стресс-факторов может использоваться в промышленных условиях для повышения выхода эргостерина, синтезируемого дрожжами *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, которые содержат его до 3–4 % по сухому весу, а некоторые штаммы при продолжительной инкубации до 8–10%.

Если предположение об индукции эргостерина оксидативным стрессом верно, то можно было бы ожидать, что эффект адаптации к пероксиду водорода или ультрафиолету будет проявляться и при анаэробных условиях культивирования, чего, однако, не наблюдается для штамма SL-100 (рис. 5.16, 5.30). Кроме того, такое предположение кажется неубедительным и потому, что положительный эффект наблюдается в аэробных условиях, когда в среде достаточно кислорода для синтеза необходимых компонентов клеточных мембран: и в присутствии пероксида, и в отсутствие его. Также трудно объяснить тот факт, что при невысоких концентрациях сахарозы в исходной среде (порядка 5 г/л) эффект адаптации не наблюдается.

Надо отметить, в наших экспериментах возникают схожие эффекты, наблюдаемые как при совместном действии пероксида водорода и видимого света, так и ближнего ультрафиолета и видимого света, т.е. в общем случае – активных форм кислорода. Данные литературы, рассмотренной в главе 2, о наличии в клетках одних и тех же рецепторов, реагирующих на ближний ультрафиолет и на  $H_2O_2$  [938-940], и о кооперативном функционировании различных систем ответа на стресс и систем репарации при внутриклеточных повреждениях в стрессовых ситуациях подтверждают возможность такого схожего действия.

Следуя данным [332, 348, 548, 619, 811], одно из возможных объяснений благоприятных изменений, наряду с повышением доли жизнеспособных клеток в по-

пуляции, может заключаться в дерепрессии под действием АФК ( $H_2O_2$ , УФА-, УФБ-излучения) путей анаболизма, репрессируемых высокими концентрациями сахарозы. Действие стрессора повышает внутриклеточный пул NADPH, особенно необходимый для функционирования аппарата трансляции, активирует системы ответа на оксидативный стресс и пентозофосфатный цикл – ключевой для анаболических путей биосинтеза. Его содержание может зависеть от внутриклеточной концентрации  $H_2O_2$ .

С другой стороны, известно, что высокие концентрации сбраживаемых углеводов у дрожжей-сахаромицетов активируют гликолиз и репрессируют аэробные пути анаболизма даже в присутствии кислорода (эффект Кребтри) [1146]. Одновременно репрессируется пентозофосфатный цикл, а с этим и реакции конструктивного обмена. Это приводит к снижению выхода биомассы при повышении концентрации сахаров в среде, что наблюдалось и в наших опытах. Так, при росте на среде с 5 г/л сахарозы конечный уровень накопления биомассы (штамм Т 985) в контроле составил 2,4–2,5 г/л, а с 30 г/л сахарозы – 2,1–2,3 г/л при полном сбраживании субстрата.

Дополнительные данные, свидетельствующие в пользу дерепрессии аэробных путей анаболизма под действием  $H_2O_2$ , были получены нами в ходе изучения изменений в динамике роста биомассы, потребления субстрата, дыхательной активности.

Таким образом, наблюдаемые изменения – повышение выхода биомассы, возрастание дыхательной и бродильной активности свидетельствуют в пользу предположения о дерепрессии анаболических путей под действием пероксида водорода, что, наряду с повышением доли живых клеток, влечет за собой положительные изменения в отношении роста дрожжей-сахаромицетов и их бродильной активности. При этом важное значение для возникновения благоприятных изменений имеет фактор освещения клеток дрожжей видимым светом. Исходя из этого предположения, положительные эффекты комбинированного действия стресс- и антистресс-факторов можно объяснить как сумма двух эффектов: с одной стороны, дерепрессия пентозофосфатного цикла и реакций конструктивного обмена в случае высоких концентраций углеводов в среде, с другой, нивелирование отрицательного последствия стресса под действием антистрессоров, в частности, системы фоторепарации, при этом повышенное содержание NADPH и активность пентозофосфатного цикла сохраняются.

В анаэробных условиях культивирования эти физиологические изменения могут неоднозначно влиять на рост и бродильную активность дрожжей. Конечный результат будет определяться лимитирующим фактором. С одной стороны, если лимитирование определяется жизнеспособностью клеток, их физиологической актив-

ностью, то повышение этих показателей может способствовать и повышению их бродильной активности в условиях анаэробнобиоза. С другой стороны, как следует из данных литературы, внесение пероксида водорода репрессирует в первую очередь гликолиз и если лимитирующей стадией брожения является именно гликолиз, то в анаэробных условиях следует ожидать подавления бродильной активности в адаптированных линиях дрожжей.

Результаты экспериментов, проведенных в биореакторе в анаэробных условиях со штаммами T 985 и SL-100, адаптированными к  $H_2O_2$ , показали, что бродильная активность адаптированных линий дрожжей может быть выше, т.е. более важен фактор поддержания высокой доли жизнеспособных клеток в популяции и их физиологической активности.

Проведенные исследования позволили предложить новый способ ведения процесса спиртового брожения с заменой традиционных для спиртовой промышленности средств термической стерилизации и закисления среды при получении условно-чистой культуры посевного материала на дрожжи, преадаптированные к пероксиду водорода, с целью уменьшения инфицированности процесса и повышения их бродильной активности.

В этом случае подготовку посевного материала целесообразно проводить в аэробных или микроаэрофильных условиях при совместном воздействии  $H_2O_2$  или мягкого ультрафиолета диапазона УФА/УФБ. Такую стресс-индуцированную линию дрожжей необходимо вести постоянно, т.е. путем периодических пересевов на среду с содержанием сбраживаемых углеводов 30 г/л и более, периодическим внесением  $H_2O_2$  в дозах 0,3–0,6 г/л при содержании дрожжевых клеток в ферментационной среде не менее 1–2 г/л в условиях освещения среды культивирования видимым светом при уровне энергетической освещенности порядка 20–100 мВт/л. В этом случае могут быть получены культуры микроорганизмов, устойчивые к воздействию отмеченных доз  $H_2O_2$ , при этом для адаптации микробных популяций и получения положительных эффектов требуется от 3 до 8 пассажей (10–30 микробных генераций). Преадаптированное к оксидативному стрессу состояние сохраняется на протяжении не более 2–3 пассажей (около 8–12 микробных генераций). Накапливать биомассу микроорганизмов следует в биореакторе в аэробных условиях с периодической подпиткой субстратом (неразбавленным зерновым суслон или другим) и внесением  $H_2O_2$  2–3 раза за цикл накопления небольшими порциями в количестве 0,1–1 г/л (по 100%  $H_2O_2$ ) на стадии активного роста при содержании клеток дрожжей не менее 0,2–0,5 г/л, лучше 2–3 г/л, содержании субстрата (по глюкозе или сахарозе) – 30 г/л и более. В этих условиях резкого торможения роста дрожжей не наблюдается, повышается жизнеспособность дрожжевых клеток, их

скорость роста и бродильная активность. Последующий ферментационный процесс также необходимо вести в условиях освещения видимым светом той же интенсивности, но без внесения пероксида водорода.

Оценки показывают, что обработка дрожжей малыми дозами  $H_2O_2$  и видимого света низкой интенсивности, удобная с методической, технологической и экологической точек зрения, и ведение ферментационного процесса по предложенному способу позволят поддерживать высокую физиологическую активность клеток дрожжей, повысить удельную скорость роста дрожжей, их бродильную активность на 10–30%, выход этанола на 2–5%, сократить время брожения в периодических условиях на 30%, время приготовления маточной культуры дрожжей в 2–3 раза, суммарное содержание примесей (сивушных масел, органических альдегидов и кислот) в сброженном сусле в 1,5–3 раза. При этом повышается устойчивость дрожжей к закислению среды, дольше сохраняется физиологическая активность клеток и продуктивность биореактора, снижается общая обсемененность.

Обнаруженные эффекты преадаптации к оксидативному стрессу и данные о положительном влиянии  $H_2O_2$  на показатели ферментационного процесса позволили предложить ряд запатентованных нами ресурсосберегающих решений, которые могут быть положены в основу использования новых способов культивирования и создания малосточных высокопроизводительных систем ферментации. Они предполагают получение культур микроорганизмов, приобретших устойчивость к пероксиду водорода путем ступенчатой адаптации на фоне освещения среды культивирования видимым светом, и последующее их выращивание с целью синтеза или трансформации различных соединений при внесении в среду небольших количеств  $H_2O_2$  по ходу процесса.

На предложенный способ этанольного брожения с внесением  $H_2O_2$  и освещением среды получен патент РФ. Способ может найти применение в спиртовом производстве при получении пищевого этанола и технического этанола (биотоплива).

#### **5.2.4. Культивирование молочнокислых бактерий с оксидативным воздействием**

Оксидативное воздействие было апробировано применительно к молочнокислым бактериям как возможный способ повышения их биосинтетической активности и показателей молочнокислого брожения в условиях, отклоняющихся от благоприятных. Такие отклонения могут наблюдаться при голодании по субстрату, пониженной концентрации ростовых факторов, повышенной плотности популяции, снижении pH, повышенных температурах, т.е. в условиях, которые часто возника-

ют в ферментационных процессах при отклонении технологических параметров от заданных значений. В качестве основного приема изучалось комбинированное воздействие малых доз пероксида водорода и видимого света с использованием процедуры адаптации популяции штамма-продуцента *L. paracasei* В4079 к воздействию  $H_2O_2$ .

#### 5.2.4.1. Адаптация к оксидативному стрессу и изменение показателей культивирования

Для проведения основных исследований предварительно определили разовую сублетальную дозу внесения пероксида водорода как 0,3 г/л, при которой логарифм числа жизнеспособных клеток популяции первого пассажа падает не более чем вдвое через 1 час после внесения в экспоненциально растущую популяцию бактерий с содержанием  $10^{10}$  КОЕ/мл. После экспозиции к этой разовой дозе остается  $(10^5-10^6)$ /мл жизнеспособных клеток, что достаточно для возобновления роста при последующих пассированиях к  $H_2O_2$ .

Последующее пассирование культуры проводили в колбах на базовой среде MRS на фоне воздействия сублетальных доз  $H_2O_2$  с учетом возможного влияния видимого света на стрессированную популяцию лактобацилл, в частности, через механизм фоторепарации, наличие которого у бактерии *Lactobacillus casei*, близкородственной к штамму-продуценту *L. paracasei*, было показано еще в 1959 г. [1040].

Таблица 5.4 – Варианты пассирования и показатели культивирования *L. paracasei* В4079 в колбах с внесением  $H_2O_2$  для линий первого пассажа.

Обозначение	Условия
$C_1$	Высокая (200 г/л) концентрация глюкозы, в среде мела нет
$C_{1к}$	
$T_1$	
$T_{1к}$	
$C_2$	Высокая (200 г/л) концентрация глюкозы, в среде присутствует мел
$C_{2к}$	
$T_2$	
$T_{2к}$	
$C_3$	Низкая (30 г/л) концентрация глюкозы, в среде мела нет
$C_{3к}$	
$T_3$	
$T_{3к}$	

В табл. 5.4 приведено описание вариантов ведения линий молочнокислых бактерий при пассировании. Культивирование проводилось как на свету (линии С<sub>1</sub>–С<sub>3</sub>), так и в темноте (линии Т<sub>1</sub>–Т<sub>3</sub>). Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> вносили в количестве 0,3 г/л при наступлении фазы замедленного роста (при стандартных условиях культивирования – на 18-й час после посева) во все линии С<sub>1</sub>–С<sub>3</sub> и Т<sub>1</sub>–Т<sub>3</sub>. Для каждого эксперимента вели контрольные линии молочнокислых бактерий с пассированием на той же среде, но без внесения Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (линии С<sub>1к</sub>–С<sub>3к</sub> и Т<sub>1к</sub>–Т<sub>3к</sub>).

На рис. 5.31 и 5.32 приведены данные по изменению уровня накопления биомассы в линиях на свету и в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> для вариантов, представленных в табл. 5.4.

Видно, что:

- 1) во всех контрольных линиях наблюдается постепенное падение уровня накопления биомассы по мере пассирования;
- 2) для контрольных линий на свету и в темноте различия небольшие, т.е. свет не влияет на культуры, не подвергавшиеся оксидативному стрессу;
- 3) наибольшее падение наблюдается для линий, пересеваемых при высоких концентрациях глюкозы без стабилизации рН мелом, что понятно, поскольку такие условия вызывают осмотический шок и рН шок, неблагоприятно действующие на рост и численность популяции бактерий; падение в линиях, поддерживаемых на среде с содержанием глюкозы 30 г/л, возможно, также обусловлено неблагоприятными воздействиями, а именно длительным голоданием культуры после исчерпания субстрата в среде (время культивирования в каждом пассаже в среднем составляло 48 ч);
- 4) для линии С<sub>2</sub>, поддерживаемой на свету при концентрации глюкозы в исходной среде 200 г/л и стабилизации рН мелом, и линии С<sub>3</sub>, поддерживаемой при концентрации глюкозы в исходной среде 30 г/л, наблюдается стабилизация уровня накопления биомассы после 4–5-го пассажей, существенно превышающего таковой в контрольных линиях.

Таким образом, освещение является значимым фактором при посевах с внесением Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. В условиях полной темноты (линии Т) во всех вариантах МКБ с внесением пероксида водорода росли хуже при пассировании, однако достаточно было рассеянного дневного освещения в некоторых линиях (С<sub>2</sub>–С<sub>3</sub>), чтобы показатели роста стабилизировались (рис. 5.31, 5.32). На свету молочнокислые бактерии адаптируются к действию Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, накапливают существенно больше биомассы, чем в контроле, и в этих условиях проявляют чувствительность к видимому свету относительно невысокой интенсивности.

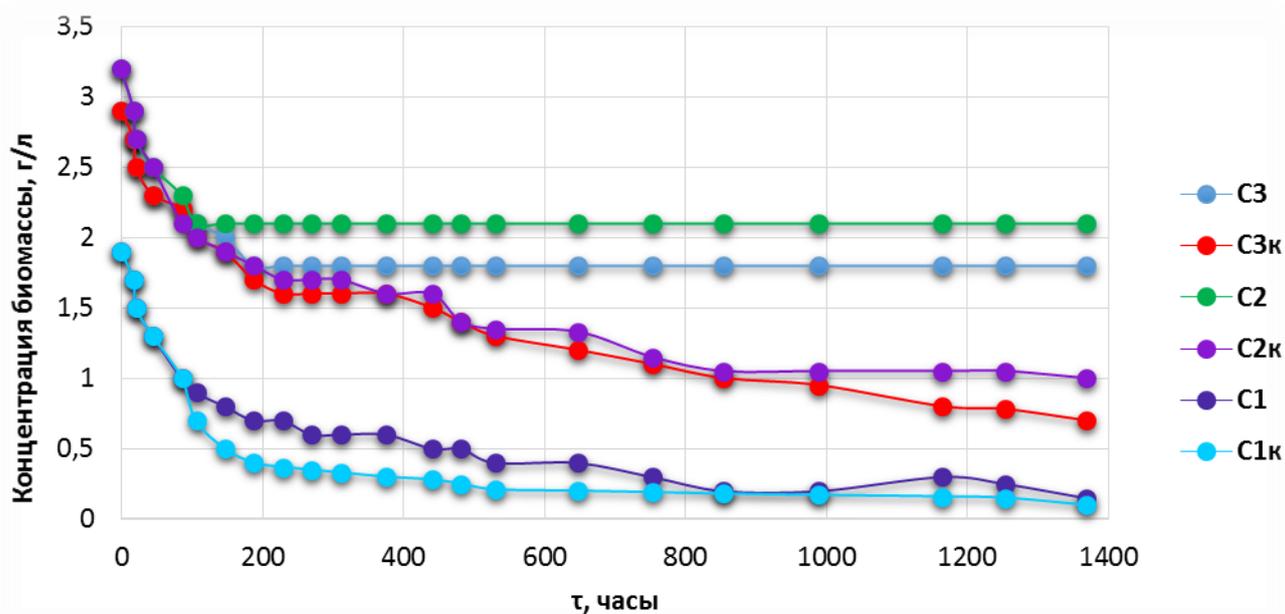


Рисунок 5.31 – Изменение конечного уровня накопления биомассы при культивировании на свету по мере увеличения количества пассажей при внесении и без внесения  $H_2O_2$  (среднее время культивирования в каждом пассаже составляло 48 час).

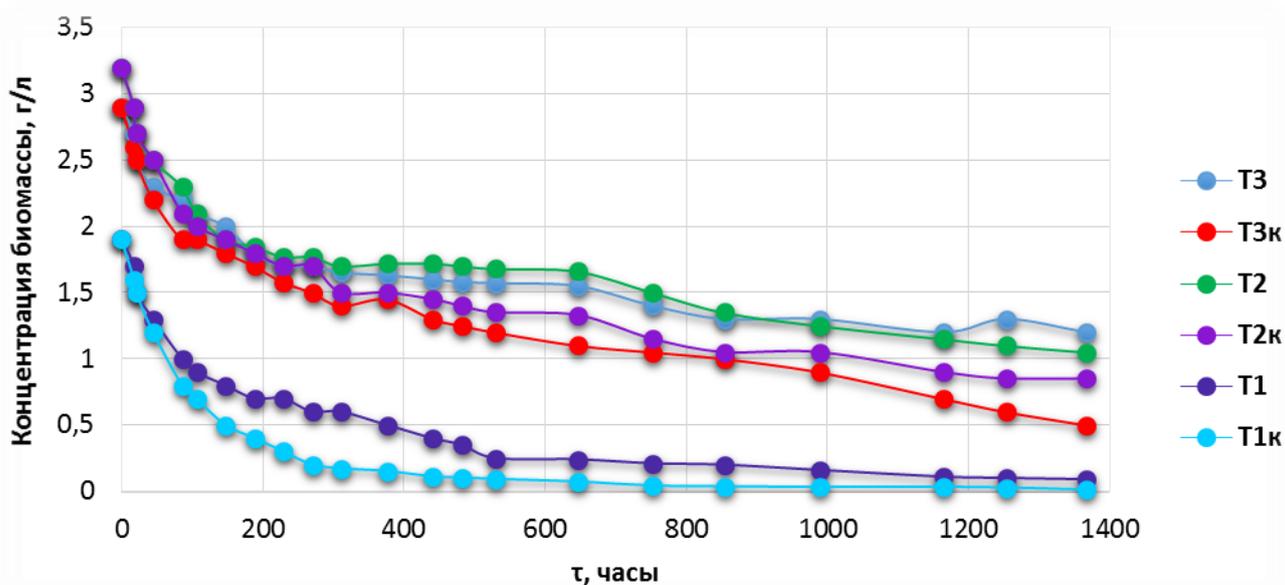


Рисунок 5.32 – Изменение конечного уровня накопления биомассы при культивировании в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении  $H_2O_2$  (среднее время культивирования в каждом пассаже составляло 48 часов).

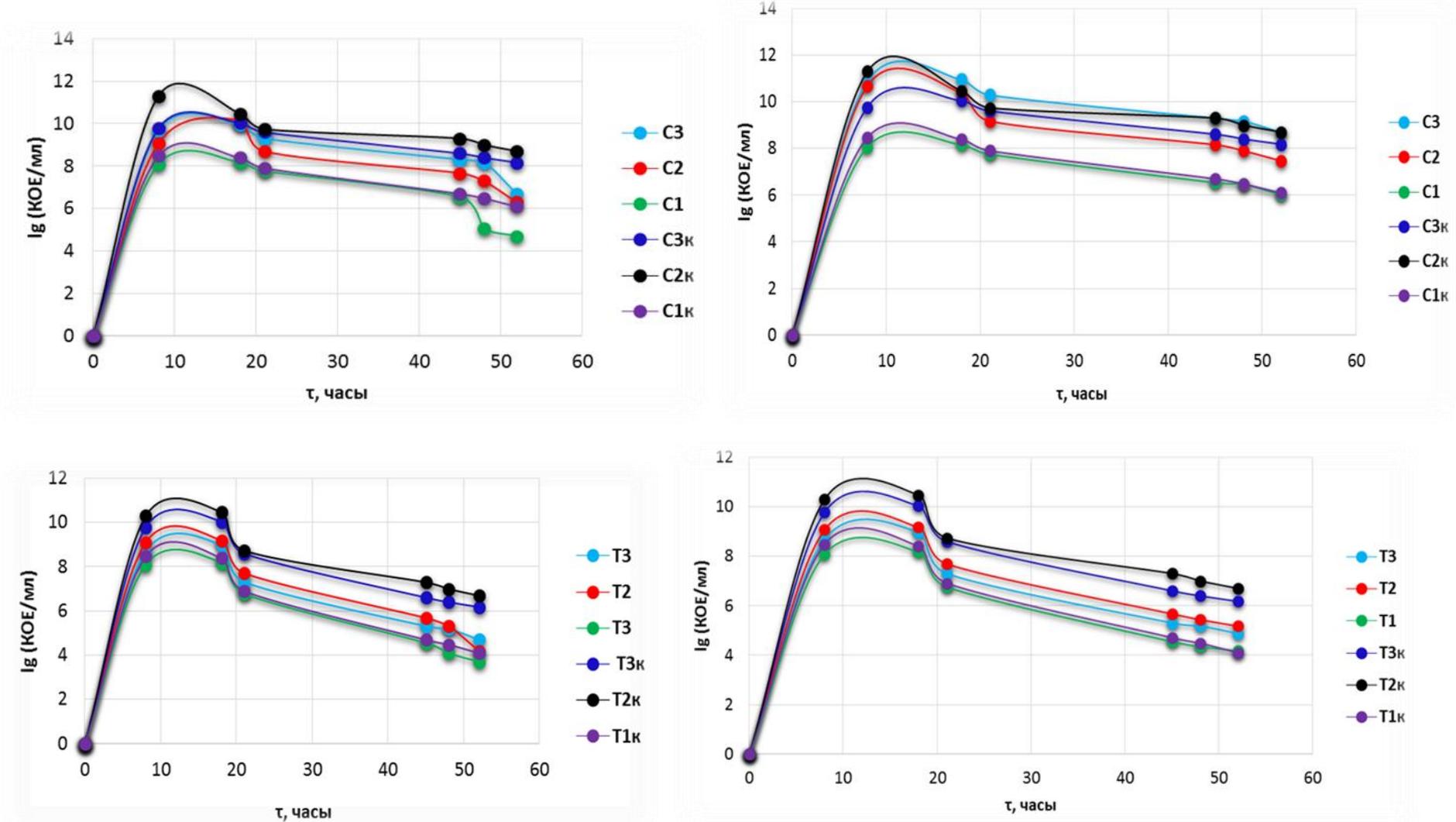


Рисунок 5.33 – Кривые роста *L. casei* при культивировании на свету и в темноте.

Слева – 10 пассаж, справа – 20 пассаж.

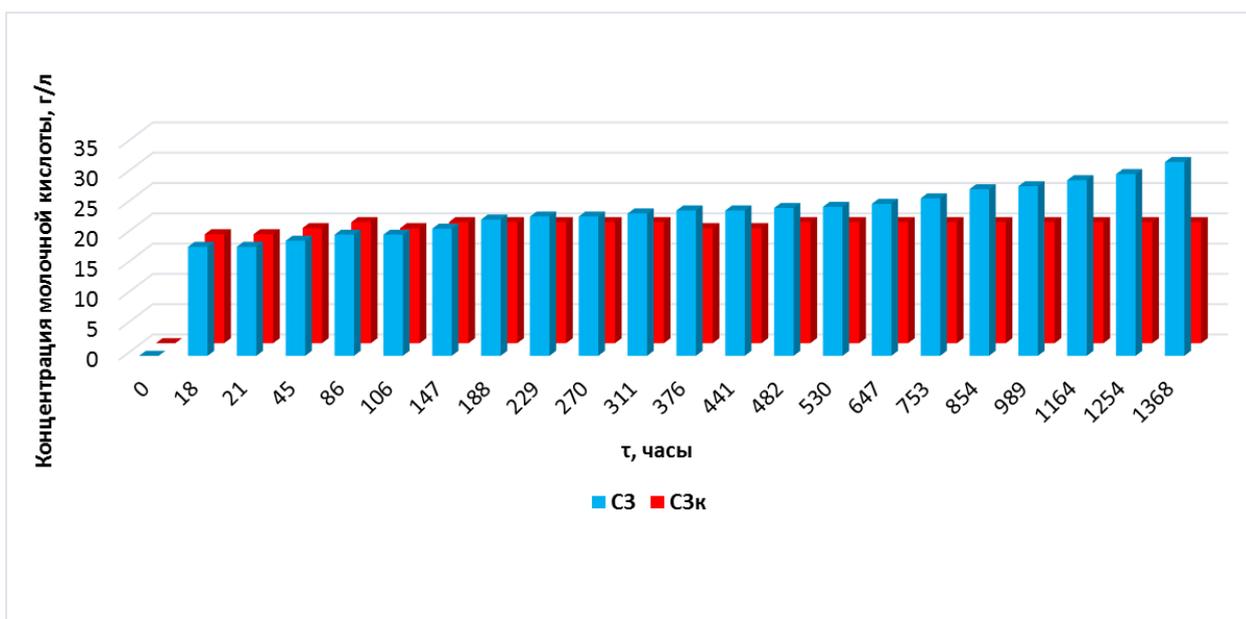


Рисунок 5.34 – Изменение конечной концентрации молочной кислоты при культивировании *L. paracasei* B4079 на свету по мере увеличения количества пассажей при внесении ( $C_3$ ) и без внесения ( $C_{3к}$ )  $H_2O_2$ .

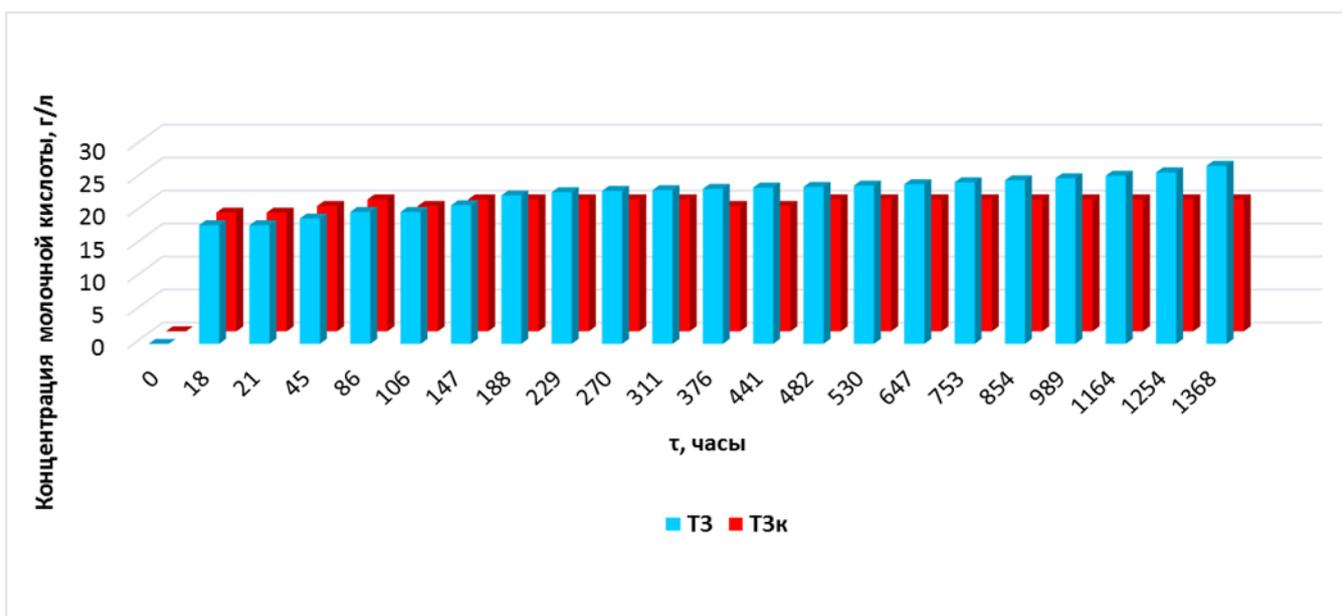
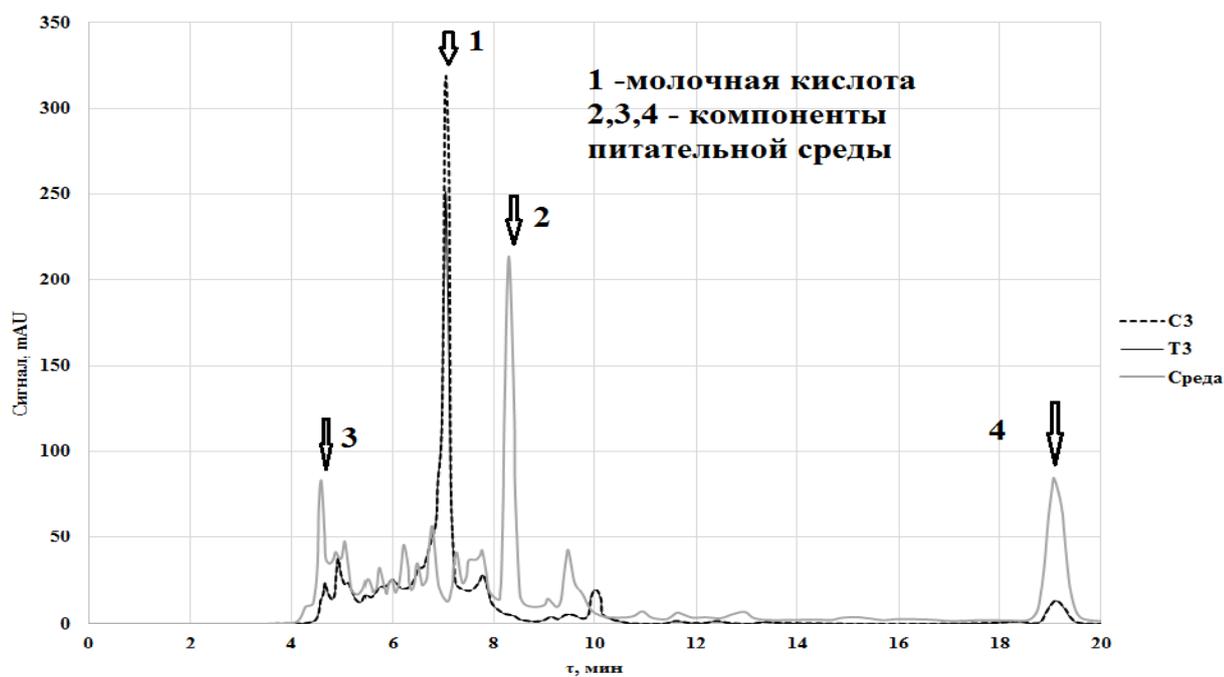
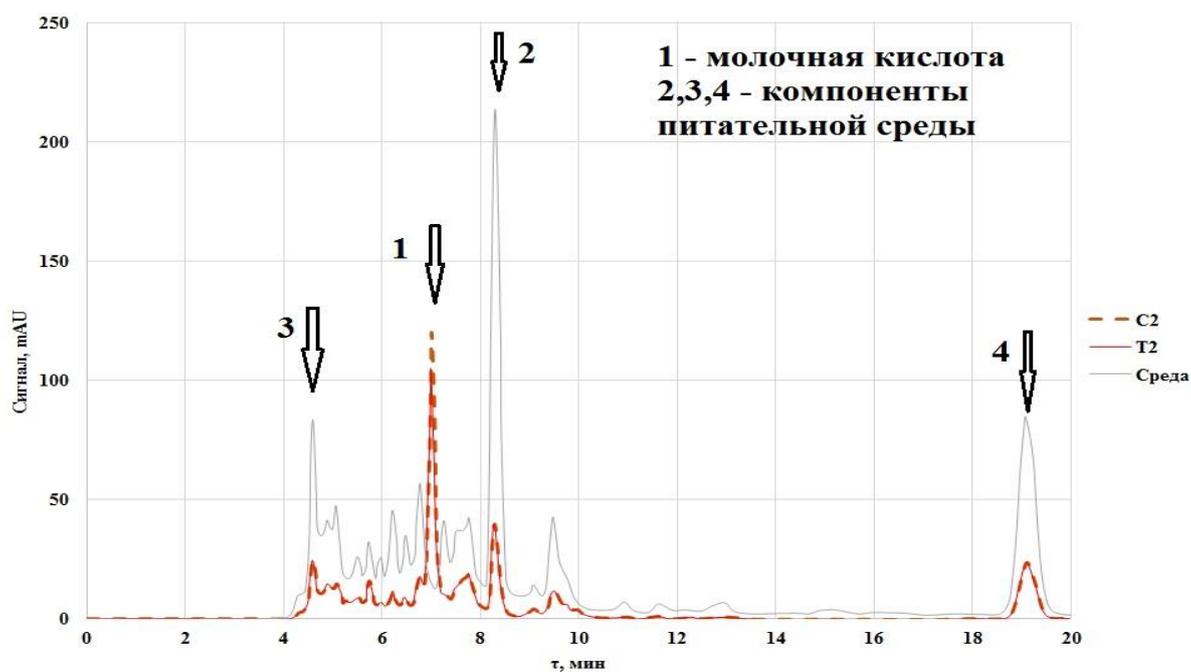


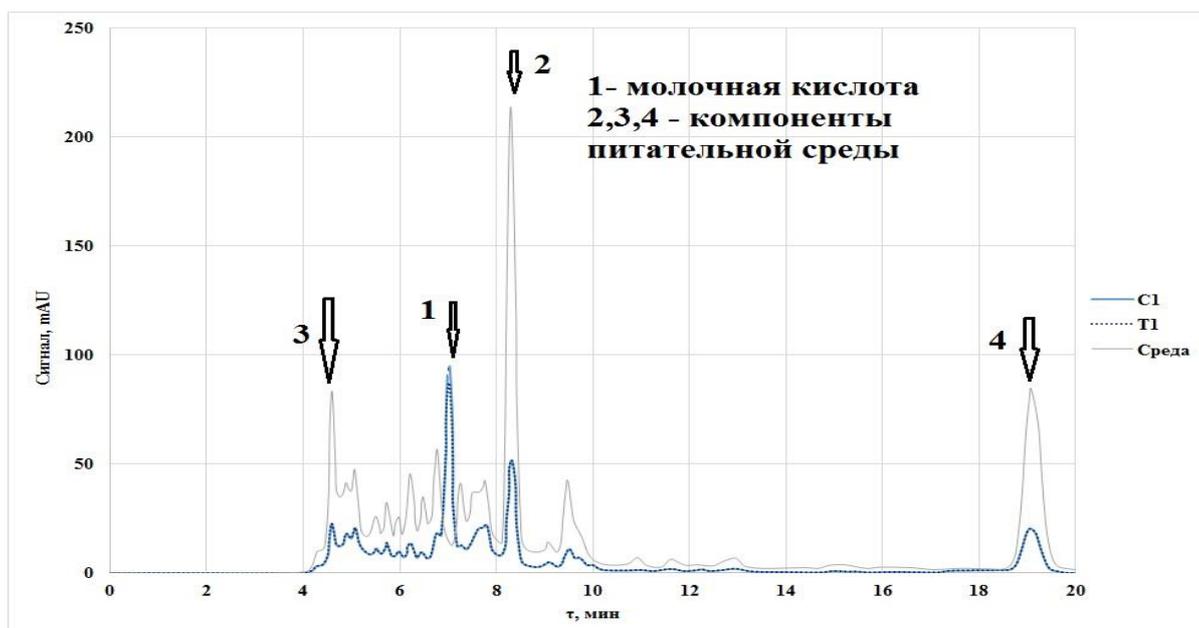
Рисунок 5.35 – Изменение конечной концентрации молочной кислоты при культивировании *L. paracasei* B4079 в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении ( $T_3$ ) и без внесения ( $T_{3к}$ )  $H_2O_2$ .



А



Б



### В

Рисунок 5.36 – Сравнительные хроматограммы (культивирование на свету и в темноте) образцов культуральной жидкости пассированных линий лактобацилл при различных вариантах культивирования.

**А** – T<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> – культивирование на свету и в темноте, концентрация глюкозы низкая (30 г/л); **Б** – T<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> – культивирование на свету и в темноте, концентрация глюкозы высокая (200 г/л), в среде присутствует мёд; **В** – T<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> – культивирование на свету и в темноте, концентрация глюкозы высокая (200 г/л), в среде мела нет.

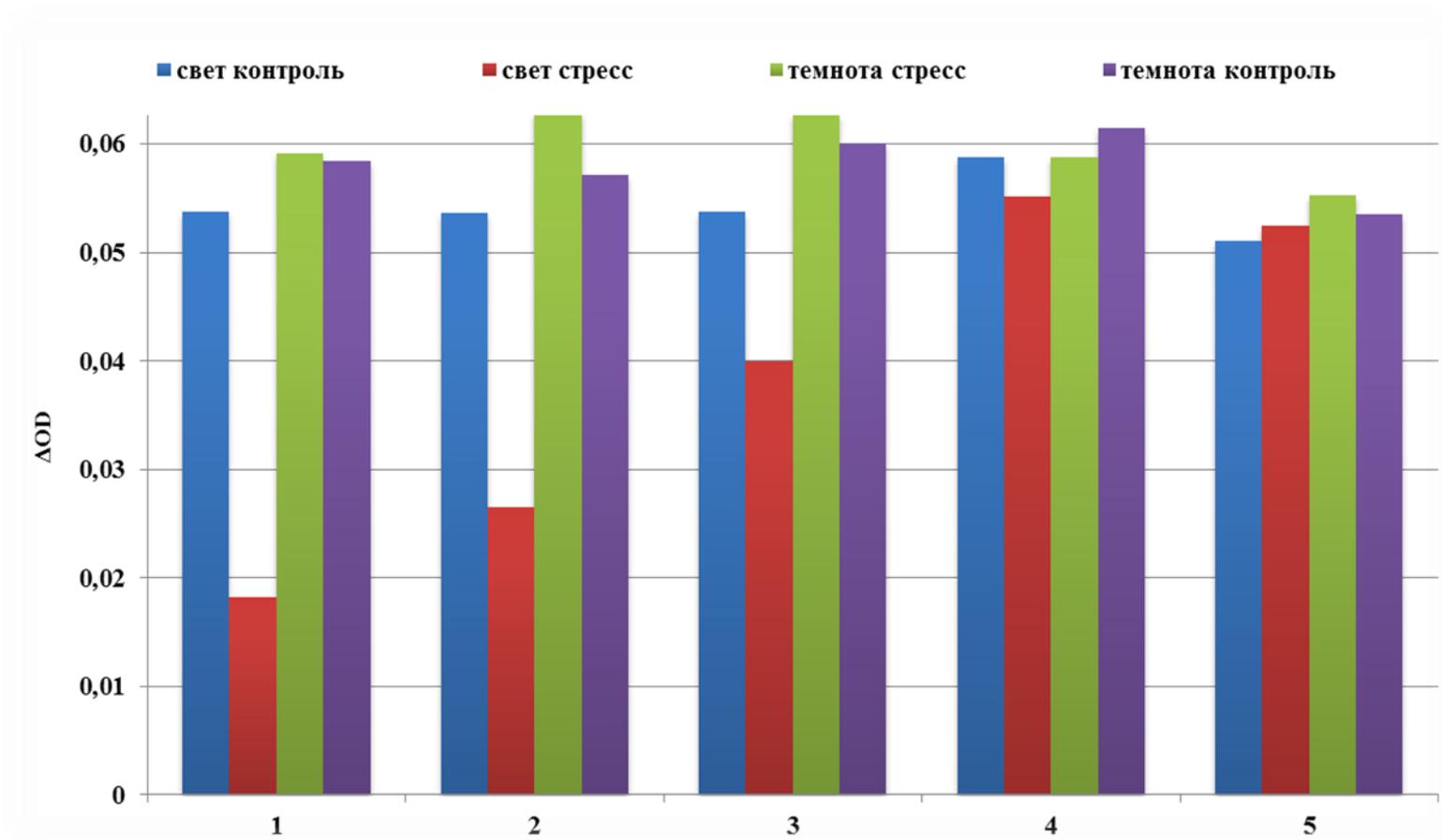


Рисунок 5.37 – Падение в оптической плотности суспензии микроорганизмов (выраженное как  $|\Delta OD|$ ) для контрольных и стрессированных линий, но пересеваемых уже без внесения  $H_2O_2$ , при проведении тестовых острых опытов на устойчивость к пероксиду водорода (пероксид водорода добавлялся в типичной сублетальной концентрации, время экспозиции составляло 1 час; 1–5 – номера пассажей; аликвоты отбирались в поздней стационарной фазе).

На рис. 5.33 приведены данные по динамике роста клеток продуцента 10 и 20-го пассажей при культивировании в колбах. В данном случае  $H_2O_2$  вносили в количестве 0,1 г/л. Видно, что количество жизнеспособных клеток при культивировании на свету во всех случаях выше на порядок по сравнению с культивированием в темноте. При невысоком содержании глюкозы в среде (линии  $C_3$ ,  $C_{3к}$ ,  $T_3$ ,  $T_{3к}$ ) на свету клетки с такой же скоростью (в пассаже 10) или существенно медленнее (в пассаже 20) отмирают при добавлении пероксида водорода, чем без добавления  $H_2O_2$ . Напротив, в темноте во всех случаях скорость отмирания клеток при добавлении  $H_2O_2$  существенно выше, чем без добавления. Таким образом, данные по динамике отмирания популяции также свидетельствуют в пользу возможного благоприятного совместного действия пероксида водорода и видимого света на выживаемость микробных клеток в определенных условиях культивирования.

На рис. 5.34, 5.35 приведены данные по изменению уровня накопления молочной кислоты на свету и в темноте по мере увеличения количества пассажей при внесении  $H_2O_2$  при ведении линии на среде с исходной концентрацией глюкозы 30 г/л. Видно, что по мере адаптации к внесению пероксида водорода наблюдается прирост в количестве накапливаемой молочной кислоты, причем на свету этот прирост существеннее с приближением к почти 100% уровню конверсии глюкозы в молочную кислоту.

На рис. 5.36 приведены данные хроматографического анализа образцов культуральной жидкости лактобацилл для различных вариантов пассирования. Из данных хроматограмм видно, что конечная концентрация МК при пассировании на свету выше чем в темноте, а содержание побочных веществ и остаточных компонентов питания ниже. При высоких концентрациях глюкозы в отсутствие в среде мела ( $T_1$ ,  $C_1$ ) компоненты питательной среды (пики 2, 3, 4) расходуются неполностью, соответственно концентрация молочной кислоты (пик 1) низкая.

На среде с содержанием глюкозы 30 г/л в опытах в колбах была оценена скорость потери устойчивости к оксидативному стрессу (деадаптация) при пассировании адаптированной линии на свету и в темноте без добавления пероксида водорода. Контролем служила нестрессированная культура, для которой также проводилось пассирование с использованием и без использования освещения.

Оценка проводилась на устойчивость к пероксиду водорода путем отбора аликвот стрессированной суспензии из колб на свету и в темноте, которые переносились в плоскодонные 96-ти луночные планшеты, в пробы добавлялся  $H_2O_2$  и через 1 час измерялось падение оптической плотности суспензии. На рис. 5.37 представлены данные по падению оптической плотности суспензии микроорганизмов

(выраженное как  $|\Delta OD|$ ) для контрольных и стрессированных линий при проведении тестовых острых опытов.

Видно, что для контрольных линий освещение не играет существенной роли – падение оптической плотности практически идентично для вариантов культивирования на свету и в темноте. Однако для стрессированных вариантов линия на свету медленнее теряет устойчивость к пероксиду водорода, чем линия в темноте. Поскольку в данных экспериментах  $H_2O_2$  в среду не вносился, наблюдаемое различие свидетельствует в пользу того, что положительное действие освещения стрессированной линии видимым светом обусловлено физиологическими и биохимическими различиями в популяциях на свету и в темноте, а не, например, различиями в скорости распада вносимого пероксида водорода в среде на свету и в темноте.

Также видно, что чувствительность стрессированной линии к  $H_2O_2$  без внесения последнего в среду культивирования к пятому пассажу приближается к чувствительности контрольной линии, поскольку разница в изменении OD по сравнению с контролем, явно выраженная для первого пассажа, становится незначительной к пятому (последнему) пассажу (рис. 5.37), т.е. к пятому пассажу происходит практически полная деадаптация популяции бактерий к пероксиду водорода.

Таким образом, результаты экспериментов с адаптацией культуры молочнокислых бактерий *L. paracasei* В4079 к внесению сублетальных доз пероксида водорода показали положительное совместное действие пероксида водорода и видимого света на сохранение физиологической активности популяции молочнокислых бактерий, при этом на свету молочнокислые бактерии лучше адаптируются к действию сублетальных доз  $H_2O_2$ , накапливают существенно больше биомассы и молочной кислоты, более полно потребляют компоненты питания и меньше образуют побочных продуктов жизнедеятельности, их выживаемость и физиологическая активность выше, чем в контроле и в темноте. Стрессированная культура молочнокислых бактерий *L. paracasei* В4079 приобретает чувствительность к низкоинтенсивному видимому свету. Возможно, такая чувствительность может быть обусловлена значимостью функционирования системы фоторепарации при оксидативном стрессе. Полная потеря устойчивости к оксидативному стрессу происходит после 5 пассирований на среде без внесения пероксида водорода.

#### **5.2.4.2. Культивирование адаптированной к оксидативному стрессу линии в биореакторе**

С устойчивыми к пероксиду водорода линиями Т<sub>3</sub> и С<sub>3</sub> молочнокислых бактерий *L. paracasei* В4079 была проведена серия экспериментов с культивированием

в биореакторе Minifors (INFORS HT, Швейцария) с рабочим объемом 3 л на базовой минеральной среде MRS с содержанием глюкозы – 110 г/л, дрожжевого экстракта – 7,5 г/л.

Полученные данные подтвердили, что воздействие малыми дозами пероксида водорода и видимого света на адаптированную к оксидативному стрессу линию продуцента существенно снижает количество примесных продуктов в культуральной жидкости и повышает на 2,3% выход молочной кислоты.

На рис. 5.38 представлены результаты культивирования в условиях оксидативного стресса с освещением (средняя освещенность на поверхности обечайки ферментера – 10800 Лк) и затемнением ферментационной среды. В данном случае среда с компонентами питания и добавленными 0,3 г/л пероксида водорода предварительно выдерживалась в стерильных условиях в течение 24 час на свету, после чего вносился инокулят (выращенная на среде MRS адаптированная культура 22 пассажа). Видно, что при использовании преадаптированной к внесению  $H_2O_2$  линии и затемнении ферментационной среды наблюдается существенное торможение роста и биосинтеза молочной кислоты – до 30 час включительно по сравнению с ростом на свету. Это свидетельствует в пользу того, что эффект обусловлен не модификацией питательной среды в результате протекания каких-либо химических или фотохимических реакций окисления, а связан именно с биологическими фоточувствительными процессами.

Сопоставление УФ-спектров водных растворов  $H_2O_2$ , растворов  $H_2O_2$  с компонентами питательной среды показало отсутствие сколь-нибудь существенных реакций химического окисления.

Таким образом, совокупные данные показали, что скорость распада пероксида водорода за счет реакции с компонентами питательной среды незначительна, то есть наблюдаемый в ходе культивирования эффект нивелирования токсичного воздействия  $H_2O_2$  не связан с протеканием фотохимических процессов распада  $H_2O_2$ , а обусловлен биологическими процессами, возможно, фоторепарацией или другими фоточувствительными биологическими реакциями.

На рис. 5.39 представлены кривые потребления субстрата, накопления молочной кислоты и биомассы в ходе культивирования преадаптированных к оксидативному стрессу линий с воздействием теплового шока. В данном случае на 7 час от начала культивирования на 15 мин поднимали температуру до 52 °С. Культивирование проводили как на свету, так и в темноте.

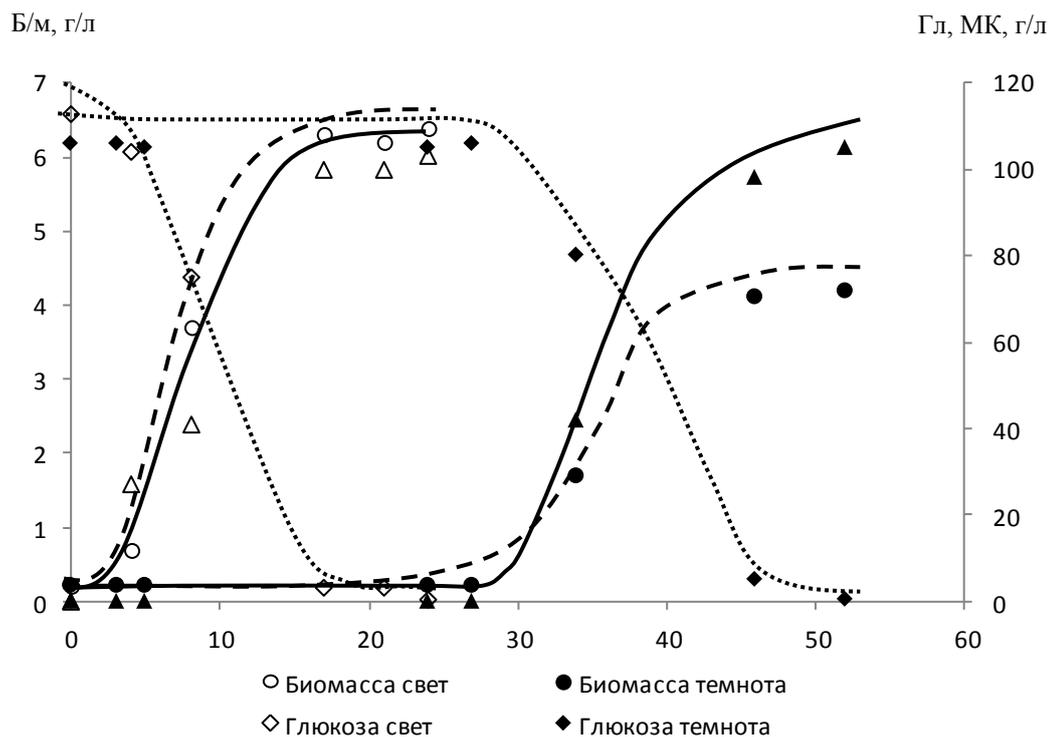


Рисунок 5.38 – Накопление биомассы, потребление глюкозы и накопление молочной кислоты при культивировании стрессированной линии на свету и в темноте в условиях предварительного суточного выдерживания питательной среды на свету с пероксидом водорода. Точка «0» на оси абсцисс соответствует моменту внесения инокулята.

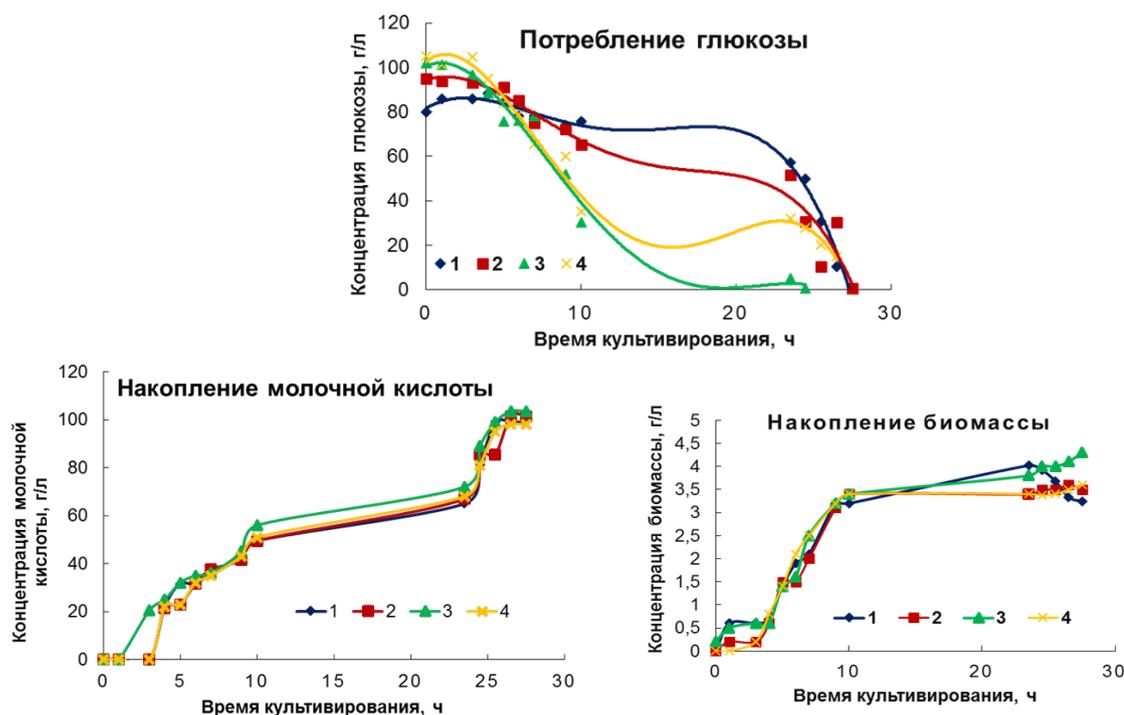


Рисунок 5.39 – Сопоставление показателей роста при сублетальной температуре 52 °С:

1. Неадаптированная к оксидативному стрессу линия, культивирование проводилось с освещением содержимого ферментера.

2. Неадаптированная к оксидативному стрессу линия, культивирование проводилось с затемнением содержимого ферментера.

3. Адаптированная к оксидативному стрессу линия, культивирование проводилось с освещением содержимого ферментера.

4. Адаптированная к оксидативному стрессу линия, культивирование проводилось с затемнением содержимого ферментера.

Видно, что кривые накопления молочной кислоты и потребления субстрата для контрольных ферментаций на свету и в темноте не имеют существенных различий, то есть фактор освещения в данном случае не имеет значения при использовании линий, не подвергавшихся ранее оксидативному стрессу (т.е. неадаптированной культуры). При использовании же линий, адаптированных к оксидативному стрессу, скорость сбраживания субстрата заметно выше, особенно в условиях освещения ферментационной среды, о чем наиболее явно свидетельствуют кривые потребления субстрата.

Таким образом, культура молочнокислых бактерий, преадаптированная к стрессовому воздействию пероксида водорода, на свету становится более устойчи-

вой и к сублетальному температурному воздействию, что свидетельствует о «перекрестной адаптации» и участии фоточувствительных процессов при ответе на оксидативный стресс и тепловой шок.

Дополнительные эксперименты показали, что у изученного штамма *L. paracasei* наблюдается перекрестный адаптивный ответ между оксидативным стрессом и осмотическим стрессом, однако между оксидативным стрессом и голоданием и оксидативным стрессом и закислением среды перекрестного ответа вероятнее всего не возникает. Возникновение же светочувствительности наблюдается только для культуры, подверженной оксидативному воздействию.

Возникновение именно такого сочетания перекрестной адаптации к стрессовым воздействиям можно объяснить, как и в случае с дрожжами pp. *Saccharomyces* и *Candida*, экологическими условиями обитания молочнокислых бактерий, а именно в одной из экологических ниш – на поверхности растений (в эпифитной зоне). В такой природной экологической нише преимущество получают те молочнокислые бактерии, которые могут использовать свет (фоторепарацию) для устранения повреждающих воздействий АФК, и одновременно устойчивые к тепловому и осмотическому воздействию. Условия голодания и закисления среды не являются отличительными признаками эпифитной зоны растений по сравнению с другими экологическими нишами.

Применительно к управляемому культивированию молочнокислых бактерий можно заключить, что их популяция, преадаптированная к оксидативному воздействию в условиях освещения ферментационной среды, обладая более высокими целевыми показателями биосинтеза, будет более устойчивой к сублетальным воздействиям температуры и осмотического давления. Последнее, в частности, может иметь технологическое значение в процессе сушки при получении препаратов на основе живых клеток молочнокислых бактерий.

Таким образом, результаты, полученные в экспериментах с пассированием штамма *L. paracasei* В4079 к пероксиду водорода, указывают на то, что:

- наблюдается процесс адаптации и деадаптации штамма *L. paracasei* В4079 к пероксиду водорода;
- стрессированная пероксидом культура становится чувствительной к воздействию небольших доз видимого света;
- при использовании линий штамма-продуцента, адаптированных к воздействию пероксида водорода на фоне воздействия низкоинтенсивного видимого света, возможно достижение относительно небольших, но стабильно наблюдаемых положительных эффектов в отношении повышения доли жизнеспособных клеток, сохранения биосинтетической активности продуцента,

увеличения выхода молочной кислоты, снижения содержания побочных внеклеточных продуктов метаболизма – примесей в бесклеточной культуральной жидкости, которые влияют на дальнейшее выделение молочной кислоты.

Наличие перекрестной адаптации к различным видам стресса расширяет возможности управляемого культивирования микроорганизмов, поддержания целевой физиологической и биохимической активности продуцента при отклонении режимов культивирования от регламентных.

Исследования по культивированию продуцента *L. paracasei* В4079 в условиях комбинированного воздействия пероксида водорода и видимого света показали, что вариантом дальнейшего совершенствования процесса молочнокислого брожения, в том числе в мембранном биореакторе, может быть использование контролируемого оксидативного воздействия. Не исключено, что в МБР такое воздействие может не только улучшить показатели ферментации, но и снизить расход ростовых факторов, а также содержание примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, и, как следствие, – улучшить экономические показатели микробиологического получения молочной кислоты.

### **5.3. Культивирование галобактерий с целью получения бактериородопсина**

В экспериментах с галобактериями отправной точкой исследований являлось выяснение управляющих факторов, влияющих на выработку бактериородопсина при культивировании галобактерий. Учитывая положительные результаты, которые были получены при культивировании дрожжей в условиях контролируемого оксидативного воздействия при совместном действии оптимальных доз пероксида водорода и видимого света, основное внимание акцентировали на возможной важной роли стрессовых воздействий и систем ответа на стрессы в жизнедеятельности и метаболизме галобактерий. Выяснению роли других факторов в изменении метаболизма ГБ хотя и уделялось достаточное внимание [1539], однако результаты таких исследований не привели к созданию эффективных методов и технологий получения БР.

Обращалось внимание на следующие моменты:

- максимизация выхода бактериородопсина;
- возможность улучшения показателей биосинтеза с учетом контролируемого оксидативного воздействия;

- возможное прооксидантное, стрессорное и антистрессорное влияние компонентов питательной среды и продуктов их окисления на показатели биосинтеза;
- апробация культивирования с адсорбентом;
- апробация подходов с культивированием антиоксидантов.

В работе использовались штаммы галобактерий *Halobacterium salinarum*, продуцирующие наиболее существенное количество бактериородопсина среди экстремальных галофилов.

Конкретные задачи исследований с продуцентами *H. salinarum* включали:

- выбор штаммов, преимущественно синтезирующих бактериородопсин;
- сравнительный анализ изменения ростовых характеристик и биосинтетической активности штаммов *H. salinarum* в различных режимах ферментации;
- отработка методов культивирования на основе выявленных закономерностей;
- апробация культивирования с контролируемым оксидативным воздействием и различных вариантов совершенствования ферментационного процесса с учетом возможных прооксидантных и антиоксидантных свойств. Если превалирует прооксидантное воздействие, вызывающее оксидативный стресс и подавляющее жизнедеятельность микроорганизмов, то эффективными могут оказаться приемы, нивелирующие такое воздействие.

### 5.3.1. Выбор исходных и получение мутантных штаммов

У галобактерий биосинтез может быть направлен по нескольким относительно устойчивым путям, в частности, по каротинсинтезирующему и по бактериородопсинсинтезирующему путям. При преобладании первого пути колонии клеток галобактерий окрашены в оранжевый цвет, при преобладании второго пути – имеют сиреневый оттенок.

В качестве исходных использовались штаммы галобактерий *Halobacterium salinarum* ET 1001, его мутанты 353П (клетки окрашены в оранжевый цвет), ST-033 (клетки окрашены в сиреневый цвет). Мутант *H. salinarum* 353П, накапливающий бактериородопсин и C<sub>50</sub>-каротиноид бактериоруберин, получен Л.Н. Чекулаевой, штамм ST-033 – Д.А. Складневым. Все штаммы были предоставлены Д.А. Складневым (ФГУП ГосНИИ генетики и селекции микроорганизмов, г. Москва).

Штамм ET 1001, из которого были получены мутанты 353П и ST-033, характеризуется пониженным содержанием каротиноидов при достаточно высоком уровне накопления бактериородопсина – около 45 мг/л [1409], что облегчает выделение пурпурных мембран и бактериородопсина.

В предварительных экспериментах с предоставленными штаммами, проведенных в качалочных колбах на стандартной питательной среде и при высеве на агаризованную питательную среду, наблюдали неудовлетворительную воспроизводимость и нестабильность результатов, зачастую при отсутствии значимого роста галобактерий, большую вариабильность в морфологии и цвете колоний при высеве на чашки Петри и в цвете суспензии галобактериальных клеток при выращивании в колбах. Так, при пересеве штамма ST-033 на среде с агаром (при освещении) появлялись оранжевые колонии (около 10% и более от общего числа колоний), встречались и белые колонии. Такая нестабильность может быть обусловлена свойствами используемых штаммов, а также вариациями в составе органических компонентов питательных сред, наличием в них нежелательных примесей. В этой связи было решено провести серию экспериментов по получению мутантных штаммов из исходных с оценкой их устойчивости к морфологическому расщеплению, способности к росту и накоплению БР на стандартной питательной среде.

Для получения мутантов был использован стандартный метод индуцированного мутагенеза с облучением суспензии клеток жестким ультрафиолетом ( $\lambda=254$  нм) и его модифицированный вариант. Стандартная процедура, использованная первоначально, проводилась следующим образом. Клетки галобактерий с предстационарной стадии роста концентрировали в 5 раз и ресуспендировали в 2 мл минеральной основы. Полученную суспензию с концентрацией ГБ около 15 г/л переносили в открытую чашку Петри и облучали с расстояния 15 см от источника, после чего высевали на агаризованную среду.

При сублетальном облучении наиболее продуктивного по бактериородопсину сиреневого штамма ST-033 жестким УФ по стандартной методике окраска колоний первоначально получаемых сиреневых мутантов была нестабильна: при последующем пересеве на агаризованную питательную среду появлялись колонии разного цвета. Расщепление у мутантов штамма ST-033 на сиреневые, оранжевые и белые колонии было более выражено при выращивании на свету, как и у исходного штамма. При выращивании в темноте сиреневые клоны практически не расщеплялись, расщепление оранжевых и белесых клонов мало зависело от освещения. **Исходя из этих наблюдений, предположили, что свет индуцирует расщепление у штаммов, содержащих БР.**

При облучении мягким УФ штамма ST-033 наблюдалось лишь небольшое возрастание изменчивости в цвете колоний по сравнению с исходным штаммом. Облучение оранжевого штамма 353П не приводило к сколько-нибудь выраженным сдвигам в изменчивости.

Нестабильность морфо-физиологических признаков может быть обусловлена как свойствами используемых штаммов, так и вариациями условий внешней среды, например, уровня освещенности (что наблюдалась в вышеописанных экспериментах), обеспеченностью субстратом, составом компонентов питания, наличием ингибиторов и стимуляторов различных путей метаболизма и т.д. Учитывая эти факторы, было решено модифицировать методику облучения и отбора мутантных клонов, моделируя природные условия обитания галобактерий, в которых большую роль может играть гетерогенность среды, наличие микроагрегатов, градиентов концентраций субстратов и продуктов метаболизма, уровня освещенности, концентрации кислорода. В качестве такого фактора, обеспечивающего микрогетерогенность условий, было решено использовать гранулированный активированный уголь, инкапсулированный в агар<sup>1</sup>. Гранулы угля АГ-3 добавлялись в количестве 15–20 г/л при приготовлении агаризованной среды. Уголь также добавлялся в жидкую питательную среду (в марлевом мешочке в количестве 20–30 г/л) при выращивании клеток ГБ, в последующем подвергаемых облучению жестким УФ.

Предварительные эксперименты показали, что непосредственный контакт клеток галобактерий с углем вызывает их сорбцию в порах гранул и контакт с сорбированными углем вредными для клеток веществами, что приводит к гибели и лизису клеток. Инкапсулирование в агар предотвращает непосредственный контакт клеток с углем, но не препятствует диффузии сорбируемых веществ – потенциальных ингибиторов биосинтеза.

Эксперименты проводили со штаммом ST-033. Добавление угля в жидкую питательную среду с выращиваемым штаммом на предстационарной стадии роста приводило к исчезновению желтого оттенка ее окраски и возрастанию насыщенности сиреневым цветом, обусловленным цветом выращиваемых клеток бактерий. Через 6–8 ч после внесения угля в колбу 2 мл суспензии вносилось на чашку Петри, где находилась агаризованная среда с распределенными в ней гранулами угля, суспензия распределялась шпателем по поверхности агара. После этого поверхность агара облучалась жестким УФ.

При приготовлении суспензии и облучении клеток по такому модифицированному варианту с использованием угля клетки выживали и после 3–5 мин. облучения. При этом непосредственно над гранулами угля преимущественно встречались оранжевые колонии, рядом с гранулами доминировали сиреневые клоны, вдали от гранул – белые. Высев клонов, образующих сиреневые колонии, на чашки Петри показал, что в большинстве своем они не расщеплялись на субклоны с раз-

---

<sup>1</sup>Использование активированного угля, его инкапсулированной в агар формы и модифицированная методика облучения предложены С.В. Калёновым [1914].

ной цветовой окраской. С другой стороны, если на чашки Петри высевалась суспензия, полученная в колбах без внесения угля, то наблюдалась изменчивость в цвете колоний. Полученные результаты свидетельствуют, что **в индукции цветового расщепления колоний могут участвовать некие компоненты исходной питательной среды или продукты метаболизма, которые поглощаются углем.**

По результатам опытов с облучением клеток по модифицированной методике на среде с углем было отобрано несколько клонов (штаммов) различного цвета с колоний наибольшего размера.

Способность отобранных клонов к росту и накоплению БР были протестированы на среде с триптоном Serva (5 г/л), дрожжевым экстрактом Organotechnie (2 г/л) и глицерином (4 мл/л) в качалочных колбах. Характеристики полученных мутантов и штамма ST-033 при росте на данной среде приведены в табл. 5.5.

Таблица 5.5. Ростовые и биосинтетические показатели некоторых из полученных штаммов в сравнении со штаммом ST-033

Мутант, штамм	Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе, ч <sup>-1</sup>	Цвет суспензии на 7-ые сутки культивирования	Выход биомассы (7 сут. культивирования), г/л	Выход БР (7 сут. культивирования), мг/л
ST-033	0,054-0,056	Розово-сиреневый	3–3,3	40-45
UM-7	0,056	Розово-сиреневый	3,4	45–50
<b>UM-17</b>	<b>0,054–0,056</b>	<b>Пурпурный</b>	<b>3–3,3</b>	<b>70–75</b>
UM-21	0,056	Розово-сиреневый	3,4	20–25
UM-23	0,057	Розово-сиреневый	3,75	40–45
UM-44	0,055	Розово-сиреневый	3,4	50–55
UM-53	0,064	Оранжевый	5,8	5–10
UM-79	0,042	Белый	2,5	–
UM-92	0,056	Розово-сиреневый	2,96	40–45
UM-93	0,062	Оранжево-желтый	4,4	5–10
UM-111	0,055	Розово-сиреневый	3,7	55–60

Все оранжевые клоны имели сходные ростовые характеристики, накапливали больше биомассы по сравнению с клонами, окрашенными в другие цвета, но вырабатывали мало БР.

По результатам тестирования в качестве наиболее перспективного был отобран штамм UM-17, колонии которого при росте на агаризованной среде окрашены в пурпурный цвет, показавший наибольшую способность к синтезу БР в качалочных колбах при приемлемых ростовых характеристиках.

Сравнительная динамика накопления биомассы исходными и отобранными штаммами галобактерий в периодических условиях представлена на рис. 5.40.

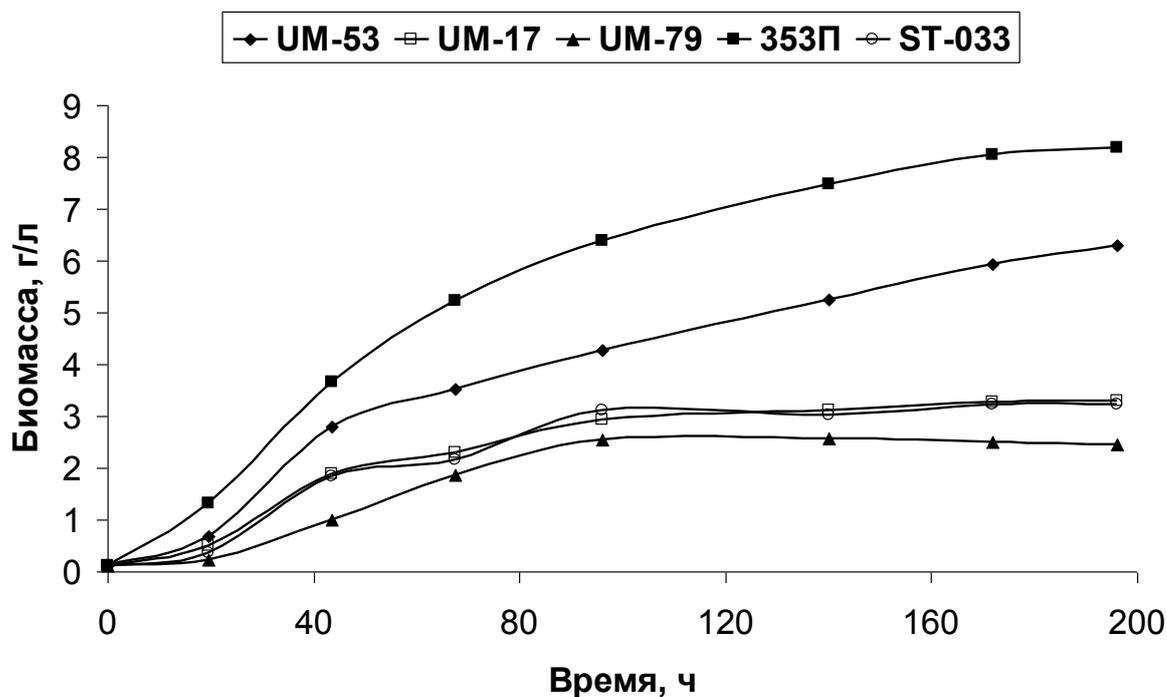


Рисунок 5.40 – Сравнительная динамика накопления биомассы исходными и полученными штаммами галобактерий в периодических условиях.

Оранжевый – UM-53, сиреневый – UM-17, белый – UM-79, ET-1001 – 353П, ST-033 – ST-033.

В стандартных условиях культивирования в колбах на качалке штамм UM-17 накапливает бактериородопсина 70–75 мг/л, что в 1,6–1,8 раз больше, чем исходный штамм ST-033, и не расщепляется на разноокрашенные клоны при пересеве.

Оранжевые клоны, как и 353П, отличаются более высокой скоростью роста и уровнем накопления биомассы, однако накапливают к концу ферментации не более 5–10 мг/л БР. Белые клоны хуже растут, чем окрашенные и практически не накапливают БР и каротиноиды.

Стабильность свойств выделенного штамма UM-17 в отношении синтеза БР при пересевах и последующем росте была проверена в асептических и неасептических условиях на свету и в темноте. Всего было проведено 10 пассажей, и результаты экспериментов показали, что штамм не только сохраняет свои ростовые и

биосинтетические характеристики при пересевах на свету, но и увеличивает свою биосинтетическую активность: накопление биомассы к 10-му пассажу выросло примерно на 15%, а бактериородопсина с 65 мг/л до 75 мг/л.

При пересеве в темноте при большем, чем на свету, накоплении биомассы удельное содержание БР к 10-му пассажу снижалось более чем в 2 раза. В неасептических условиях результаты были нестабильны и при высеве клеток на агаризованную среду появлялись оранжевые колонии.

Пересевы и выращивание штамма UM-17 в последующем, если это не оговорено особо, проводились в стерильных условиях с инокулятом 5–10 пассажей.

Таким образом, в ходе первого этапа исследований с галобактериями был выделен штамм UM-17, колонии которого при росте на агаризованной среде были окрашены в пурпурный цвет, показавший наибольшую способность к синтезу БР в качалочных колбах при приемлемых ростовых характеристиках и стабильный при пересевах в асептических условиях.

### **5.3.2. Выявление основных факторов, определяющих активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина**

С наиболее перспективным штаммом UM-17 была проведена серия экспериментов, в которой выявлялись основные факторы, определяющие активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина. Определяли наиболее подходящие условия роста галобактерий и синтеза БР, прежде всего такие наиболее очевидные для ферментации, как состав питательной среды, рН, интенсивность аэрации, освещенность.

Применяемые в биологической промышленности сухие пептоны и триптоны являются продуктами ферментативного гидролиза белков. При их приготовлении глубина и степень гидролиза трудно регулируема, поэтому в различных марках этих источников аминокислот и ростовых факторов соотношения продуктов с высокой и низкой степенью расщепления белка непостоянны. Кроме того, они могут содержать желчные кислоты, сильно угнетающие развитие галобактерий [1536-1538]. Поэтому прежде всего важно было проверить способность к росту штамма UM-17 и накопление им БР на средах с различными марками триптонов, пептонов, дрожжевых экстрактов при варьировании концентрации их в питательной среде. Опыты проводились в качалочных колбах.

В качестве источников органического углерода было испытано 4 триптона и пептона и 2 дрожжевых экстракта различных фирм, а именно:

- триптон 1 – триптон (гидролизат казеина, получаемый обработкой трипсином) фирмы «Serva»;
- триптон 2 – триптон фирмы «Hispanlab» (Испания);
- пептон 3 – пептон Difco;
- пептон 4 – пептон Hispanlab;
- дрожжевой экстракт 1 (YE1) – фирма «Hispanlab»;
- дрожжевой экстракт 2 (YE2) – фирма «Organotechnie».

Результаты испытаний показали, что марка дрожжевого экстракта не влияет на рост и цвет галобактерий. Существенных отличий не наблюдалось и при использовании дрожжевых экстрактов других фирм-производителей.

На рис. 5.41 представлена динамика накопления биомассы и синтеза бактериородопсина штаммом UM-17 на некоторых из тестированных композиций сред с добавлением глицерина.

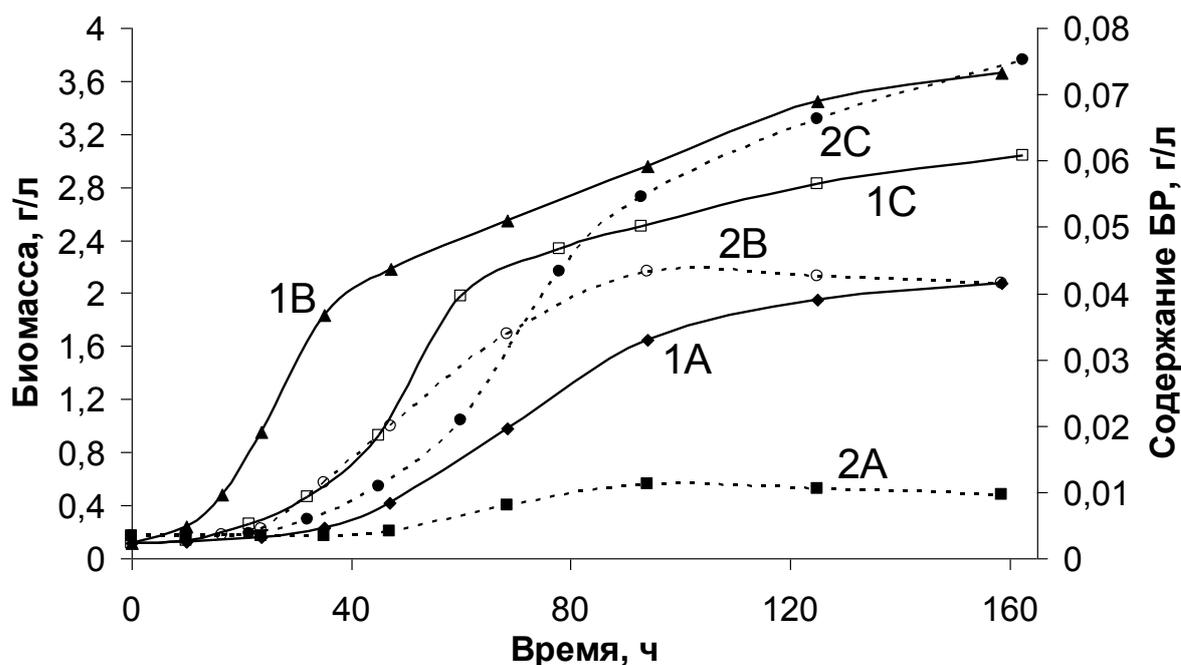


Рисунок 5.41 – Сравнительная характеристика роста биомассы и накопления БР штаммом UM-17 на средах с различным составом органических компонентов и добавлением глицерина.

А – 5,5 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина; В – 5 г/л триптона Hispanlab, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина; С – 5 г/л триптона Serva, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина. 1 – накопление биомассы, 2 – накопление бактериородопсина. Энергетическая интенсивность освещения 70 мВт/л.

Наибольшая оптическая плотность достигается при росте на триптоне Hispanlab, однако наибольшее содержание БР наблюдается для триптона Serva. Среда на триптоне Hispanlab, а также чистом дрожжевом экстракте (YE) имеет конечные оттенки ржаво-желтого цвета, что говорит о малом выходе бактериородопсина и повышенном содержании каротиноидов.

При использовании в качестве источника углерода только дрожжевого экстракта и глицерина (рис. 5.41, вариант А) максимальный выход БР составил 11 мг/л, конечный уровень биомассы около 2 г/л, удельная скорость роста  $0,041 \text{ ч}^{-1}$ .

На триптоне Serva с дрожжевым экстрактом и глицерином (рис. 5.41, вариант С) конечный уровень биомассы составил 3 г/л, удельная скорость роста в экспоненциальной стадии –  $0,054 \text{ ч}^{-1}$ , максимальное накопление БР – 75 мг/л. На триптоне Hispanlab с дрожжевым экстрактом и глицерином конечный уровень биомассы – 3,7 г/л, удельная скорость роста –  $0,1 \text{ ч}^{-1}$ , максимальное накопление БР – 43–44 мг/л. Аналогичная картина наблюдалась при культивировании штамма ST-033 на тех же питательных средах, однако накопление им бактериородопсина составило лишь 55–60% от уровня штамма UM-17.

Как видно из динамики роста биомассы (рис. 5.41), после достижения уровня накопления биомассы 1,9–2,1 г/л наступает стадия ее линейного роста, что обусловлено дефицитом в обеспечении среды кислородом в условиях качалочных колб, однако такое лимитирование кислородом благоприятно для синтеза БР. В дальнейшем, в стационарной фазе роста микроорганизмов, наблюдается падение содержания БР (рис. 5.41, варианты А, В).

Качественные изменения в состоянии культуры хорошо прослеживаются по спектрам лизатов. На рис. 5.42 приведены спектры лизатов галобактерий по ходу выращивания на триптоне Serva (5 г/л), дрожжевом экстракте Organotechnie (2 г/л) и глицерине (4 мл/л) в сравнении со спектром лизата, полученного при выращивании на среде с триптоном Hispanlab. После 96–100 ч культивирования в спектрах наряду с пиком БР ( $\lambda=568 \text{ нм}$ ) начинают проявляться пики каротиноидов ( $\lambda=480\text{--}550 \text{ нм}$ ). Они тем ярче выражены, чем дольше проводится культивирование. Штамм UM-17 на 162 ч накапливает до 75 мг/л БР, а на 210 ч содержание БР снижается до 50–55 мг/л. При использовании триптона Hispanlab ярко выраженные пики каротиноидов проявляются уже на 158 ч культивирования. Содержание БР к этому времени составляет 44 мг/л, а на 210 ч падает до 38 мг/л. При использовании среды с дрожжевым экстрактом, но без триптона или пептона, пики каротиноидов проявляются еще раньше.

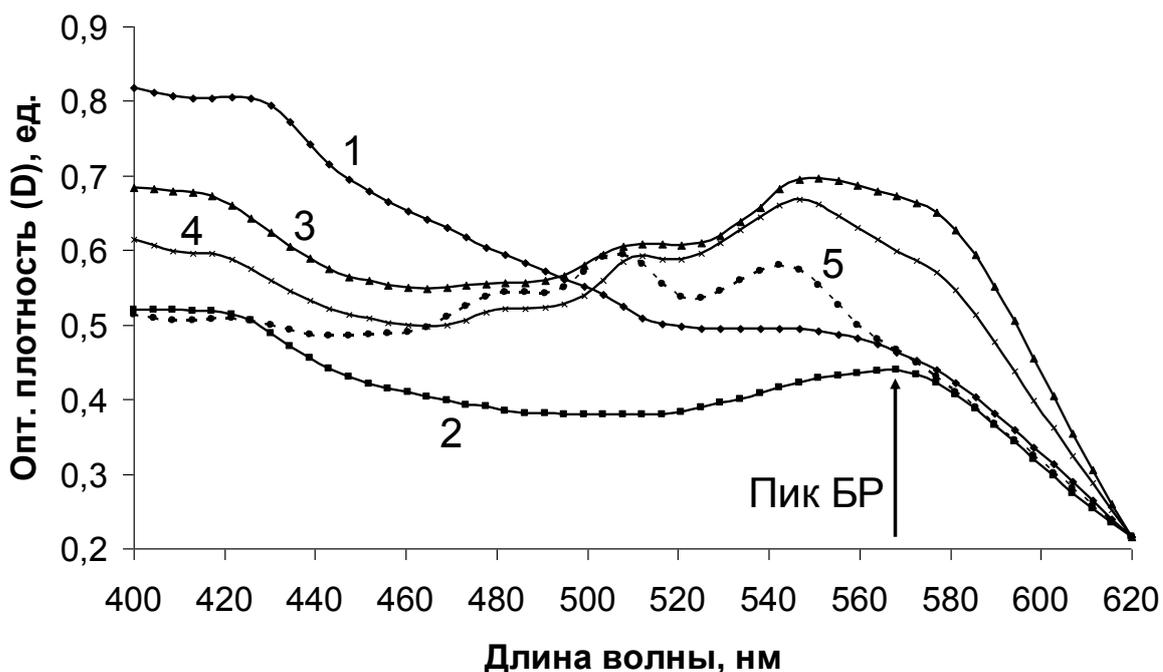


Рисунок 5.42. – Изменения в спектрах лизатов по ходу культивирования штамма UM-17.

1–4 – среда содержит триптон Serva, 5 – среда содержит триптон Hispanlab.  
 Время культивирования: 1 – 45 ч; 2 – 93 ч; 3 – 162 ч; 4 – 210 ч, 5 – 158 ч.

В целом данные, представленные на рис. 5.41–5.42 указывают на отсутствие прямой зависимости между накоплением биомассы в ходе культивирования и синтезом бактериородопсина, скорее напротив, при высоком уровне накопления биомассы синтез бактериородопсина репрессируется и синтезируются каротиноиды, пики которых начинают проявляться уже на ранних стадиях роста.

Последующие опыты проводились со штаммом UM-17 на среде, обеспечившей наилучшие показатели синтеза бактериородопсина (триптон Serva с дрожжевым экстрактом Organotechnie и глицерином). В качестве основной использовалась среда состава, г/л: NaCl – 250, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 20, KCl – 2, цитрат Na – 3, триптон фирмы Serva – 5, дрожжевой экстракт Organotechnie – 2, глицерин, мл/л – 4.

Апробировали различные типичные подходы к повышению показателей культивирования:

- культивирование с подпиткой питательной средой;
- изменение интенсивности аэрации и уровня освещения;
- изменение состояния и дозы посевного материала;
- культивирование с добавлением отработанной культуральной жидкости.

Эксперименты, проведенные с исходными штаммами 353П, ST-033, и полученными сиреневым UM-17, оранжевым UM-53, белым UM-79 (см. табл. 5.5), вы-

ращиваемыми в качалочных колбах, показали, что при подпитке стерильными высококонцентрированными растворами вносимых компонентов исходный штамм 353П и оранжевый штамм UM-53 способны накапливать относительно высокий уровень биомассы (10–14 г/л по сухой биомассе) с экономическими коэффициентами выхода биомассы 0,58 г АСБ/г и 0,43 г АСБ/г комплексного органического субстрата соответственно. Однако при этом наблюдается низкое содержание БР в среде, не более 5–8 мг/л. Штаммы ST-033 и UM-17, имеющие сиреневую окраску, накапливали биомассу до уровня 4–5 г/л с экономическим коэффициентом выхода биомассы 0,25–0,27 г АСБ/г комплексного органического субстрата при существенно большем содержании БР по сравнению с исходными штаммами. Без подпитки сиреневый штамм ST-033 нарабатывал около 45 мг/л БР, после подпитки его содержание падало до 20–25 мг/л. Штамм UM-17 нарабатывал около 70 мг/л БР, а после подпитки – 37 мг/л. Белый штамм UM-79, в котором отсутствуют и каротиноиды, и бактериородопсин, накапливал наименьшее количество биомассы ( $Y = 0,18$  г АСБ/г субстрата). Во всех случаях по мере возрастания числа подпиток рост культуры прекращался, цвет суспензии стремился к ржаво-желтому.

Таким образом, клоны или штаммы галобактерий, окрашенные в оранжевый цвет и в сиреневый цвет, существенно различались по физиологическим характеристикам. Оранжевые штаммы были способны накапливать биомассу при подпитке в 2–2,5 раз больше, чем сиреневые, однако они мало накапливали бактериородопсина. Учитывая, что оранжевый цвет штаммов обусловлен повышенным содержанием каротиноидов, был сделан вывод, что эти штаммы накапливают много биомассы, но мало бактериородопсина и наоборот, накапливающие мало каротиноидов, – меньше биомассы, но синтезируют повышенные количества БР.

Исходя из наблюдаемых различий в опытах с подпиткой, было предложено два варианта объяснения такого влияния накапливающихся продуктов.

1. Учитывая различия в поведении по-разному окрашенных клонов, экологические условия среды обитания галобактерий, а также физиолого-биохимическую роль и свойства каротиноидов как веществ-антиоксидантов, вещества-индукторы, имеющиеся или накапливающиеся в среде культивирования галобактерий и переключающие метаболизм ГБ на синтез каротиноидов, могут быть, в частности, продуктами перекисного окисления компонентов питательной среды. Эти продукты стимулируют синтез каротиноидов, выполняющих защитные функции в отношении роста и накопления биомассы. При этом каротиногенез у сиреневых клонов в определенной степени заблокирован, поэтому такие клоны более чувствительны к перекисным соединениям и накапливают меньше биомассы в процессе культивирования.

2. В процессе культивирования накапливаются продукты метаболизма ГБ – ингибиторы роста ГБ и биосинтеза БР. Клоны, вырабатывающие преимущественно каротиноиды, накапливают гораздо меньше ингибиторов роста ГБ и больше ингибиторов синтеза БР по сравнению с клонами, накапливающими БР. Однако, с этим, вторым предположением плохо согласуется факт уменьшения содержания БР в биомассе сиреневых клонов после подпитки ферментационной среды органическим субстратом.

Как указывалось выше (см. раздел 3.1.4.3), значимыми факторами, стимулирующими образование пурпурных мембран и накопление бактериородопсина галобактериями, являются пониженное содержание кислорода в среде культивирования и освещенность среды [1157, 1530, 1532].

Опыты, проведенные со штаммами UM-17 и ST-033 в колбах на качалке и в биореакторе, показали, что, как и следовало ожидать, с увеличением интенсивности аэрации конечный уровень накопления биомассы возрастал, однако наибольшее накопление БР наблюдалось при умеренной аэрации. Так, при удельной вводимой мощности падающего света на единицу объема 15–20 мВт/л (в пересчете на длину волны 555 нм) существенного понижения скорости прироста биомассы не наблюдалось при уменьшении среднего уровня содержания растворенного кислорода вплоть до 7%. Однако при уровнях растворенного кислорода 20% и более удельное содержание БР уменьшалось, а пики каротиноидов в спектрах лизатов становились все более выраженными. Такие данные согласуются с режимами аэрации, рекомендованными в литературе [1539], согласно которым концентрация растворенного кислорода должна поддерживаться в интервале 10–20%.

При культивировании в колбах на качалке при 50 мл среды в колбе накапливалось около 70–75 мг БР на 1 л. При 75 мл – 55–60 мг/л, при 25 мл – не более 45 мг/л, при этом удельное содержание БР в биомассе было практически одинаково при 50 и 75 мл среды в колбах и существенно ниже при наибольшей аэрации (25 мл среды в колбах).

При снижении интенсивности освещения с 15–20 мВт/л вплоть до 13–14 мВт/л в опытах на колбах падения удельного содержания БР и накопления биомассы не наблюдалось. Дополнительное экранирование колб от света с целью дальнейшего снижения освещенности приводило к уменьшению удельного содержания БР.

Несколько неожиданной оказалась разница в накоплении биомассы на свету и в темноте. Вопреки ожиданиям, в ряде экспериментов накопление биомассы в темноте на 5–10% опережало накопление на свету. Такие результаты можно объяснить либо ингибированием дыхания светом [1510, 1526], либо стимулированием образования ингибиторов роста на свету. Последнее предположение согласуется с выска-

занным выше предположением об образовании продуктов окисления компонентов среды, отрицательно влияющих на рост ГБ. На свету скорость образования таких продуктов, например в результате процессов фотохимического окисления, может быть выше. В то же время, при выращивании ГБ на свету и использовании инокулята, полученного на свету, выход БР был наибольший, как и следовало ожидать согласно литературным данным [1157]. При пересеве штамма UM-17 со света на свет содержание БР составило 73 мг/л, со света в темноту – 62 мг/л, с темноты на свет – 36 мг/л, с темноты в темноту – 29 мг/л. Цвет суспензии к концу культивирования при использовании инокулята, полученного в темноте, был более желтый, и спектр лизатов свидетельствовал о более высоком содержании каротиноидов относительно содержания бактериородопсина. Цвет суспензии при использовании инокулята, полученного на свету, был пурпурный.

Если исходить из предположения об отрицательном влиянии света на рост ГБ вследствие более интенсивного образования ингибиторов роста на свету, то тогда следует сделать вывод о меньшем влиянии этих продуктов на синтез БР по сравнению с их влиянием на рост ГБ. В пользу предположения о большем накоплении ингибиторов биосинтеза на свету свидетельствуют и наблюдения о большей частоте образования оранжевых клонов штаммом ST-033 на свету, чем в темноте при высеве его на твердую среду. При пересевах и выращивании штамма на твердой среде в темноте оранжевых клонов появляется крайне мало. Эти данные также согласуются с предположением о накоплении в среде культивирования веществ, в частности, продуктов перекисного окисления компонентов питательной среды, переключающих метаболизм ГБ на синтез каротиноидов. Их более интенсивное накопление на свету приводит к повышению частоты расщепления сиреневых (пурпурных) клонов с образованием оранжевых колоний. В любом случае, независимо от механизмов воздействий света, кислорода и компонентов питательной среды на биосинтез у галобактерий, очевидно необходимо учитывать, что:

- 1) свет непосредственно стимулирует синтез бактериородопсина;
- 2) свет может индуцировать образование продуктов фотохимического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина;
- 3) кислород благоприятно влияет на накопление биомассы, а при большом содержании в ферментационной среде, непосредственно репрессирует синтез БР;
- 4) кислород может индуцировать образование продуктов химического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно

стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина.

Совокупный результат сочетанного воздействия света и кислорода может определяться всеми четырьмя отмеченными воздействиями, преобладанием одних изменений над другими. Очевидно, должны быть оптимальные диапазоны освещения среды и аэрации, в максимальной степени способствующие накоплению биомассы галобактерий и бактериородопсина.

Эксперименты показали, что скорость роста и уровень накопления биомассы в определенной степени зависят и от состояния посевного материала, а именно его дозы и фазы роста. Оптимальным является внесение 4% инокулята. При таком засеве накапливается 70–75 мг/л БР, постферментационная среда имеет сиреневый (пурпурный) оттенок. При меньших и больших дозах засева насыщенность получаемой суспензии желтым цветом более выражена, выход БР меньше при практически одинаковом накоплении биомассы.

С увеличением возраста посевного материала наблюдалось лишь незначительное уменьшение скорости и конечного уровня накопления биомассы, при этом достоверные отличия в уровне накопления БР выявлены не были.

Внесение инокулята с отделением клеток от культуральной жидкости или без отделения не влияло существенно на результаты ферментации. Этот факт также свидетельствует в пользу предположения о накоплении ингибиторов биосинтеза непосредственно из компонентов питательной среды. При малых дозах засева фаза активного роста продлевается и за большее время культивирования может накопиться существенно больше рост-угнетающих продуктов побочных реакций, в которых могут участвовать компоненты питательной среды.

Меру воздействия возможных метаболитов и продуктов окисления компонентов питательной среды, ингибирующих рост галобактерий и синтез ими бактериородопсина, иллюстрируют результаты опытов с внесением определенной доли отработанной культуральной жидкости (ОКЖ) в исходную среду культивирования (рис. 5.43–5.45).

Видно, что для штамма UM-17 существенное торможение роста наблюдается, лишь когда содержание ОКЖ в исходной питательной среде составляет более 60% общего объема среды культивирования (рис. 5.43). Однако снижение в уровне накопления БР начинается уже при внесении ОКЖ в объеме 1/5 от общего объема питательной среды (рис. 5.44). Спектры лизатов, полученные для штамма UM-17 в этих вариантах экспериментов, демонстрируют, что с увеличением доли внесенной ОКЖ увеличивается содержание каротиноидов по отношению к содержанию БР (рис. 5.45).

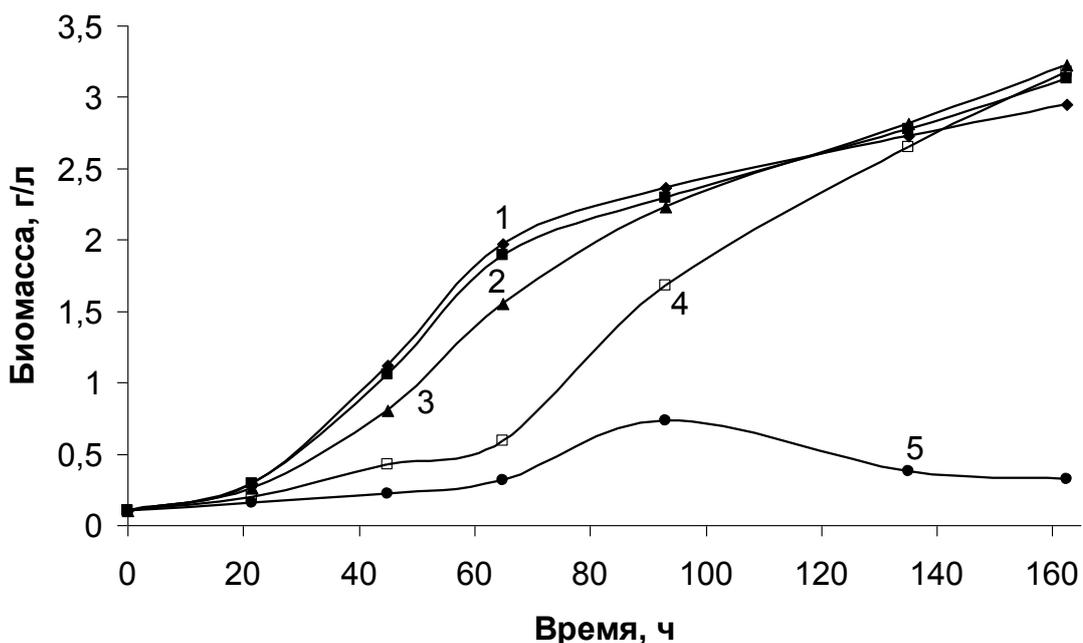


Рисунок 5.43 – Динамика накопления биомассы штамма UM-17 при внесении отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах исходная среда с внесенной ОКЖ содержала одно и то же количество органического субстрата.

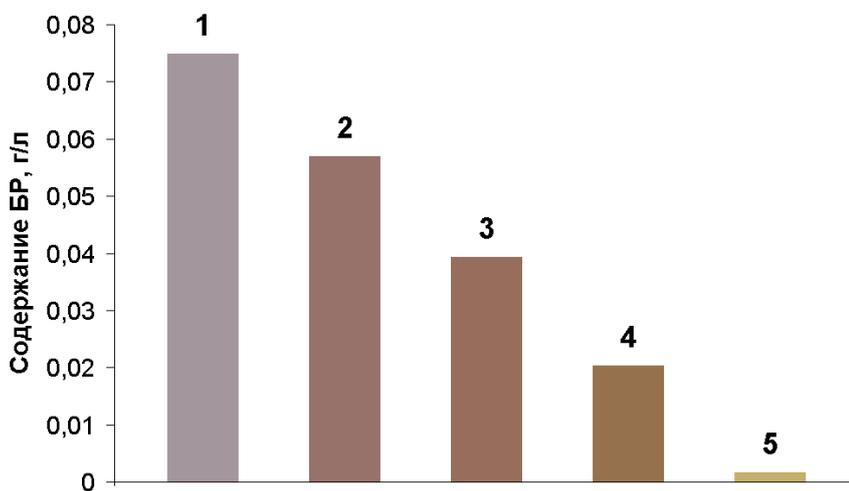


Рисунок 5.44 – Цвет суспензии и уровень накопления БР штаммом UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Измерение БР проводилось в конце (на 163 ч) культивирования.

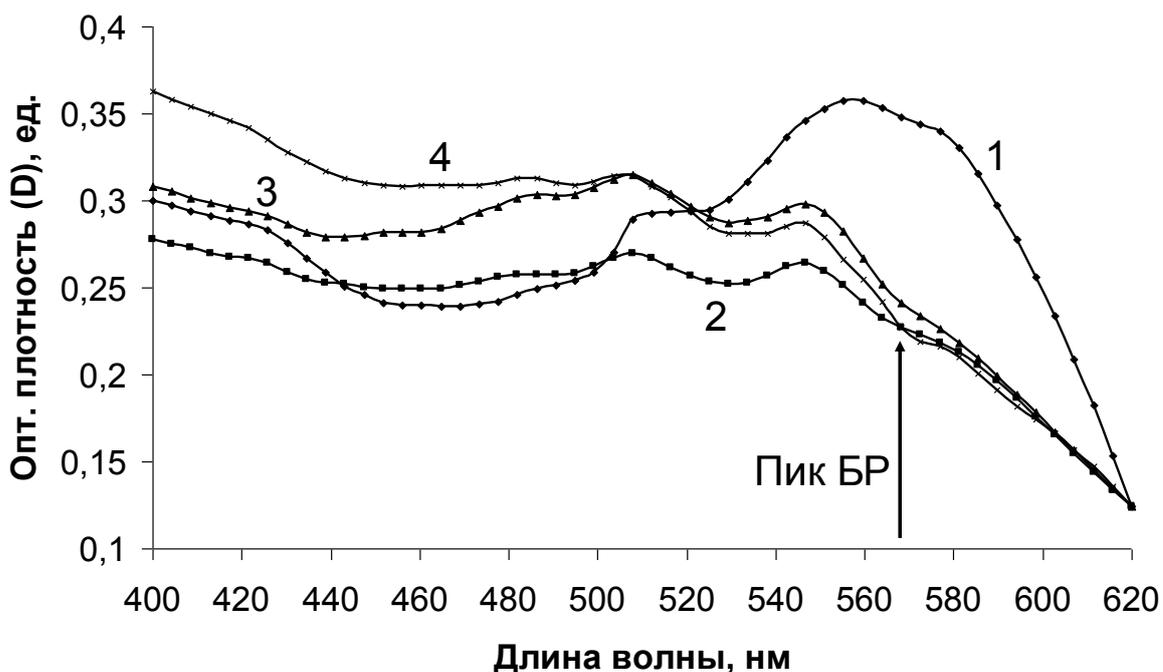


Рисунок 5.45 – Спектры лизатов биомассы штамма UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в исходную питательную среду.

1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема.

Выработка каротиноидов определяет изменения в цвете суспензии вариантов – конечный цвет суспензии меняется с увеличением доли ОКЖ в исходной среде от сиреневого до ржаво-желтого (рис. 5.44). Результаты культивирования штамма ST-033 с добавлением ОКЖ были аналогичны результатам, полученным со штаммом UM-17 за исключением варианта с добавлением 4/5 объема ОКЖ, при котором наблюдался рост штамма ST-033. Возможно, это обусловлено тем, что штамм ST-033 менее чувствителен к накапливаемым ингибиторам метаболизма, поскольку он изначально содержит существенно больше каротиноидов и меньше бактериородопсина и неустойчив – расщепляется при пересеве на твердые среды на сиреневые, оранжевые и белые клоны. Такие отличия свидетельствуют в пользу возможной роли каротиноидов в устранении негативного влияния ингибиторов в ферментационной среде.

Таким образом, результаты опытов с внесением ОКЖ свидетельствуют, что хотя в постферментационной среде и содержатся ингибиторы ГБ, но существенное торможение их роста наблюдается лишь при возврате очень высокой доли ОКЖ – более 60% от объема среды, т.е. ингибирование роста ГБ, обусловленное накоплением продуктов жизнедеятельности ГБ, выражено лишь в незначительной степени. Более чувствителен к ингибиторам, содержащимся в ОКЖ, синтез бактериородоп-

сина. Для сохранения показателей роста доля отработанной среды по отношению к исходной не должна превышать 15–20%. Учитывая, однако, что в ОКЖ могут сохраняться и продукты, образующиеся абиотически из исходных компонентов среды, предположение о роли метаболитов биологического происхождения, как единственного фактора ингибирования роста ГБ и синтеза БР, представляется не совсем обоснованным.

### 5.3.3. Исследование эффекта «старения» среды

Предположение, что основными ингибиторами роста ГБ и синтеза БР могут быть продукты, образующиеся при протекании побочных абиотических реакций с участием компонентов питательной среды, получило наиболее убедительное подтверждение в опытах с изучением эффекта старения среды. Такое «старение» может быть обусловлено образованием продуктов химического и/или фотохимического окисления из органических компонентов питательной среды при ее хранении. Эти продукты могут ингибировать рост и биосинтез.

Было обращено внимание, что уже при культивировании на 2-х суточной среде, заготовленной впрок и хранящейся при комнатной температуре и дневном освещении, наблюдались существенно худшие рост галобактерий и накопление БР. Аналогичные, но более интенсивные процессы старения среды могут протекать и в ходе культивирования галобактерий (5–7 суток культивирования при температуре 37–38 °С и аэрации).

Как уже было отмечено при обзоре литературы (см. раздел 2.4) такие соединения как липиды, которые могут входить в состав примесей используемых органических субстратов, могут подвергаться процессам перекисного окисления [364]. В эти реакции могут вступать и другие классы соединений, включая аминокислоты [1015]. Образовавшиеся вещества могут оказывать токсическое действие на липиды мембран ГБ, другие структуры, вызывать у ГБ состояние оксидативного стресса и индуцировать синтез веществ-антиоксидантов, участвующих в ответе бактерий на стресс-факторы, в частности, каротиноидов [333, 635, 636, 638]. Имеются также сообщения [333, 638, 657], что каротиноиды в определенных условиях приобретают прооксидантные свойства. При взаимодействии их как антиоксидантов с активными формами кислорода в реакциях окисления – дезактивации могут образовываться токсичные соединения.

С целью выяснения роли фактора «старения» среды были проведены опыты, в которых стерильная среда перед засевом инокулятом находилась на качалке без за-

сева 2, 4, 6 суток при аэрации и освещении – с последующим выращиванием штамма UM-17. Результаты опытов представлены на рис. 5.46.

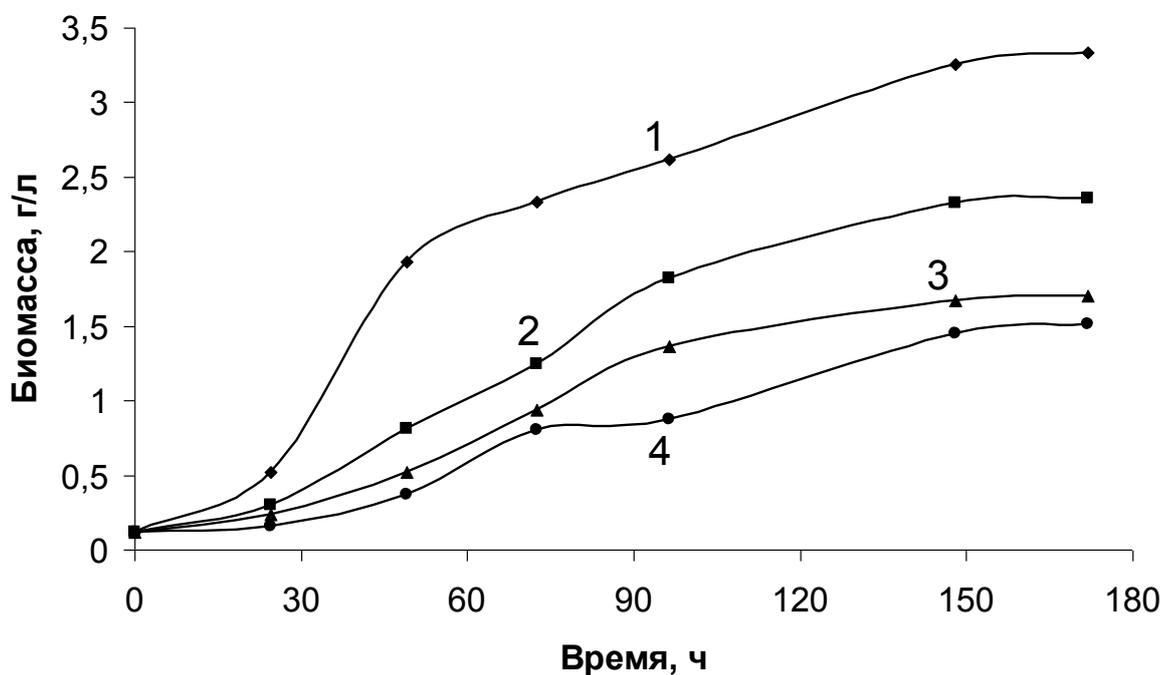


Рисунок 5.46 – Влияние «возраста» питательной среды на накопление биомассы штаммом UM-17.

1 – с внесением инокулята в свежеприготовленную среду, 2 – 2 сут. аэрации и освещения стерильной среды до засева, 3 – 4 сут. аэрации и освещения среды до засева, 4 – 6 сут. аэрации и освещения среды до засева.

Как видно из представленных данных, уровень накопления биомассы закономерно падал с увеличением «возраста» среды перед засева. К концу культивирования активного по синтезу БР штамма UM-17 на среде с предварительной аэрацией и освещением ее в течение 6 сут. накопление биомассы составило лишь около 50% по сравнению с использованием свежеприготовленной среды (рис. 5.46). Содержание БР после 160 ч культивирования составило: для свежеприготовленной среды – 72 мг/л, при использовании двухсуточной питательной среды – 37 мг/л, четырехсуточной – 22 мг/л, шестисуточной – 14 мг/л. Суспензия клеток в варианте со свежей средой имела насыщенный сиреневый цвет. По мере увеличения возраста среды наблюдалось все более и более существенное изменение цвета суспензии с увеличением доли ржаво-желтых оттенков и убыванием сиреневого, что свидетельствовало о возрастании количества каротиноидов. При этом эффект изменения цвета не был обусловлен изменением цвета исходной среды при старении: среда при аэрации и освещении без засева своих цветовых свойств не изменяла в течение,

по крайней мере, 12 сут. после нахождения при 37 °С и аэрации при  $N_{об. меш.} = 150$  об./мин.

Штамм ST-033, менее активный в отношении синтеза БР и накапливающий больше каротиноидов в аналогичных опытах, оказался менее чувствительным к «старению» среды по сравнению со штаммом UM-17.

Дополнительные опыты показали, что эффект ингибирования более выражен при выдерживании среды на свету по сравнению с выдерживанием в темноте. Насыщенность сиреневого цвета в варианте со свежей средой и оранжево-желтого цветов в варианте «состаренной» среды на свету была больше, чем в вариантах в темноте.

Такая сильная зависимость конечных результатов от возраста среды, особенно для более активного по синтезу БР штамма UM-17, свидетельствует, что **старение среды, проявляющееся в абиотическом накоплении ингибиторов биосинтеза, является одним из ключевых факторов, влияющих на рост биомассы ГБ и синтез БР.**

Наиболее вероятно, что в питательной среде протекают процессы химического и фотохимического окисления ее компонентов, приводящие к ингибированию роста галобактерий, синтеза ими БР и к индукции синтеза каротиноидов [654]. На свету эти процессы более интенсивны, поскольку наряду с химическим окислением компонентов среды, происходит и их фотохимическое окисление. Чем больше возраст среды, тем больше образующихся токсичных продуктов, меньше уровень накопления биомассы и БР, отчетливее и раньше проявляются пики каротиноидов в спектрах лизатов. Можно предположить, что продукты химического и фотохимического окисления, приводящие к образованию перекисных и радикальных частиц [348, 654], участвуют в регуляции синтеза каротиноидов и БР на внутриклеточном уровне, стимулируя в первую очередь синтез каротиноидов (желто-ржавый оттенок) и репрессируя синтез БР, а также стимулируя расщепление исходного клона на субклоны разного цвета. О возможности такого расщепления и образования мутантов под действием продуктов перекисного окисления аминокислот и других органических соединений свидетельствуют и данные литературы [1015].

**Накопление ингибиторов роста и биосинтеза – продуктов химических и фотохимических реакций, очевидно, происходит и по ходу культивирования параллельно с накоплением биомассы.** Совместное действие продуктов абиотических и биотических процессов – ингибиторов метаболизма – приводит к замедлению роста галобактерий и накопления ими бактериородопсина, ухудшению качества посевного материала.

### 5.3.4. Влияние пероксида водорода и мягкого УФ-излучения

Вывод о возможном участии перекисных частиц в регуляции синтеза каротиноидов и БР, стимулировании ими синтеза каротиноидов и репрессии синтеза БР был подтвержден в прямых опытах с внесением  $H_2O_2$  в среду культивирования галобактерий, а также с облучением суспензии галобактерий мягким ультрафиолетом (УФА-диапазона).

В опытах с внесением  $H_2O_2$  в среду культивирования штамма UM-17 предварительно была найдена критическая концентрация пероксида водорода, не приводящая к инаktivации клеток ГБ, а именно 0,4–0,6 г  $H_2O_2$  на 1 л среды. Однако результат внесения 0,5 г/л  $H_2O_2$  зависел от фазы роста. Внесение такого количества пероксида в момент засева и в поздней стадии роста приводило к гибели клеток ГБ, при внесении в момент активного роста гибели популяции не наблюдалось, однако БР накапливалось существенно меньше: 27 мг/л БР – при внесении  $H_2O_2$  на 18-ый час культивирования, 39 мг/л БР – при внесении на 44-ый час, и 77 мг/л – в контроле без внесения  $H_2O_2$ . Цвета суспензии клеток в вариантах с внесением  $H_2O_2$  были оранжевые, в спектрах лизатов присутствовали пики каротиноидов. Цвет суспензии в контрольном варианте – сиреневый. Следует заметить, что в данном случае использовались галобактерии, неадаптированные к  $H_2O_2$ .

Аналогичные изменения наблюдались при воздействии разных сублетальных доз мягкого ультрафиолета. После облучения конечный уровень накопления биомассы был выше, чем в контроле без облучения. Эти различия по сравнению с необлученным вариантом были тем меньше, чем позже была облучена суспензия галобактерий. В накоплении БР наибольшие различия также наблюдались при облучении культуры во время засева. С увеличением продолжительности облучения цвет суспензии ГБ в конце культивирования приобретал все более выраженный оранжевый оттенок, а в спектрах лизатов пики каротиноидов становились все более явными.

Таким образом, непосредственное воздействие сублетальных доз пероксида водорода или УФА излучения стимулирует синтез каротиноидов и накопление биомассы галобактерий и репрессирует синтез бактериородопсина.

Высевы на агаризованную среду штамма UM-17, подвергнутого воздействию  $H_2O_2$  или мягкого ультрафиолета, показали, что культура к 3-му пассажу приобретает свои первоначальные характеристики в отношении роста и выработки БР. При высевах ее на агаризованную среду наблюдались типичные колонии без расщепления. Таким образом,  $H_2O_2$  или мягкий ультрафиолет не вызывали образования стабильных мутантных линий галобактерий.

Взаимосвязь между накоплением биомассы, каротиноидов, бактериородопсина можно объяснить, исходя из экологической стратегии регуляции метаболизма у галобактерий.

Непосредственно на поверхности воды или твердых субстратов содержание кислорода и освещенность видимым светом и ультрафиолетом Солнца высокие. В таких условиях активируется аэробное дыхание, окислительное фосфорилирование, выход биомассы повышается, образуется повышенное количество активных форм кислорода (перекисей и др.), а с этим активируется и синтез каротиноидов, выполняющих антиоксидантные, защитные функции в отношении накопления биомассы; бактериородопсин не нужен. В толще воды или биопленок наблюдается дефицит кислорода, ультрафиолетовое излучение сильно ослаблено, видимого света достаточно. В этих условиях аэробное дыхание и окислительное фосфорилирование репрессировано, каротиноиды не нужны, но нужен бактериородопсин, позволяющий клеткам получать дополнительную энергию в результате светозависимой генерации трансмембранного градиента протонов в условиях дефицита кислорода.

Исходя из представленных результатов исследований по значимости влияния на рост галобактерий и накопление бактериородопсина экологические и биологические факторы могут быть ранжированы следующим образом (в порядке убывания значимости): особенности штамма > интенсивность аэрации  $\approx$  продукты перекисного окисления компонентов среды > состав триптонов или пептонов, входящих в питательную среду > уровень освещения  $\approx$  доза посевного материала > ингибиторы метаболизма, накапливающиеся в процессе жизнедеятельности галобактерий > фаза роста посевного материала  $\approx$  состав дрожжевых экстрактов, входящих в питательную среду.

Для получения бактериородопсина в промышленных объемах используется культивирование с достаточно интенсивным подводом кислорода и освещением среды. Однако такой режим приводит к повышению скорости образования ингибиторов роста биомассы ГБ и накопления БР.

Выявленные закономерности позволили предположить, что для разработки технологически рациональных способов культивирования галобактерий целесообразно использовать такие приемы, которые снижают содержание продуктов фотохимического и химического окисления (в частности, перекисей, активных форм кислорода) в среде культивирования галобактерий, нивелируют, подавляют воздействие этих факторов оксидативного стресса, т.е. разработать способы культивирования галобактерий в условиях **контролируемого оксидативного воздействия (контролируемого оксидативного стресса)**.

### **5.3.5. Разработка способов культивирования в условиях контролируемого оксидативного воздействия**

Основываясь на полученных данных о негативном воздействии ингибиторов биосинтеза, образующихся по ходу культивирования в результате абиотических и биотических процессов, были апробированы методы культивирования, нивелирующие их отрицательное действие. Использовались следующие подходы:

**1 – подготовка посевного материала** (с целью возможного уменьшения степени репрессии синтеза БР продуктами, содержащимися в посевном материале и воздействующими на клетки галобактерий уже на стадии выращивания посевного материала);

**2 – культивирование с доливом** (по ходу культивирования постепенно доливается определенный объем свежеприготовленной среды, при этом совокупное количество образующихся токсичных продуктов должно быть меньше);

**3 – внесение антиоксидантов;**

**4 – подбор условий освещения** (стимулирование выработки БР при одновременном уменьшении фотохимического воздействия на среду);

**5 – селективное извлечение ингибиторов сорбентом в процессе роста.**

Во всех этих случаях эксперименты проводились со штаммом UM-17 как в колбах, так и в биореакторе.

#### **5.3.5.1. Подготовка посевного материала**

Очевидно, клетки галобактерий, выращиваемые в качестве посевного материала, также могут подвергаться воздействию продуктов химического или фотохимического окисления компонентов питательной среды. В результате в таких клетках индуцирован синтез каротиноидов и репрессирован синтез бактериородопсина.

Учитывая стимулирующее влияние продуктов перекисного окисления на синтез каротиноидов и появление оранжевых клонов, целенаправленно была проведена серия экспериментов, в которых выращивали посевной материал на среде с добавлением активированного угля. Продукты окисления – ингибиторы биосинтеза могут поглощаться из питательной среды добавляемыми сорбентами, в частности, активированным углем. Кроме того, в опытах, проведенных в чашках Петри с внесением гранул угля в твердую агаризованную среду, расщепление клонов, образующих сиреневые колонии, на субклоны с разной цветовой окраской, в большинстве своем не наблюдалось.

Использовался активированный уголь марки АГ-3, хорошо сорбирующий органические компоненты среды.

Первоначально апробировалось культивирование с внесением в жидкую среду адсорбента в марлевом или полотняном мешочке (для предотвращения разрушения гранул угля, см. раздел 5.3.1). Однако эксперименты показали, что такой способ внесения угля не стимулирует, а тормозит рост галобактерий. Возможно это обусловлено адсорбцией клеток галобактерий на поверхности угля и, как следствие, неблагоприятными условиями для роста клеток, в частности, дефицитом кислорода в микроразделах контакта. Однако при этом суспензия клеток приобретала сиреневую окраску, а на спектре лизата исчезали пики каротиноидов.

Более убедительные положительные результаты были получены при внесении угля, инкапсулированного в агаризованную минеральную основу (без добавления органических компонентов питания). Проведение культивирования по такому варианту аналогично процессу гемосорбции, применяемому в медицине для очистки крови от токсичных веществ [1926]. Инкапсулирование в гемосорбции предотвращает разрушение форменных элементов крови, например эритроцитов.

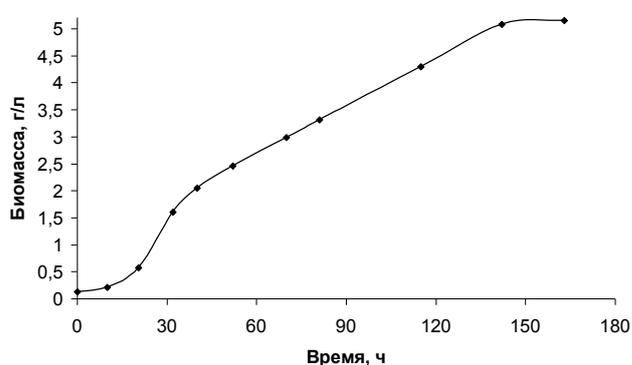
По варианту культивирования с использованием инкапсулированного в агар угля подготовка посевного материала проводилась по процедуре, описанной в разделе 4.1.1. Стерильная питательная среда (5 г/л триптона фирмы Serva или Hispanlab, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie, 4 мл/л глицерина и минеральные компоненты) заливалась в колбу с углем и агаром и засеивалась клетками галобактерий в количестве 4% суспензии клеток от объема жидкой среды в колбах. Засеянные колбы ставились на качалку.

В табл. 5.6 приведены результаты экспериментов с внесением в колбы разного количества угля. Видно, что в этих условиях конечные уровни накопления биомассы и бактериородопсина существенно выше уровней, достигаемых без угля. Увеличение количества внесенного угля вплоть до 20–30 г/л (1,0–1,5 г на колбу) повышало уровень накопления БР. Внесение угля в больших количествах уже не приводило к существенному росту уровня накопления биомассы и БР. Суспензия клеток в конце культивирования с углем имела насыщенный сиреневый цвет.

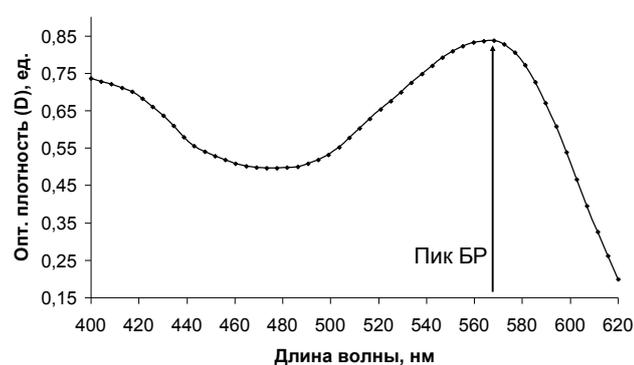
Исходя из результатов этих опытов, для получения максимального выхода БР количество инкапсулированного угля в колбе должно составлять 1,0–1,5 г на колбу (20–30 г/л). Типичная кривая роста биомассы и спектр лизата биомассы штамма UM-17 при внесении в колбу 1,5 г угля с инкапсулированием его в агаризованную среду представлены на рис. 5.47.

Таблица 5.6 – Культивирование галобактерий в колбах с активированным углем, инкапсулированным в агар

Количество угля (г) на 1 л культуральной жидкости	Биомасса (г/л) на 163 час культивирования	БР (мг/л) на 163 час культивирования
0	3,1–3,3	70–75
4	4,44	97
12	4,95	110
20	5,1	119
28	5,12	125
30	5,15	125–130



А



Б

Рисунок 5.47 – Накопление биомассы ГБ (А) и спектр лизата биомассы штамма UM-17 (Б) при культивировании с инкапсулированным адсорбентом (активированный уголь АГ-3).

Очень важно, что при использовании сорбента в спектре лизата биомассы галобактерий практически полностью отсутствуют пики каротиноидов и проявляется только ярко выраженный пик БР (рис. 5.47), что в дальнейшем позволяет существенно облегчить выделение БР из биомассы, очистку его от каротиноидов и обеспечить получение относительно недорогих препаратов БР.

Полученный таким образом посевной материал сохранял повышенную способность накапливать бактериородопсин на среде без угля на протяжении последующих двух пересевов, однако его активность постепенно падала. При первом пассаже после выращивания на агаризованной среде с углем выход БР составлял около 100 мг/л БР (засевной материал – 125 мг/л) при уровне накопления биомассы 3,8–3,9 г/л, во втором пассаже – 80–85 мг/л БР, в третьем – практически соответствовал типичным значениям, наблюдаемым без использования угля (75–77 мг БР на 1 л среды).

Высокую биосинтетическую активность галобактерий в этих опытах можно объяснить удалением части ингибиторов метаболизма из жидкой фазы среды в агаризованную среду, в которую клетки ГБ не проникают, и, как следствие, дерепрессией синтеза БР. Это приводит к увеличению содержания биомассы и БР в жидкой фазе. Результаты, представленные в табл. 5.6, и сохранение повышенной биосинтетической активности клеток галобактерий на протяжении первых двух пассажей при культивировании на среде без угля указывает на значимость непосредственно угля как селективного материала, извлекающего ингибиторы синтеза БР из среды культивирования.

Таким образом, при использовании посевного материала штамма UM-17, выращенного на среде с углем в периодических условиях, конечный уровень накопления биомассы повышается на 50–65%, существенно повышается удельная скорость роста, значение которой достигает  $0,09 \text{ ч}^{-1}$ , а накопление БР – на 65–85% при примерно одинаковой продолжительности культивирования и уменьшении содержания каротиноидов в биомассе.

### 5.3.5.2. Культивирование в доливном режиме

При апробации доливного режима осуществляли постепенный долив одной и той же порции свежей стерильной среды через одинаковые промежутки времени. Засев осуществлялся инокулятом, выращенным с применением инкапсулированного активированного угля; первоначальный объем культивирования равнялся объему последующего однократного долива, содержание растворенного кислорода в жидкости поддерживалось на уровне 5–10%.

По ходу доливного культивирования наблюдалось постепенное снижение скорости роста биомассы с  $0,054 \text{ ч}^{-1}$  до первого долива до  $0,049 \text{ ч}^{-1}$  после 1-го долива и до  $0,025 \text{ ч}^{-1}$  после 2-го. Третий долив привел к еще большему замедлению роста, после 4-го содержание клеток начало уменьшаться (рис. 5.48). В накоплении БР прослеживались те же тенденции, что и в накоплении биомассы. При выбранном временном интервале между доливами целесообразно применять лишь 2 долива, в каждом из которых вносилось бы по 1/3 от конечного объема культуральной жидкости.

Максимальный уровень накопления БР после 2-го долива приходился на третьи сутки культивирования и составлял 90 мг/л, что характерно при применении инокулята, подготовленного на инкапсулированном адсорбенте. Однако по сравнению с вариантом культивирования в периодических условиях при том же режиме аэрации галобактерии накапливали биомассы больше на 40–45%, с большим экономическим коэффициентом выхода от субстрата.

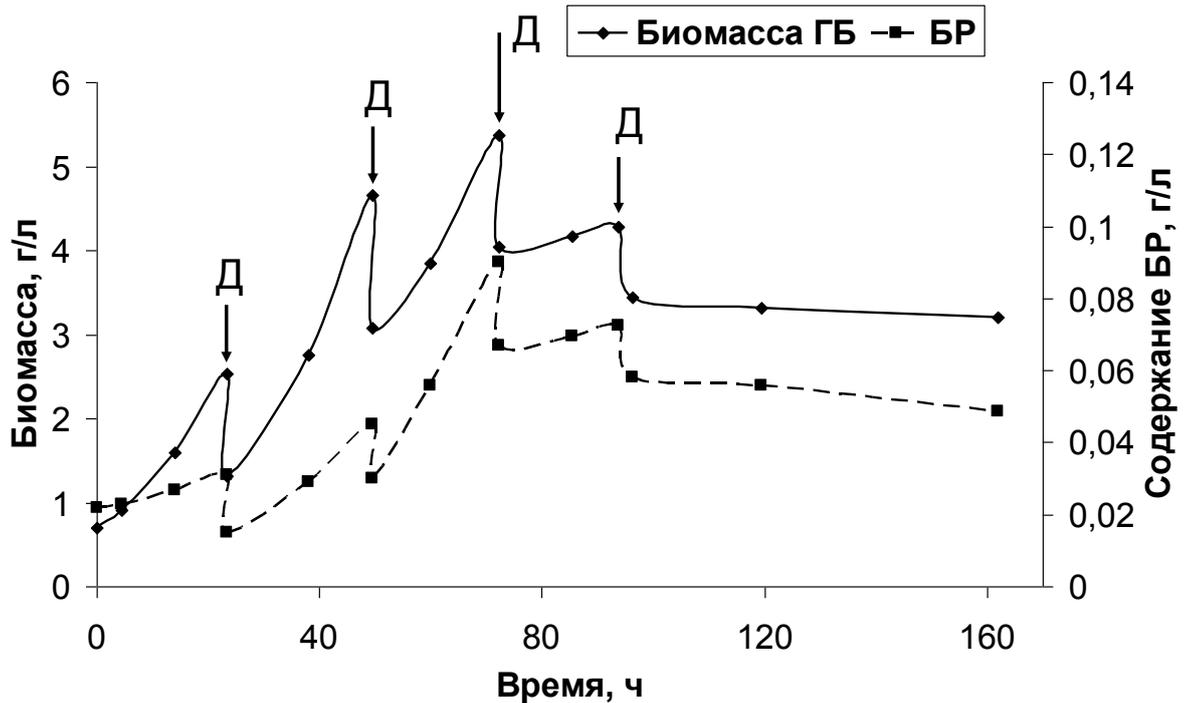


Рисунок 5.48 – Накопление биомассы и БР при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с доливом свежеприготовленной питательной среды. Д – долив среды.

### 5.3.5.3. Культивирование с внесением антиоксидантов

Эксперименты были проведены в качалочных колбах. Испытывалось на антиоксидантную активность действие:  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , цистеина, токоферола (витамин Е), тиамина,  $\text{B}_{12}$  (цианокобаламин),  $\text{B}_6$  (пиридоксин), аскорбиновой кислоты, аргинина. Вещества вносились при засеве в количествах 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 г/л. Также варьировался момент внесения веществ от начала культивирования. Критерием антиоксидантной активности было исчезновение пиков каротиноидов в спектре лизата галобактерий и усиление пика бактериородопсина. Результаты опытов при внесении антиоксидантов в начальный момент культивирования представлены в табл. 5.7.

Из этих данных видно положительное влияние сульфита натрия, цистеина, тиамина, цианокобаламина и токоферола на выход БР. При этом внесение цистеина приводит к повышению уровня накопления БР и наиболее существенному изменению спектра лизата в сторону синтеза БР и подавления синтеза каротиноидов.

Варьирование количества внесенных веществ в использованном диапазоне не приводило к заметным изменениям результатов. Однако, чем позднее происходило внесение, тем меньше проявлялся антиоксидантный эффект.

Таблица 5.7 – Результаты опытов с внесением антиоксидантов в исходную питательную среду

Вещество	Прирост в уровне накопления бактериородопсина, % к контролю	Влияние на выработку каротиноидов (сравнение с контролем)	Прирост в уровне накопления биомассы, % к контролю
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	107–110%	по сравнению с контролем пики каротиноидов более выражены	уровень контроля
Цистеин	115–118%	полное исчезновение пиков каротиноидов, отчетливое проявление пика БР	уровень контроля
Токоферол (витамин Е)	107–110%	уменьшение проявления пиков каротиноидов, пик БР более выражен	128%
Тиамин	107–110%	уменьшение проявления пиков каротиноидов, пик БР более выражен	уровень контроля
В <sub>12</sub> (цианкобаламин)	109–112%	уменьшение проявления пиков каротиноидов, пик БР более выражен	уровень контроля
В <sub>6</sub> (пиридоксин)	12–15%	ярко выраженные пики каротиноидов, нет выраженного пика БР	60%
Аскорбиновая кислота	5–8%	ярко выраженные пики каротиноидов, пик БР отсутствует	33%
Аргинин	32–35%	более выраженные пики каротиноидов, нет выраженного пика БР	112%
Контроль	70 мг/л (100%)	имеются пики каротиноидов и пик БР	3,2 г/л (100%)

#### 5.3.5.4. Подбор условий освещения

С целью изучения возможности оптимизации облучения галобактерий как варианта уменьшения скорости образования ингибиторов биосинтеза проводились тестовые опыты с использованием светодиодов разных длин волн: красного ( $\lambda=642$  нм), светло-зеленого ( $\lambda=529$  нм), зеленого ( $\lambda=513$  нм), голубого ( $\lambda=465$  нм)<sup>1</sup>. Энергетическая мощность падающего света при облучения светодиодами варьировалась от 69–70 мВт/л до 137–140 мВт/л. Эксперименты со светодиодной матрицей голубого света ( $\lambda=465$  нм) показали наилучшие результаты среди вышеуказанного набора светодиодов, а также использованных в работе люминесцентных ламп. При освещении ферментационной среды светодиодной матрицей с  $\lambda=465$  нм выход биомассы в периодическом режиме культивирования повышался на 10%, а БР – на 22% по сравнению с контрольными опытами при освещении лампами дневного

<sup>1</sup> Светодиодные матрицы были предоставлены и эксперименты проводились совместно с НТЦ-44 ГУП НПО «Астрофизика»

света с интенсивностью облучения 69–70 мВт/л. Повышение интенсивности облучения до 137–140 мВт/л не приводило к заметным изменениям в выходе биомассы галобактерий и бактериородопсина.

Таким образом, облучение монохроматическим голубым светом светодиодной матрицы положительно влияет на выход биомассы и БР. Возможно, это обусловлено тем, что монохроматическое освещение определенной длины волны, а не широкого спектра, как у люминесцентных ламп, с одной стороны, стимулирует образование бактериородопсина, с другой – уменьшает скорости протекания процессов фотохимического окисления компонентов питательной среды и/или выработку каротиноидов, с третьей – способствует фоторепарации, протекающей с участием фотолиазы Phr2, наиболее эффективно поглощающей свет с длиной волны 440 нм [1070, 1550] и функционирующей при протекании перекрестного ответа на стрессовое воздействие АФК.

#### **5.3.5.5. Культивирование с селективным извлечением ингибиторов сорбентом в процессе роста**

Вышеописанные опыты с апробированием методов культивирования, нивелирующих отрицательные воздействия ингибиторов биосинтеза, показали, что варианты культивирования при обработке среды сорбентом на стадии подготовки посевного материала, но без внесения сорбента при последующем культивировании позволяют лишь незначительно повысить уровень накопления биомассы и бактериородопсина без существенного уменьшения содержания каротиноидов в биомассе галобактерий, накапливаемой к концу ферментации. Так, внесение антиоксидантов (цистеина, токоферола, сульфита натрия) увеличивает выход биомассы и БР на 10–15%. Изменение условий освещения (интенсивности, длины волны) повысило выход биомассы не более, чем на 10%, а БР – на 22%. При обработке среды сорбентом лишь на стадии подготовки посевного материала в дальнейшем при последующих пересевах и размножении клеток наблюдается постепенное снижение активности в отношении синтеза БР.

В этой связи закономерное развитие метода с сорбентом, очевидно поглощающим из культуральной жидкости продукты, которые препятствуют росту галобактерий и выработки ими бактериородопсина, заключалось в проведении всего цикла ферментации – от стадии подготовки посевного материала до стадии основной ферментации – с использованием сорбента (активированного угля, а также полимерного ионита).

На рис. 5.49 приведены результаты эксперимента при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментационной суспензии через выносной контур с емкостью с сорбентом (уголь АГ-3, инкапсулированный в гранулы агаризованной среды) для извлечения ингибиторов биосинтеза.

По ходу ферментации уровень растворенного кислорода поддерживался ниже 15% от насыщения. Для повышения выхода биомассы ГБ и содержания БР в реактор вносили свежеприготовленную субстратную подпитку, представляющую концентрированный раствор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и глицерин, а также после 140 ч культивирования обновили гранулы с инкапсулированным углем. Совокупный объем гранул агара с углем по отношению к объему среды в реакторе (с учетом долива) составил 1 часть на 7 частей среды. Решение о замене адсорбента принималось на основании разработанной экспресс-методики с градиентной картой изменения цвета (см. рис. 4.6, на котором показана линия изменения цвета суспензии в реальном процессе культивирования галобактерий с внесением инкапсулированного угля). Заблаговременная замена позволила предупредить выработку каротиноидов и поддерживать метаболизм галобактерий в состоянии синтеза БР.

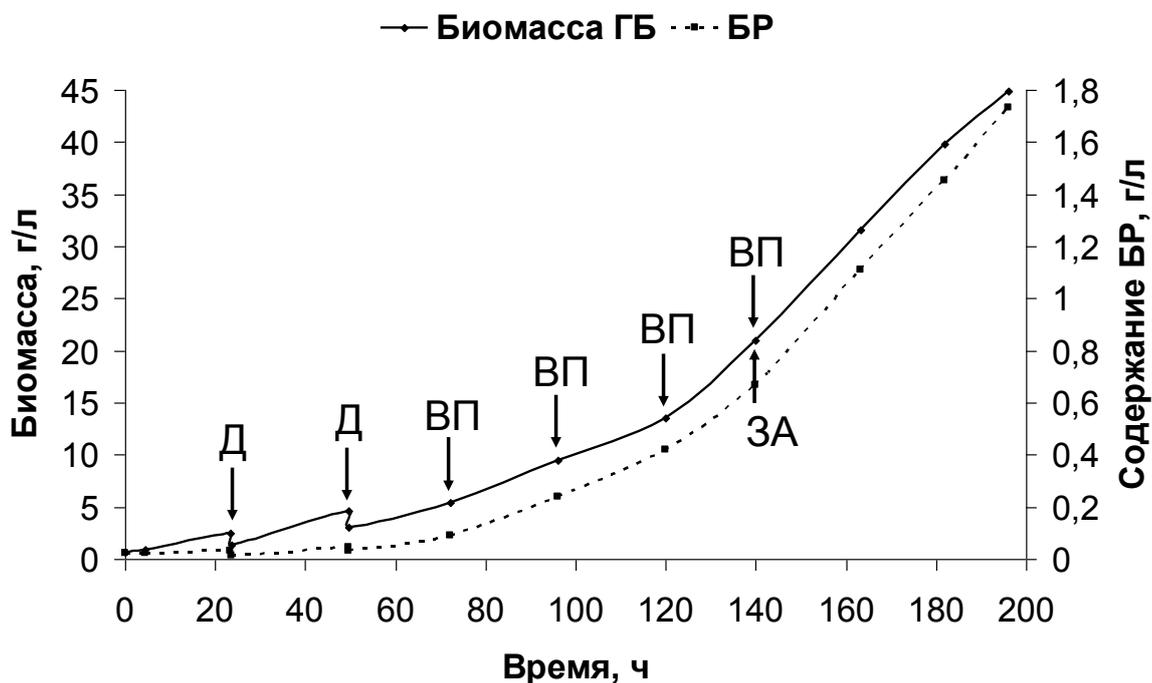


Рисунок 5.49 – Накопление биомассы при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментационной суспензии через выносной контур с емкостью с сорбентом для извлечения ингибиторов биосинтеза, доливом свежеприготовленной питательной среды в биореактор и внесении подпиток. Д – долив среды, ВП – внесение субстратной подпитки, ЗА – замена адсорбента.

Используя такой способ культивирования, по истечении 8 сут. удалось достичь конечного уровня накопления биомассы 45 г/л (по сухому веществу) при суммарном содержании бактериородопсина 1700–1750 мг/л. В спектре лизата биомассы галобактерий, накопленной в конце ферментации, практически полностью отсутствовали пики каротиноидов и проявлялся только ярко выраженный пик БР (см. рис. 5.47Б). Одновременно более чем в 2 раза снижался расход органического субстрата на 1 г бактериородопсина: в обычном периодическом режиме культивирования он составлял для триптона – около 83 г/г, дрожжевого экстракта – около 33 г/г, глицерина – около 60 мл/г; в варианте с инкапсулированным углем для триптона – около 37 г/г, дрожжевого экстракта – около 15 г/г, глицерина – около 22 мл/г БР.

Таким образом, комбинация подготовки посевного материала в присутствии инкапсулированного угля на свежеприготовленной среде с подобранными органическими компонентами питания с последующим проведением процесса культивирования в режиме поддержания низкой концентрации растворенного кислорода, с подпиткой субстратом и *on line* обработкой среды инкапсулированным углем в циркуляционном контуре позволила резко повысить производительность биореактора, выход биомассы и бактериородопсина. Выход БР по данному способу повышается до 1700–1750 мг/л за 8 сут. ферментации, в то время как в обычном периодическом режиме он составляет максимум 70–75 мг/л за 7 сут. Реализация ферментационного процесса по такому высокоплотностному режиму снижает и количество жидких отходов – отработанной культуральной жидкости.

Однако самое главное преимущество способа культивирования с сорбентом – отсутствие большого количества каротиноидов, и следовательно, упрощение задачи выделения и очистки бактериородопсина – достаточно 1-ой отмывки (методом ультрацентрифугирования) от каротиноидов, в то время как в обычном варианте необходимо до 5 отмывок (операций ультрацентрифугирования), что резко снижает трудоемкость процесса выделения бактериородопсина и его потерю в ходе очистки.

Наличие ярко выраженной сиреневой окраски клеток галобактерий, обусловленной высоким содержанием в клетках и цветом бактериородопсина, с минимальными оттенками желтого, оранжевого и красного цветов каротиноидов, позволяет повысить точность предложенной экспресс-методики определения БР (см. рис. 4.6Б), при которой анализируется доля красного, зеленого и синего цвета в цветовом оттенке. При возрастании содержания бактериородопсина в биомассе к концу культивирования доля красного цвета растет с 0,34–0,36 до 0,55–0,57, доля синего цвета возрастает с 0,3–0,35 до 0,38–0,40, а доля зеленого цвета падает до 0,03–0,05 (рис. 4.6Б). Возрастание содержания каротиноидов приводит к росту доли зеленого цвета – до 0,3–0,35 и снижению доли синего цвета до 0,01–0,05. Сопоставление

данной методики с прямым измерением содержания БР в биомассе показало, что при содержании биомассы от 2 г/л до 3 г/л погрешность определения БР составляет около 35%, а при 5 г/л стабилизируется на уровне 7–8%.

Недостатком способа культивирования с инкапсулированным активированным углем является наличие трудоемкой процедуры предварительного приготовления такого сорбента и сложность его регенерации. Поэтому было решено апробировать другие товарные сорбенты, инкапсуляция которых не требуется и которые могут быть относительно легко регенерированы и многократно использованы.

В экспериментах использовали адсорбенты фирмы «Purolite». Данные адсорбенты подходят для эффективной сорбции высокомолекулярных органических веществ с липофильными свойствами. Они применяются в технологиях осветления соков, сахарных сиропов и культуральных жидкостей, для очистки сточных вод и относительно недороги. Их хватает на более чем 40 циклов сорбции. Одним из их основных преимуществ является то, что они могут быть регенерированы легче, чем другие материалы. Регенерация осуществляется с помощью горячей воды, растворами кислот или щелочей, а также водно-щелочным раствором в смеси с этанолом.

Предварительные исследования показали, что при контакте с некоторыми из адсорбентов Purolite галобактерии не инактивируются, поэтому не требуется инкапсулирования адсорбентов, что является важным технологическим преимуществом. Можно стерилизовать питательную среду вместе с адсорбентом.

Использовали 5 вариантов адсорбентов, характеристики которых приведены в табл. 5.8.

Опыты по выбору сорбентов проводили в колбах на 100 мл, в которые вносился адсорбент в количестве 20 г/л, питательная среда в количестве 50 мл. Содержимое колб стерилизовали и после охлаждения вносили инокулят галобактерий (4% об.). Все адсорбенты предварительно помещались и уравнивались относительно используемой минеральной среды, но без внесения органических компонентов питания, во избежание резкого изменения рН из-за ионообменных реакций во время культивирования.

По ходу роста галобактерий адсорбенты не разрушались. После культивирования их гранулы можно было легко отделить от суспензии клеток с остатками питательной среды. Наиболее высокие показатели по уровню и скорости накопления биомассы и бактериородопсина, сопоставимые с вариантом использования инкапсулированного в агар активированного угля, наблюдались при использовании катионообменного адсорбента MN500.

Таблица 5.8 – Характеристика сорбентов марки Purolite, использованных при культивировании галобактерий

Показатель	MN500	MN202	MN200	MN150	A500P
Применение	Адсорбционное разделение гидрофобных органических соединений – катионообменная матрица	Адсорбционное разделение гидрофобных органических соединений – неионообменная матрица	Адсорбционное разделение гидрофобных органических соединений – неионообменная матрица	Адсорбционное разделение гидрофобных органических соединений – анионообменная матрица	Удаление органических веществ при промышленном и внутреннем водоснабжении
Полимерная структура	Полистирол, макропористый дивинилбензолом	Полистирол, макропористый дивинилбензолом	Полистирол, макропористый дивинилбензолом	Полистирол, макропористый дивинилбензолом	Полистирол, макропористый дивинилбензолом
Внешний вид	Сферические гранулы	Сферические гранулы	Сферические гранулы	Сферические гранулы	Сферические гранулы
Функциональная группа	Сульфокислоты	–	–	Третичный амин	–
Ионная форма	H <sup>+</sup>	–	–	–	Cl <sup>-</sup>
Общая обменная ёмкость (миним.), г-экв/л	0,8–1,0	–	–	0,2	0,8

**Предельное накопление биомассы галобактерий и содержание бактериородопсина при культивировании на разных адсорбентах фирмы PUROLITE**

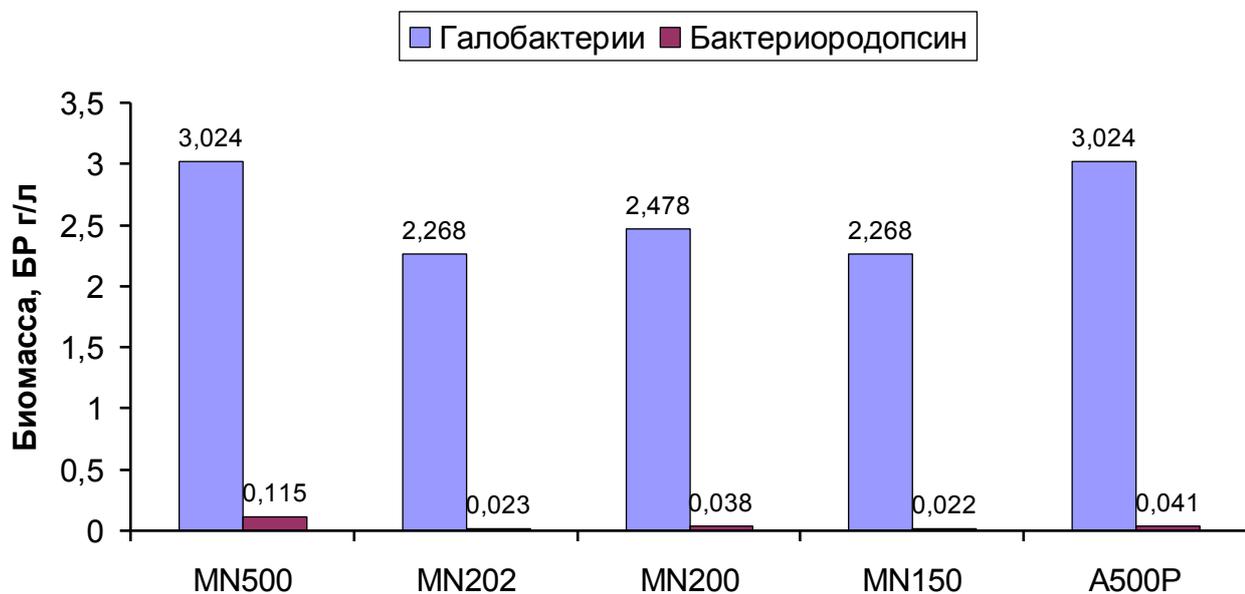


Рисунок 5.50 – Конечный уровень накопления биомассы галобактерий и бактериородопсина при внесении адсорбентов в количестве 20 г/л.

Для остальных сорбентов показатели роста галобактерий и синтеза бактериородопсина были ниже (рис. 5.50), кроме того, в клетках галобактерий накапливались каротиноиды.

Конечный выход биомассы при внесении адсорбента MN500 в количестве 20 г/л культуральной жидкости составил около 3 г/л, содержание бактериородопсина 115 мг/л, содержание каротиноидов – минимальное. Дополнительно проведенные эксперименты показали, что внесение адсорбента MN500 в дозах от 20 г/л до 80 г/л не изменяет существенно накопление биомассы галобактерий и бактериородопсина; для использованной исходной концентрации питательного субстрата в ростовой среде и условий роста достаточно 20 г/л внесенного адсорбента MN500.

Отработанный адсорбент Purolite MN500 восстанавливал свою способность поглощать ингибиторы биосинтеза после регенерации. Подбор условий регенерации показал, что отработанный катионит MN500 можно было регенерировать сначала путем отмывки горячей (80–90 °С) дистиллированной водой, при этом первые порции стекающего в ходе регенерации раствора имели желтоватый оттенок, в последующем по ходу отмывки (регенерации) стекающий раствор становился прозрачным. Затем обработкой раствором NaCl его можно перевести в Na<sup>+</sup>-форму с последующей промывкой дистиллированной водой.

В дальнейшем с целью наработки биомассы культивирование проводили в биореакторе (рабочим объемом 2 л) в режиме с подпиткой субстратом, представляющим собой концентрированный раствор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и глицерин, и непрерывной прокачкой среды с клетками через выносную колонку с сорбентом при заданном количестве адсорбента без его смены. Первоначальные опыты с внесением данного адсорбента непосредственно в биореактор показали, что гранулы адсорбента истираются механической мешалкой биореактора по мере культивирования, поэтому было признано целесообразным использовать выносную колонку с адсорбентом с циркуляцией ферментационной среды с клетками галобактерий через колонку по выносному контуру (см. рис. 4.2).

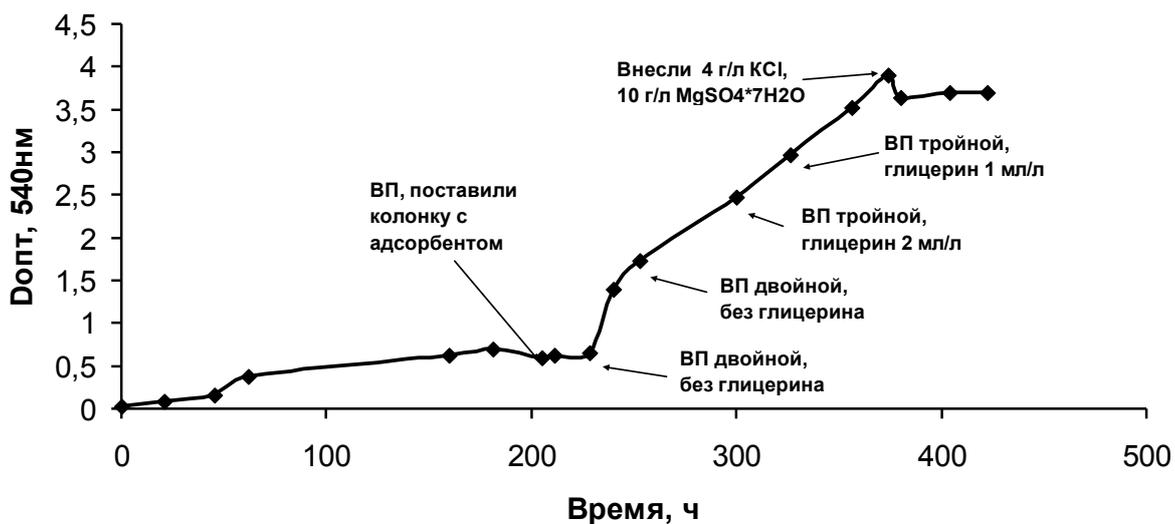
На рис. 5.51–5.52 представлены результаты экспериментов с культивированием галобактерий в биореакторе с сорбционной колонкой.

В первом варианте перед началом культивирования в колонку засыпали адсорбент в H<sup>+</sup>-форме в количестве 100 г влажного адсорбента (50 г/л среды). Через 205 ч с момента начала культивирования среду с галобактериями начинали прокачивать через колонку с адсорбентом перистальтическим насосом со скоростью 2 л/ч (рис. 4.2). Непосредственно после внесения адсорбента наблюдалось резкое падение кислотности среды, так как адсорбент был внесен в исходной H<sup>+</sup>-форме.

Подтитровка среды раствором NaOH до нейтрального значения pH возобновила нарастание биомассы.

В процессе культивирования удалось накопить 16,4 г/л биомассы с суммарным содержанием бактериородопсина 390 мг/л.

### Кривая роста при культивировании *Halobacterium salinarum* в ферментере с подпитками



ВП – внесение подпитки.

Рисунок 5.51 – Рост галобактерий в реакторе с прокачкой культуральной жидкости через выносную колонку с адсорбентом MN500 в  $H^+$ -форме и подпитками. Объем среды в биореакторе 2 л, количество адсорбента 100 г.

На рис. 5.52 представлены результаты ферментации с подпиткой субстратом и с использованием 100 г влажного адсорбента в солевой форме, уравновешанной по отношению к питательной среде.

В результате такого процесса также удалось существенно повысить уровень накопления биомассы и, соответственно, бактериородопсина: биомассы – до 20 г/л, БР – до 430 мг/л (рис. 5.52), что в 5,5 раз выше, чем при использовании стандартного процесса культивирования без адсорбента. Дальнейшая подпитка субстратом без процедуры регенерации сорбента приводит к накоплению каротиноидов, что указывает на отработку адсорбента.

### Кривая роста при культивировании *Halobacterium salinarum* в реакторе с подпитками

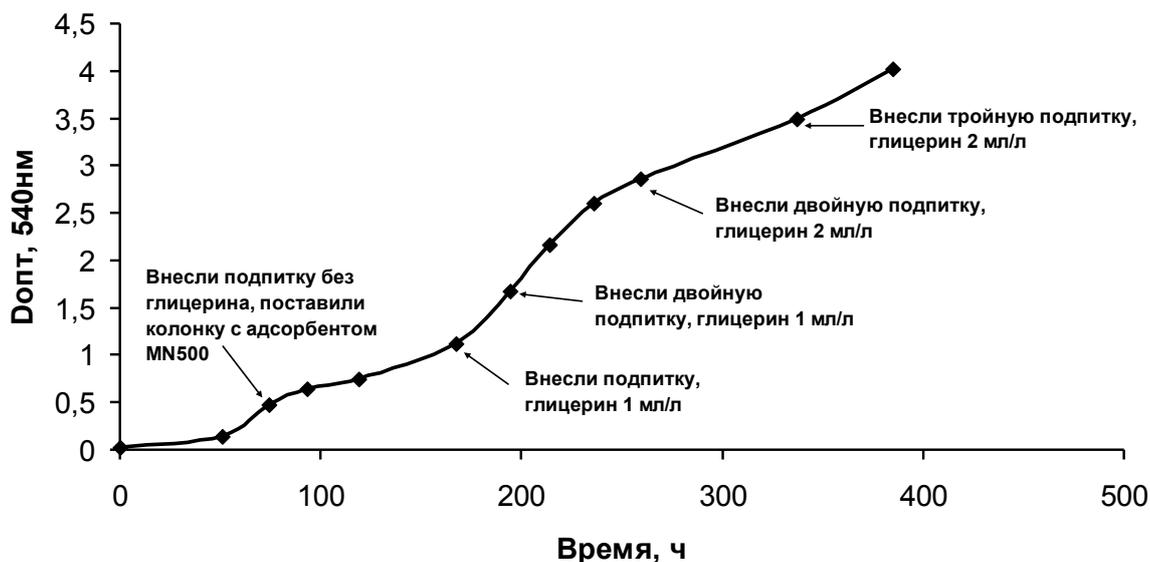


Рисунок 5.52 – Рост галобактерий в реакторе с прокачкой культуральной жидкости через выносную колонку с адсорбентом MN500 в Na<sup>+</sup>-форме и подпитками. Объем среды в биореакторе 2 л, количество адсорбента 100 г.

Уменьшение количества адсорбента со 100 г до 50 г привело к снижению конечного выхода биомассы галобактерий до 10,2 г/л, а бактериородопсина – до 380 мг/л. Вместе с тем уровень накопления БР при снижении количества адсорбента падал в существенно меньшей степени. Адсорбент в Na<sup>+</sup>-форме несколько более эффективен, чем в H<sup>+</sup>-форме.

Таким образом, в результате проведенных исследований был подобран адсорбент Purolite MN500, представляющий собой сильноокислый катионит, использование которого в процессе ферментации позволяет заменить активированный уголь (марка АГ-3), инкапсулированный в агар, и обойтись без стадии инкапсулирования угля.

Полученные образцы биомассы в различных опытах содержали от 2-х до 4% БР с минимальным содержанием каротиноидов в биомассе.

Присутствие в среде в относительно высоких количествах веществ-ингибиторов, накапливаемых в результате химического и фотохимического окисления, как это следует из результатов опытов со старением исходной среды, или образуемых по ходу биосинтеза как побочных метаболитов, является основным фактором, лимитирующим рост галобактерий и биосинтез ими бактериородопсина, поэтому внесение адсорбента в ферментационную среду является наиболее эффективным вариантом улучшения показателей роста галобактерий и биосинтеза БР.

Более высокие показатели роста и биосинтеза, полученные при использовании, с одной стороны, инкапсулированного угля, с другой – сильноокислого катионита, свидетельствуют о наличии и гидрофобной части, и катионной части в молекулах веществ-ингибиторов.

Для более детального выяснения химической природы веществ-ингибиторов проводился анализ компонентов исходной среды и культуральной жидкости методами ВЭЖХ. Анализировались следующие образцы:

- свежеприготовленная среда культивирования;
- питательные среды после их выдерживания на свету или при аэрации в течение определенного времени в стерильных условиях без внесения инокулята;
- бесклеточные культуральные жидкости, полученные после культивирования галобактерий в течение определенного времени;
- бесклеточные культуральные жидкости, полученные после культивирования галобактерий в течение определенного времени на среде с внесением сорбентов Purolit MN 500, Purolit MN 200, инкапсулированного угля марки АГ-3.

Анализ методом ВЭЖХ проводился на базе Института элементоорганических соединений РАН.

Результаты анализа показали появление новых пиков на хроматограммах «состарившейся» исходной питательной среды, что свидетельствует в пользу предположения об изменениях в питательной среде по мере старения, при этом скорее всего химическим превращениям подвергается один из компонентов питательной среды. Величина пиков, связанных с исходными компонентами питательной среды, снижается в образцах культуральной жидкости после ферментации. Также появляются новые пики для образцов лизата клеток свежеприготовленного и после выдерживания на свету в течение 11 суток, что также свидетельствует о возможности протекания химических/фотохимических трансформаций, в данном случае уже в лизате галобактерий при его хранении. Изменения в хроматограммах наблюдаются при сравнении образцов бесклеточной культуральной жидкости при ферментации с сорбентом и без сорбента. При анализе элюатов с сорбентов (угля, катионита MN500) для эффективных сорбентов наблюдаются пики поглощенных веществ, для неэффективных (MN200) – пики не проявляются.

Однако в целом, результаты хроматографического анализа не позволили однозначно идентифицировать вещества-ингибиторы. Можно лишь констатировать, что причиной стимулирования роста галобактерий и биосинтеза бактериородопсина при добавлении сорбента является поглощение вещества/веществ, отрицательно влияющих на биосинтез. Поглощаемые вещества имеют гидрофобную природу и положительно заряжены в области нейтрального pH. Часть веществ, накапливаемая

в процессе химического/фотохимического окисления непосредственно из компонентов исходной питательной среды, не поглощается сорбентом и в то же время не оказывает прямого негативного действия на рост и биосинтез.

Таким образом, по результатам диссертационной работы применительно к исследованию галобактерий был получен штамм, стабильный и устойчивый в отношении синтеза БР и разработана экспресс-методика оценки уровня накопления его, выявлены основные факторы, определяющие активность роста ГБ и синтеза ими БР, подобраны условия культивирования, обеспечивающие стабильный рост ГБ и синтез БР, показана важная роль эффекта старения питательной среды в ингибировании роста ГБ и синтеза БР со сдвигом метаболизма в сторону накопления каротиноидов. Эффект ингибирования роста биомассы и накопления бактериородопсина может обуславливаться протеканием нежелательных побочных реакций химического и фотохимического окисления в присутствии кислорода и под действием видимого света в исходной среде культивирования, либо при ее хранении, либо параллельно с накоплением биомассы в ходе культивирования. Эффект старения более выражен при хранении среды на свету.

Полученные результаты подтверждают важность контроля стрессового и антистрессового воздействия веществ – оксидантов, прооксидантов и антиоксидантов в процессах микробиологического синтеза и при поддержании высокой физиологической активности продуцентов. Вместе с тем, все же нельзя утверждать окончательно, что лежит в основе эффектов повышенного уровня накопления биомассы и бактериородопсина при культивировании по разработанному нами высокоинтенсивному методу. Причиной может быть снижение гетерогенности популяции галобактерий в ходе ферментации и повышение стабильности сиреневых клонов, переключение в сторону синтеза бактериородопсина при удалении определенных метаболитов или трансформированных компонентов питательной среды из зоны ферментации. Не выяснена природа этих веществ, их возможное действие как оксидантов, антиоксидантов или прооксидантов.

Эксперименты показали, что нестабильность морфо-физиологических признаков может быть обусловлена как свойствами используемых штаммов, так и вариациями условий внешней среды, например, уровня освещенности, обеспеченности субстратом, состава компонентов питания, наличием ингибиторов и стимуляторов различных путей метаболизма и т.д. На рис. 5.53 приведена базовая блок-схема влияний основных факторов окружения на рост галобактерий и синтез бактериородопсина, предложенная на основании проведенных нами исследований.

Согласно этой схеме, избыток активных форм кислорода, источником которых является молекулярный кислород, ультрафиолетовое излучение, химические

факторы с прооксидантной и оксидантной активностями, стимулирует синтез внутриклеточных каротиноидов, которые, с одной стороны, блокируют неблагоприятное действие АФК на рост галобактерий, с другой – ингибируют накопление бактериородопсина.

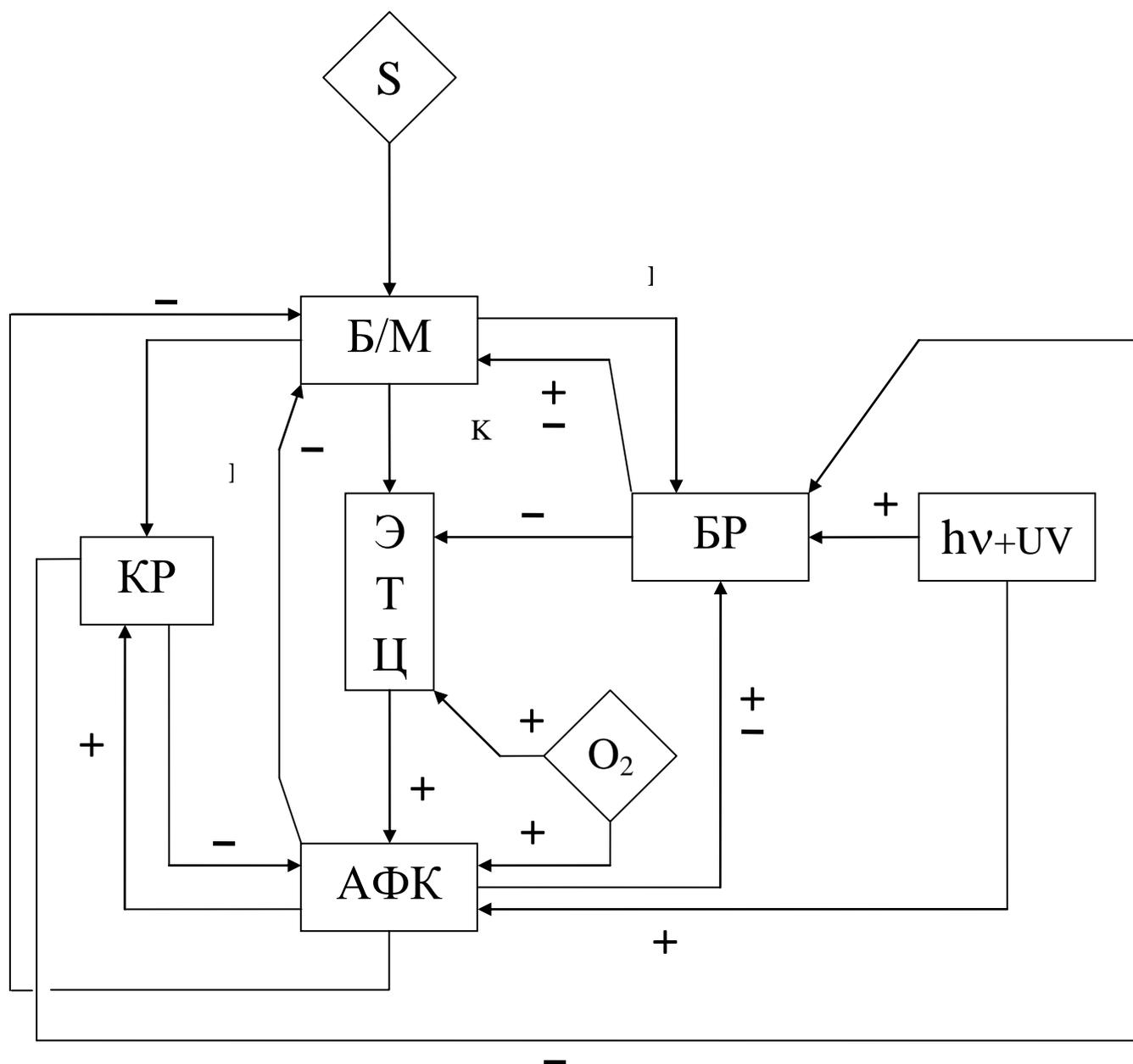


Рисунок 5.53 – Схема влияний основных факторов окружающей среды на рост галобактерий и синтез бактериородопсина.

Б/М – биомасса галобактерий, БР – бактериородопсин, КР – каротиноиды, ЭТЦ – электронтранспортная цепь, АФК – активные формы кислорода, S – органический субстрат;

+ положительное действие, ± - нейтральное действие, – отрицательное действие.

Схема, представленная на рис. 5.53, может быть взята за основу математического описания и моделирования роста галобактерий и биосинтеза бактериородопсина. Однако она не учитывает генотипическую и фенотипическую изменчивость популяции галобактерий, которая, очевидно, может происходить и в ходе ферментационного процесса. В наших экспериментах выяснилось, что нестабильность клонов, их расщепление на различно окрашенные морфоформы также сильно зависит от интенсивности освещения, присутствия АФК.

Учет факторов оксидативного стресса, негативного воздействия ингибиторов биосинтеза, образующихся по ходу культивирования в результате абиотических и биотических процессов, и совмещение процесса ферментации с адсорбцией, нивелирующей отрицательные воздействия, позволили разработать эффективный способ культивирования галобактерий с целью получения бактериородопсина. В данном случае, в отличие от культивирования дрожжей и молочнокислых бактерий с оптимальным воздействием АФК, наиболее эффективным оказалось применение мер, позволяющих нивелировать неблагоприятное воздействие АФК. Разработанный способ культивирования галобактерий ферментацией с адсорбентом не имеет мировых аналогов и позволяет за один цикл повысить: уровень накопления биомассы в среде культивирования с 4–4,5 г/л (по асб) за 6–7 сут. для обычной периодической ферментации до 30–50 г/л биомассы за 8 сут. ферментации с подпиткой субстратом, с удельным содержанием бактериородопсина в биомассе 2–4%; суммарное содержание БР с 70–75 мг/л за 6–7 сут. до 1700–1750 мг/л за 8 сут. ферментации при минимальном содержании каротиноидов в биомассе, т.е. в 10–15 раз увеличить накопление биомассы ГБ, в 25–30 раз выработку ими БР за цикл ферментации и производительность биореактора в целом. Способ обеспечивает устойчивость физиологической и биосинтетической активности штамма-продуцента, стабильность процесса, минимальное содержание каротиноидов в биомассе, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина при одновременном сокращении ферментационных стоков (в виде отработанной культуральной жидкости) и без существенного увеличения длительности ферментационного цикла. В данном случае ферментационный процесс ведется в автоматическом режиме с удалением из среды веществ, предположительно обладающих прооксидантной активностью. Для регулирования параметров разработана методика экспресс анализа БР, позволяющая контролировать накопление БР в реальном времени. По сравнению с наилучшими зарубежными аналогами [1539] выход биомассы галобактерий по разработанному способу выше в 1,5–1,6 раз, а накопление бактериородопсина – в 5–6 раз.

На разработанный способ получения биомассы галобактерий получены 2 патента РФ (патенты РФ №№ 2323226; 2323251).

Разработанная в рамках диссертационной работы малозатратная ресурсосберегающая и экологически чистая технология культивирования галобактерий и выделения бактериородопсина в составе пурпурных мембран позволяет получать образцы пурпурных мембран высокого качества. Показатели качества:

- отсутствие пика каротиноидов на спектре лизата с БР;
- максимум пика БР при  $\lambda$  568 нм;
- соотношение белок/хромофор  $A_{280}/A_{560}=1.8-1.9$ ;
- $A_{560}/A_{350} > 3$

Образцы ПМ с БР соответствовали указанным требованиям и были переданы в ИБХ, МГУ, Институт биофизики в Пущино для создания пленок на их базе.

Д.А. Складневым с использованием атомно-силовой микроскопии был выполнен анализ образцов пурпурных мембран, выделенных из биомассы галобактерий, полученной по разработанному нами способу [1411]. Результаты анализа показали, что в отличие от ПМ из биомассы, обогащенной каротиноидами, ПМ из биомассы, обедненной каротиноидами и обогащенной бактериородопсином, обладают повышенной активностью АТФ-синтетазы, что способствует выработке АТФ, его вовлечению в процессы метаболизма и росту галобактерий. Препараты иммобилизованных пурпурных мембран, получаемые по разработанному Складневым и др. способу из галобактерий, выращенных в найденных нами «супероптимальных» условиях культивирования, содержат ключевые функциональные белковые комплексы двух энергетических биосистем галобактерий: пурпурные мембраны, выполняющие функции фотозависимого протон-транспортного насоса, и трансмембранные ферментные комплексы АТФ-синтетазы. В таких ПМ молекулы АТФ-синтетазного комплекса образуют фланкирующие участки с многочисленными структурами шаровидной формы вокруг ПМ с БР.

### **5.3.6. Оценка технико-экономических показателей получения бактериородопсина по разработанному способу в сравнении с другими вариантами**

По результатам полученных данных были выполнены оценочные расчеты затрат на получение БР по нами разработанному наиболее эффективному варианту культивирования галобактерий с использованием адсорбента и штамма UM-17 в сравнении со стандартным общепринятым методом периодического культивирования.

Оценка показала, что по сравнению с базовым стандартным вариантом (объем выпуска биомассы ГБ в год – 1 кг или БР – 0,0075 кг, реализация технологии без адсорбента) при одинаковом объеме ферментационного оборудования себестоимость бактериородопсина по разработанному варианту можно снизить в 4 раза, а при увеличении объема выпуска в 8 раз – еще в 8 раз. При увеличении объема выпуска БР до 5 кг/год с использованием реактора с рабочим объемом 100 л себестоимость бактериородопсина составит около 12 центов/мг или около 8 руб/мг, а при выпуске БР по варианту в объеме около 500 кг/год – снизится до 1,4 центов/мг (1,0 руб/мг).

По данным зарубежных фирм каталожная цена 1 мг БР составляет ~10–200 USD в зависимости от чистоты продукта и объемов выпуска. Таким образом, разработанная технология позволяет резко снизить себестоимость БР (в составе пурпурных мембран) с 700–14000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта) до 1–8 руб. за 1 мг при организации крупномасштабного производства, т.е. в 90–14000 раз. Другое преимущество организации выпуска биомассы галобактерий и бактериородопсина при реализации разработки в промышленных масштабах – уменьшение количества жидких стоков (в виде отработанной культуральной жидкости).

Анализ изменения затрат на выпуск продукции показал, что наиболее важными путями снижения себестоимости являются:

- увеличение масштабов выпуска;
- увеличение уровня накопления биомассы в конце ферментации до 30–50 г/л по сухой биомассе и повышение удельного содержания бактериородопсина в биомассе до 4–8%;
- снижение трудозатрат за счет увеличения объема биореактора и снижения стадий очистки при выделении бактериородопсина;
- снижение стоимости органического субстрата при крупномасштабном производстве.

При крупнотоннажном производстве галобактерий и бактериородопсина снижение их себестоимости будет сдерживаться, главным образом, высокой стоимостью органического субстрата.

Поскольку, в отличие от биомассы галобактерий, получаемой по стандартному способу культивирования, галобактерии, получаемые по разработанному нами способу, при высоком уровне накопления бактериородопсина содержат минимальное количество каротиноидов, ее качества как потребительского продукта могут быть иными.

#### 5.4. Культивирование продуцентов рибофлавина и трансформантов по рибофлавиновому оперону

С продуцентами рибофлавина изучалась возможность применения разрабатываемых подходов, а именно контролируемого оксидативного стресса к рекомбинантным штаммам микроорганизмов для повышения показателей биосинтеза.

Типично, без создания селективных условий отбора, все рекомбинантные продуценты теряют свою целевую активность по мере роста популяции из-за нестабильности внедренных в геном конструкций. Процедура же использования контролируемого оксидативного воздействия предусматривает преадаптацию продуцента к стресс-факторам путем последовательного пассирования. Поэтому на примере рекомбинантных продуцентов рибофлавина интересно было посмотреть, во-первых, насколько быстро будет падать биосинтетическая активность продуцента по ходу пассирования и роста на питательной среде без стрессорного воздействия и в условиях адаптации к оксидативному стрессу. Во-вторых, интерес представляла апробация варианта контролируемого оксидативного воздействия с внесением  $H_2O_2$  на фоне освещения среды видимым светом, учитывая что избыточное количество накапливаемого во внеклеточной среде рибофлавина, как фотосенсибилизатора и прооксиданта [371, 623, 624], может оказывать токсичное действие на клетки продуцента в условиях аэрации ферментационной среды и ее освещения видимым светом. Такое прооксидантное действие рибофлавина может быть интересно и с точки зрения моделирования условий и изучения отклика популяции микроорганизмов при ведении биосинтеза с комбинированным действием стрессоров и антистрессоров. С другой стороны, можно полагать, что  $H_2O_2$  при внесении в среду культивирования не будет окислять рибофлавин, но будет действовать на выращиваемый микроорганизм-продуцент как фактор оксидативного стресса. Воздействие факторов оксидативного стресса может существенно ускорить реверсию штамма-продуцента к дикому типу. Наряду с этим, возможно и двойственное действие света: антистрессорное через фоторепарацию и стрессорное через фотоокисление рибофлавина. В-третьих, вследствие образования АФК, окисления и фотосенсибилизации рибофлавина исследовались варианты культивирования с нивелированием токсичных воздействий, в частности, с помощью адсорбентов и антиоксидантов.

Таким образом, обращалось внимание на следующие моменты:

- возможность улучшения показателей биосинтеза с использованием контролируемого оксидативного воздействия;
- возможное прооксидантное и стрессорное влияние рибофлавина на показатели биосинтеза;

- чувствительность ферментации к видимому свету;
- апробация подходов с культивированием с добавлением антиоксидантов;
- апробация культивирования с адсорбентом.

В работе использовались бациллярные трансформанты по синтезу рибофлавина.

Конкретные задачи исследований с продуцентами рибофлавина включали:

- отработку методики и подбор режимов преадаптации продуцентов рибофлавина, получение линий бактерий *Bacillus subtilis*, адаптированных к пероксиду водорода;
- исследование изменения устойчивости преадаптированного к  $H_2O_2$  штамма в отношении синтеза рибофлавина по сравнению со штаммом, неадаптированным к пероксиду;
- наличие перекрестной адаптации;
- сравнительный анализ изменения ростовых характеристик и биосинтетической активности адаптированной и неадаптированной к  $H_2O_2$  линий штаммов *B. subtilis* в условиях глубинной ферментации с контролируемым оксидативным воздействием;
- апробация различных вариантов совершенствования ферментационного процесса с учетом возможных прооксидантных и антиоксидантных воздействий.

Исследования с культивированием продуцентов и трансформантов по рибофлавиновому оперону выполнялись в рамках проекта Минобрнауки «Реконструкция метаболизма бактерий с помощью сенсорных РНК и получение на этой основе штаммов-продуцентов» по Государственному контракту № 02.512.11.2078 от 19.02.2007 (головной исполнитель – Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, руководитель проекта – проф. А.С. Миронов, соисполнитель – РХТУ им. Д.И. Менделеева).

#### 5.4.1. Используемые штаммы и процедура анализа генетического ответа

Для изучения изменения показателей биосинтеза в условиях контролируемого оксидативного воздействия использовались рекомбинантные штаммы *B. subtilis* В-52 и *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4.

*Bacillus subtilis* В-52 содержит *rib*-оперон в составе плазмиды pMX45 и способен накапливать 5–7 г/л рибофлавина при культивировании в колбах. Сверхпродуцент *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4 получен из штамма *B. subtilis* Y51/pMX45 ( $Em^R$   $Rib_{Bsu+}$ ), *aab*::pЕК14( $Rib_{Bam+}$   $Km^R$ ), *recE*::cat ( $Cm^R$ ), содержащего 4 рибофлавиновых оперона в одной бактериальной клетке. Два рибофлавиновых оперона *B. subtilis* локализованы на 2 копиях плазмиды pMX45, одна копия *rib*-оперона *B. subtilis* ло-

кализована на хромосоме и одна копия *rib*-оперона *B. amyloliquefaciens* интегрирована в хромосому. Штамм *B. subtilis* Y51/pMX45 продуцирует 5 г/л рибофлавина за 72 ч на колбах и 15 г/л рибофлавина за 70 ч в 1 л лабораторном ферментере. Штамм *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4 способен производить 9,6 г/л рибофлавина в течение 70 ч ферментации в колбах и 21 г/л рибофлавина в течение 70 ч ферментации в ферментерах объемом 1 л. Все штаммы были получены и предоставлены лабораторией проф. А.С. Миронова (ГосНИИгенетика) [1570].

Для изучения влияния оксидативного стресса на стабильность рекомбинантных трансформантов по рибофлавиновому оперону был использован штамм *B. subtilis* RKH25 *hisribC<sup>-</sup> ribG::MUTIN2*, ауксотрофный по рибофлавинову и гистидину и несущий вставку (конструкцию) Mutin2 гетерологичного участка ДНК, отвечающего за синтез фермента β-галактозидазы. Конструкция содержит также ген устойчивости к эритромицину, что позволяет вести селекцию штаммов.

Транскрипционные фьюзы, несущие конструкцию Mutin2, построены таким образом, что ген β-галактозидазы попадает под контроль промотора (промотор-подобных структур) генов рибофлавинового оперона (см. раздел 3.1.5.2). Уровень экспрессии гена β-галактозидазы в конструкции Mutin2, попадающего под контроль какого-либо оперона хозяина, легко отслеживать по изменению ферментативной активности лизата бактерий с помощью стандартной методики анализа β-галактозидазной активности (в данном случае определяемой по модифицированному методу Миллера [1947]).

Ген *ribC* является бифункциональным и кодирует синтез двух ферментов: рибофлавинкиназы и FAD-синтазы, катализирующих последовательные реакции превращения рибофлавина в FMN и FAD. У мутантов по гену *ribC* с нарушенной активностью рибофлавинкиназы только добавленные в среду экзогенные FMN и FAD сохраняют способность подавлять экспрессию генов *rib*-оперона. Поэтому для того, чтобы не допустить репрессию оперона наличием рибофлавина, были взяты штаммы с *ribC<sub>1</sub><sup>-</sup>*. Используемые трансформанты являются ауксотрофами по гистидину и рибофлавинову. Штаммы *ribC<sub>1</sub><sup>-</sup>* также дефектны по рибофлавинкиназе и не способны синтезировать FMN.

#### **5.4.2. Адаптация к контролируемому оксидативному воздействию и ее влияние на устойчивость ростовых показателей популяции и биосинтез рибофлавина**

С рекомбинантными продуцентами рибофлавина *B. subtilis* В-52 и Y51/pMX45 №18/4 была отработана методика, подобраны режимы предадаптации и исследова-

на устойчивость в отношении синтеза рибофлавина преадаптированного к  $H_2O_2$  штамма в сравнении со штаммом, неадаптированным к пероксиду.

Адаптацию к  $H_2O_2$  вели ступенчато, по процедуре, ранее отработанной на других продуцентах (см. раздел 5.2), путем пассивирования в колбах на качалке.

Для штаммов-сверхсинтетиков рибофлавина *B. subtilis* В-52 и Y51/pMX45 №18/4 при пассировании без внесения  $H_2O_2$  в темноте или при освещении колб видимым светом с интенсивностью 1500 Лк на поверхности колб во всех случаях проявлялась тенденция возрастания конечного уровня накопления биомассы, однако позитивных изменений по отношению к накоплению рибофлавина не наблюдалось. В варианте на свету по сравнению с вариантом в темноте уровень накопления рибофлавина был заметно ниже. В течение первых 5–6 пассажей организмы, подвергавшиеся освещению, росли существенно хуже и синтезировали в среднем в два раза меньше рибофлавина, чем растущие в темноте. На стадии 8-го пассажа световые варианты почти сравнивались по активности с контрольными, и далее синтез рибофлавина поддерживался на том же незначительном уровне, не превышающим таковой в контрольных вариантах.

При пассировании бактерий *B. subtilis* В-52 и Y51/pMX45 №18/4 с внесением пероксида водорода в темноте накопление рибофлавина также быстро снижалось к 3-му пассажиру, затем до 8–9 пассажей значительных изменений не наблюдалось. При последующем увеличении числа пассажей количество рибофлавина, накапливаемое адаптированными к  $H_2O_2$  организмами, становилось выше по сравнению с контрольным вариантом без внесения  $H_2O_2$ . К 15-ому пересеву уровень витамина стабилизировался и на 40% превосходил среднюю концентрацию  $B_2$ , характерную для контроля.

В целом, воздействие света на штаммы всех протестированных продуцентов рибофлавина угнетало рост бактерий, воздействие же пероксида водорода по мере пассирования увеличивало выход накапливаемой биомассы как при росте на свету, так и при росте в темноте. Снятие светового воздействия возвращало показатели роста к темновому варианту уже через 2–3 пассажа. Аналогично, при снятии воздействия пероксидом водорода уровень накопления биомассы возвращался к контрольному неадаптированной культуре также через 2–3 пассажа. Таким образом, изменения на уровне физиологического ответа в результате адаптации к воздействию стресс-факторов носят обратимый характер. Вместе с тем не исключено, что улучшение ростовых характеристик под действием пероксида водорода, как компонента реактива Фентона, генерирующего ОН-радикалы, обусловлено повышением частоты мутаций в геноме клетки, что ускоряет процесс реверсии к прототрофному типу.

В дальнейшем при адаптации к пероксиду водорода на свету с интенсивностью 1500 Лк параллельно вели следующие линии (в двух повторностях):

- 1) разовое внесение  $\text{H}_2\text{O}_2$  после 2–4 ч и 12–14 ч культивирования при различной исходной концентрации углеводов;
- 2) дробное внесение  $\text{H}_2\text{O}_2$  через 2–4, 12–14 и 18–20 ч культивирования;
- 3) контроль без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

При первом пассаже вносили 0,3 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Эксперименты показали, что на посевной среде с содержанием сахарозы 20 г/л и на модифицированной посевной среде с повышенным содержанием сахарозы 50 г/л по ходу пассирования к  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдались положительные изменения в отношении повышения устойчивости к  $\text{H}_2\text{O}_2$  по сравнению с контролем, а также увеличение каталазной активности. Наиболее выраженные положительные изменения наблюдались для линии 2 – при дробном внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После 5-го пассажа эта линия выдерживала внесение 0,8 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На 10-ом пассаже она выдерживала разовое внесение 2 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при этом содержание биомассы в преадаптированных вариантах было на уровне контрольного, а содержание рибофлавина было выше на 10–90%.

При ведении контрольной линии на модифицированной среде с исходным содержанием сахарозы 50 г/л наблюдалось подавление роста бацилл уже в 3-ем пассаже. В то же время популяция 3-го пассажа линии с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  устойчиво росла и синтезировала рибофлавин, т.е. преадаптация штамма *B. subtilis* В-52 к  $\text{H}_2\text{O}_2$  дерепрессировала его рост на среде с концентрацией сахарозы 50 г/л, что позволяло рассчитывать на позитивное проявление эффекта преадаптации к пероксиду водорода в условиях культивирования с подпиткой. Преадаптированная к  $\text{H}_2\text{O}_2$  линия росла газоном после высева на чашки Петри с внесением пероксида в агаризованную среду (0,3 г  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 1 л агаризованной среды), при этом биосинтетическая активность суспензионной преадаптированной культуры повышалась после пассирования на твердой агаризованной среде с добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Линия контрольного варианта на такой среде не росла.

При пересеве на ферментационную среду с суммарным содержанием углеводов 120 г/л рост биомассы во всех линиях, включая контрольную, прекратился уже после 3-го пересева.

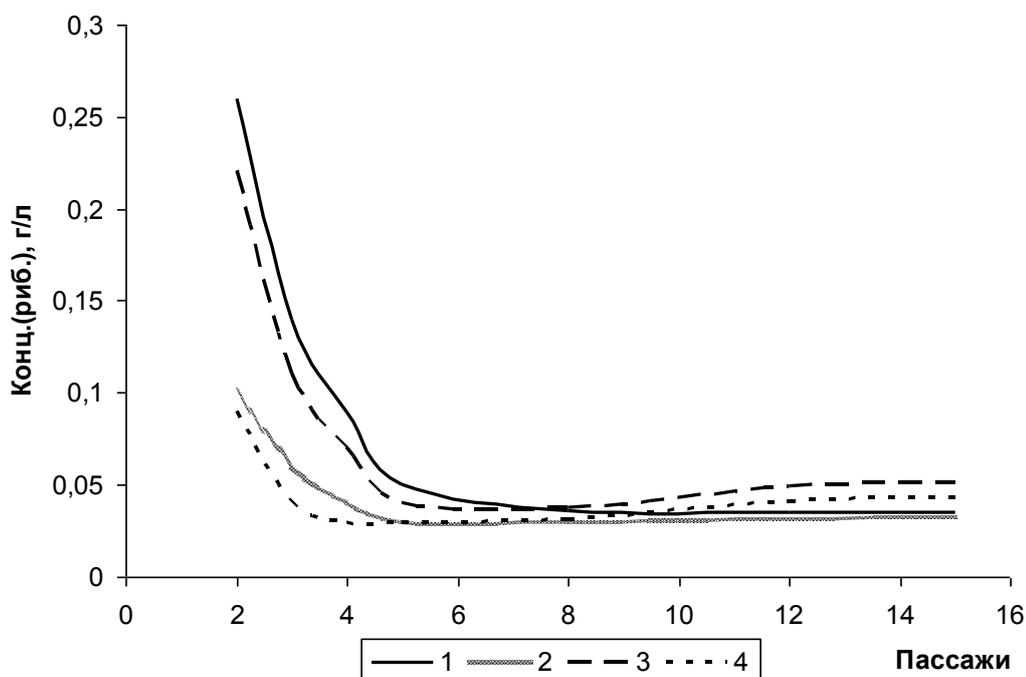


Рисунок 5.54 – Изменение концентрации рибофлавина при пассивировании продуцента *B. subtilis* В-52.

1 – контроль; 2 – бактерии, адаптируемые к освещению; 3 – бактерии, адаптируемые к  $H_2O_2$ ; 4 – бактерии, адаптируемые к освещению и  $H_2O_2$ .

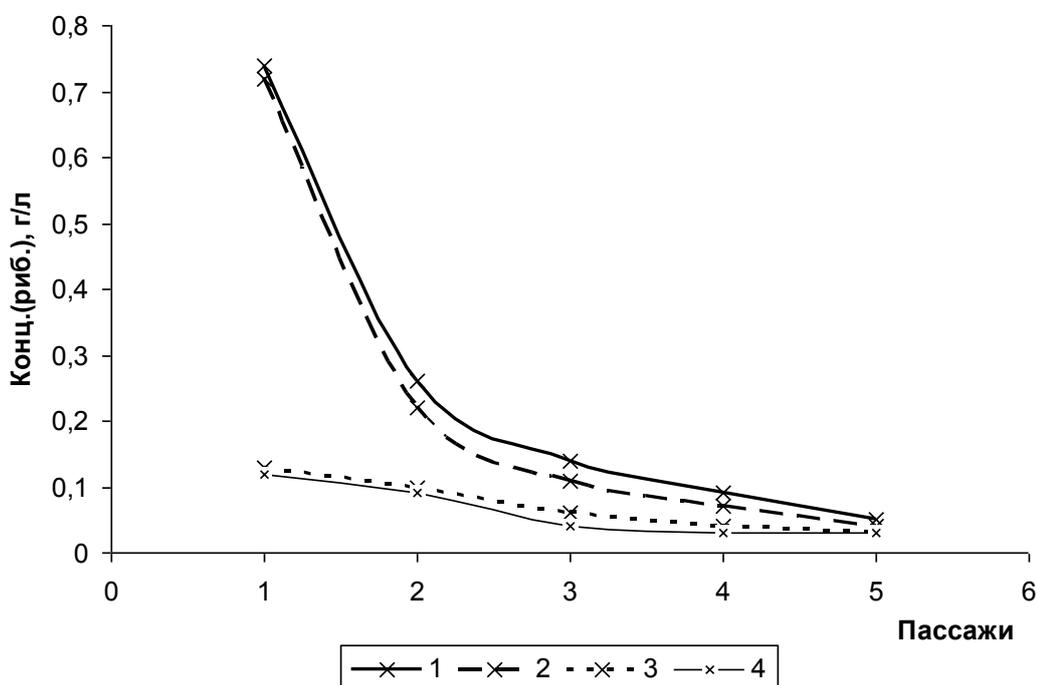


Рисунок 5.55 – Падение концентрации накопленного рибофлавина при пассивировании продуцента *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4.

1 – контроль; 2 – бактерии, адаптируемые к  $H_2O_2$ ; 3 – бактерии, адаптируемые к освещению; 4 – бактерии, адаптируемые к освещению и  $H_2O_2$ .

Вместе с тем необходимо отметить, что по мере пересевов во всех случаях наблюдалось резкое падение накопления рибофлавина (рис. 5.54, рис. 5.55). К 12–15 пассажам биосинтетическая активность микроорганизмов падала в десятки раз. Это, видимо, обусловлено реверсией штамма-продуцента к дикому типу при последовательных пассивированиях. При культивировании в колбах количество накапливаемого рибофлавина во всех вариантах, включая контрольный, не превышало 2 г/л, что существенно ниже заявленных паспортных характеристик штамма (5 г/л рибофлавина за 72 ч культивирования).

Освещение с интенсивностью 1500 Лк сильно ускоряло падение активности. Уже в первом пассаже количество рибофлавина было в 7 раз ниже, чем в темноте. Данная закономерность подтверждает предположение о том, что ингибиторами биосинтеза могут выступать продукты фотохимического окисления рибофлавина, поскольку, как уже отмечалось, рибофлавин подвержен фотохимическому окислению на свету и относительно устойчив к окислению пероксидом водорода.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о проявлении и усилении прооксидантных свойств рибофлавина в результате химической и особенно фотохимической трансформации, что может привести к угнетению роста продуцента.

Другой причиной падения биосинтетической активности может быть реверсия рекомбинантного штамма к варианту с исходным генотипом.

Для оценки значимости такого процесса провели высевы гистидинового ауксотрофа *B. subtilis* RKH25 *hisribC<sup>-</sup>ribG::MUTIN2* методом Коха на минимальные гистидин-селективные среды [1928]. Частичная потеря ауксотрофности штаммом RKH25 *hisribC<sup>-</sup>ribG::MUTIN2* в результате образования мутантов *his<sup>+</sup>* приводит к преодолению лимитирования роста по гистидину, в популяции данные ревертанты получают конкурентное преимущество и постепенно вытесняют исходный генотип. Ростовые характеристики популяции, таким образом, улучшаются.

Результаты посева и анализа колоний трансформанта RKH25 *hisribC<sup>-</sup>ribG::MUTIN2* на среде sModShis+/- показали, что количество колоний, выросших на гистидин селективной модифицированной среде Спицайзена (ModS), sModShis<sup>-</sup>, характеризующих прототрофные ревертанты по гистидину, по отношению к общему числу колоний, выросших на среде sModShis<sup>+</sup>, по мере пассивирования возрастало, при этом в нулевом пассаже доля ревертантов была близка к 0, а через 10–15 пассажей приближалась к 95%, т.е. ауксотрофия по гистидину полностью пропадала. В линиях, адаптированных к пероксиду водорода, реверсия происходила более интенсивно, чем в линиях без адаптации к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что говорит о меньшей стабильности генома в условиях индуцированного оксидативного стресса.

При высеве на более богатую среду sLB с x-gal наблюдалась диссоциация трансформанта RKN25 *hisribC<sup>-</sup>ribG::MUTIN2* в ходе пассирования. Уже спустя несколько пассажей как с внесением, так и без внесения пероксида происходило расщепление культуры по признаку наличия галактозидазы. Визуально при высеве на среду sLB-X методом Коха были обнаружены 3 субпопуляции: «1» – белые колонии, «2» – голубые колонии, «3» – синие колонии. В нулевом пассаже доля голубых колоний составляла 100%, к 12 пассажу доля этих колоний снижалась до 10%, доля белых возрастала до 70–90%, доля синих – до 2–18%. Аналогичные изменения, но с меньшей скоростью, наблюдались при высеве на модифицированную среду Спицайзена (ModS). Полученные данные показывают существенную роль диссоциации в процессе адаптации.

Таким образом, метод рассевов показал, что геном трансформантов *B. subtilis* весьма нестабилен, и протекание процессов автоселекции весьма вероятно, при этом при пассировании и адаптации к оксидативному стрессу имеют место два процесса – внутривидовая изменчивость, сопровождаемая появлением дискретных субпопуляций с различиями по морфологическим, физиологическим, биохимическим и генетическим признакам, и повышение устойчивости субпопуляций к агенту оксидативного стресса, в частности, к пероксиду водорода. Внутривидовая изменчивость может существенно ускоряться при оксидативном стрессе, характерном для аэробных условий культивирования и обусловленным присутствием активных форм кислорода, а также при наличии в среде компонентов с оксидантной и прооксидантной активностями, что, в свою очередь, ведет к ускорению потери целевой биосинтетической активности рекомбинантных продуцентов.

Вместе с тем, в условиях оксидативного стресса ускорение микроэволюционного процесса может компенсироваться повышением устойчивости субпопуляций к агентам оксидативного воздействия. Применение антистрессоров – факторов, нивелирующих действие стрессоров, в частности с антиоксидантной активностью, может замедлить скорость микроэволюции и повысить устойчивость заданных свойств популяции. Все это создает научную основу для целенаправленной разработки методов управляемого культивирования рекомбинантных продуцентов.

Применительно к биосинтезу рибофлавина две основные причины вызывают потерю активности продуцента: 1) реверсия к прототрофу; 2) прооксидантное действие рибофлавина из-за образования АФК вследствие его окисления и фотосенсибилизации.

Использование процедуры адаптации рекомбинантных штаммов-продуцентов рибофлавина *B. subtilis* к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не привело к повышению их биосинтетической активности по сравнению с исходным, неадаптированным штаммом. К положитель-

ным моментам такой процедуры можно отнести лишь относительно меньшее снижение их биосинтетической активности по сравнению с пассированием неадаптированной линии без внесения  $H_2O_2$ . Однако положительный эффект контролируемого оксидативного воздействия несущественен на фоне неблагоприятных изменений, наблюдаемых при последовательных пересевах рекомбинантного штамма. В связи с этим было целесообразно апробировать такие условия культивирования и активных мер управления процессом, которые нивелировали бы воздействие неблагоприятных продуктов окисления и, тем самым, замедлили бы снижение активности продуцента.

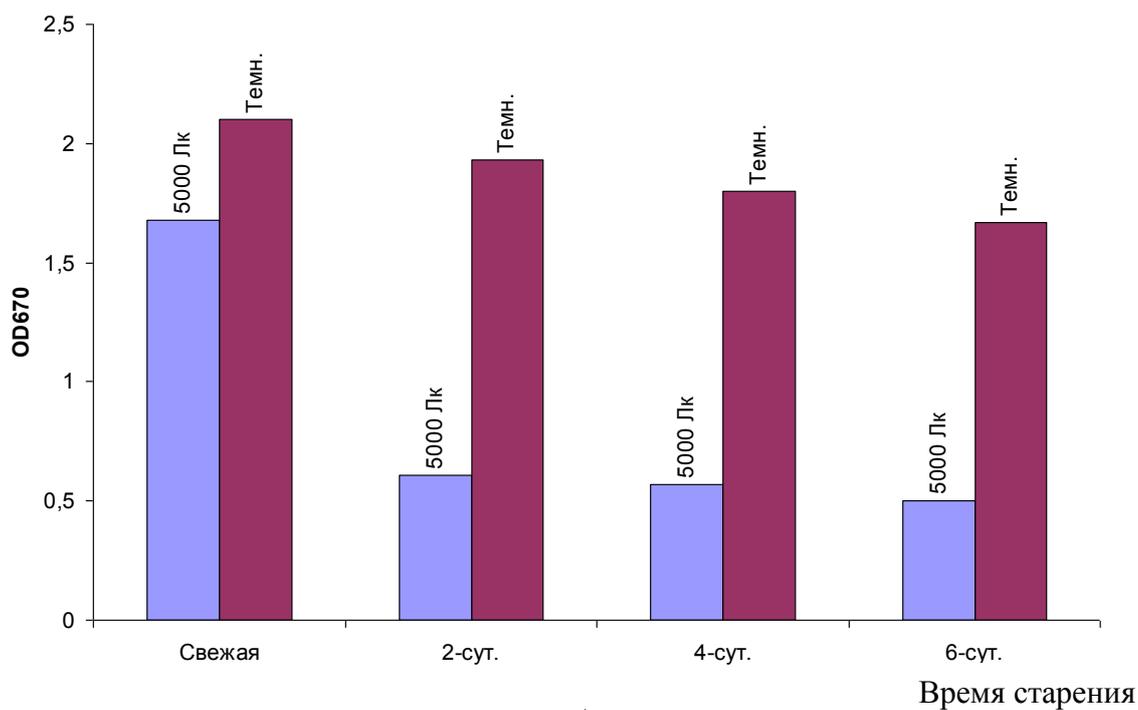
#### **5.4.3. Апробация различных приемов снижения неблагоприятных воздействий стрессоров в отношении биосинтетической активности продуцента и реверсии штамма к дикому типу**

Исследовались следующие возможности повышения выхода рибофлавина:

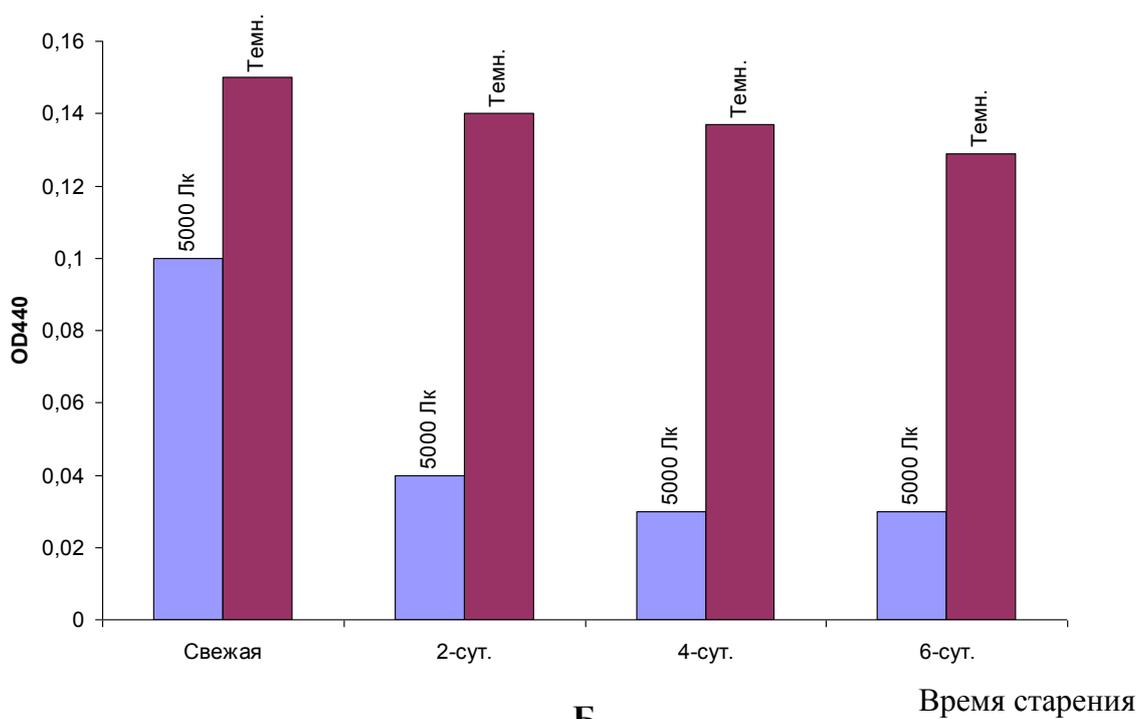
- использование свежеприготовленной среды для снижения отрицательного влияния продуктов химического и фотохимического окисления;
- изменение параметров культивирования: освещенности, аэрации;
- вывод рибофлавина из зоны ферментации путем его поглощения адсорбентом;
- внесение химических антиоксидантов в среду культивирования.

##### **5.4.3.1. Влияние «старения» среды на биосинтез**

В вышеописанных исследованиях с галобактериями было выявлено отрицательное влияние «старения» питательной среды на рост галобактерий и накопление бактериородопсина, обусловленное химическим и фотохимическим окислением некоторых органических компонентов (например, компонентов пептона, которые могут окисляться при освещении и аэрации). Аналогичные исследования по изучению эффекта «старения» были проведены с продуцентом рибофлавина *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4. При хранении питательной среды и последующей ферментации возможно окисление такого ее компонента, как дрожжевой экстракт, что может приводить к некоторому подавлению биосинтеза. Поэтому проверялось предположение об ускорении снижения биосинтетической активности окисленными компонентами исходной питательной среды и минимизации этого воздействия путем использования свежеприготовленной среды.



А



Б

Рисунок 5.56 – Влияние старения среды при интенсивности освещения 5000 Лк на выход биомассы (А) и накопления рибофлавина (Б) продуцентом *B. subtilis* Y51/pMX45

Стерильная среда выдерживалась в колбах на качалке без засева 1, 2, и 3 суток при аэрации и освещении интенсивностью 500 Лк (удельная величина энергии видимого света около 100 мВт/л) и 2, 4, и 6 сут. при аэрации и интенсивности освещения 5000 Лк (удельная величина энергии видимого света около 1 Вт/л), а также

без освещения. После этого вносился инокулят первого пассажа, полученный без внесения  $H_2O_2$  и без преадаптации к  $H_2O_2$ , и по прошествии 3 суток культивирования определялся уровень накопления рибофлавина. Часть колб освещалась и в процессе культивирования, что позволило сравнить эффекты влияния света на питательную среду и непосредственно на микроорганизмы.

Результаты этой серии опытов показали, что «старение» среды в темноте или при умеренном освещении 500 Лк оказывает несущественное влияние на снижение активности штамма Y51/pMX45 №18/4, по крайней мере, в пределах 3-х суток ферментации. Уровень накопления рибофлавина при последующем культивировании в темноте на среде, предварительно «состаренной» при умеренном освещении, было лишь на 10–20% ниже, чем в контрольных вариантах без «старения» среды. Однако при культивировании на свету при уровне освещения 500 Лк на тех же предварительно состаренных средах количество накопленного рибофлавина резко падало.

При «старении» среды при интенсивном освещении 5000 Лк уровень накопления биомассы и рибофлавина резко снижается при росте уже на 2-х дневной среде (рис. 5.56). Учитывая, что при такой освещенности ее влияние на биосинтетическую активность во время ферментации сопоставимо с влиянием света на «старение» среды, образование токсичных продуктов окисления исходных компонентов питательной среды, ускоренное освещением, также может вносить существенный вклад в снижение биосинтетической активности, обусловленный возникающим оксидативным стрессом. Таким образом, эти результаты подтверждают предположение о том, что существенную роль в падении активности могут вносить продукты окисления компонентов питательной среды, наряду с продуктами окисления рибофлавина, образование которых значительно ускоряется на свету и при аэрации.

#### **5.4.3.2. Изменение параметров культивирования: аэрации и освещенности**

Из литературных данных известно, что в большинстве случаев интенсивный рост культуры *B. subtilis*, а также активный биосинтез наблюдаются при сильной аэрации, когда  $pO_2$  поддерживается на уровне равновесного насыщения. Однако, учитывая возможность протекания процессов химического окисления рибофлавина в присутствии кислорода, высокие концентрации кислорода могут привести к снижению выхода рибофлавина.

В этой связи было проведено целенаправленное изучение влияния уровня аэрации на биосинтез рибофлавина со штаммом Y51/pMX45 №18/4.

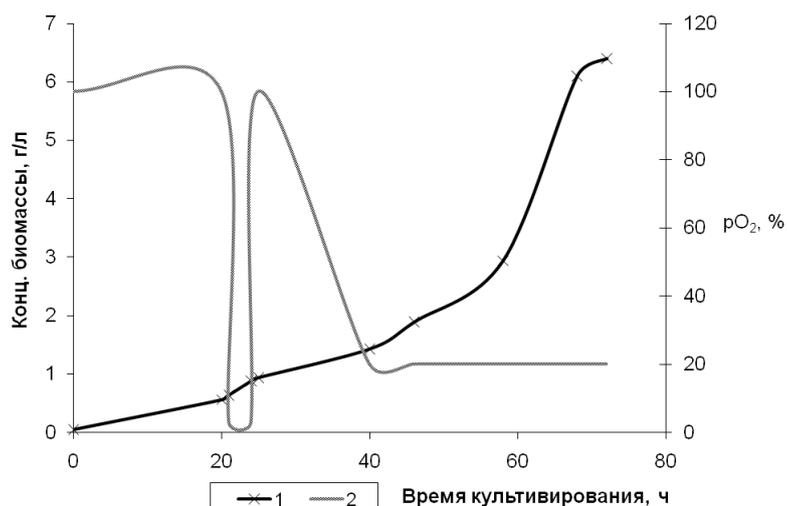
Эксперименты в качалочных колбах на показали, что существует оптимум аэрации, ниже и выше которого уровень накопления рибофлавина снижается.

При культивировании в ферментере без целенаправленного изолирования от фонового лабораторного света с поддержанием в течение первых 20 часов ферментации  $pO_2$  на уровне 100% лаг-фаза роста культуры растянулась во времени, и темп прироста биомассы и накопления рибофлавина был относительно невысок (рис. 5.57). При снижении на 3 часа подачи воздуха до уровня лимита по кислороду скорость накопления биомассы и рибофлавина повысилась, и культура перешла в экспоненциальную фазу роста. Однако при повторном повышении уровня аэрации рост бактерий снова стал ингибироваться избыточным количеством  $O_2$  в культуральной жидкости. По мере снижения показателя  $pO_2$  ослаблялось также ингибирующее действие кислорода, и в некоторый момент культура опять вошла в экспоненциальную фазу роста. Уровень  $pO_2$  при этом составлял около 20%. Поддерживая аэрацию на данном уровне, удалось обеспечить стабильный рост микроорганизмов и накопление рибофлавина.

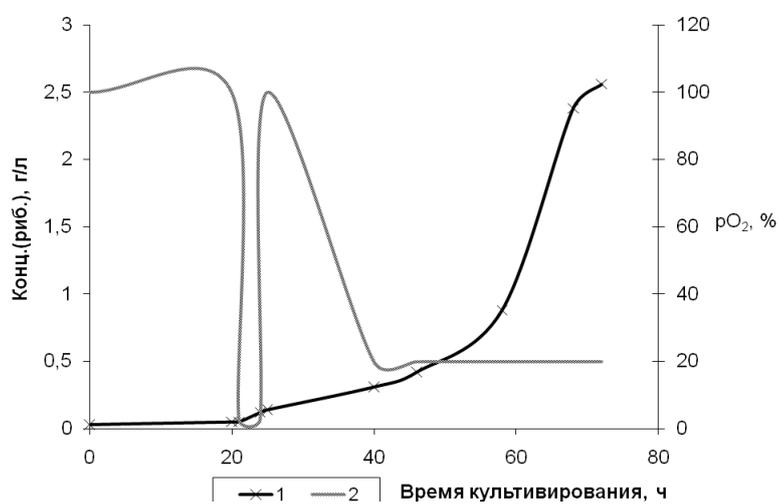
Таким образом, штамм *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4, обладающий потенциально высокой биосинтетической активностью по рибофлавину, чувствителен к повышенному уровню аэрации, что косвенно свидетельствует о возможном угнетении его роста и активности высокими концентрациями продуктов химического окисления, предположительно продуктами окисления рибофлавина. Данное обстоятельство позволяет рекомендовать, как одну из мер устранения негативного влияния оксидативного стресса, поддержание оптимального уровня концентрации растворенного кислорода 10–20% от насыщения. Выше оптимального интервала концентраций находится зона, где кислород оказывает оксидативное воздействие, что может быть обусловлено воздействием АФК на бактериальные клетки. Ниже оптимального диапазона располагается зона лимита по кислороду.

Вероятно, адаптируя бактерии к оксидативному стрессу, можно расширить вышеназванный интервал концентраций, в частности, поднять его верхнюю границу, что позволило бы интенсифицировать метаболизм микроорганизмов. Но процесс подобной адаптации сопряжен со всеми трудностями, связанными с потерей активности продуцента при пассировании.

Целенаправленные эксперименты с различной степенью освещенности культуры, адаптируемой путем пассирования к пероксиду водорода и пассируемой без внесения пероксида водорода, показали, что умеренное освещение – интенсивность ниже 500 Лк – может повысить показатели роста биомассы и накопления рибофлавина; напротив, слишком интенсивное освещение – около 5000 Лк – ухудшает рост биомассы, выход рибофлавина и стабильность продуцента (рис. 5.58).



**А**

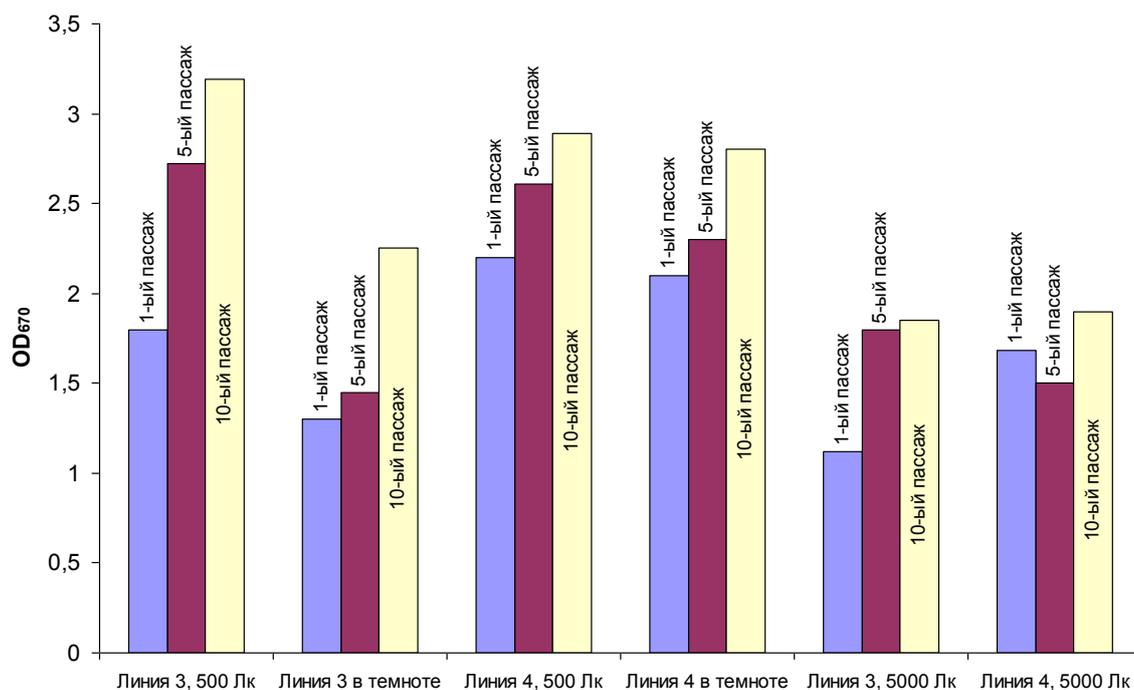


**Б**

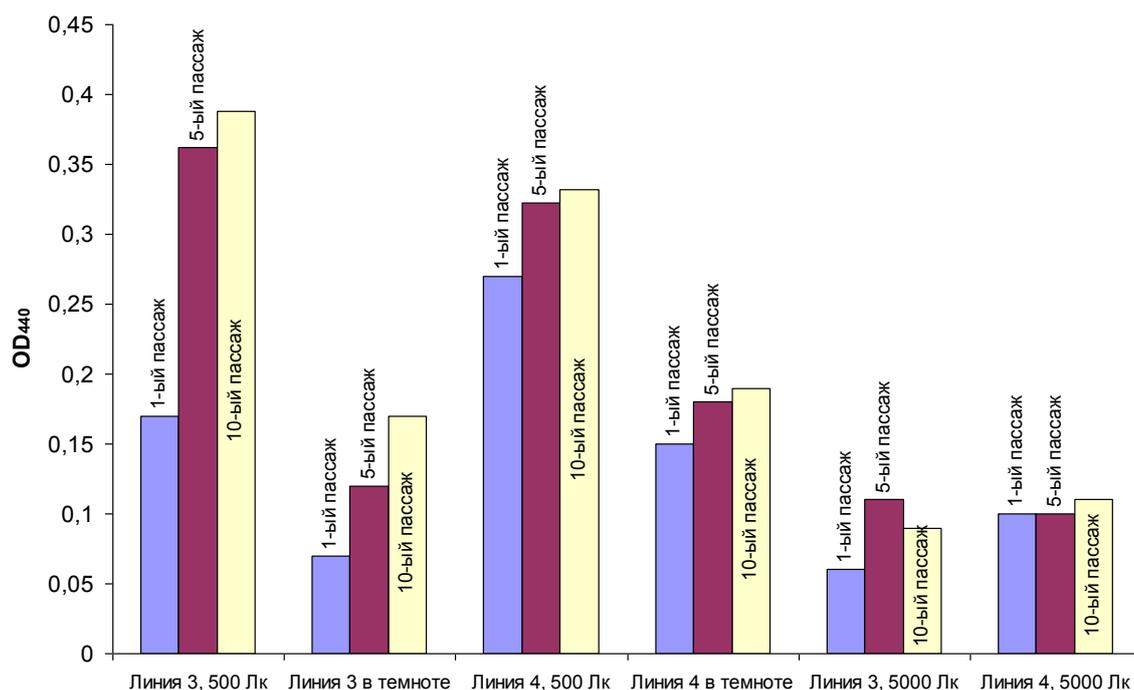
Рисунок 5.57 – Влияние уровня аэрации на скорость накопления биомассы

А) 1 – кривая роста микроорганизмов; 2 – уровень  $pO_2$ .

Б) 1 – кривая накопления рибофлавина; 2 – уровень  $pO_2$ .



А



Б

Рисунок 5.58 – Влияние уровня освещения видимым светом на накопление биомассы и рибофлавина в пассажирах различных линий рибофлавинсинтезирующей культуры *B. subtilis* Y51/pMX45.

А) Накопление биомассы; Б) Накопление рибофлавина

Линия 3 – с пассированием к вносимому H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; линия 4 – контроль, пассирование без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Наибольший уровень накопления биомассы и рибофлавина наблюдается в варианте преадаптации к пероксиду и умеренном освещении. По-видимому, при данном уровне освещения количество активных форм кислорода находится в зоне оптимума, в которой наблюдается позитивное совместное действие видимого света и АФК. Эти результаты согласуются с выводами, сделанными при использовании других культур микроорганизмов, что при оптимальной комбинации стрессоров и антистрессоров возможно увеличение биосинтетической активности.

По сравнению с вариантом умеренного освещения синтез рибофлавина и накопление биомассы при внесении  $H_2O_2$  в темноте намного ниже вследствие отсутствия или малого эффекта адаптации культуры к вносимому  $H_2O_2$  или иным АФК, генерируемым в результате окисления рибофлавина в аэробных условиях. Аналогичный эффект наблюдается у дрожжевых культур и лактобактерий при адаптации к стрессу в темноте и связан, возможно, с отсутствием фоторепарации в данных условиях.

Сравнение изменений в контрольной линии 4 показывает, что при том же умеренном освещении 500 Лк линия 4 накапливает также несколько больше биомассы и рибофлавина, чем в темноте. Можно опять же предположить, что это обусловлено генерированием рибофлавином свободнорадикальных частиц в аэробных условиях, действующим аналогично пероксиду водорода. Причем при данном уровне освещения количество активных форм кислорода находится в зоне оптимума, в которой наблюдается позитивное действие видимого света и АФК. Чрезмерное освещение 5000 Лк подавляет и рост биомассы, и синтез рибофлавина в линии 4, так же как и в линии 3.

Таким образом, наблюдаемые эффекты подтверждают предположение о прооксидантном действии рибофлавина и/или других веществ, содержащихся в ферментационной среде и возможном положительном действии умеренных доз АФК и видимого света невысокой интенсивности на показатели биосинтеза, что согласуются с данными, полученными с использованием других культур микроорганизмов.

Применительно к продуцентам рибофлавина подходящими параметрами аэрации и освещенности могут быть: концентрация растворенного кислорода в среде – 10–20% от уровня насыщения, удельная величина вводимой энергии видимого света – 20–100 мВт/л.

### 5.4.3.3. Вывод рибофлавина из зоны ферментации путем его поглощения адсорбентом

Для устранения токсичных продуктов, образуемых при культивировании продуцентов рибофлавина, был апробирован метод адсорбции с активированным углем в слое агара, аналогичный использованному при культивировании галобактерий. Гранулы угля АГ-3 инкапсулировали в слой агара на дне колбы; поверх этой подложки наливалась питательная среда. В процессе культивирования ингибиторы диффундировали через слой агара и адсорбировались на угле.

Этот метод рассматривался с целью проверки его эффективности в процессе пассирования и подготовки инокулята для ферментации. При каждом новом пересеве с колбы на колбу с углем осуществлялся также посев на колбу без угля, чтобы после каждого пассажа можно было определять количество рибофлавина, не экстрагируя его из угля (что привело бы к большой погрешности определения количества синтезированного рибофлавина). Результаты первых пяти пассажей показали, что при использовании активированного угля уровень накапливаемого рибофлавина стабилизировался в 3-ем пассаже. В 5-ом пассаже количество витамина было больше, чем в опытах без инкапсулированного угля. Однако, падение биосинтетической активности оставалось резким – после первых 3 пересевов концентрация рибофлавина снижалась в 6 раз. Напротив, концентрация биомассы во всех вариантах возрастала от пассажа к пассажи. После 4–5 пересевов она стабилизировалась и в 3 раза превосходила уровень накопления в первом пассаже.

Столь интенсивный рост бактерий обусловлен, по-видимому, отсутствием в среде не только окисленного рибофлавина, но и других токсичных соединений, адсорбируемых углем.

В вариантах, подвергнутых освещению, уровень рибофлавина был ниже, чем в затемненных колбах, в то время как уровень биомассы немного выше. Это указывает на то, что, устранив стрессовое воздействие токсичных продуктов, все же невозможно избавиться от потери рибофлавинсинтетической активности. Данный штамм склонен к реверсии, и снятие стрессового воздействия образующимися токсичными продуктами не остановит, а только замедлит снижение активности.

Таким образом, учитывая положительное действие обработки углем биомассы продуцента в отношении сохранения его биосинтетической активности, использование инкапсулированного угля представляется целесообразным для подготовки инокулята для ферментации. При культивировании с углем при затемнении ферментационной среды наряду с лучшим сохранением целевой биосинтетической ак-

тивности повышается концентрация клеток в инокуляте, что, в свою очередь, может сократить продолжительность лаг-фазы и всего процесса ферментации.

#### 5.4.3.4. Внесение химических антиоксидантов в среду культивирования

Результаты экспериментов с пассированием на колбах в течение 3 пассажей с добавлением цистеина в количестве 1 г/л, либо аскорбиновой кислоты в количестве 2 г/л, либо янтарной кислоты в количестве 2 г/л показали, что накопление рибофлавина во всех вариантах падало, однако при добавлении аскорбиновой кислоты уровень рибофлавина был на 15% выше по сравнению с контролем на стадии 1-го пассажа, и на 60% – на стадии третьего пассажа. Добавление цистеина также оказывало положительное воздействие, в то время как янтарная кислота не влияла на процесс биосинтеза. Таким образом, внесение химических антиоксидантов, в принципе, позволяет повысить выход рибофлавина. Наибольшее благоприятное воздействие на биосинтез рибофлавина оказывает аскорбиновая кислота.

#### 5.4.4. Ферментация в биореакторе с учетом оксидативных воздействий

Возможности совершенствования культивирования рекомбинантных продуцентов рибофлавина с учетом выявленных особенностей оксидативных воздействий были протестированы при проведении ферментации в лабораторном биореакторе объемом 5 л, в который заливали 2 л ферментационной среды. Ферментацию вели при поддержании подходящих параметров культивирования –  $pO_2$  на уровне 10–20% от насыщения, умеренная удельная величина вводимой энергии видимого света – около 50 мВт/л.

В первой серии экспериментов оценивали скорость падения биосинтетической активности продуцента *B. subtilis* В-52 при использовании посевного материала с разной степенью пассирования. Как видно из результатов, представленных на рис. 5.59А, 5.59В, 5.59С по мере пассивирования и в контрольном варианте, и в варианте с внесением  $H_2O_2$  наблюдается увеличение уровня накопления биомассы и падение выхода рибофлавина. Данная закономерность, согласуется с представлением о нестабильности рекомбинантного штамма даже в присутствии эритромицина и реверсией его к прототрофным вариантам.

Обращает на себя внимание увеличение скорости роста биомассы адаптированной линии по сравнению с контрольной (рис. 5.59А), сопровождаемой большей скоростью накопления рибофлавина (рис. 5.59В) и потребления редуцирующих веществ (рис. 5.59С) в первые 20 ч культивирования. В то же время после 20 ч

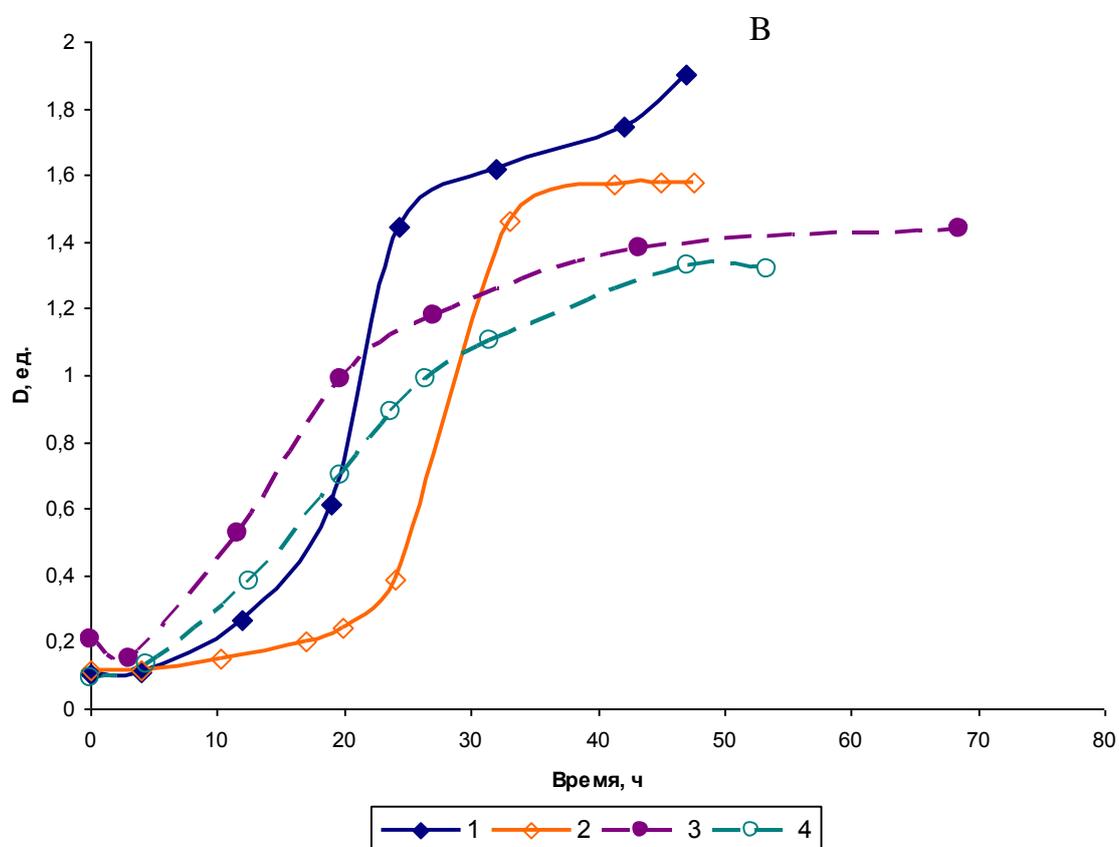
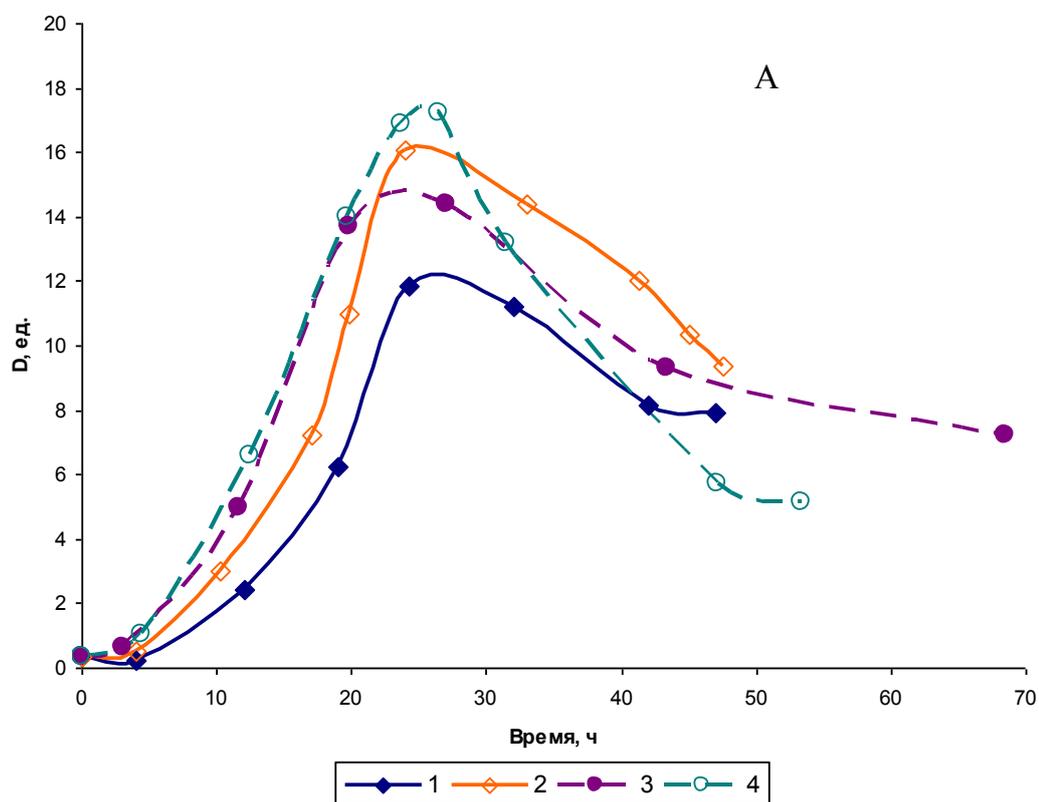
культивирования в адаптированных линиях синтез рибофлавина и потребление сахаров резко замедляется. Возможно, такое поведение адаптированной линии обусловлено тем, что при ферментации в биореакторе пероксид водорода в среду не вносили. Непосредственно после засева адаптированная линия еще находится в состоянии индуцированного оксидативного стресса, в течение которого поддерживаются системы репарации, помогающие клеткам преодолевать неблагоприятное воздействие стрессоров. Однако постепенно в результате деадаптации культура возвращается в состояние нормы, что начинает проявляться через 20 ч от начала ферментации, сопровождается перестройкой метаболизма и торможением ростовой и биосинтетической активности.

Как следует из результатов ранее проведенных нами экспериментов с другими продуцентами, такой процесс деадаптации может произойти уже через 2–3 пассирования в отсутствие селективного давления.

Полученные в опытах в биореакторе результаты позволили предположить, что наиболее эффективным может оказаться вариант культивирования адаптированной к  $H_2O_2$  линии с дробным внесением пероксида небольшими порциями по 0,1–0,5 г/л в первые сутки культивирования, а в варианте с подпиткой субстратом – по мере роста культуры и накопления рибофлавина. Поэтому во второй серии экспериментов с продуцентом рибофлавина *Bacillus subtilis* В-52 ферментацию вели в периодическом режиме с подпиткой субстратом.

На рис. 5.60 представлены результаты сравнительных экспериментов в варианте с внесением и без внесения  $H_2O_2$ . В данном случае в контрольном опыте, без внесения  $H_2O_2$ , в качестве посевного материала использовали биомассу 10-го пассажа (считая с момента высева на жидкую среду с чашек Петри). В опыте с культивированием преадаптированной линии бацилл в качестве посевного материала использовали биомассу 10-го пассажа, полученную на посевной среде с внесением  $H_2O_2$  в условиях умеренного освещения видимым светом (энергетическая освещенность не более 100 мВт/л), при этом в обоих случаях при культивировании непосредственно в биореакторе пероксид водорода вносили на 20-й (0,45 г/л  $H_2O_2$ ), 45-й (0,2 г/л) и 70-й (0,2 г/л) час с момента культивирования. Использовалась подпитка субстратом следующего состава (г/л): сахароза – 450; мальтоза – 250,  $(NH_4)_2SO_4$  – 10, триптон – 10, дрожжевой экстракт – 15.

Как видно из результатов, представленных на рис. 5.60, в варианте с внесением  $H_2O_2$  наблюдается увеличение уровня накопления рибофлавина по ходу ферментации и подпитки, при этом биосинтетическая активность культуры сохраняется на протяжении более длительного времени, чем в варианте без внесения  $H_2O_2$ .



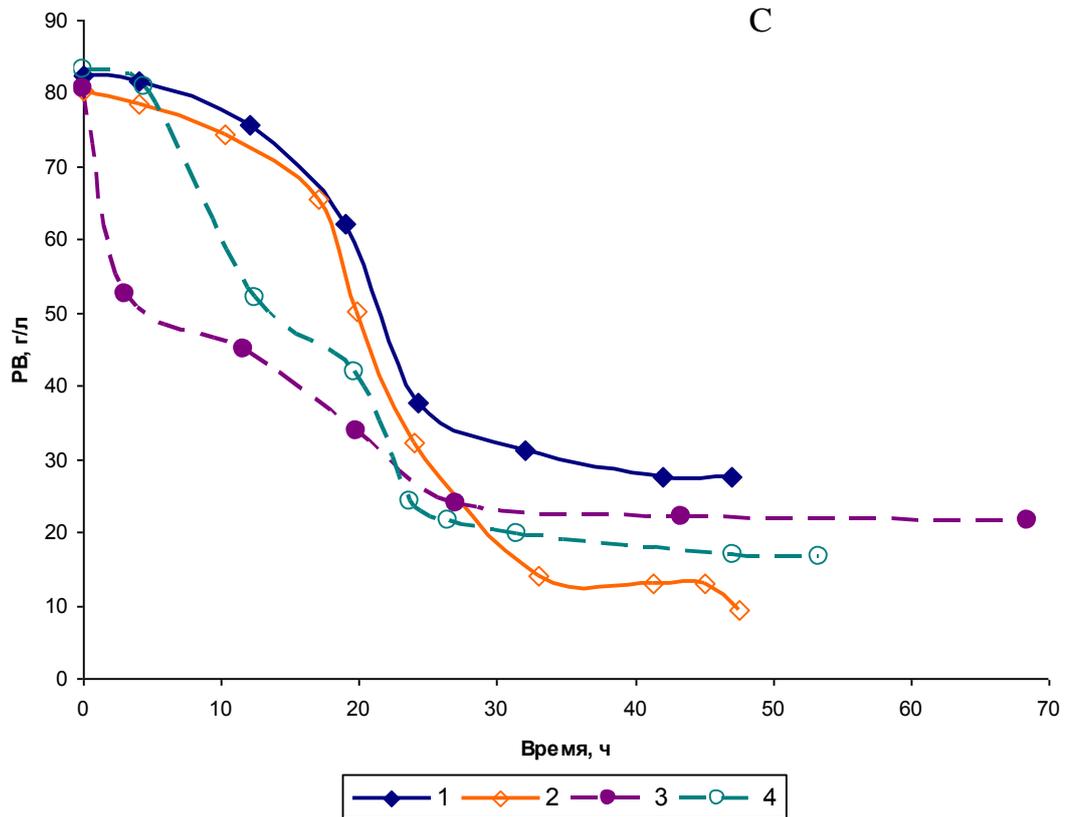


Рисунок 5.59 – Изменение концентрации биомассы (А), рибофлавина (Б) и концентрации редуцирующих веществ (В) при культивировании в биореакторе линий штамма *B. subtilis* В-52.

1 – контроль, 1-й пассаж; 2 – контроль, 10-й пассаж; 3 – линия 3 5-го пассажа, адаптированная к  $H_2O_2$ ; 4 – линия 3 10-го пассажа, адаптированная к  $H_2O_2$ .

На заключительном этапе исследований в биореакторе апробировали процесс с добавлением антиоксиданта – аскорбиновой кислоты в посевную и ферментационную среды в количестве 2 г/л, а также с подготовкой посевного материала в присутствии угля. Предподготовка инокулята на угле приводила к увеличению уровня биомассы в ферментере на 30%, при этом количество накапливаемого рибофлавина возрастало на 8%. Добавление аскорбиновой кислоты практически не влияло на рост культуры, но повышало уровень рибофлавина на 16%.

Результаты опытов в ферментере подтвердили возможность повышения физиологической и биосинтетической активности микроорганизмов-продуцентов при совместном действии стрессоров ( $H_2O_2$ ) и антистрессоров (видимого света, антиоксидантов, обработка инкапсулированным углем) в подходящих режимах культивирования.

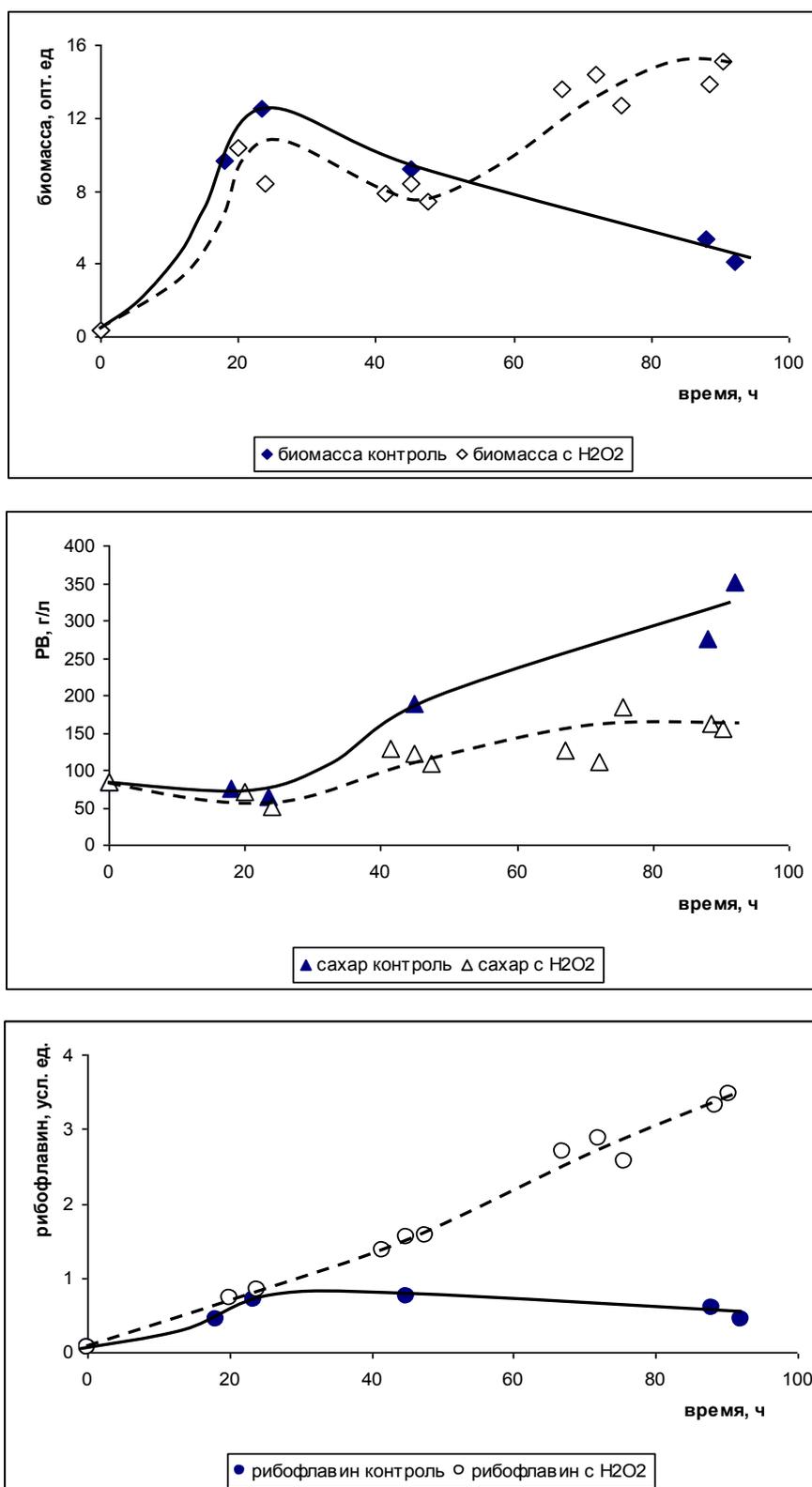


Рисунок 5.60 – Изменение показателей роста и биосинтеза при культивировании в биореакторе в режиме с подпиткой субстратом линий штамма *B. subtilis* B-52 и освещения видимым светом.

Пунктир – с внесением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, сплошная линия – контроль без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Таким образом, эксперименты с рекомбинантными штаммами показали возможность совершенствования процесса управляемого культивирования и биосинтеза рибофлавина путем рационального сочетания стрессорных и антистрессорных воздействий на популяцию продуцентов, при этом положительный эффект может достигаться за счет снижения скорости реверсии рекомбинантного штамма к прототрофным вариантам и фотосенсибилизирующего и прооксидантного угнетающего действия накапливаемого рибофлавина и продуктов окисления компонентов питательной среды на клетки продуцента, наиболее заметного в условиях интенсивных аэрации и освещения ферментационной среды видимым светом. Учитывая, что рибофлавин-индуцированный стресс во многом аналогичен стрессу, вызванному действием пероксида водорода, адаптация популяции штамма-продуцента к действию малых доз пероксида водорода при одновременном освещении видимым светом низкой интенсивности, достаточным для протекания, по-видимому, фоторепарации, но недостаточным для проявления фотосенсибилизирующих свойств рибофлавина, может иметь положительный эффект. В такой адаптации к оксидативному стрессу имеют место два процесса: 1) внутрипопуляционная изменчивость, скорость которой возрастает при воздействии пероксида водорода и которая сопровождается появлением субпопуляций с различиями по морфологическим, физиологическим, биохимическим и генетическим признакам; 2) повышение устойчивости совокупной популяции к агенту оксидативного стресса, в частности, к пероксиду водорода. Эти совместные процессы могут нивелировать стрессовые воздействия у адаптированной популяции. Однако данный вариант ограничен потерей активности продуцента по мере пассирования к пероксиду водорода. К тому же, воздействие факторов оксидативного стресса может существенно ускорить реверсию штамма-продуцента к дикому типу, что надо учитывать при поддержании биосинтетической активности продуцента в ферментационном процессе.

Другие варианты совершенствования микробиологической ферментации при биосинтезе рибофлавина:

- использование свежеприготовленной питательной среды, в частности применительно к источникам ростовых факторов;
- поддержание условий аэрации на уровне 10–20% от равновесной концентрации кислорода;
- подготовка посевного материала на среде с инкапсулированным в агар активированным углем.

Внесение химических антиоксидантов также может положительно повлиять на выход рибофлавина, однако их использование нецелесообразно по причине относительно большого расхода при проведении ферментации.

## ГЛАВА 6. СОВМЕЩЕННЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Исследования, результаты которых представлены в данном разделе, проводились с учетом основных тенденций в области переработки отходов и биологической очистки сточных вод, кратко изложенных в главе 1, разделе 3.2 и подробно рассмотренных в нашей книге [2].

В ходе исследований пытались «сочетать несочетаемое» – одновременно обеспечить высокую производительность, экологическую эффективность и высокое качество очистки сточных вод путем использования реакторов современных конструкций, в частности, с гранулированным илом, с биопленкой, совмещения микробиологического процесса с мембранным разделением в мембранных реакторах, без отвода избыточного активного ила из очистных сооружений и за счет использования оптимального оксидативного воздействия.

### 6.1. Очистка стоков спиртовой и пивоваренной промышленности

#### 6.1.1. Биологическая очистка реальных и модельных стоков солодовни

Эксперименты с биологической очисткой стока солодовни были начаты по инициативе фирмы «Энви́ро-Хеми ГМБХ» (ФРГ), столкнувшейся с проблемой неудовлетворительной работы очистных сооружений, построенных по проекту фирмы для ряда отечественных солодовен.

Был взят реальный промышленный сток солодовни (Вороновский завод по производству солода, ВЗПС, пос. Вороново, Московская обл.), а именно наиболее загрязненный сток – первая сливная вода (первая вода замачивания) из чанов после замачивания ячменя. Первая вода замачивания солодовни поступает вместе с другими стоками на очистные сооружения ВЗПС с типичной системой биологической очистки, включающей в себя емкость-усреднитель объемом 1000 м<sup>3</sup>, аэротенк объемом 2000 м<sup>3</sup> с вторичным отстойником объемом 250 м<sup>3</sup> и рециклом части ила, доочистку сточной воды после аэротенка на тканевом фильтре и с обработкой ультрафиолетом. Типичный состав первой сливной воды замачивания ячменя приведен в табл. 6.1.

Пуск в 2005 г. и эксплуатация построенных очистных сооружений солодовен показали, что их сточные воды крайне сложно поддаются биологической очистке. При требуемых нормативах очистки по ХПК<sub>вых.</sub> 30 мг/л сооружения снижают ХПК<sub>вых.</sub> в лучшем случае лишь до 80–120 мг/л. Активный ил в аэротенке склонен к вспуханию, пенообразованию, плохо отделяется во вторичных отстойниках.

Таблица 6.1 – Характеристика первой воды замачивания ВЗПС

Показатель	Значение
pH	6,2–6,5
ХПК, мг/л нефильтров. фильтров.	2400–4900 1500–4000
БПК <sub>5</sub> нефильтров., мг/л	1600–1900
БПК <sub>5</sub> фильтров., мг/л	1300–1800
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, мг/л	14–33
N <sub>общ.</sub> , мг/л	110–150
P <sub>общ.</sub> , мг/л	48
Углеводы, (моносахара в пересчете на глюкозу), мг/л	200–250
Сухой остаток, мг/л	3500–4000

Комплексное обследование очистных сооружений и анализ причин их неудовлетворительной работы, выполненные нами, показали, что содержание загрязнений в сточной воде в пиковые периоды суток – при сбросе на очистные сооружения первой воды замачивания – превышает значения, установленные техническим заданием в 2–3,2 раза. Соотношение ХПК/БПК<sub>5</sub> = 1,3–2,7 в водах замачивания в среднем выше установленного техническим заданием (1,25), что обусловлено присутствием в стоках солодовни ряда веществ, таких как флавоноиды (см. раздел 3.2.3), устойчивых к биологическому окислению в аэробных условиях.

Для выяснения причин нестабильной работы был проведен корреляционный анализ данных с сопоставлением входных и выходных показателей и параметров очистки. Сопоставление биологической активности илов, отобранных из разных солодовен, и дополнительные целенаправленно поставленные лабораторные эксперименты показали, что на работу очистных сооружений отрицательно влияют следующие обстоятельства:

- периодически наблюдающийся дефицит доступного азота вследствие угнетения активности гидролитических бактерий и бактерий-аммонификаторов в аэробных условиях;

- повышенная вспениваемость наиболее загрязненных стоков, интенсивное развитие нитчатых бактерий, обусловленное дефицитом доступного азота и чрезмерной аэрацией в аэротенке;

- возможный дефицит жизненно важных биогенных элементов (Fe, K, Mg) в технологической, и как следствие, сточной воде;

- отрицательное влияние моющего средства, используемого на ВЗПС, в первую очередь на микроорганизмы-гидролитики и на простейших в аэробных условиях, в результате чего ухудшается осаждаемость ила, повышается мутность воды после осаждения взвешенных веществ и ухудшается работа механического фильтра;

- нестабильность условий очистки: количества вносимых реагентов, скорости потоков сточной воды.

При этом важное значение имеет происхождение активного ила: ил с очистных сооружений солодовни с большей активностью лучше удаляет загрязнения из стоков других солодовен.

Для выработки рекомендаций по устранению негативных явлений в работе очистных сооружений ВЗПС был проведен ряд мероприятий непосредственно на очистных сооружениях, а также тестовые эксперименты в колбах на качалке при аэрации среды, включающие:

- внесение дополнительного количества азота в стоки: аммонийного, нитратного, аминного, мочевины;
- уменьшение интенсивности пенообразования;
- внесение коагулянта – оксихлорида алюминия в аэротенк, либо во вторичный отстойник;
- изменение скорости рецикла ила из вторичного отстойника в аэротенк;
- внесение дополнительного количества сульфатов в стоки;
- внесение дополнительного количества ионов  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ;  $Fe^{2+}$ ;
- внесение биопрепарата для доочистки сточных вод; использовался специализированный препарат Waste Treat, поставщик – фирма ООО «РСЭ-трейдинг».

По результатам выполнения мероприятий и проведения дополнительных лабораторных исследований были выявлены условия, улучшающие скорость биологического окисления и в наибольшей степени снижающие ХПК воды на выходе, и выработаны следующие рекомендации:

- перемешивание сточных вод в усреднителе-смесителе без аэрации;
- поддержание уровня растворенного кислорода в аэротенке в пределах 1,5–2,5 мг/л;
- внесение в качестве питательной подкормки мочевины в количестве не более 5–10 г мочевины на 1 м<sup>3</sup> стоков, а также ионов  $Fe^{2+}$  (не более 3 г/м<sup>3</sup> стоков),  $K^+$  (не более 3 г/м<sup>3</sup>) и  $Mg^{2+}$  (не более 3 г/м<sup>3</sup>);
- внесение коагулянта – оксихлорида алюминия в количестве 0,1–0,3 л/м<sup>3</sup>;

- поддержание скорости рецикла возвратного ила из вторичного отстойника на уровне 50–60 м<sup>3</sup>/ч при общем потоке сточных вод, поступающих на вход очистных сооружений, около 40 м<sup>3</sup>/ч;

- обеспечение стабильности условий очистки, что улучшает адаптацию активного ила к окислению загрязнений сточных вод;

- замена моющего средства.

Однако все эти меры не привели к кардинальному снижению остаточного значения ХПК и цветности после 2-х – 3-х суток биологического окисления загрязнений сточной воды. ХПК<sub>вых.</sub> в наиболее удачных вариантах очистки по-прежнему оставалось на уровне 60–100 мг/л, превышающем природохранные требования (30 мг/л).

В этой связи было решено апробировать метод биологической очистки с внесением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, учетом фактора освещения среды для решения проблемы очистки сточных вод солодовен.

### **6.1.2. Очистка в условиях контролируемого окислительного воздействия в периодическом режиме**

Тестовые эксперименты с внесением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> проводились в периодических условиях в колбах на качалке при аэрации среды, с активным илом, отобранном из очистных сооружений ВЗПС. До проведения этих опытов активность ила постоянно поддерживалась путем пересевов на стоки ВЗПС или модельный сток (на основе пива «Балтика 0», см. ниже) и аэрирования ила со стоком в колбах на качалке. Пересевы проводились обычно 1 раз в 3–6 сут. в зависимости от ХПК в исходной среде. В ходе пересева содержащую ил среду переливали в мерный цилиндр и давали отстояться в течение 5–7 минут, затем сливали надосадочную жидкость до объема 30 мл. Осевший ил заливали новой порцией сточной воды до объема 100 мл и ставили на качалку. В ряде случаев в опытах контролировали величину рН. В качестве нейтрализующего реагента использовался 2 н раствор NaOH.

На рис. 6.1 приведены результаты очистки в колбах с илом, отобранном непосредственно в период пуско-наладки очистных сооружений ВЗПС. Видно, что по мере адаптации ила к окислению загрязнений сточной воды наблюдается повышение степени удаления загрязнений. За 1,5 мес. непрерывной работы очистных сооружений в период пуско-наладки (с 16.06.05 по 29.07.05, в том числе с 28.06.05 по 29.07.05 – при полной нагрузке) количество удаленного ХПК в тестовых экспериментах повысилась с 50% до 80% по удаленной ХПК<sub>фильтр.</sub> – к концу первых суток, и с 80% до 90% – к концу третьих суток. Остальная часть загрязнений стоков не окисляется из-за присутствия биологически стойких загрязнений.

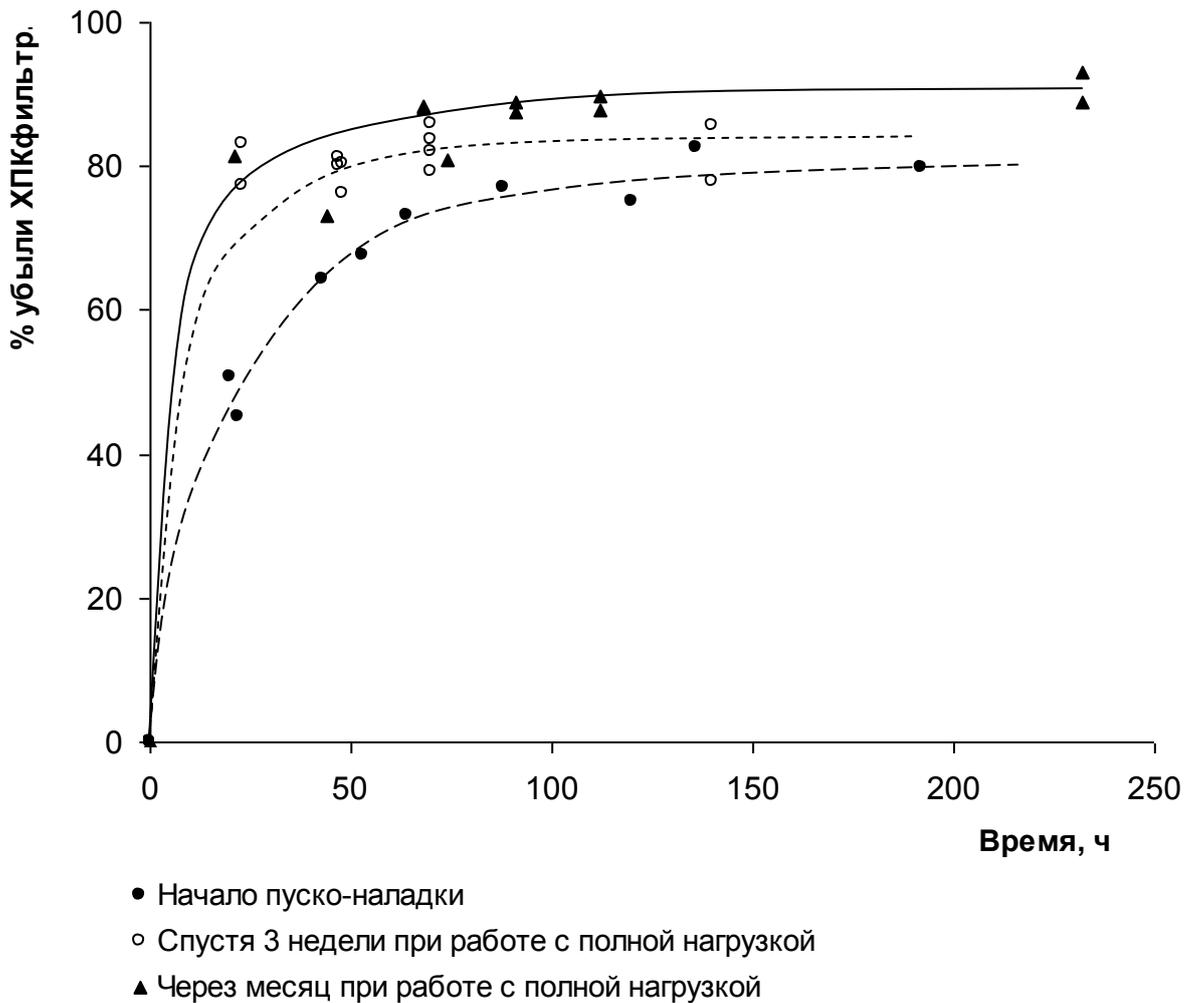


Рисунок 6.1 – Динамика потребления загрязнений в тестовых экспериментах в колбах на качалке по мере функционирования очистных сооружений ВЗПС.

Для исследований с внесением  $H_2O_2$  был получен активный ил, адаптированный к пероксиду водорода, по процедуре, отработанной ранее при изучении биологического окисления фенола (см. разделы 4.2, 6.2.1).

Для этого путем последовательных пассажей в качалочных колбах при условиях, описанных ранее, но с учетом фактора освещения среды видимым светом, велись 2 линии активного ила: контрольная (без внесения  $H_2O_2$ ) и с внесением  $H_2O_2$ . Колбы освещались на качалке фоновым светом лаборатории с уровнем освещенности на поверхности колб 100–200 Лк. Пероксид водорода вносился в виде 10%  $H_2O_2$  в количестве 200 мг/л через час после пересева. Результаты показали, что пероксид водорода в использованных концентрациях не угнетал развитие аэробного ила. Напротив, по ходу возрастания числа пассажей наблюдалась тенденция повышения уровня и скорости накопления биомассы и степени очистки в варианте с

внесением  $H_2O_2$  относительно контроля. Это повышение уровня накопления биомассы и степени очистки наблюдалось при исходном ХПК стока 2000–2500 мг/л и нивелировалось при  $XPK_{исх.}$  выше 3000 мг/л.

В дальнейшем поддерживались 8 линий аэробного ила: 2 контрольные и 6 отличающихся условиями внесения  $H_2O_2$  и адаптации к пероксиду водорода. Всего было проведено 6 пассажей активного ила на очищаемых стоках с внесением пероксида водорода. Пересев осуществлялся 1 раз в 2–5 сут.

В табл. 6.2 представлены результаты очистки первой сливной воды замачивания ячменя ВЗПС ( $XPK_{фильтр.}$ , цветность после центрифугирования суспензии при  $\lambda=400$  нм,  $l = 1$  см) для различных пассажей и линий активного ила в сравнении с контрольными вариантами (без внесения  $H_2O_2$ ).

Таблица 6.2 – Показатели очистки сточной воды ВЗПС при внесении  $H_2O_2$  и с использованием линий ила, адаптированных к внесению  $H_2O_2$ .

№ пассажа	Показатель	Время с момента пересева, ч	Контроль, без $H_2O_2$		Линия активного ила с внесением $H_2O_2$ и освещением					
			1к	2к	1	2	3	4	5	6
2	ХПК	165	227	192	259	230	242	230	204	215
2	Цветность	165	0,239	0,215	0,217	0,247	0,216	0,223	0,220	0,216
4	ХПК	49	203	113	104	88	93	99	83	100
69		142	103	94	88	117	79	62	58	
96		213	104	73	104	80	70	74	81	
4	Цветность	49	0,138	0,099	0,093	0,096	0,093	0,097	0,093	0,091
69		0,161	0,114	0,098	0,100	0,123	0,111	0,088	0,086	
96		0,088	0,088	0,098	0,082	0,088	0,090	0,098	0,093	
5	ХПК	73	112	113	82	77	71	55	58	58
6	ХПК	23	124	160	130	130	104	94	116	132
		50	91	125	86	92	63	49	43	76
		71	78	69	63	27	47	66	61	55

Как видно из представленных данных, варианты с внесением  $H_2O_2$  по мере адаптации ила к пероксиду водорода (по мере увеличения числа пассажей) обеспечивают увеличение скорости окисления органических загрязнений (по ХПК) и снижение остаточного содержания ХПК в 1,5–3 раза по сравнению с контролем. Для повышения качества очистки достаточно использовать 4 пассажа ила.

Таким образом, эксперименты с реальным стоком солодовен подтвердили положительное действие пероксида водорода в отношении повышения качества очистки при использовании активного ила, преадаптированного к  $H_2O_2$ , и фоновом освещении среды видимым светом.

### 6.1.3. Очистка в условиях контролируемого оксидативного воздействия в непрерывном режиме

После проведения работ со стоком солодовни исследования продолжили с модельным стоком на основе безалкогольного пива «Балтика 0», разбавленного водой от 50 до 200 раз, в зависимости от целей эксперимента (табл. 6.3). Чистое пиво «Балтика 0» содержит мальтозную патоку, хмель, этиловый спирт в количестве 0,5%. ХПК свежего неразбавленного пива составляет 152000 мг/л, рН 6,2. Данный модельный сток в определенной степени воспроизводит сток в виде первой воды замачивания ячменя.

Таблица 6.3 – Характеристика модельного стока

Показатель	Значение
рН	4–6
ХПК, мг/л	600–4000
$N-NH_4^+$ , мг/л	14–66
$N_{общ}$ , мг/л	30–220
$P_{общ}$ , мг/л	1,0–10,0
Углеводы (моносахара в пересчете на глюкозу), мг/л	50–400
Сухие вещества, мг/л	700–7000

Влияние добавления пероксида водорода на эффективность очистки по ХПК изучалось в биореакторе с вторичным отстойником при освещении его содержимого видимым светом при очистке с биопленкой и с активным илом (см. рис. 4.4). Вода, выходящая из биореактора, поступала во вторичный отстойник, суспензия ила осаждалась и полностью возвращалась в биореактор со дна отстойника. Выходящая из вторичного отстойника осветленная вода собиралась в приемную емкость. Пероксид водорода вносился в очищаемую среду порциями с интервалами от 1 сут. до 7 сут. в зависимости от плана эксперимента.

В качестве первичного инокулята использовали ил с очистных сооружений солодовни (пос. Вороново, Моск. обл.). Этот ил заблаговременно отобрали и хранили при +4 °С.

Первоначально процесс очистки проводили в режиме с биопленкой и без внесения  $H_2O_2$ . В качестве стартовой в биореактор загрузили около 3,5 л очищаемой среды с ХПК около 800 мг  $O_2$ /л, и внесли 30 мл аэробного активного ила. Первые 42 сут. для накопления ила процесс проводился в периодическом режиме с внесением новой порции модельного стока в количестве 1 л каждые 44–50 ч. При этом также наблюдали образование биопленки на стенках биореактора, вторичного отстойника и переливных шлангов. Далее режим очистки переводили на непрерывный с ХПК подаваемой среды в интервале 800–1200 мг  $O_2$ /л и временем пребывания среды в реакторе около 5 сут. В этом режиме по мере нарастания биопленки доля удаляемого ХПК повышалась, а содержание взвесей в выходном стоке падало.

Спустя 10 сут. после перевода биореактора на непрерывный режим работы нагрузку на реактор повысили в 2 раза с подачей стока в дневное (рабочее) время порциями через 6 ч. Несмотря на увеличение суточного количества подаваемого стока ХПК на выходе продолжало уменьшаться, что свидетельствовало о стабильной работе реактора и продолжении увеличения его окислительной способности по мере нарастания биомассы. Спустя 49 суток после начала проведения эксперимента реактор перевели на непрерывный режим подачи стока со скоростью разбавления среды  $0,5 \text{ сут}^{-1}$  (время пребывания среды в реакторе 2 сут.). Во всех режимах очистки ХПК стока на выходе не было ниже 150–160 мг/л.

На 80-е сутки эксперимента в реактор стали вносить малыми дозами  $H_2O_2$  с постепенным повышением общей суточной дозы вносимого пероксида, чтобы обеспечить возможность адаптации ила к  $H_2O_2$ . Одновременно исследовалась реакция ила и изменение показателей очистки в зависимости от дозы вносимого  $H_2O_2$ .

Внесение пероксида водорода в относительно небольших дозах 35–140 мг/л.сут сразу же привело к резкому падению ХПК на выходе – с 250 мг/л до 10–100 мг/л. Снижению остаточного  $XPK_{\text{вых}}$  соответствовало увеличение дыхательной активности ила (рис. 6.2). Такая антикорреляция между дыхательной активностью и изменением  $XPK_{\text{вых}}$  очевидна, поскольку с увеличением дыхательной активности ила увеличивается скорость, с которой окисляются органические вещества, что приводит к уменьшению  $XPK_{\text{вых}}$  и подтверждает достоверность наблюдаемых положительных эффектов воздействия небольших доз пероксида водорода при освещении очищаемой среды.

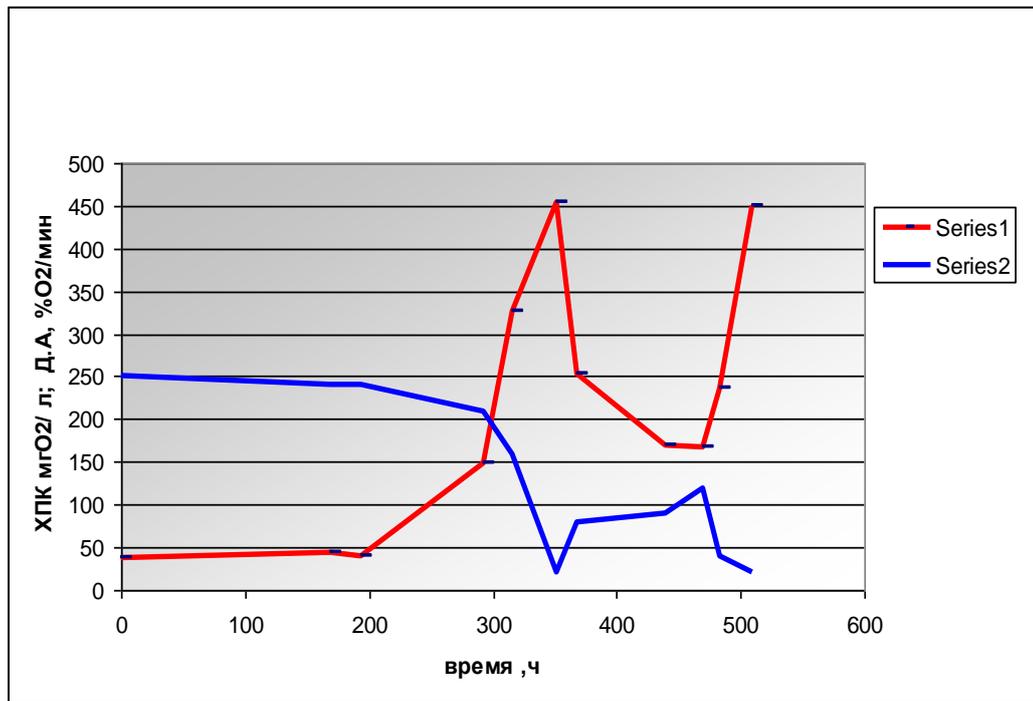


Рисунок 6.2 – Сопоставление изменения дыхательной активности с изменением  $XPK_{\text{вых}}$  в режиме проточной очистки с внесением  $H_2O_2$  и освещением среды.

Серия 1 – дыхательная активность; серия 2 –  $XPK_{\text{вых}}$

Увеличение дыхательной активности ила наблюдалось вплоть до повышения суточной дозы вносимого пероксида водорода до 140 мг/л.сут. При увеличении суточной дозы  $H_2O_2$  до 0,3 г/л дыхательная активность падала, при этом показатели очистки ухудшались, однако при последующем снижении суточной дозы до 0,21–0,22 г/л и далее до 0,035 г/л дыхательная активность вновь повышалась, а  $XPK_{\text{вых}}$  снизилось. Такие изменения свидетельствуют, во-первых, об обратимости ответов ила на оксидативное воздействие при сохранении его окислительной способности и ее возрастании по мере адаптации ила к пероксиду и, во-вторых, о действии  $H_2O_2$  на физиологическое состояние активного ила, способствующее повышению его активности, а не о снижении  $XPK$  за счет химических или фотохимических процессов с участием  $H_2O_2$ .

Положительное действие  $H_2O_2$  и видимого света проявляется и в изменении содержания взвешенных веществ в выходящей из реактора воде, которое снизилось с 0,02–0,03 до 0,005–0,012 усл. ед. оптической плотности через 8–11 сут. с момента начала внесения пероксида.

Оптимальная суточная доза внесения  $H_2O_2$  в данной серии опытов составила 140 мг/л (рис. 6.3).

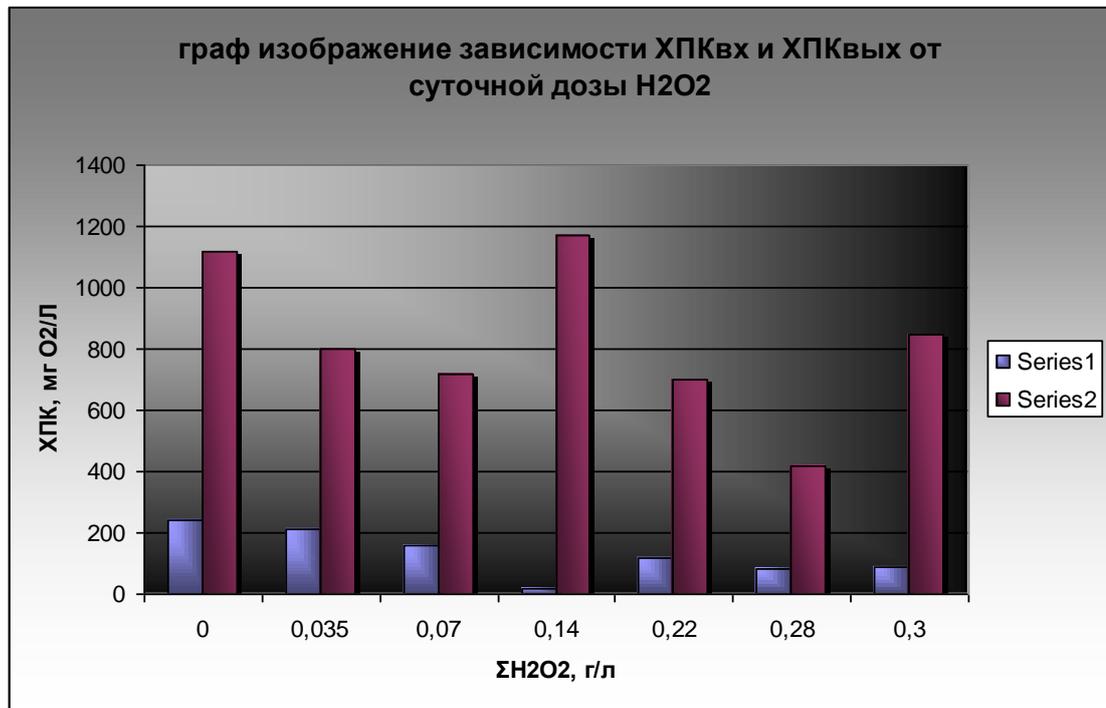


Рисунок 6.3 – Изменение качества очистки в зависимости от суточной дозы добавляемого H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Серия 1 – ХПК<sub>вых</sub>; Серия 2 – ХПК<sub>вх</sub>.

Таким образом, совместное действие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и видимого света приводит к улучшению показателей очистки в проточном режиме с биопленкой, при этом уменьшается содержание взвешенных веществ в выходящей воде, а главное, уменьшается значение ХПК<sub>вых</sub> вплоть до величин, не превышающих установленные природоохранные нормы (15 мг/л) без видимого угнетения активности биоценоза очистных сооружений.

Данные опытов в проточном режиме очистки в реакторе с биопленкой подтверждают обнаруженный эффект повышения качества очистки сточных вод при комбинированном воздействии относительно небольших доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и видимого света.

На следующем этапе экспериментов с проточной очисткой с активным илом биореактор модифицировали, оснастив его механической мешалкой. Эксперименты также проводили на фоне одновременного изучения влияния режима освещенности на биологическую очистку.

Как и ранее, объектом исследования служила модельная сточная вода на основе пива «Балтика 0», разбавленного водой от 50 до 200 раз, в зависимости от целей эксперимента. В качестве источника активного ила в биореакторе использовались ил и биопленка, сформированные при изучении очистки в биореакторе с биопленкой.

Вначале в режиме очистки с внесением  $H_2O_2$  поддерживали средний уровень освещенности содержимого биореактора вблизи поверхности стеклянной обечайки фоновым светом лаборатории 100–200 Лк (10–20 мВт на 1 л среды в реакторе). На определенном этапе исследований биореактор дополнительно освещали двумя лампами дневного света Philips мощностью по 20 Вт каждая, в результате средний уровень освещенности на поверхности обечайки составлял около 3500 Лк (250 мВт/л).

На рис. 6.4 – рис. 6.5 представлена часть результатов экспериментов которые проводились на протяжении 19 месяцев непрерывно в проточном режиме очистки модельного стока. Анализировались изменения  $XPK_{\text{вых}}$  при различных режимах освещения, внесения  $H_2O_2$ , времени пребывания среды в системе и  $XPK_{\text{вх}}$ . Во всех случаях  $XPK$  определяли до внесения  $H_2O_2$ . При разовом внесении  $H_2O_2$  его содержание рассчитывали суммарно только на объем биореактора и вторичного отстойника без учета подачи сточной воды в реактор. Каждый заданный режим поддерживался неизменным на протяжении от 1–2 недель до 1–2 мес. Изменения  $XPK$ , представленные на графиках, получены при заданном режиме протока,  $XPK_{\text{вх}}$  и условиях освещения.

Из рис. 6.4 видно, что при  $XPK_{\text{вх}}$  3000–4000 мг/л и времени пребывания среды в системе около 3 сут. добавление пероксида водорода в оптимальных дозах, как правило, приводит к падению  $XPK_{\text{вых}}$  от 2 до 4 раз. При прекращении подачи  $H_2O_2$  на длительное время, 2 нед. и более, наблюдается возрастание  $XPK_{\text{вых}}$ .

Из рис. 6.5 видно, что оптимальная доза  $H_2O_2$ , которую необходимо подавать в очищаемую воду, при  $XPK_{\text{вх}}$  3000–4000 мг/л составляет не более 5 мл/нед. 30%  $H_2O_2$ , что соответствует удельному количеству внесенного пероксида на весь объем среды (включая объем биореактора 3 л, вторичного отстойника 1,5 л, количество среды, подаваемой за неделю 10,5 л) не более 15 мг/л.сут.

Эффект падения  $XPK_{\text{вых}}$ , типично в 2–4 раза, наблюдается при всех использованных временах пребывания среды в реакторе (от 1 до 9 сут) и  $XPK_{\text{вх}}$  (от 700 до 4000 мг/л).

Сравнение эффекта последствия  $H_2O_2$  в отношении падения  $XPK_{\text{вых}}$  для времени пребывания среды в системе 9 сут., 2 сут. и 1 сут. показало, что в первом случае при времени пребывания среды в системе около 9 сут. и  $XPK_{\text{вх}}$  1200–1400 мг/л эффект снижения  $XPK_{\text{вых}}$  после внесения  $H_2O_2$  длится до 13 сут. (рис. 6.6), т.е. примерно до 1,5 генераций микроорганизмов ценоза.

При времени пребывания среды в системе около 2 сут. и  $XPK_{\text{вх}}$  1200–1400 мг/л эффект снижения  $XPK$  после внесения  $H_2O_2$  длится 4–6 сут., т.е. примерно 2,5–3 генерации микроорганизмов ценоза.

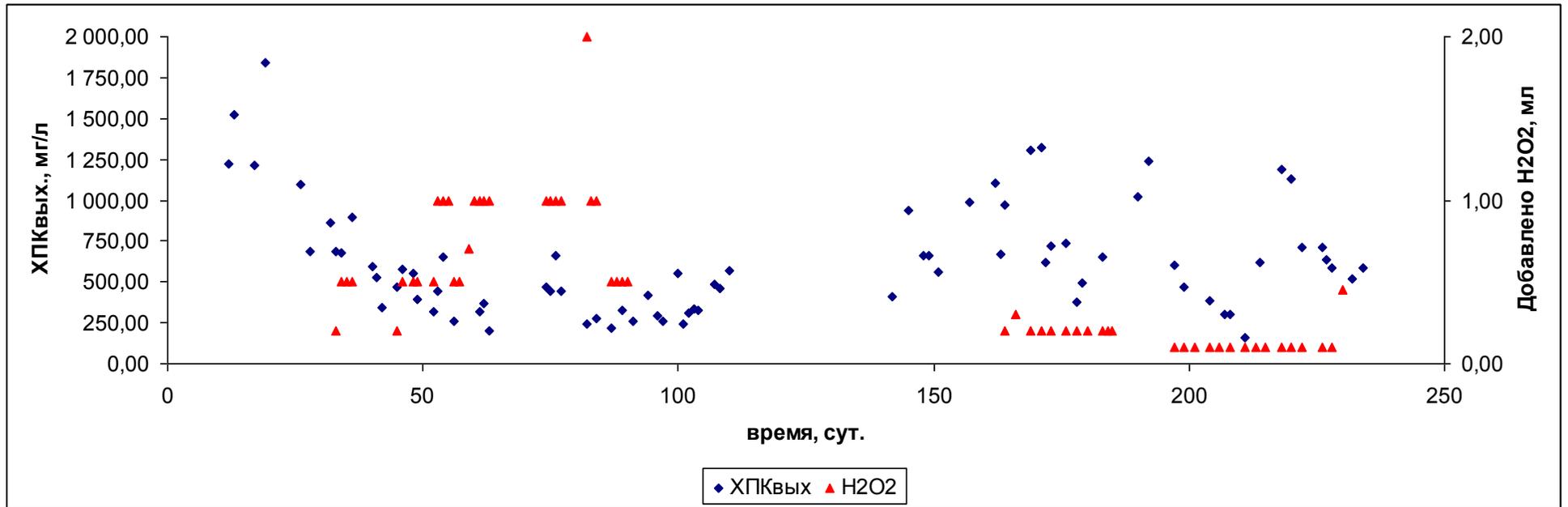


Рисунок 6.4 – Сопоставление изменения  $XPK_{\text{вых}}$  с добавлением  $H_2O_2$  по ходу очистки.

$XPK_{\text{вх}}$  – 3000–4000 мг/л; объем среды в реакторе 3 л; объем отстойника 1,5 л; скорость подачи среды 1,5 л/сут.; время пребывания среды в системе 3 сут.; интенсивность освещения 1600–3500 Лк (130–250 мВт/л). 0,1 мл однократного внесения  $H_2O_2$  в сутки соответствует среднесуточной концентрации  $H_2O_2$  2 мг/л (усредненно на весь суточный объем среды, включая сточную воду, поданную на вход биореактора в течение суток), температура 27–32 °С.

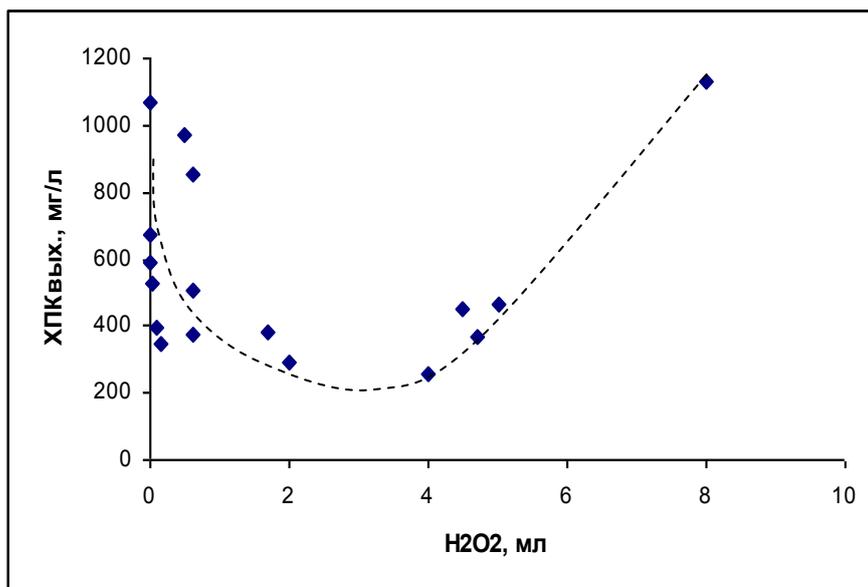


Рисунок 6.5 – Зависимость  $\text{ХПК}_{\text{вых.}}$  от недельной дозы внесенного  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$\text{ХПК}_{\text{вх.}}$  – 3000–4000 мг/л; время пребывания среды в системе 3 сут.; интенсивность освещения 1600–3500 Лк (130–250 мВт/л).

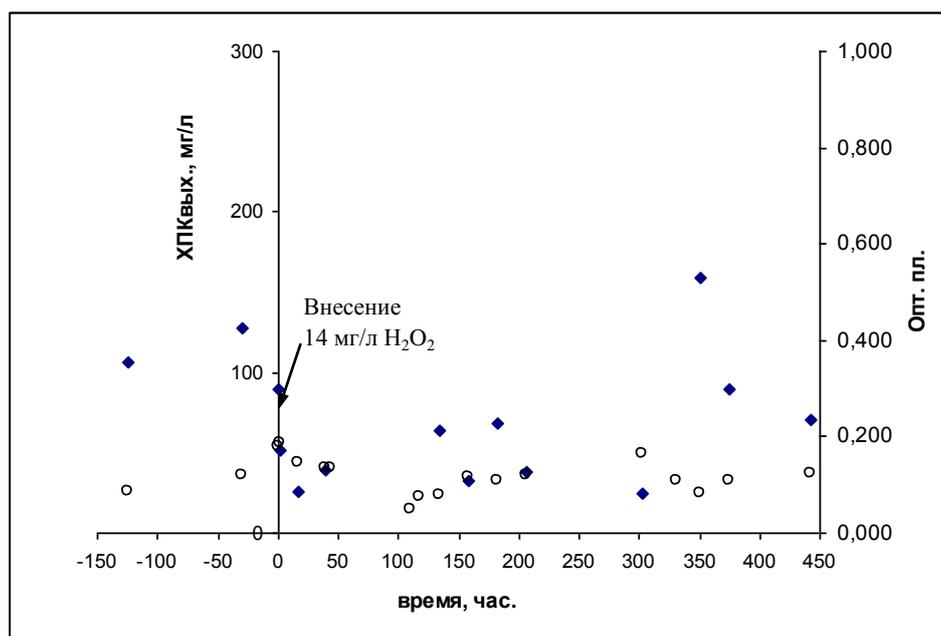


Рисунок 6.6 – Изменение  $\text{ХПК}_{\text{вых.}}$  и оптической плотности среды в биореакторе после разового добавления 14 мг/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$\text{ХПК}_{\text{вх.}}$  – 1200–1400 мг/л; время пребывания среды в системе 9 сут.; интенсивность освещения 3500 Лк (250 мВт/л); температура 22–28 °С. 320–344 сутки проточной очистки в биореакторе.  $\blacklozenge$  –  $\text{ХПК}_{\text{вых.}}$ ;  $\circ$  – оптическая плотность.

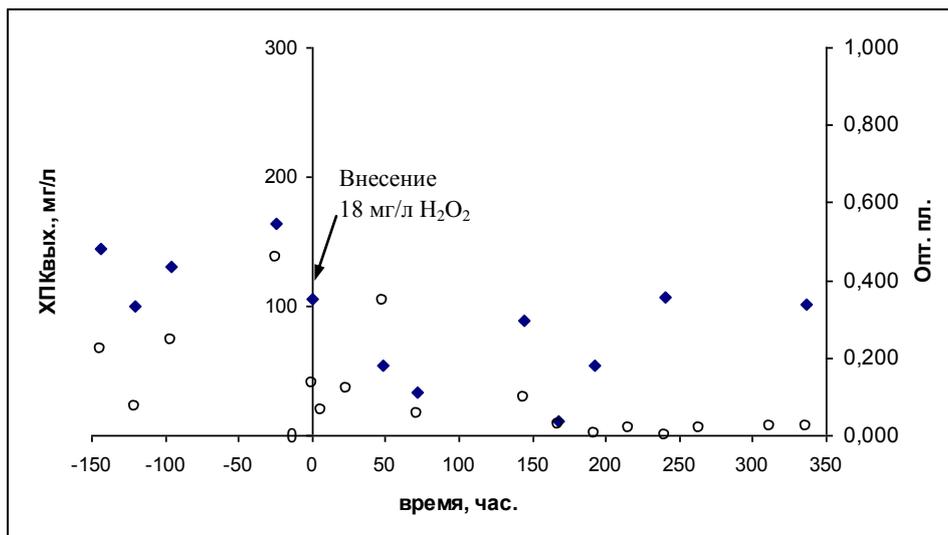


Рисунок 6.7 – Изменение ХПК<sub>вых.</sub> и оптической плотности среды в биореакторе после разового добавления 18 мг/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

ХПК<sub>вх.</sub> – 700–900 мг/л; время пребывания среды в системе около 1 сут.; среда без освещения; температура 23–24 °С. 420–440 сутки проточной очистки в биореакторе.

◆ – ХПК<sub>вых.</sub>; ○ – оптическая плотность.

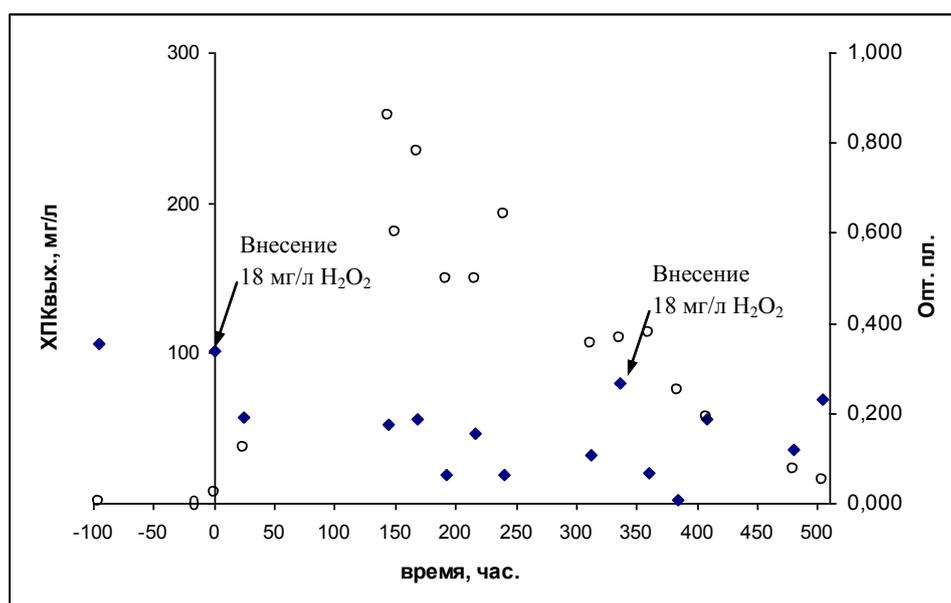


Рисунок 6.8 – Изменение ХПК<sub>вых.</sub> и оптической плотности среды в биореакторе после добавления 18 мг/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

ХПК<sub>вх.</sub> – 700–900 мг/л; время пребывания среды в системе 1 сут.; освещение 25–40 Лк (2–3 мВт/л); температура 24–28 °С. 437–461 сутки проточной очистки в биореакторе.

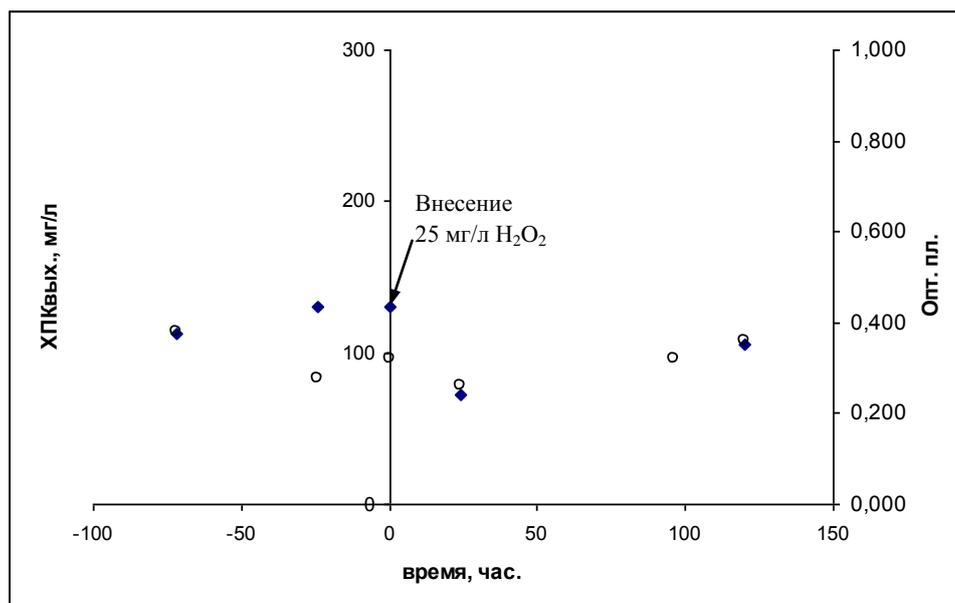


Рисунок 6.9 – Изменение ХПК<sub>вых.</sub> и оптической плотности среды в биореакторе после добавления 25 мг/л H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

ХПК<sub>вых.</sub> – 1400–1800 мг/л; время пребывания среды в системе около 2 сут.; освещение 5–10 Лк (0,5–1 мВт/л); температура 16–17 °С. 547–555 сутки проточной очистки в биореакторе.

При времени пребывания среды в системе около 1 сут. и ХПК<sub>вых.</sub> 700–900 мг/л эффект снижения ХПК после внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> длится 4–6 сут., т.е. примерно 2,5–3 генерации микроорганизмов ценоза.

Во втором и третьем случаях нагрузки на системы были близки, составляя 600–700 и 700–900 мг/л.сут. соответственно. Возможно этим объясняется близость величин времени последствия внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> во втором и третьем случаях (т.е. 4–6 сут.).

Таким образом, при стандартных режимах работы аэротенка для обеспечения снижения ХПК<sub>вых.</sub> на всем протяжении очистки достаточно вносить H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среду через каждые 3–5 сут., порциями в оптимальных дозах 10–20 мг/л, т.е. с учетом притока среды в систему среднесуточно примерно 3–7 мг/л на суммарный объем среды, находящейся в аэротенке с вторичным отстойником и поступившей в систему за 3–5 сут.

При затемнении биореактора (рис. 6.7) или освещении среды видимым светом с интенсивностью 5–40 Лк (рис. 6.8, 6.9) эффект внесения пероксида водорода также наблюдается, однако он не столь явно выражен, как при более высоких уровнях освещения. В темноте или при крайне низких уровнях освещенности фототрепарация незначительна, тем не менее положительный эффект низких доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сохраняется. Это может быть объяснено тем, что биоценоз ила на момент проведения данной серии

опытов, во-первых, был уже в определенной степени адаптирован к  $H_2O_2$ , во-вторых, зависимостью эффекта от физиологического состояния популяции и ее плотности в среде. Такая зависимость наблюдалась в экспериментах с микробными и дрожжевыми культурами.

Интерпретация результатов как проявление эффекта совместного положительного действия низких доз  $H_2O_2$  и видимого света с интенсивностью, достаточной для протекания фоторепарации, затрудняется тем обстоятельством, что по мере увеличения продолжительности эксперимента наблюдалось накопление микроводорослей и цианобактерий в среде, особенно обильное при высокой освещенности – к 360–395 суткам эксперимента. Об этом свидетельствует уменьшение  $XPK_{\text{вых}}$  после затемнения биореактора, который длительное время освещался светом с интенсивностью 3500 Лк (250 мВт/л), а также возрастание дыхательной активности ила, измеряемой по убыли  $pO_2$ , наблюдаемой при кратковременном прекращении аэрации и перемешивания среды, при смене режима с освещением на режим с затемнением среды. При затемнении среды выделение кислорода фотосинтетиками прекращается, и содержание растворенного кислорода в водной среде падает более резко. Известно, что обильный рост водорослей и цианобактерий приводит к повышению уровня накопления продуктов фотосинтеза, выделению части продуктов и метаболитов в окружающую среду и повышению  $XPK_{\text{вых}}$ . В то же время рост микроводорослей, но прежде всего цианобактерий, может сильно угнетаться уже небольшими дозами  $H_2O_2$ . Поэтому падение  $XPK_{\text{вых}}$  при внесении  $H_2O_2$  может быть также объяснено и негативным воздействием пероксида на рост фотосинтезирующих микроорганизмов, прежде всего цианобактерий, а не гетеротрофов-деструкторов.

Для достижения максимальной степени очистки по  $XPK$  освещенность среды должна быть такой, чтобы в биоценозе ила содержалось минимальное количество фотосинтетиков и в то же время могли протекать процессы фоторепарации при внесении  $H_2O_2$ . Этому режиму соответствуют освещенность 25–40 Лк (2–3 мВт/л), при которой понижение  $XPK$  было выражено в наибольшей степени (рис. 6.8). При этом уровне освещенности,  $XPK_{\text{вх}}$  700–900 мг/л, времени пребывания среды в системе около 1 сут. величина  $XPK_{\text{вых}}$  в среднем составила 40 мг/л, а степень удаления  $XPK$  94,8%, достигая в отдельные моменты 97,5–99,7%.

Оптическая плотность взвешенных частиц в толще среды биореактора на протяжении всех 19 мес. эксперимента обычно не превышала 0,2–0,3 ед., что соответствует содержанию взвешенных веществ около 150–200 мг/л, а в ряде случаев не превышала 50–60 мг/л.

При высокой интенсивности освещения внесение пероксида водорода, в целом, приводило к некоторому падению оптической плотности среды в биореакторе (рис. 6.6) и соответственно содержания взвешенных веществ (иловых частиц) в толще среды. При незначительном освещении или полном затемнении биореактора падения оптической плотности при внесении  $H_2O_2$  не наблюдалось (рис. 6.7, 6.8, 6.9).

Оптическая плотность мало менялась при кратковременном затемнении биореактора, но начинала возрастать при увеличении скорости потока. Однако после увеличения скорости потока оптическая плотность со временем вновь начинает снижаться и стабилизируется на уровне 0,1–0,3 ед., даже при времени пребывания среды в системе около 1 сут. (рис. 6.7, 6.8, 6.9).

В целом, оптическая плотность среды падала по ходу ведения эксперимента, что объясняется автоселекцией и агрегированием микроорганизмов, способных удерживаться в системе, и выносом плохо удерживаемых форм. В используемой нами системе с полным рециклом ила часть его находится в виде флокул, часть образует биопленку, а третья часть формирует гранулы.

Независимо от режима освещения и внесения  $H_2O_2$  использованная система с полной рециркуляцией ила устойчиво функционирует до  $XPK_{\text{вх.}}$  2000 мг/л (рис. 6.10) и нагрузках по  $XPK$  до 750–800 мг/л.сут. (рис. 6.11), при этом  $XPK_{\text{вых.}}$  не превышает 250 мг/л. рН в среде авторегулируется и колебалось на всем протяжении эксперимента в интервале 6,5–8,3. Случаи пенообразования в системе наблюдались в первые 150 сут. эксперимента. В дальнейшем образования пены и вспухания ила не возникало. Также в начальной фазе эксперимента наблюдалась плохая фильтруемость ила, обусловленная большим количеством слизи. Добавление пероксида водорода приводило к агрегированию такого плохо фильтруемого ила и резкому повышению его фильтрационной способности.

Низкое содержание взвешенного ила в системе, составляющее всего 150–200 мг/л, даже с учетом сформированной в биореакторе биопленки намного ниже величин, типичных для аэротенков классического типа (2–4 г/л). Это свидетельствует о высокой удельной активности сформированного ценоза, превышающей в несколько раз активность ила классических аэротенков.

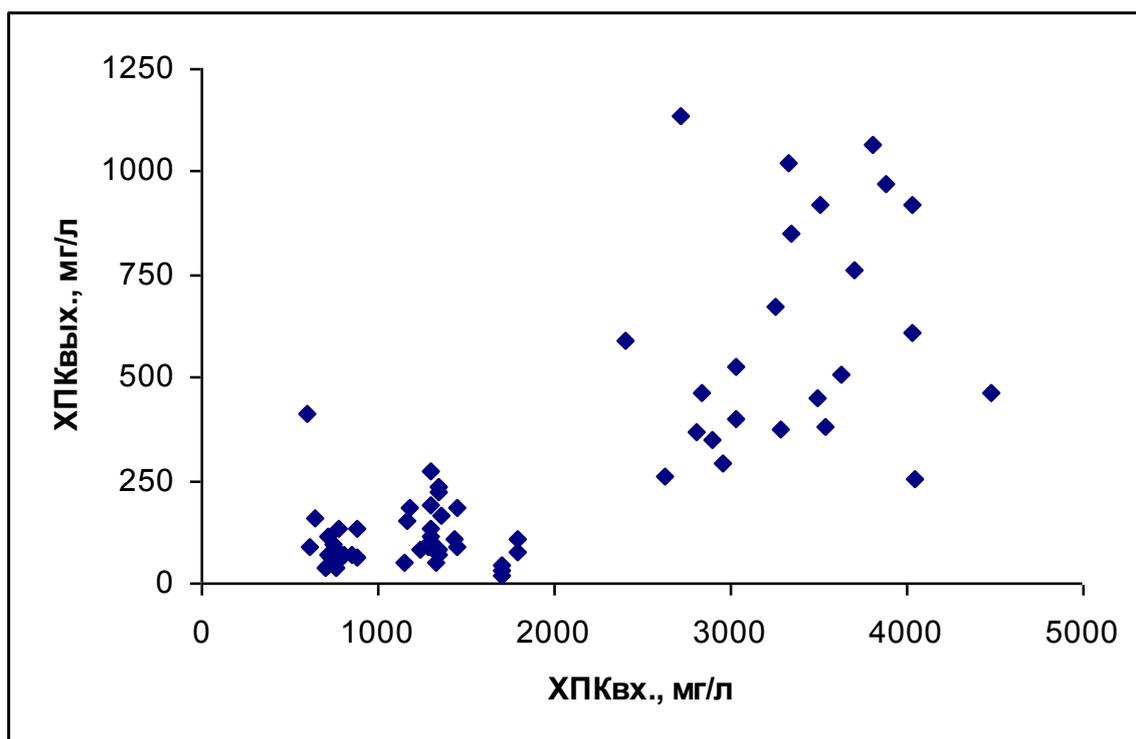


Рисунок 6.10 – Изменение  $\text{ХПК}_{\text{вых.}}$  в зависимости от  $\text{ХПК}_{\text{вх.}}$ .

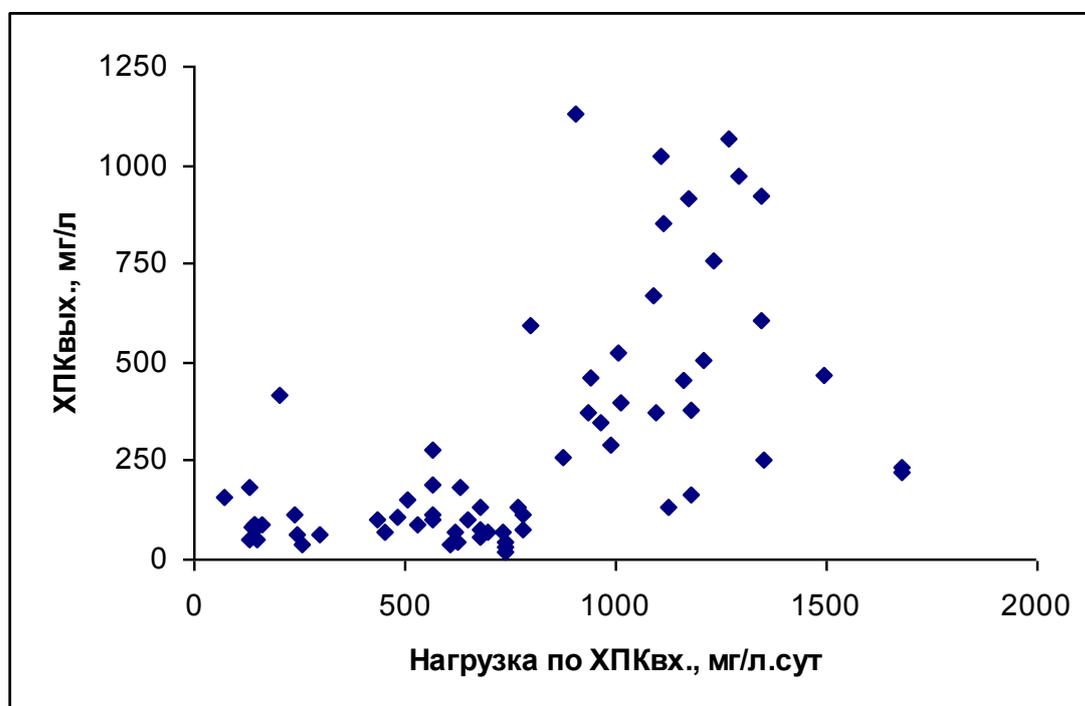


Рисунок 6.11 – Изменение  $\text{ХПК}_{\text{вых.}}$  в зависимости от нагрузки по  $\text{ХПК}_{\text{вх.}}$ .

В табл. 6.4 приведены обобщенные результаты очистки (по изменению ХПК) в экспериментах с модельным стоком при освещении среды с интенсивностью 7–3500 Лк (0,5–250 мВт/л).

Таблица 6.4 – Показатели очистки в экспериментах с модельным стоком

Условия очистки	Без внесения $H_2O_2$		С внесением $H_2O_2$ и освещением среды	
	ХПК на входе	ХПК на выходе	ХПК на входе	ХПК на выходе
Время пребывания среды 1 сут., суточная доза $H_2O_2$ 15–20 мг/л	700–900	100–140	700–900	<10–50
Время пребывания среды 2 сут., суточная доза $H_2O_2$ 80–100 мг/л	400–500	100–120	420	30–70
	1000–1300	230–260	1000–1300	10–110
Время пребывания среды 2 сут., суточная доза $H_2O_2$ 15–20 мг/л	1300–1600	140–230	1300–1600	40–130
Время пребывания среды 3 сут., суточная доза $H_2O_2$ 2–3 мг/л	700–900	70–90	700–900	<10–30
Время пребывания среды 3 сут., суточная доза $H_2O_2$ 10–15 мг/л	3000–4000	750–900	3000–4000	250–450
Время пребывания среды 9 сут., суточная доза $H_2O_2$ 7–14 мг/л	1100–1400	110–320	1050	<10–150

Повышение качества очистки проявляется во всех режимах: при различных способах очистки, нагрузках, содержании загрязнений (ХПК, биогенных элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения  $H_2O_2$ .

Так, в проточном режиме очистки в реакторе с биопленкой внесение  $H_2O_2$  в очищаемую среду в дозах, не превышающих 140 мг/л.сут., при одновременном освещении среды видимым светом с интенсивностью не более 20 мВт/л (ниже фонового освещения лаборатории) при подаче на вход стока с  $XPK_{вх.}$  600–1200 мг/л и времени пребывания среды в реакторе 2 сут. приводило к снижению ХПК на выходе со 150–200 мг/л – без добавления  $H_2O_2$  – до 10–20 мг/л и ниже вплоть до недетектируемых величин (т.е. около 0) – с добавлением  $H_2O_2$  и освещением очищаемой среды видимым светом.

Внесение пероксида водорода в очищаемую среду с активным бактериальным илом в проточном режиме очистки в дозах 2–100 мг/л.сут. при одновременном освещении

щении среды видимым светом с энергетической интенсивностью 0,5–250 мВт/л и в условиях отсутствия избытка микроводорослей приводит к снижению содержания остаточных загрязнений в сточной воде по сравнению с вариантом без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  типично в 1,5–3 раза. Поскольку прекращение подачи  $\text{H}_2\text{O}_2$  ведет к нивелированию положительных эффектов, в зависимости от условий очистки, через 1,5–8 генераций микроорганизмов, то пероксид водорода лучше вносить равномерно равными долями, чем однократно увеличенной дозой. Важным является использование биоценозов, предварительно адаптированных к стрессовому действию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ходе последовательных пассажей.

Представленные результаты получены со средой, содержащей только разбавленное водопроводной водой пиво «Балтика 0» без внесения каких-либо дополнительных компонентов питания.

Измерения показали, что без внесения минеральных солей содержание фосфатов на всем протяжении эксперимента в воде на выходе из системы не превышало 0,02 мг/л,  $\text{NH}_4^+$  – не более 0,05 мг/л,  $\text{NO}_2^-$  – не более 0,02 мг/л,  $\text{NO}_3^-$  – не более 1,5 мг/л.

Столь низкое содержание биогенных элементов в воде на выходе может быть обусловлено их дефицитом в исходной среде, что может ухудшать показатели очистки. Поэтому на заключительной стадии экспериментов в режиме подачи среды с  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  1600–1800 мг/л в среду было добавлено 30 мг/л аммонийного азота. Результаты этой части эксперимента представлены на рис. 6.12. Видно, что внесение дополнительного количества азота обеспечивает стабильное снижение  $\text{ХПК}$  с ~1600–1800 мг/л до 5–40 мг/л, т.е. степень удаления  $\text{ХПК}$  достигает 97,5–99,7%.

Удаление 97,5–99,7%  $\text{ХПК}$  в одну стадию является очень высоким показателем для одностадийного проточного процесса биологической очистки, с высокой удельной активностью ила, без накопления больших масс избыточного ила, с устойчивым функционированием при подаче на вход воды с  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  до 2000 мг/л, нагрузках по  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  до 750–800 мг/л.сут. без возникновения проблем образования пены и вспухания ила. Ил, присутствующий в системе, хорошо фильтруется и легко отдает воду. Обладая такими показателями, разработанный способ может быть отнесен к наилучшему из существующих на сегодня способов одностадийной аэробной биологической очистки. Он может быть использован для глубокой биологической очистки сточных вод промышленных предприятий и хозяйственно-бытовых стоков с обеспечением соответствующих нормативных требований к содержанию органических загрязнений в очищенной воде при уровнях загрязнения сточной воды по  $\text{ХПК}$  до 1500–2000 мг/л и нагрузках по  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  до 1000 мг/л.сут.

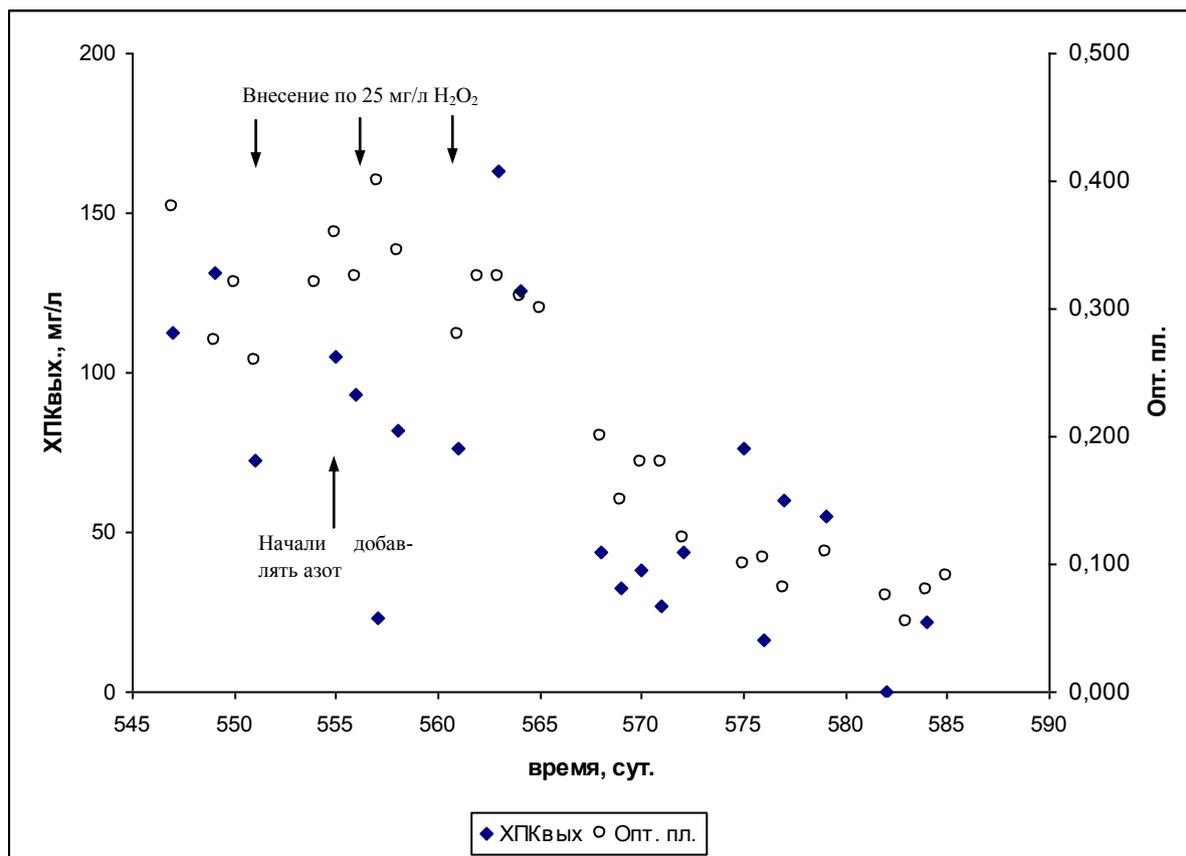


Рисунок 6.12 – Изменение ХПК<sub>вых.</sub> на выходе после добавления в среду требуемого количества аммонийного азота.

ХПК<sub>вх.</sub> – 1600–1800 мг/л; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – 30 мг/л; время пребывания среды в системе около 2 сут.; освещение 5–10 Лк (0,5–1 мВт/л); температура 25–28 °С. 547–585 сутки проточной очистки в биореакторе.

В режиме работы биореактора, использованном в лабораторной установке, биоценоз активного ила эволюционирует в сторону уменьшения содержания суспендированных клеток в очищаемой воде, поэтому содержание взвешенных веществ на выходе из биореактора невысокое (показатель оптической плотности близок к нулю).

Вместе с тем, фактором, мешающим достижению высоких степеней очистки, является присутствие микроводорослей и цианобактерий в очистной системе, доля которых в составе используемых биоценозов возрастает с увеличением интенсивности освещения среды. Переход от низкоинтенсивного режима освещения к более интенсивному приводит к повышенному накоплению микроводорослей и цианобактерий в зоне очистки и ухудшению качества очистки. При ХПК<sub>вх.</sub> 1000–2000 мг/л в режиме интенсивного освещения и без внесения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и дополнительного количества минеральных компонентов питания в среду (контрольный режим)

содержание остаточного ХПК на выходе из системы возрастало со 100–200 мг/л до 200–250 мг/л, а в варианте с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  в очищаемую среду с 30–50 мг/л до 100–110 мг/л. В отличие от ситуации с использованием режима низкоинтенсивного освещения и бактериального ила, при высоком содержании микроводорослей в ценозе содержание ХПК на выходе из реактора не падает ниже 100–120 мг/л. При режимах низкоинтенсивного освещения, достаточных для протекания фоторепарации, рост водорослей незначительный и не ухудшает существенно показатели очистки.

Из результатов проведенных экспериментов также следует, что положительное воздействие пероксида водорода на фоне видимого света в отношении снижения ХПК на выходе из очистной системы не ухудшает другие показатели очистки.

Уточнение требуемых доз и режимов внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$  показало, что при нагрузке по сточной воде на биореактор  $0,5\text{--}1 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{сут}$  с  $\text{ХПК}_{\text{вх.}}$  700–2000 мг/л для поддержания необходимого физиологического состояния преадаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$  ила и его биодеструкционной активности в очищаемую среду с илом достаточно вносить  $\text{H}_2\text{O}_2$  порциями 1 раз в 2–5 сут. в дозе 20–30 мг/л (в пересчете на 100%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) на фоне ввода в среду энергии света не более 0,5–10 мВт/л. Такой эффект относительно малых доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  на фоне воздействия низкоинтенсивного видимого света в отношении повышения качества очистки свидетельствует не о непосредственном химическом воздействии пероксида водорода на загрязнения, а о регуляторной, физиологической роли комбинированного воздействия  $\text{H}_2\text{O}_2$  и видимого света.

Для достижения положительного эффекта важно учитывать не только значимость фактора освещения очищаемой среды видимым светом в условиях внесения активных форм кислорода в очищаемую среду, но и активный ил должен быть преадаптирован к  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В условиях освещения среды низкоинтенсивным видимым светом преадаптированный ил сохраняет высокую физиологическую активность с обеспечением повышенной степени очистки (до 99,7% в одностадийном процессе) на протяжении не менее 3–5 генераций после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что позволяет резко снизить расход пероксида водорода на очистку. Без освещения среды скорость окисления загрязнений ниже, а требуемые нормативные показатели очистки не достигаются.

Таким образом, исследования, проведенные с модельным стоком пивоварения, выявили новую принципиальную возможность совершенствования процессов биологической очистки сточных вод с использованием комплексного воздействия на основе концепции «контролируемого оксидативного стресса», а именно с внесением пероксида водорода, использованием активного ила, адаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и освещением среды видимым светом низкой интенсивности, в частности, с целью снижения

остаточного ХПК в воде и достижения нормативных требований к очистке, действующих в Российской Федерации.

Полученные данные указывают на возможность создания замкнутой системы аэробной очистки в проточных условиях с полным рециклом ила с типичной нагрузкой по ХПК<sub>вх.</sub> 500–2000 мг/л.сут., в которой для повышения эффективности очистки используются комбинированное воздействие низких доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4–15 мг/л.сут.) и низкоинтенсивного видимого света (0,5–10 мВт/л), при этом степень очистки сточных вод может достигать 99% в одностадийном биологическом процессе, т.е. при ХПК<sub>вх.</sub> 500–1000 мг/л ХПК на выходе из очистной системы может составить 10 мг/л. В процессе биологической очистки можно получить воду с полной нитрификацией аммонийного азота.

При ХПК сточной воды на входе 5000–7000 мг/л показатели очистки по ХПК<sub>вых</sub> не выше 10 мг/л могут быть достигнуты в двухступенчатой очистке сточных вод с удалением 75–95% загрязнений на первой, анаэробной стадии в реакторах с гранулированным илом (UASB и др.) с последующей доочисткой стоков на второй, аэробной стадии с использованием контролируемого оксидативного воздействия.

## 6.2. Биодеструкция фенола

Применительно к идеологии диссертационной работы в исследованиях с модельными фенолсодержащими стоками апробировались возможности:

1) Биодеструкции фенола в режимах периодическом и непрерывном с использованием адаптированных к фенолу микробоценозов.

2) Биодеструкция фенола в режимах с внесением в очищаемую среду пероксида водорода (точнее, разбавленный реактив Фентона – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и Fe<sup>2+</sup>) как вариант апробации гибридного процесса с одновременным совмещением по месту и времени биологического и химического окисления загрязнений. Первоначально планировалось изучить особенности поведения микробной популяции в таком процессе и выяснить, возможно ли существенное химическое окисление, повышение биодоступности частично окисленного фенола, его интермедиатов или каких-либо внеклеточных продуктов пероксидом водорода (реактивом Фентона) на фоне протекания биологического окисления и определить, смогут ли выдерживать консорциумы фенолдеструкторов достаточно жесткие условия, в данном случае высокие концентрации пероксида водорода в активной фазе биоокисления.

3) Проведение биоокисления фенола в режиме с подпиткой субстратом (фенолом) – аналогично процессу «fed-batch» культивирования при биосинтезе с ис-

пользованием  $H_2O_2$ . Высокоплотностной режим культивирования с подпиткой субстратом мог бы быть применен для переработки высококонцентрированных стоков с токсичными органическими веществами и другими ксенобиотиками, однако из-за токсичного действия биологическая деструкция высококонцентрированных стоков требует их предварительного разбавления, иногда в десятки и сотни раз.

Учитывая что  $H_2O_2$  в природе участвует в процессах самоочищения, полагали, что внесение  $H_2O_2$  в зону биоокисления может нивелировать вредные воздействия накапливаемых продуктов метаболизма и привести к определенным положительным результатам. Этот метод мог бы оказаться весьма эффективным для биодеструкции токсикантов высококонцентрированных стоков ввиду возможности резкой интенсификации процесса биологического окисления при повышенном содержании биомассы, а также ввиду отсутствия необходимости разбавления стоков. Кроме того, в таком процессе из-за высокой плотности микроценоза прирост ила и удельный выход биомассы активного ила на единицу минерализованных загрязнений уменьшаются, т.е. минимизируется образование вторичных отходов.

### **6.2.1. Получение изолятов микроорганизмов – деструкторов фенола**

На первом этапе исследований были получены работоспособные биоценозы микроорганизмов, адаптированные к высоким концентрациям фенола, а также устойчивые к относительно высоким концентрациям  $H_2O_2$ .

В качестве исходных образцов для выделения фенолдеструкторов были взяты стоки коксохимического и нефтехимического производства, загрязненные образцы почв. Изоляты, обогащенные фенолдеструкторами, получали обычными методами накопительной культуры путем выращивания и последующего пересева популяции каждые 3–5 сут. в пробирках или колбах на качалке с числом оборотов 160–220 об/мин на минеральной среде с фенолом при  $pH_{исх.}$  5,0 и 7,0, температуре 28–32 °С с постепенным повышением его концентрации в среде культивирования.

В результате, после 26 пассирований, были получены два консорциума микроорганизмов: с доминированием дрожжей (при  $pH$  5,0) и с доминированием бактерий (при  $pH$  7,0). Микроорганизмы изолятов были способны расти в аэробных условиях на средах с концентрацией фенола до 3,0 г/л и разлагали фенол при его исходной концентрации 2 г/л при температуре 28–32 °С за 48 ч – для дрожжевого ценоза и за 26 ч – для бактериального ценоза.

Параллельно с получением фенолдеструкторов проводили их адаптацию к внесению в среду  $H_2O_2$  при  $pH$  5,0 и  $pH$  7,0 в постепенно повышающемся количестве от

0,03 до 3,0 г/л при концентрациях  $\text{Fe}^{2+}$  10 мг/л и 100 мг/л в среде культивирования, что близко к концентрациям в реактиве Фентона (0,1–1 мМ  $\text{Fe}^{2+}$ ). Всего также было сделано 26 пассажей.  $\text{H}_2\text{O}_2$  добавляли непосредственно в среду с фенолом и активным илом при каждом пассивировании спустя 2–4 ч после пересева на новую среду.

В результате длительной (более 1,5 лет) адаптации двух изолятов к  $\text{H}_2\text{O}_2$  были получены ценозы микроорганизмов, способные расти на средах с концентрацией фенола до 3,0 г/л. Из этих консорциумов при расसेве на чашки Петри с агаризованной средой с добавлением фенола и  $\text{H}_2\text{O}_2$  были выделены три вида микроорганизмов, два из которых – дрожжи, и один – бактерии. Видовая идентификация дрожжей и бактерий полученных ценозов не проводилась.

Результат действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  зависил от плотности популяции микроорганизмов и их фазы роста. Ценоз с доминированием дрожжей и концентрацией клеток микроорганизмов в популяции не ниже 0,3–0,5 г асб/л, полученный при рН 5,0, при культивировании в колбах на качалке выдерживал внесение 0,4 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$  без заметного уменьшения физиологической активности. Бактериальный, полученный при рН 7,0 – внесение 3 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ . С увеличением концентрации микроорганизмов возрастала их устойчивость к  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Наибольшей резистентностью обладали популяции, находящиеся в наиболее активной – экспоненциальной фазе роста. Микробоценозы в периодическом режиме были способны утилизировать большую часть фенола в первые сутки при содержании последнего в среде 1,8–2,5 г/л. В сравнении с вариантами деструкции фенола микроорганизмами 26 пассажа без внесения пероксида водорода для бактериального ценоза 26 пассажа с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдались близкие скорости деструкции, а для дрожжевого – превышение скорости деструкции фенола в варианте с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Остаточная концентрация фенола в среде после 40 ч культивирования составляла менее 0,01 г/л.

Таким образом, были получены работоспособные биоценозы микроорганизмов, адаптированные к высоким концентрациям фенола и с повышенной устойчивостью к пероксиду водорода. Полученные консорциумы микроорганизмов 26-го пассажа были использованы в дальнейшем при исследовании окисления фенола в биореакторах при различных режимах культивирования: периодическом, непрерывном хемостатном, периодическом с подпиткой субстратом (фенолом) без внесения и с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Целью этих экспериментов являлось сравнение различных режимов культивирования микроорганизмов на феноле как единственном источнике углерода.

### 6.2.2. Биодеструкция фенола в проточных условиях

Культивирование в проточном хеостатном режиме проводили одновременно в двух лабораторных ферментерах объемом 100 мл, оснащенных аэрирующим устройством и магнитной мешалкой, при температуре  $32 \pm 1$  °С при значениях рН: 5,0 – в первом ферментере и 7,0 – во втором. Использовались биоценозы 26 пассажа, полученные в условиях адаптации к потреблению фенола без внесения  $H_2O_2$ . В ферментер № 1 внесли в качестве посевного материала дрожжевой ценоз 26-го пассажа в количестве 10% об.; в ферментер № 2 – бактериальный в том же количестве. На вход обоих ферментеров подавалась среда одинакового состава, содержащая от 1,8 г/л до 3 г/л фенола. Регулировка и поддержание рН на заданном уровне не проводились. Скорость протока составляла  $0,042$  ч<sup>-1</sup>. Результаты культивирования представлены на рис. 6.13.

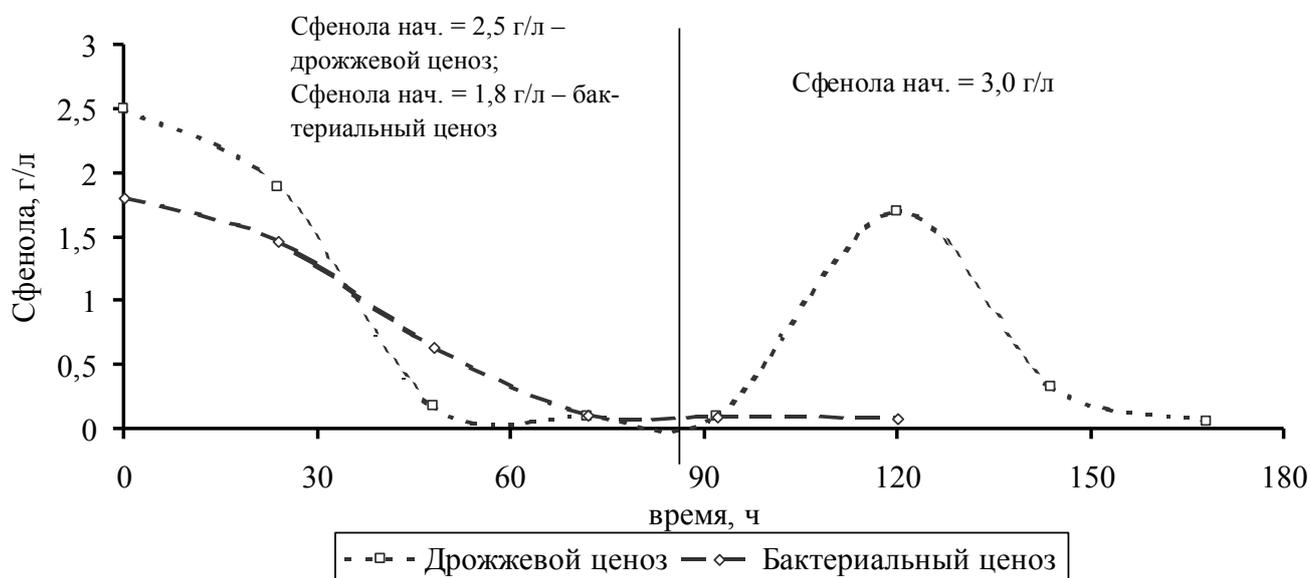


Рисунок 6.13 – Изменение содержания фенола в среде на выходе из реактора в проточном хеостатном режиме с «дрожжевым» ценозом (рН 5,0) и «бактериальным» (рН 7,0) при  $D = 0,042$  ч<sup>-1</sup> без внесения  $H_2O_2$ . В обоих случаях в качестве стартовых использовались ценозы 26 пассажа.

В этих условиях при скорости разбавления  $0,042$  ч<sup>-1</sup> и входной концентрации фенола в среде культивирования до 3 г/л скорость его окисления не превышала 0,13 г/л.ч. Остаточная концентрация фенола в среде на выходе из биореактора находилась на уровне 0,1–0,2 г/л. Повышение концентрации фенола до уровня 3 г/л в подаваемой среде в варианте с дрожжевым ценозом привело к кратковременному повышению текущей концентрации фенола в биореакторе с последующим ее падением до 0,1 г/л.

Максимальная окислительная мощность биореактора по потреблению фенола составила  $2,9 \text{ г/л} \cdot 0,042 \text{ ч}^{-1} = 0,122 \text{ г/л.ч}$ . При повышении  $D$  до  $0,07 \text{ ч}^{-1}$  происходило возрастание остаточной концентрации фенола до  $0,3\text{--}0,4 \text{ г/л}$ .

Таким образом, полученные бактериальный и дрожжевой ценоз были способны окислять фенол в проточном хемостатном режиме при его исходной концентрации в подаваемой среде до  $3 \text{ г/л}$ . Окислительная мощность ферментера по потреблению фенола в этих условиях составляла до  $0,122 \text{ г/л.ч}$  при скорости разбавления  $D = 0,042 \text{ ч}^{-1}$ . Концентрация фенола на выходе при этом составляла около  $0,1 \text{ г/л}$ . При более высоких  $D$  в хемостатных условиях происходило возрастание остаточной концентрации фенола.

### **6.2.3. Биодеструкция фенола в проточных условиях с внесением пероксида водорода**

В проточных хемостатных условиях была исследована биоочистка с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $0,1 \text{ г/л Fe}^{2+}$  в подаваемую в биореактор среду культивирования с фенолом и использованием полученных дрожжевого и бактериального консорциумов, адаптированных к фенолу и  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

В случае применения в качестве фенолдеструктора дрожжевого консорциума микроорганизмов, созданного при  $\text{pH} = 5,0$  и адаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , начальная скорость разбавления среды составляла  $0,042 \text{ ч}^{-1}$ . Начальная концентрация фенола –  $1,8 \text{ г/л}$ . Пероксид водорода в первой фазе эксперимента не подавали. Через 70 часов после начала проточного культивирования концентрация фенола в выходящей среде вышла на постоянные значения и составила в среднем  $0,25 \text{ г/л}$ . На 525 час эксперимента скорость разбавления увеличили до  $0,075 \text{ ч}^{-1}$ , концентрация фенола возросла незначительно. На протяжении следующих 400 часов она практически не менялась. На 900 час эксперимента скорость разбавления среды увеличили до  $0,10 \text{ ч}^{-1}$ . Концентрация фенола увеличилась в среднем до  $0,3 \text{ г/л}$ . На 1064 час культивирования вновь увеличили скорость подачи среды ( $D = 0,117 \text{ ч}^{-1}$ ), концентрация фенола возросла в среднем до  $0,4 \text{ г/л}$ . На 1500 час опыта скорость разбавления была опять увеличена до  $0,150 \text{ ч}^{-1}$ . Концентрация фенола вновь возросла до  $0,85 \text{ г/л}$ . Затем (1625 ч) скорость разбавления уменьшили до  $0,117 \text{ ч}^{-1}$ , концентрация фенола уменьшилась до  $0,40 \text{ г/л}$  и на протяжении 125 часов изменялась в диапазоне  $0,4\text{--}0,6 \text{ г/л}$ .

К 1909 часу в режиме хемостатного культивирования получили дрожжевой биоценоз, окисляющий фенол при его концентрации на входе  $1,8 \text{ г/л}$  и на выходе – около  $0,5 \text{ г/л}$ . Окислительная мощность реактора по фенолу на данном этапе составила  $(1,8 - 0,5) \text{ г/л} \cdot 0,117 \text{ ч}^{-1} = 0,15 \text{ г/л.ч}$ .

На 1910 час культивирования дрожжевого ценоза при  $\text{pH} = 5,0$  и остаточной концентрации фенола на выходе  $0,50$  г/л в подающую емкость был добавлен пероксид водорода с начальной концентрацией  $0,1$  г/л. Скорость подачи среды уменьшили до  $0,10 \text{ ч}^{-1}$ . После добавления пероксида, концентрация фенола на выходе снизилась до  $0,08$  г/л. Сразу после этого на 1933 часу опыта концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  увеличили до  $0,2$  г/л, концентрация фенола вновь снизилась до  $0,01$  г/л. На 2056 час культивирования концентрацию пероксида увеличили до  $0,4$  г/л, концентрация фенола увеличилась до  $0,405$  г/л. На 2269 часу опыта концентрацию пероксида увеличили до  $0,8$  г/л. В таком режиме начало наблюдаться вымывание микроорганизмов из биореактора и повышение концентрации фенола. На 2718 час эксперимент был прекращен. На данном этапе окислительная мощность реактора по фенолу при оптимальных вносимых количествах  $\text{H}_2\text{O}_2$  составляла около  $(1,8 - 0,01) \text{ г/л} * 0,10 \text{ ч}^{-1} = 0,18 \text{ г/л.ч}$ .

В случае применения в качестве фенолдеструктора консорциума микроорганизмов, созданного при  $\text{pH} 7,0$  и адаптированного к внесению  $\text{H}_2\text{O}_2$ , первые четверо суток процесс проводили в периодическом режиме для накопления биомассы. На 121 час опыта режим культивирования был переведен на непрерывный, скорость подачи среды установлена  $0,033 \text{ ч}^{-1}$ , концентрация фенола в подаваемой среде –  $1,5$  г/л, количество вносимого  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $0,1$  г/л, остаточная концентрация фенола при этом не повысилась. На 140 ч от начала опыта была увеличена исходная концентрация фенола до  $1,8$  г/л, что привело к кратковременному росту концентрации фенола на выходе с последующим падением до  $0,01$  г/л. На 260 ч эксперимента проток увеличили до  $0,04 \text{ ч}^{-1}$ . Это вызвало резкий скачок концентрации фенола на выходе с последующим спадом до  $0,01$  г/л. На протяжении 300 часов концентрация фенола на выходе существенно не изменялась. На 650 час эксперимента концентрация пероксида водорода была увеличена до  $1$  г/л, а на 1029 ч – до  $3$  г/л. Остаточная концентрация фенола увеличилась незначительно. Через 120 часов после увеличения концентрации пероксида, увеличили скорость подачи среды до  $0,12 \text{ ч}^{-1}$ , однако в этом режиме остаточная концентрация фенола начала повышаться. На 1462 час опыт был прекращен.

Таким образом, в данном эксперименте в режиме хемостатного культивирования бактериальный ценоз, адаптированный к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , выдерживал присутствие пероксида водорода в концентрации до  $3$  г/л при производительности реактора по окисленному фенолу до  $1,8 \text{ г/л} * 0,12 \text{ ч}^{-1} = 0,22 \text{ г/л.ч}$ .

Результаты культивирования в условиях хемостата с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  показали, что дрожжевой ценоз физиологически активен при непрерывной подаче  $\text{H}_2\text{O}_2$  в биореактор при содержании пероксида во входной среде до  $0,4$  г/л. При этом в

условиях внесения  $H_2O_2$  окислительная мощность по фенолу для дрожжевого ценоза была выше на 50%, чем в тех же условиях без добавления  $H_2O_2$ . Бактериальный консорциум микроорганизмов при содержании фенола в среде на входе 1,8 г/л выдерживал до 3 г/л  $H_2O_2$ . Окислительная мощность по фенолу для бактериального ценоза, адаптированного к  $H_2O_2$ , была выше на 80% по сравнению с вариантом без внесения  $H_2O_2$ . Для обоих ценозов наблюдалось снижение остаточных концентраций фенола до 0,01 г/л на выходе из биореактора при внесении пероксида водорода, т.е. примерно в 10 раз ниже по сравнению с вариантом проточной очистки без внесения  $H_2O_2$ . Полученные результаты свидетельствуют, что внесение пероксида водорода в среду с активным илом, адаптированным к  $H_2O_2$ , благоприятно сказывается на физиологической активности микроорганизмов ила и приводит к повышению качества очистки.

#### **6.2.4. Биодеструкция фенола при культивировании с подпиткой с внесением пероксида водорода**

Учитывая, что внесение  $H_2O_2$  в периодическом и проточном режимах биоокисления приводило к уменьшению остаточных концентраций фенола в ферментационной среде, было решено апробировать процесс малосточного биоокисления фенола с внесением пероксида водорода в режиме с дробной подпиткой субстратом (фенолом) по мере исчерпания его в ферментационной среде, аналогично тому как проводилось в экспериментах с высокоплотным культивированием дрожжей *C. tropicalis* с подпиткой сахарозой (см. раздел 5.2.1). Это позволяет не только снизить объем вторичных стоков и отходов со стадии биологической очистки, но и повысить концентрацию клеток микроорганизмов в среде культивирования при поддержании неизменной удельной скорости биосинтеза, а с этим – общую производительность биореактора. Кроме того, питательные субстраты должны подаваться в биореактор в концентрированном виде. Однако применительно к переработке токсичных соединений возможности процесса с подпиткой в стандартном варианте реализации существенно ограничиваются из-за образования побочных продуктов метаболизма, ингибирующих процесс окисления. Наряду с этим, fed-batch culture требует тщательного выдерживания необходимых параметров биосинтеза (прежде всего текущей концентрации органического субстрата и концентрации растворенного кислорода, а также pH и содержания минеральных компонентов питания).

В опытах с подпиткой фенолом использовался дрожжевой ценоз, как неадаптированный, так и адаптированный к внесению  $H_2O_2$ . Эксперименты проводились на

установке «Фермус – 3» в биореакторе с рабочим объемом среды 2,5 л. Момент внесения очередной порции фенола определялся по возрастанию концентрации растворенного кислорода в среде. Кроме того, по показателю  $pO_2$  определялась и скорость распада  $H_2O_2$  в ферментационной среде. Внесение  $H_2O_2$  в среду приводит к резкому росту  $pO_2$  вследствие каталитического распада  $H_2O_2$  с последующим снижением показаний  $pO_2$  до исходной величины в течение 1–3 мин.

В контрольных экспериментах с неадаптированным к пероксиду водорода дрожжевым консорциумом фенолдеструкторов с дробным внесением фенола порциями по 0,5–1 г/л и без внесения  $H_2O_2$  в среду культивирования разложение фенола останавливалось уже после суммарного внесения 4–6 г фенола на 1 л среды. Однако в аналогичных экспериментах с периодическим внесением  $H_2O_2$  и дрожжевым консорциумом, адаптированным к  $H_2O_2$ , не наблюдалось замедления биологического окисления по мере внесения фенола. Напротив, скорость окисления фенола даже увеличивалась.

Для проверки этого эффекта был поставлен отдельный эксперимент, цель которого заключалась в выяснении потенциальных возможностей режима окисления с подпиткой, а также изучение поведения микробной популяции и устойчивости процесса к режимам подпитки. В данном опыте использовали выделенный дрожжевой консорциум фенолдеструкторов, адаптированный к  $H_2O_2$ . Результаты данного эксперимента представлены на рис. 6.14.

В течение всего опыта в биореактор вносили фенол порциями по 0,5–5,0 г/л. Процесс окисления осуществляли при умеренном перемешивании среды в биореакторе, так что потребление фенола можно было легко определить по падению текущей концентрации растворенного кислорода в ферментационной среде, а возрастание  $pO_2$  свидетельствовало об исчезновении фенола в среде и необходимости внесения его новых порций.

Одновременно в первые от начала процесса 1000 ч после внесения очередной порции фенола в биореактор вносили  $H_2O_2$  в виде 50%-го раствора разовыми дозами от 0,1% до 2% (в пересчете на 100%  $H_2O_2$  по массе относительно среды культивирования) с периодичностью 1–2 раза в сутки. В ночное время суток и в выходные фенол и  $H_2O_2$  не вносились. По мере увеличения суммарного количества вносимого фенола возрастала скорость его окисления. Очевидно, это было обусловлено возрастанием концентрации биомассы фенолдеструкторов в реакционной среде без падения ее удельной активности. Наряду с этим остаточная концентрация фенола в ферментационной среде все время была на достаточно низком уровне.

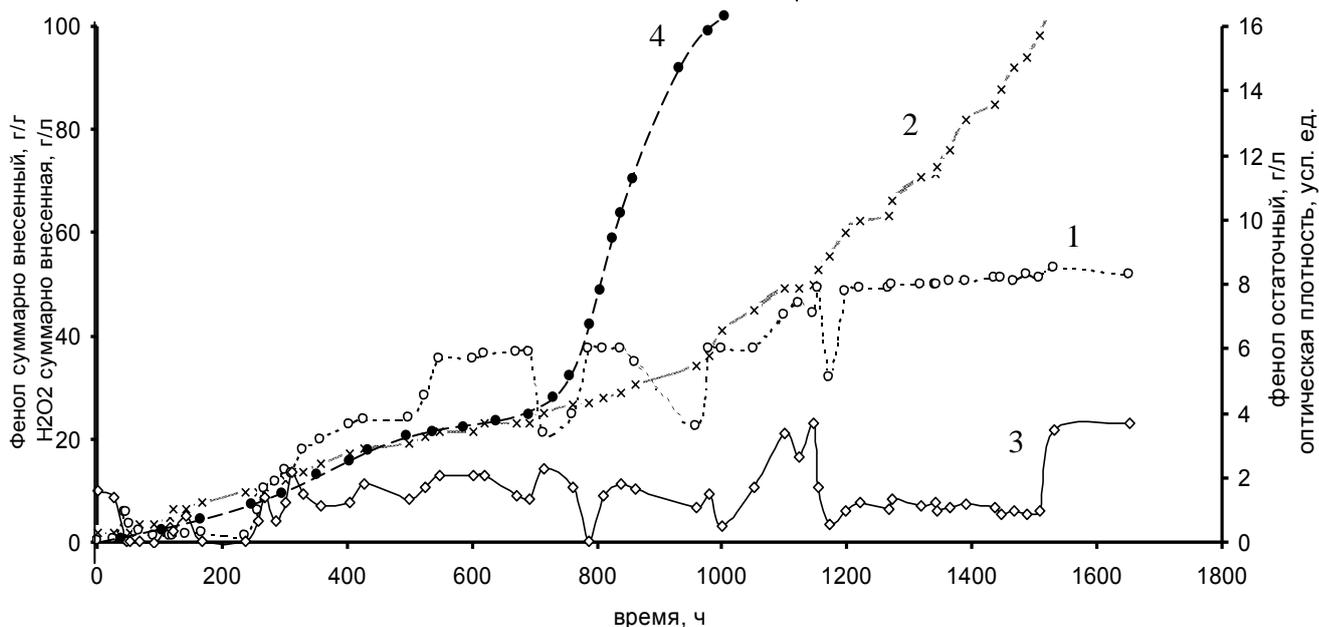


Рисунок 6.14 – Показатели процесса окисления фенола в режиме культивирования с подпиткой с использованием биоценоза на основе дрожжей, преадаптированного к пероксиду водорода.

1 – оптическая плотность, усл. ед.; 2 – суммарное количество внесенного фенола, г/л; 3 – концентрация фенола, остаточная, г/л; 4 – количество суммарно внесенного пероксида водорода, г/л.

Осторожное экспериментирование с увеличением концентрации вносимого  $\text{H}_2\text{O}_2$  по ходу опыта и концентрации вносимого фенола показало, что в условиях, когда фенол активно разлагался, скорость его разложения возрастала с увеличением дозы вносимого  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а популяция микроорганизмов выдерживала внесение до 2% об.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 мл 50% р-ра  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 1 л среды). Скорость окисления достигла 1 г/л.ч при максимальной текущей концентрации фенола 5 г/л. Окисление фенола без появления тенденции к замедлению процесса наблюдалось и после прекращения подачи  $\text{H}_2\text{O}_2$  (начиная с 1001 ч от начала опыта). Окисление прекратилось лишь тогда, когда в среду разово внесли фенол в количестве 6 г/л, оказавшемся критическим для микроорганизмов биоценоза. К этому моменту количество суммарно внесенного фенола составило 100 г/л (ХПК более 250000 мг  $\text{O}_2$ /л). В отличие от неадаптированного дрожжевого консорциума, консорциум, адаптированный к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , имел высокую каталазную активность, о чем свидетельствовало бурное «вскипание» среды сразу же после внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . По мере протекания процесса происходило последовательное изменение окраски среды: бесцветная – светло-коричневая – бурая – черная, что говорит, воз-

можно, о протекании процессов полимеризации промежуточных продуктов, образующихся при окислении фенола. Однако содержание этих веществ в конце процесса оказалось относительно невысоким – общее содержание твердых веществ в среде, включая клетки микроорганизмов, к концу процесса составило 17 г асв/л.

Прирост биомассы по мере увеличения суммарного количества окисленного фенола уменьшался, причем в конце процесса содержание биомассы в реакторе стабилизировалось. Увеличение длительности голодания (после исчерпания фенола в среде) в пределах до 12 ч приводило лишь к незначительному замедлению скорости окисления фенола при его последующем добавлении. Поскольку в ходе эксперимента были перерывы в подаче фенола – от 12–14 ч до 2–3 сут., и кроме того, процесс окисления в определенной степени лимитировался скоростью подачи кислорода в ферментационную среду, то можно ожидать и более высоких суммарных скоростей окисления фенола в такой системе.

Обращает на себя внимание тот факт, что эффект окисления фенола без ингибирования продуктами метаболизма сохранялся и после прекращения внесения пероксида водорода в среду окисления. После того как в среду было внесено фенола суммарно около 40 г/л и  $H_2O_2$  перестали добавлять, процесс продолжал идти с той же скоростью и эффективностью окисления вплоть до внесения фенола суммарно 100 г/л.

Таким образом, биоценоз микроорганизмов, преадаптированный к внесению  $H_2O_2$  (к оксидативному стрессу) оказался способным окислять фенол, вносимый в среду дробно, с высокой скоростью. Микроорганизмы длительно поддерживают свою физиологическую активность, активны после длительного голодания (сутки и более) и продолжают окислять дробно добавляемый фенол и без внесения  $H_2O_2$ . В таком процессе с подпиткой субстратом остаточная концентрация фенола намного ниже, чем без использования пероксида водорода. Можно предположить, что в этом случае популяция существенно изменяет свои физиолого-биохимические свойства, приобретает способность окислять фенол без накопления продуктов метаболизма, ингибирующих окисление. Это означает, что эффективность минерализации органического субстрата в данном случае близка к 100% (без учета небольшой части субстрата, перешедшей в биомассу). Микроорганизмы, преадаптированные к  $H_2O_2$ , сохраняют свою повышенную физиологическую активность в течение достаточно длительного времени без внесения  $H_2O_2$ . В активной фазе роста и биоокисления такая популяция выдерживает внесение 2% масс.  $H_2O_2$  и способна окислять фенол в количестве более 100 г/л по внесенному суммарно фенолу за один цикл окисления. Скорость разложения фенола в таком процессе способна достигать 1 г/л.ч (до 2000 мг  $O_2$ /л.ч) при максимальной текущей концентрации фенола 5 г/л без проявления каких-либо признаков ингибирования.

ния. Микробные популяции, не адаптированные к  $H_2O_2$ , не обладают такой возможностью (окисляется не более 5–6 г/л фенола). Остаточные концентрации фенола в среде биоокисления намного ниже величин, наблюдаемых в контрольной неадаптированной популяции при окислении фенола без внесения  $H_2O_2$ . Полученные показатели биоокисления фенола в 2–3 раза (по скорости окисления) и в 10–20 раз (по количеству суммарно окисленного фенола в среде биологического культивирования) превышают величины, реализуемые в традиционных процессах биологического окисления.

В табл. 6.5 приведены сравнительные показатели изученных режимов деструкции фенола, в табл. 6.6 – оценочное сравнение разработанных методов очистки с проточной очисткой в аэротенке сточных вод на АО «Саратоворгсинтез» [1929]. В случае переработки шламов оценочное снижение затрат составит 27,5 %, а в случае очистки сточных вод – 55%.

Таблица 6.5 – Сравнительные показатели деструкции фенола при различных режимах культивирования

Показатели	Процесс без внесения $H_2O_2$		«Гибридный» процесс с внесением $H_2O_2$		
	периодический	проточный	периодический	проточный	периодический с подпиткой
$C_{\text{фенола}}$ , г/л, ВХОД.	2,0	3,0	2,0	2,0	до 100 г/л за 1 цикл
$C_{\text{фенола}}$ , г/л, ВЫХОД.	<0,01	>0,1	<0,01	<0,01	<0,05
проток, ч <sup>-1</sup>		0,042		0,12	
Окислительная мощность, г/л.ч	0,06	0,12	0,09	0,22	~ 1,0
Степень деструкции фенола, %	>99,4	<96,7	>99,4	>99,4	>99,95
Концентрация активного ила в конце процесса деструкции, г/л по сух. вещ-вам	0,6				17,0
Выход ила от фенола, г/г	0,3				0,17

Таблица 6.6 – Техничко-экономическое сравнение методов переработки токсичных сточных вод на примере АО «Саратоворгсинтез».

Основные технические характеристики	
Разработанного способа	Способа-аналога
<p><i>Объект – стоки производства фенола и ацетона АО "Саратоворгсинтез", 10000 м<sup>3</sup>/год.</i></p> <p>Режим очистки – проточный аэробный без разбавления сточных вод в биотенке.</p> <p>Количество фенолов, суммарно окисляемых в проточном режиме очистки сточных вод – не менее 3 г/л.</p> <p>Скорость биологической очистки не менее 0,5 г/л.ч (определяется режимом аэрации).</p> <p>Объемы дополнительных сточных вод на 1т шлама – отсутствуют.</p> <p>Объемы вторичных шламов – не более 3 кг/т шлама.</p> <p>Расход минеральных солей – азот 0,2 кг/т шлама, фосфор 0,2 кг/т; расход H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 2,5 кг/т шлама.</p>	<p>Режим очистки – проточный аэробный с разбавлением сточных вод минимум в 15 раз с физико-химической предобработкой на катализаторе.</p> <p>Количество фенолов, суммарно окисляемых в проточном режиме очистки сточных вод – не более 0,5 г/л.</p> <p>Скорость биологической очистки – не более 0,1 г/л.ч (определяется биологическими ограничениями).</p> <p>Объемы сточных вод на 1 т шлама – более 15 м<sup>3</sup>.</p> <p>Объемы вторичных шламов – не менее 10 кг/т шлама.</p> <p>Расход минеральных солей – азот 0,7 кг/т шлама, фосфор 0,7 кг/т шлама.</p>

Показанная возможность «бессточного» разложения такого токсичного субстрата, как фенол, микроорганизмами, адаптированными к оксидативному стрессу, без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение, без образования сточных вод и большого количества избыточной биомассы коррелирует с результатами, полученными при высокоплотном культивировании дрожжей *Candida tropicalis* (см. раздел 5.2.1). Это создает основу для разработки замкнутых малоотходных высокопроизводительных и низкзатратных систем биологического окисления. В данном случае неразбавленный сток с органическими субстратами – токсикантами дробно вносится в зону биоокисления, туда же небольшими порциями вносится пероксид водорода и при необходимости биогенные элементы (азот, фосфор), а также используются ценозы микроорганизмов, адаптированные к повышенным концентрациям H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом не требуется разбавления

концентрированного стока, достигается высокая окислительная мощность реактора, вносится минимальное количество биогенных элементов, остаточные концентрации субстратов в биологически обработанном стоке минимальны, и количество накопленного избыточного активного ила также минимально. Такие системы интенсивного биологического окисления, ограниченные только массообменными характеристиками биореактора, прежде всего могут найти применение при обезвреживании стоков с высокой концентрацией органических загрязнений, в частности, фенолов и их производных, других ароматических соединений. Они дают возможность интенсифицировать биодеструкцию и минимизировать количество вторичных отходов и остаточного загрязнения, поступающих в окружающую среду со стадии биологической переработки, полностью минерализуя органическое вещество до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . При этом количество  $\text{H}_2\text{O}_2$ , вносимое в среду, относительно невелико, количество внесенных источников азота и фосфора, необходимых для обеспечения нормальной жизнедеятельности микроорганизмов, незначительно, что важно с точки зрения технико-экономических показателей процесса. Он устойчив к перерывам в подаче субстрата, к лимитированию биоокисления кислородом, компонентами питания.

Результаты патентного поиска показали, что процесс биологической очистки с дробным внесением токсичного субстрата и пероксида водорода не имеет мировых аналогов. Он более экологически чистый, более интенсивный при обезвреживании потоков загрязнений с высоким содержанием органических токсикантов, протекает с минимальным образованием вторичных загрязнений и отходов в виде избыточного активного ила, остаточных загрязнений в потоках сточной воды на выходе, остатков компонентов минерального питания микроорганизмов-деструкторов. В этой связи ряд предложенных решений был нами запатентован.

Однако в промышленных условиях растворы, содержащие фенол в высоких концентрациях – выше 1–2 г/л, выгодно перерабатывать для его извлечения и повторного использования, поэтому для практических приложений важно выяснить распространенность обнаруженных эффектов применительно к другим микроорганизмам и субстратам. Учитывая, что фенол является простейшим соединением, по пути окисления которого разлагаются многие другие органические соединения с ароматическими кольцами (орто- и мета- пути расщепления через пирокатехин), а также результаты экспериментов с высокоплотным культивированием дрожжей на сахарозе, можно ожидать воспроизводимости положительных эффектов и для других субстратов.

### **6.3. Биологическая очистка модельных стоков с образованием биопленок и гранул ила в аэробных условиях в отъемно-доливном режиме и с оксидативным воздействием**

#### **6.3.1. Изменение показателей очистки при оксидативном воздействии на модельные стоки в отъемно-доливном режиме**

Как уже отмечалось в предыдущих разделах, наиболее полная схема обработки, в частности, высококонцентрированных стоков, может последовательно включать обработку в анаэробных реакторах современных конструкций (UASB и другие), аэробное удаление остаточных загрязнений в аэротенках и других аналогичных сооружениях, доочистку в реакторах для удаления остаточных соединений азота и фосфора. Анаэробная очистка позволяет удалить основную массу органических загрязнений энергосберегающим и экологически рациональным способом, что одновременно снижает количество образующегося избыточного ила. Как было показано выше, на второй, аэробной стадии, применение оксидативного воздействия при очистке в аэротенках позволяет существенно повысить эффективность очистки, в том числе в режиме с полным рециклом ила, что минимизирует проблему утилизации его избытка. В современных системах на третьей стадии (вторичная или третичная очистка) используются SB-реакторы, работающие в отъемно-доливном режиме для удаления соединений азота и фосфора из сточных вод. В таких реакторах со временем образуется гранулированный ил, что повышает эффективность очистки. В этой связи интересно было выяснить, как влияет оксидативное воздействие на биологическую очистку в отъемно-доливном режиме.

В лабораторных исследованиях использовали модельные хозяйственно-бытовые стоки и сток пивоварения на основе пива «Балтика 0». Состав стоков приведен в разделах 4.1.1 и 6.1.3.

Очистка велась в отъемно-доливном режиме, описанном в разделах 3.2.4 и 4.1.1, когда по окончании цикла очистки перемешивание и аэрация прекращается на короткое время, активный ил оседает на дно, надосадочная жидкость сливается, добавляется новая порция неочищенной сточной воды, и процесс очистки возобновляется при перемешивании и аэрации. Один цикл очистки длился в среднем 97 час. В реальных очистных сооружениях SBR работают с гораздо меньшей длительностью цикла, однако в нашем случае технические возможности не позволяли реализовать такие условия.

При изучении очистки модельного хозяйственно-бытового стока с оксидативным воздействием на первом этапе были взяты образцы ила из канализации г. Москвы,

речных и прудовых донных отложений, которые путем последовательных пересевов на модельном хозяйственно-бытовом стоке в течение 6 месяцев были адаптированы к потреблению загрязнений, содержащихся в данном стоке, в аэробных условиях в колбах на качалке при комнатной температуре. Адаптацию вели на стоке с  $XPK_{исх}$  450–500 мг  $O_2$ /л. Всего вели 4 линии ила из различных источников в двух повторностях. Температура, аэрация, объем среды и колб, условия освещения во всех линиях были одинаковы. Начальное содержание ила в среде в этих опытах составляло 2–4 г/л.

К концу процесса адаптации все линии активного ила окисляли загрязнения модельного хозяйственно-бытового стока практически с одинаковой скоростью, без каких-либо существенных регулярных отличий, до величин  $XPK$  ниже 30 мг/л. В результате, после ведения линий в течение 6 мес., в колбах были сформированы биоценозы, показывающие стабильные показатели очистки по  $XPK$ . При  $XPK_{исх}$  450 мг/л очистка осуществляется за 4 сут., при  $XPK_{исх}$  800 мг/л – за 5 сут., при  $XPK_{исх}$  1500 мг/л – за 7 сут.

На следующем этапе исследований полученные линии ила адаптировались к внесению  $H_2O_2$  при ведении процесса в том же циклическом отъемно-доливном режиме. По результатам опытов были найдены сублетальные дозы  $H_2O_2$ , при которых биоценоз активного ила в той или иной степени адаптировался к стрессору и которые составили: 0,6 г/л при внесении в активной и предстационарной фазе ростового цикла; 1,2 г/л в конце ростового цикла.

Дальнейшие опыты проводились в тех же условиях с внесением  $H_2O_2$ , но при культивировании на свету и в темноте. Источниками освещения служил естественный оконный свет лабораторного помещения, а также искусственный свет люминесцентных ламп (освещенность 800–1250 Лк). В половине колб пересев проводили при освещении среды видимым светом, а в другой половине – при затемнении среды культивирования фольгой. Путем последовательных пересевов поддерживались линии ила с добавлением  $H_2O_2$  (линии  $C_1$ – $C_6$ ,  $T_1$ – $T_6$ ) и без добавления  $H_2O_2$  (линии  $C_7$ ,  $T_7$ ) на фоне освещения содержимого колб с илом (линии  $C_1$ – $C_7$ ) и с затемнением колб (линии  $T_1$ – $T_7$ ) (табл. 6.7).

Как и в опытах с модельным стоком пивоварения значимым фактором при пересевах с внесением  $H_2O_2$  являлось освещение среды.

В условиях полной темноты (линии  $T_1$ – $T_6$ ) во всех вариантах активный ил с внесением пероксида водорода рос нестабильно и зачастую лизировал, однако достаточно было рассеянного дневного освещения (около 40 мВт/л) в некоторых линиях ( $C_3$ – $C_5$ ), чтобы рост активного ила стабилизировался (рис. 6.15, 6.16). Как видно из этих рисунков, к пятому пересеву рост ила в контрольной линии и в линиях с сублеталь-

ными концентрациями на свету (линии С<sub>3</sub>–С<sub>5</sub>) стабилизируется, при этом в контрольных линиях С<sub>7</sub> и Т<sub>7</sub> (на свету и в темноте) характер изменений мало отличается. При дробном внесении пероксида водорода в пассажах в сублетальных концентрациях биоценоз был более устойчив (линия С<sub>3</sub>) по сравнению с вариантами с разовым внесением пероксида (С<sub>4</sub>, С<sub>5</sub>).

Таблица 6.7 – Линии активного ила в экспериментах с последовательным пассивированием к Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> на свету и в темноте.

Рассеянное освещение(не менее 40 мВ/л)	В темноте	Концентрация Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> ; время внесения Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> от начала цикла (пассажа)
С <sub>1</sub>	Т <sub>1</sub>	0,6 г/л; 0 часов
С <sub>2</sub>	Т <sub>2</sub>	0,6 г/л; 72 часа
С <sub>3</sub>	Т <sub>3</sub>	0,3 г/л; 48 часов и 0,6 г/л; 72 часа
С <sub>4</sub>	Т <sub>4</sub>	0,6 г/л; 96 часов
С <sub>5</sub>	Т <sub>5</sub>	1,2 г/л; 96 часов
С <sub>6</sub>	Т <sub>6</sub>	1,2 г/л; 0 часов
С <sub>7</sub>	Т <sub>7</sub>	Контроль без внесения Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>

Существенные изменения наблюдались в отношении показателей очистки сточной воды. При внесении пероксида водорода в течение первых нескольких пассажей во всех линиях наблюдалось ухудшение функционирования биоценоза и качества очистки по сравнению с контрольными вариантами С<sub>7</sub>, Т<sub>7</sub>. В контрольной линии без Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> к 96 часу цикла концентрация загрязнений по ХПК падала до 7–15% от исходной. В линии С<sub>3</sub> первого пассажа, которая была угнетена в наименьшей степени, качество очистки к 96-му часу по сравнению с контролем снизилось по ХПК примерно в 2 раза. В целом, биоценоз активного ила в первых пассажах с пероксидом (начальная стадия адаптации) находился в угнетенном состоянии, поэтому показатели удаления загрязнений, полученные в контрольной линии, не достигались.

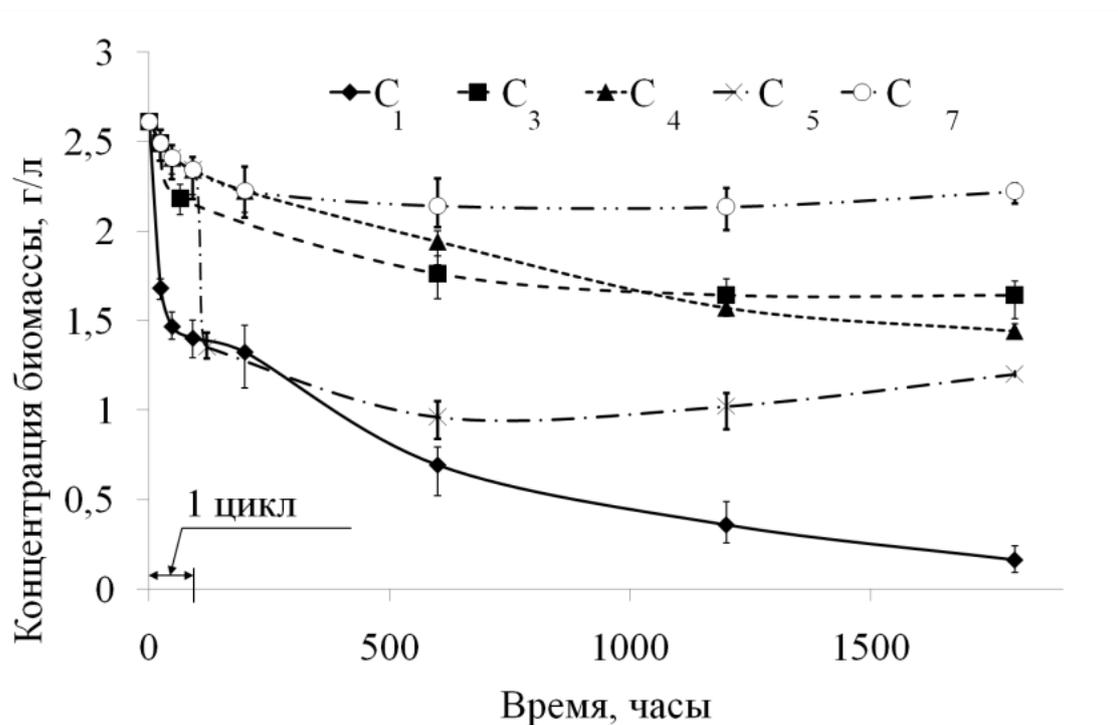


Рисунок 6.15 – Изменение конечной концентрации активного ила линий С (на свету, см. табл. 6.7) в колбах по мере пассирования.

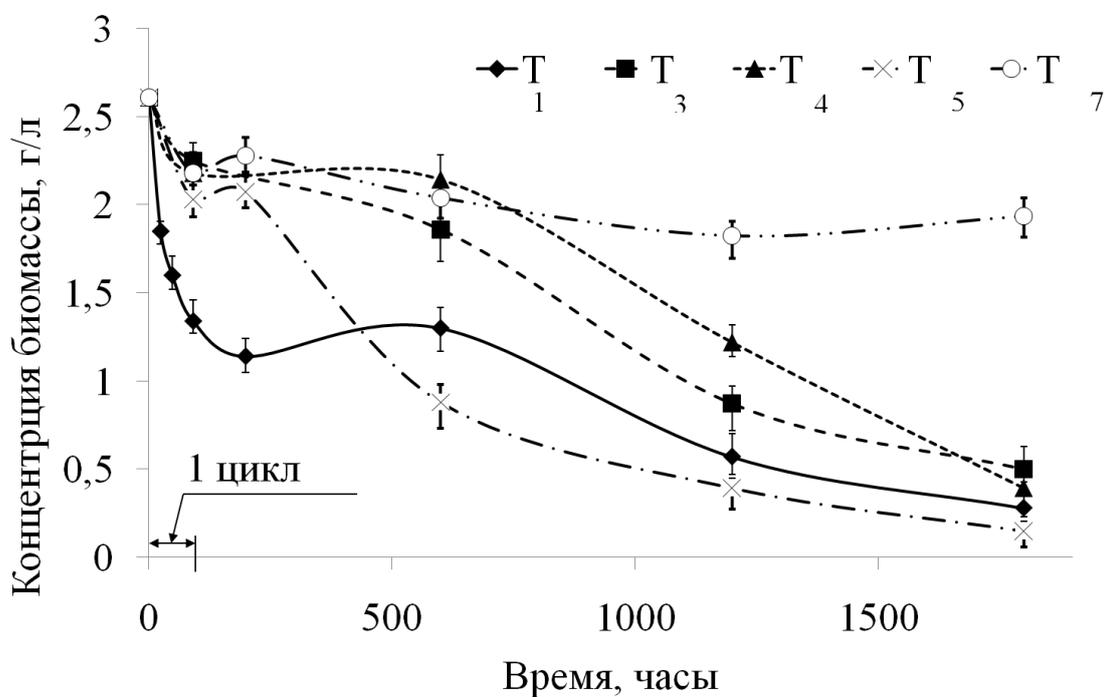


Рисунок 6.16 – Изменение конечной концентрации активного ила линий Т (в темноте, см. табл. 6.7) в колбах по мере пассирования.

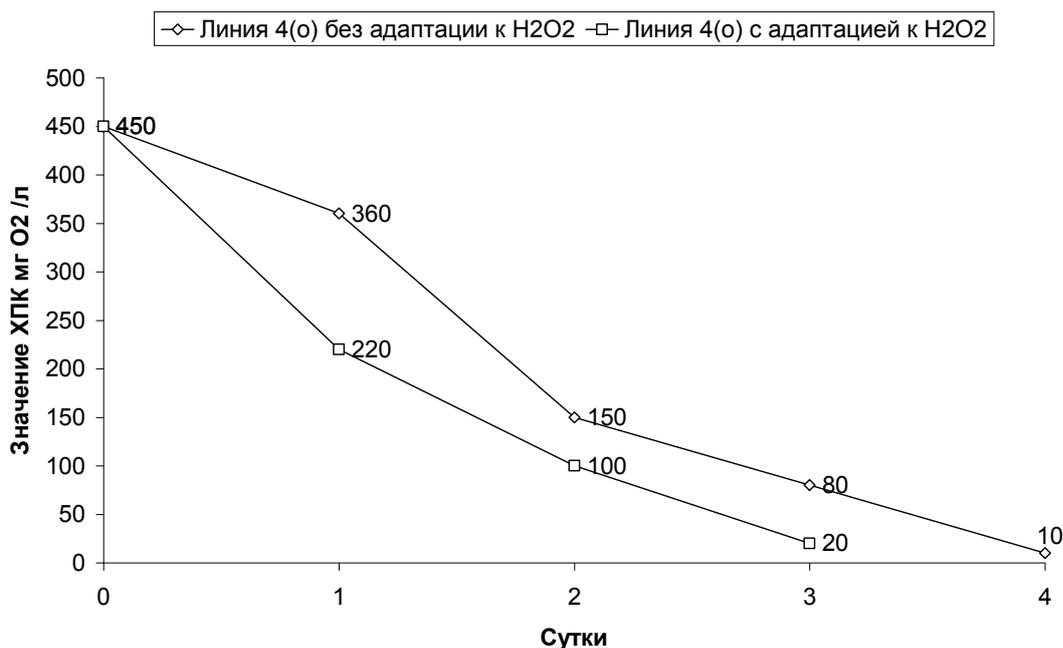


Рисунок 6.17 – Динамика изменения ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления для линии аэробного ила, адаптированной к  $H_2O_2$  на свету, и контрольной без внесения  $H_2O_2$  при первоначальном ХПК 450 мг  $O_2$ /л.

К 5–6 пассажиру с внесением  $H_2O_2$  показатели очистки для линий  $C_3$ ,  $C_4$  улучшились по сравнению с теми же линиями первого пассажа и с неадаптированными к  $H_2O_2$  контрольными линиями (рис. 6.17). Линии, которые вели при освещении, на 20–25% эффективнее очищали стоки по сравнению с затемненными вариантами. Режимы и дозы внесения  $H_2O_2$  оказались наилучшими для вариантов  $C_3$ ,  $C_4$  среди использованных. В этих условиях уровни биомассы к 10-му пассажиру стабилизируются, что свидетельствует об адаптации биоценоза активного ила к действию  $H_2O_2$ .

Качественная разница между контрольными и стрессированными вариантами наблюдалась в отношении аккумуляции илом фосфатов. В то время как в контроле к концу цикла во внешней среде накапливалось значительное количество фосфатов вследствие их выхода из клеточной массы или частичного лизиса ила (рис. 6.18), в стрессированной линии в середине цикла содержание фосфатов во внеклеточной среде было незначительным – в конце цикла их концентрация составила всего 0,2–0,3 мг/л  $P-PO_4^{3-}$  (рис. 6.19).

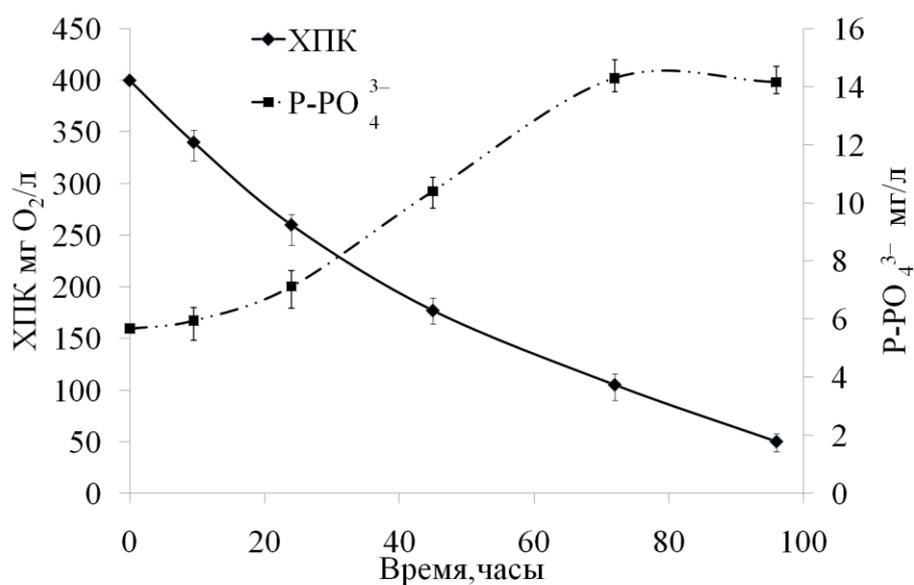


Рисунок 6.18 – Зависимость концентрации фосфатов и ХПК от времени очистки активным илом варианта С<sub>7</sub> (контроль без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на свету).

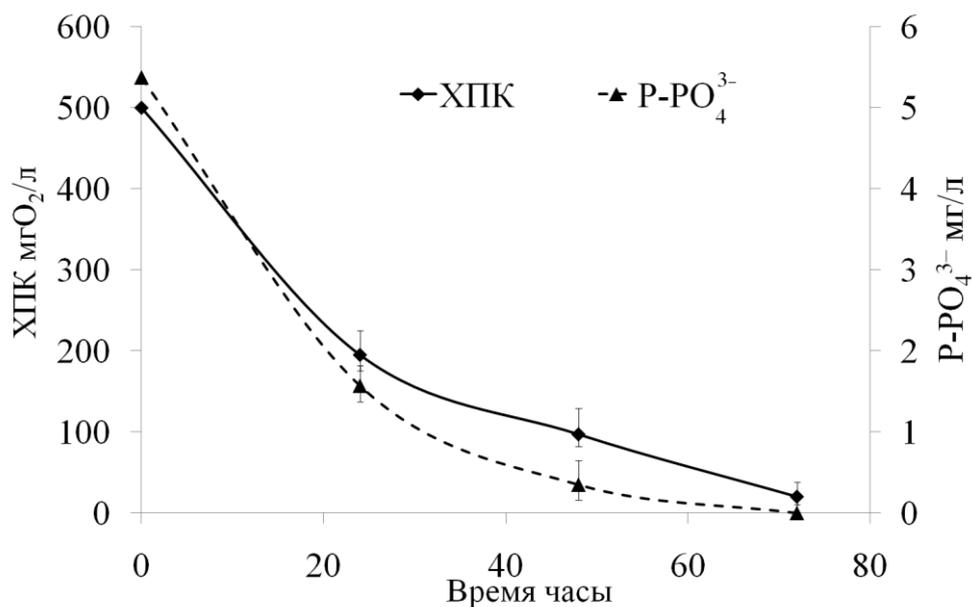


Рисунок 6.19 – Изменение ХПК и содержание фосфатов при очистке модельного бытового стока адаптированным к перексиду водорода активным илом.

Таким образом, опыты с очисткой модельного хозяйственно-бытового стока в отъемно-доливном режиме подтвердили значимость освещения среды низко интенсивным рассеянным светом при внесении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и позитивные изменения в качестве очистки по мере адаптации активного ила в наиболее подходящих условиях. Адаптирован-

ный активный ил выдерживает в 2–3 раза большую разовую дозу пероксида водорода по сравнению с неадаптированными вариантами.

Положительные изменения, наблюдающиеся в отношении удаления фосфатов из среды в условиях оксидативного воздействия и отъемно-доливного режима очистки в SB-реакторах с чередованием анаэробной и аэробной фаз, способствующего накоплению фосфатаккумуляирующих микроорганизмов, были подтверждены и с модельным стоком пивоварения.

Очистку в четырех SB-реакторах с объемом среды 500 мл в каждом проводили в циклическом режиме с длительностью цикла 96 ч, при этом с 0 по 24 ч осуществлялась аэрация среды, с 24 по 96 ч – отключение аэрации. Затем перед повторным включением аэрации сливали 300 мл надосадочной жидкости, повторно добавляли новую порцию среды, включали аэрацию на 24 ч, повторно отключали аэрацию и т.д.

При запуске биореакторов в колбы с 500 мл суспензии активного ила добавили по 5 мл пива «Балтика 0» и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (концентрация N-NH<sub>4</sub> в очищаемой среде 4 мг/л). Дополнительный фосфор и пероксид водорода в среду не вносили.

По мере возрастания циклов во всех SB-реакторах начал формироваться ил, окисляющий загрязнения в аэробной фазе цикла и выделяющий загрязнения во внешнюю среду в анаэробной фазе.

На рис. 6.20 приведены результаты измерения показателей очистки по удалению фосфора усредненно по всем четырем реакторам, начиная с 15 цикла в начальной фазе эксперимента, когда пероксид водорода еще не вносился. Во всех 4-х реакторах наблюдалось довольно хорошее согласие в изменении показателей очистки. Начиная с 16 цикла очистки, количество фосфора, выделяемое на анаэробной стадии, начало постепенно снижаться, по-видимому вследствие накопления фосфатаккумуляирующих микроорганизмов в реакторах и лучшего удерживания ими фосфора в анаэробной стадии.

На втором этапе эксперимента в два (опытные, № 3 и 4) из четырех биореакторов, начиная с 19-го цикла, начали добавлять пероксид водорода при освещении их содержимого. Пероксид водорода добавляли в концентрации 15 мг/л, каждый раз через 5 ч после начала аэробной стадии. Освещенность составляла 1800 Лк. Два остальных биореактора (контрольные, № 1 и 2) затемнили алюминиевой фольгой и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в них не добавляли.

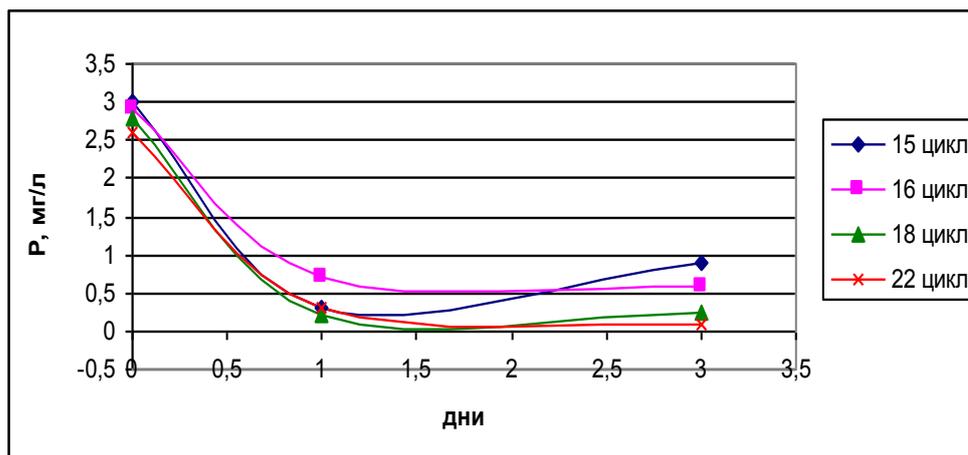


Рисунок 6.20 – Изменение концентрации фосфора по ходу цикла очистки в SB-реакторах (усредненно по 4-м реакторам).

0–1 сут. – аэрация колб, 1–3 сут. – отключение аэрации. Приведены данные для 15, 16, 18 и 22 циклов очистки.

Через 5 циклов с момента начала внесения  $H_2O_2$  существенных различий между показателями удаления фосфора в контрольных и опытных вариантах не наблюдалось. Важно отметить, что в этих экспериментах фосфор в среду дополнительно не вносился. Поэтому отсутствие видимых различий в опытах с внесением и без внесения  $H_2O_2$  могло быть обусловлено дефицитом фосфора в среде, который во всех вариантах полностью поглощается микроорганизмами.

Для выяснения максимальной величины накопления фосфора микроорганизмами и выявления возможных различий начиная с 24 цикла очистки в очищаемую среду начали вносить дополнительное количество фосфора в виде соли  $K_2HPO_4$ . Добавлялась среда следующего состава: на 500 мл суспензии активного ила 10 мл пива «Балтика 0», раствор  $(NH_4)_2SO_4$  (концентрация N- $NH_4$  в очищаемой среде 30 мг/л), раствор  $K_2HPO_4$  (концентрация P- $PO_4$  в очищаемой среде 6,3 мг/л).

Результаты измерения показателей очистки и активности ила по ходу цикла через 25 циклов приведены в табл. 6.8.

Видно, что при добавлении дополнительного количества фосфора в очищаемую среду с первого же цикла начали появляться различия между контрольными и опытными вариантами. При этом снижение ХПК в вариантах с внесением  $H_2O_2$  более глубокое, фосфор и азот лучше поглощаются биомассой ила в аэробной стадии и удерживаются в анаэробной. Эти различия постепенно увеличивались и, как видно из данных в табл. 6.9, 6.10, начиная с 30 цикла очистки стали ярко-выраженными.

Таблица 6.8 – Изменение показателей очистки при добавлении  $H_2O_2$  (реактор № 3 и 4) в сравнении с контрольным вариантом без добавления  $H_2O_2$  (реактор № 1 и 2) на 25 цикле

сут.роста	реактор	воздух	pH	ОП	ХПК	P	N-NH <sub>4</sub>
0	1,2	да	6,5	0,25	2227,2	28,5	118
	3,4	да	6,5	0,27	2150	27	122
1	1	да	6,8	0,72	499,2	0,85	21
	2	да	6,8	0,66	499,2	0,75	13
	3	да	6,7	0,75	345,6	0,75	9
	4	да	6,7	0,78	422,4	0,75	9
4	1	нет	6,3	0,72	276,48	0,9	21
	2	нет	6,3	0,66	307,2	0,1	16
	3	нет	6,5	0,75	184,3	0,1	16
	4	нет	6,5	0,72	184,3	0,9	16

Таблица 6.9 – Изменение показателей очистки при добавлении  $H_2O_2$  (реактор № 3 и 4) в сравнении с контрольным вариантом без добавления  $H_2O_2$  (реактор № 1 и 2) на 30 цикле

сут.роста	реактор	воздух	pH	ОП	ХПК	P	N-NH <sub>4</sub>
0	1,2	да	7,2	1,3	1740	30	130
	3,4	да	7,2	1,3	1740	30	130
1	1	да	6,7	1,5	304,36	10	3
	2	да	6,8	1,35	304,36	12	6
	3	да	6,9	1,2	217,4	8	0
	4	да	6,7	1,3	217,4	6,5	0
4	1	нет	6,2	1,6	275	21	9
	2	нет	6,2	1,5	304,36	18,25	12
	3	нет	6,1	1,3	92,8	14	0
	4	нет	6,1	1,4	122,9	12	0

Таблица 6.10 – Изменение показателей очистки при добавлении  $H_2O_2$  (реактор № 3 и 4) в сравнении с контрольным вариантом без добавления  $H_2O_2$  (реактор № 1 и 2) на 34 цикле

сут.роста	реактор	воздух	pH	ОП	ХПК	P	N-NH <sub>4</sub>
0	1,2	да	7,4	1,4	1624	25	360
	3,4	да	7,4	1,45	1682	23	320
1	1	да	7,3	1,68	139,2	4,4	115
	2	да	7,3	1,56	139,2	2,5	105
	3	да	6,9	1,4	58	0,7	64
	4	да	6,8	1,5	58	0,7	42
4	1	нет	6,8	1,68	77,4	11,7	197
	2	нет	6,8	1,56	77,4	10,4	180
	3	нет	6,6	1,4	38,7	6,8	123,5
	4	нет	6,6	1,5	38,7	4,4	107,3

В общей сложности за 234 сут. проведения эксперимента в SB-реакторах было проведено 34 аэробно-анаэробных цикла очистки. По ходу эксперимента способность активного ила поглощать фосфор сильно увеличилась и составила в среднем 8,8% внутриклеточного фосфора от сухой массы ила, что характерно для фосфатаккумулирующих микроорганизмов.

Видимых внешних различий между хлопьями активного ила с внесением и без внесения  $H_2O_2$  не наблюдалось.

Таким образом, добавление пероксида водорода к активному илу SB-реактора приводит к улучшению очистки сточных вод по всем измеренным показателям. Его внесение на фоне освещения среды способствует лучшему усвоению соединений фосфора и азота в аэробной фазе процесса и позволяет сильнее удерживать их в клетках в ходе анаэробной фазы, а также уменьшает накопление избыточной биомассы активного ила.

При условии сбалансированности среды по соотношению органических загрязнений, азота и фосфора можно ожидать достижения степени удаления ХПК в разработанном методе 97,5–99,7%, что является очень высоким показателем для одностадийного проточного процесса биологической очистки.

### **6.3.2. Образование биопленок в аэробных условиях с контролируемым оксидативным воздействием**

Важным моментом применительно к биологической очистке сточных вод с оксидативным воздействием и освещением среды видимым светом являлось изучение особенностей развития биопленок и гранул аэробного ила в таких условиях. В исследованиях с модельными стоками пивоварения в биореакторе с полным рециклом активного ила (см. раздел 6.1.3) биопленка на стенках и погружных поверхностях биореактора была существенным фактором, вносящим вклад совместно со взвешенным активным илом в процесс очистки. Также в исследованиях с модельными стоками (см. раздел 6.3.1) очистка велась в отъемно-доливном режиме, подобном режиму SBR, при котором со временем наблюдается гранулообразование активного ила. Учитывая практическую значимость биореакторов с биопленкой и стабильное возращение применения SB-реакторов с гранулированным илом, в частности, для удаления азота и фосфора из сточных вод, а также позитивные результаты, описанные в предыдущих разделах, в диссертационной работе было уделено дополнительное внимание изучению контролируемого оксидативного воздействия применительно:

- к образованию биопленок;
- к образованию гранул активного ила.

Исследование образования биопленок проводилось на базе Института молекулярной генетики РАН (лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов, проф. Хмель И.А., аспирант Плюта В.А.) с участием автора диссертационной работы применительно к воздействию оксидативного стресса, индуцируемого внесением  $H_2O_2$  в среду культивирования, на систему кворум-сенсинг и образование биопленок.

Бактерии в составе биопленок, обладая более высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, являются также идеальной модельной системой для изучения сочетанного воздействия стрессоров и антистрессоров, поскольку в природе они являются теми объектами, на которые эти факторы воздействуют одновременно. Пример – биопленки на поверхности водных и почвенных сред, растений, различных сооружений, открытые солнечному освещению и облучаемые одновременно мягким ультрафиолетом (фактор оксидативного стресса) и видимым светом.

Согласно немногочисленным пока данным, в ответе бактерий на оксидативный стресс участвуют кворум сенсинг системы, подробно рассмотренные в разделе 3.2.5.

В исследованиях, проведенных в лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН, было изучено действие растительных фенолов (катехола, ванилина, эпикатехина, хлорогеновой кислоты, коричной кислоты) и гормонов (сали-

циловой кислоты, индолил-3-уксусной кислоты, абсцизовой кислоты, гибберллиновой кислоты) на штаммы *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58 и было показано стимулирующее действие данных веществ в субингибиторных и/или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях на образование биопленок этими бактериями. Напротив, при высоких концентрациях растительные фенолы подавляют бактериальный рост, защищая растения от патогенных бактерий. Было также показано, что усиление функционирования QS LasI-LasR – системы *P. aeruginosa* за счет повышения синтеза ацилгомосеринлактона и стимуляция образования биопленок при действии низких концентраций фенольных соединений взаимосвязаны.

Механизмы стимулирования образования биопленок субингибирующими или слабо подавляющими бактериальный рост концентрациями данных веществ в настоящее время неясны. Мы предположили, что действие растительных фенолов и гормонов на образование биопленок может быть частично связано с их антиоксидантной активностью и с действием на QS системы. Также некоторые из них могут действовать как прооксиданты, индуцируя повреждения ДНК [1807]. В пользу данных предположений свидетельствуют и данные литературы о стимулировании образования биопленок и гранул субингибиторными дозами доноров NO и окислителей [1700, 1703-1705], а также данные, полученные в Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН об увеличении формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 в присутствии в среде субингибиторных концентраций лекарственных препаратов нитрофурановой природы и доноров NO [1930].

Для проверки предположений о стимулировании были проведены исследования с воздействием пероксида водорода на способность образовывать биопленки *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58 и *Burkholderia cenocepacia* 370. Бактерии данных видов являются известными модельными микроорганизмами для изучения QS систем и образования биопленок [1931-1933]. Штамм *B. cenocepacia* 370 получен из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

На рис. 6.21 и 6.22 приведены данные опытов по влиянию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58, *B. cenocepacia* 370, выращиваемых в плашках в течение 24 часов с разными концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Можно видеть, что в диапазоне увеличения концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> от 300 до 1500 мкг/мл наблюдалось стимулирование образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 до 2,5 раз (при 1500 мкг/мл) по сравнению с контролем (без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). При этом величина суспензионного роста не изменялась до 750 мкг/мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и уменьшалась в 2,5 раза при 1500 мкг/мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 6.21 А). При дальнейшем повышении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> количество биомассы образованных биопленок и суспензионных клеток резко снижалось. Аналогичные законо-

мерности наблюдались при действии  $H_2O_2$  на образование биопленок *V. senocerasia* 370: формирование биопленок стимулировалось в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (рис. 6.22). При этом наблюдаемые значения уровней формирования биопленок *V. senocerasia* 370 были существенно ниже по сравнению с аналогичными значениями для *P. aeruginosa* PAO1. Таким образом, возможно стимулирование образования биопленок у бактерий при действии не только антиоксидантов, но и окислителей, т.е. эффект фенольных соединений определяется, возможно, не только их антиоксидантной активностью. В то же время, пероксид водорода не действовал подобным образом на образование биопленок *A. tumefaciens* C58 (рис. 6.21 В). Суспензионные клетки и биопленки *A. tumefaciens* C58 были существенно более чувствительными к действию  $H_2O_2$ , чем клетки *P. aeruginosa* PAO1.

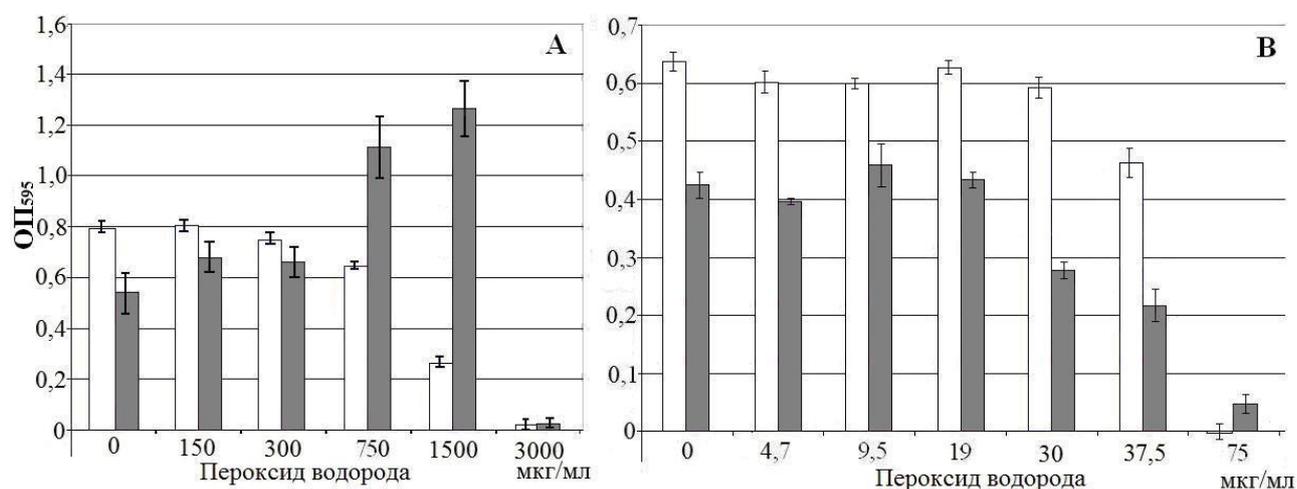


Рисунок 6.21 – Влияние пероксида водорода на образование биопленок и суспензионный рост: А – *P. aeruginosa* PAO1; В – *A. tumefaciens* C58.

Биопленки – темные столбцы, суспензионный рост – светлые столбцы. По оси ординат: оптическая плотность при  $\lambda=595$  нм. По оси абсцисс – концентрация  $H_2O_2$ , мкг/мл.

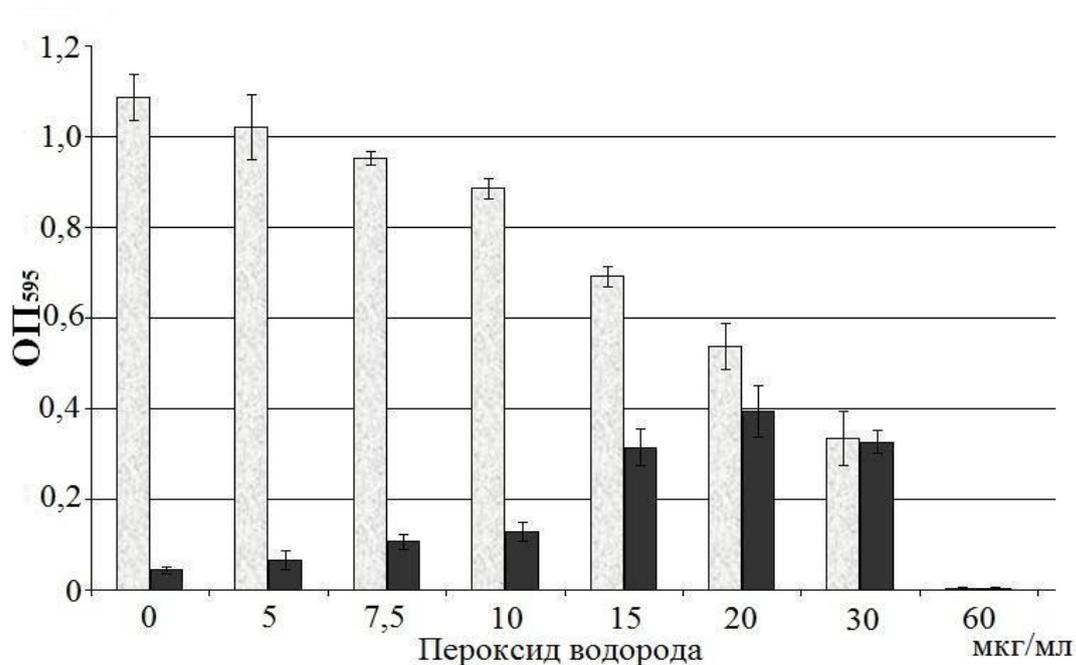


Рисунок 6.22 – Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *B. cephalotrichus* 370.

Биопленки – темные столбцы, суспензионный рост – светлые столбцы.

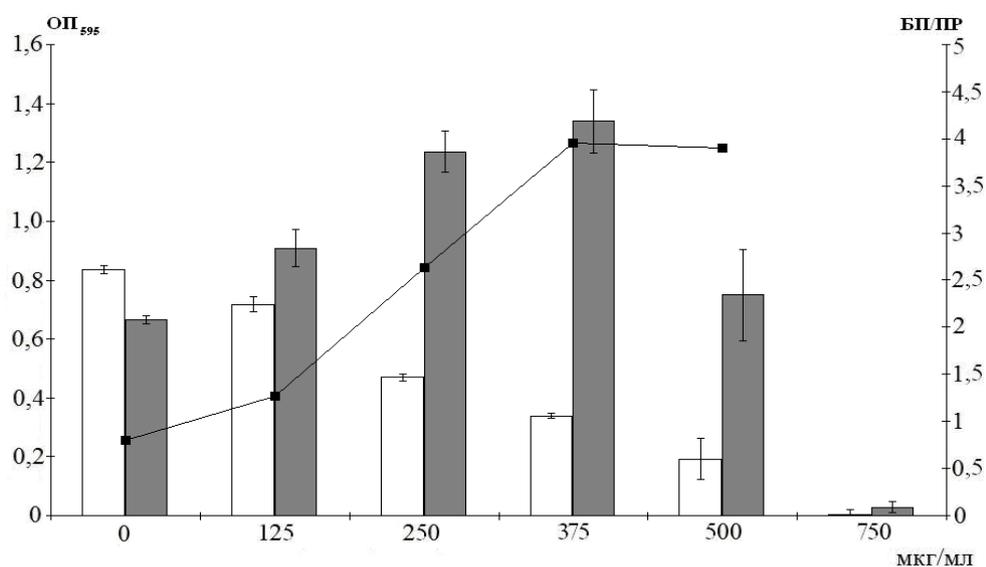


Рисунок 6.23 – Влияние пероксида водорода на образование биопленок и суспензионный рост *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000.

Биопленки – темные столбцы, суспензионный рост – светлые столбцы. Кривая линия – соотношение роста в биопленке к росту в суспензии.

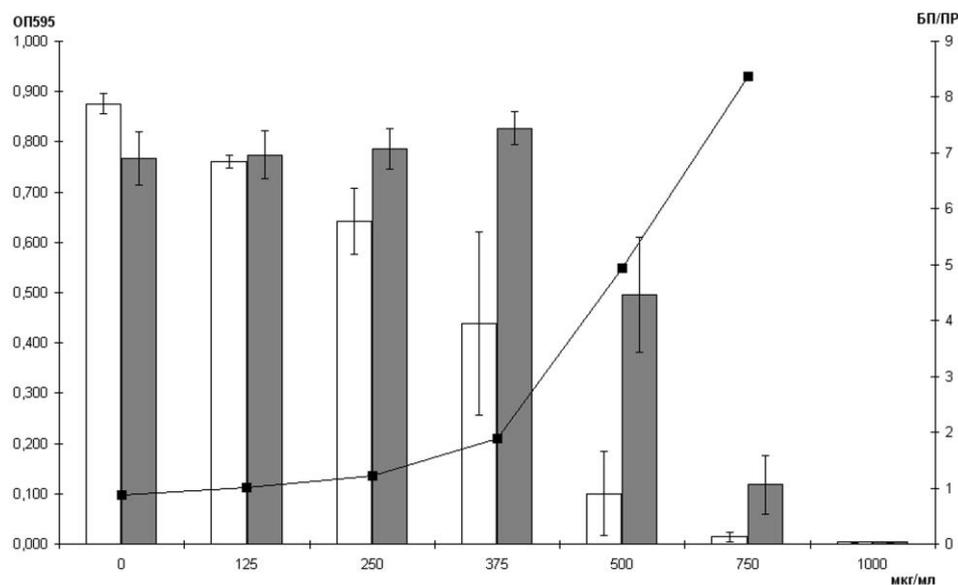


Рисунок 6.24 – Влияние пероксида водорода на образование биопленок и суспензионный рост *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863.

Биопленки – темные столбцы, суспензионный рост – светлые столбцы. Кривая линия – соотношение роста в биопленке к росту в суспензии.

Исследования со штаммом *P. aeruginosa* PAO1/pME6000 с введенным гетерологичным геном АГЛ-лактоназы *aiiA* (ген гомосеринлактоназы из *Bacillus*) и функционирующей QS-системой, использующей АГЛ в качестве сигнальных молекул, и со штаммом *P. aeruginosa* PAO1/pME6863, в котором было подавлено функционирование Las- и Rhl- QS систем вследствие деградации АГЛ АГЛ-лактоназой, показали, что эффект стимулирования образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> зависит от функционирования QS систем, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул. При действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1/pME6000 наблюдалась та же закономерность, что и в случае штамма *P. aeruginosa* PAO1, т.е. формирование биопленок стимулировалось (до 2,3 раза) в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (рис. 6.23). В то же время для штамма, содержащего плазмиду pME6863, явно выраженного стимулирования образования биопленки не наблюдалось (рис. 6.24).

Таким образом, оксидативный стресс, инициированный действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, может стимулировать образование биопленок, которое, в свою очередь, связано с функционированием QS-систем регуляции.

Механизм стимулирующего действия субингибиторных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на формирование биопленок может быть связан с основным регулятором, белком OxyR,

осуществляющим глобальную регуляцию ответа на оксидативный стресс. Его мишени включают до 56 генов [757, 1934]. Биопленки более устойчивы к действию пероксида водорода и могут защищать бактерии от его воздействия [758, 759]. Было показано, что пероксид водорода не эффективен против уже сформированной микробной биоплёнки *P. aeruginosa*: биополимеры матрикса биопленки адсорбируют большие количества выделяемой каталазы, и пероксид водорода не успевает проникнуть в глубь биопленки, разлагаясь на ее поверхности без вреда для бактерий [1722]. Т.е. стимулирование образования биопленок в присутствии  $H_2O_2$  – это механизм защиты бактерий от действия пероксида водорода [757, 1935, 1936]. Если QS блокирован мутациями в генах QS систем или ингибиторами QS систем, устойчивость биопленок (как и планктонных клеток) к  $H_2O_2$  снижается. Поэтому среди белков, индуцируемых в ответ на оксидативный стресс, могут быть те, которые участвуют в образовании биопленок.

Таким образом, приведенные данные показывают, почему может происходить стимуляция формирования биопленок в присутствии  $H_2O_2$  и почему она зависит от QS систем. Эти данные, по-видимому, не исчерпывают всех механизмов влияния  $H_2O_2$  на образование биопленок. В отношении биологической очистки сточных вод стимулирование образования биопленок и в более общем случае размера, морфологии и седиментационных свойств агрегатов активного ила имеет важное практическое значение для устойчивого функционирования очистных сооружений [1697].

### **6.3.3. Образование гранул ила в аэробных условиях с контролируемым оксидативным воздействием**

Еще один эффект, на который было обращено внимание в ходе исследований очистки в условиях контролируемого оксидативного стресса – улучшение гранулообразующих свойств активного ила.

Получение и использование аэробного гранулированного активного ила само по себе представляет интерес как вариант совершенствования систем аэробной биологической очистки. Если бы удалось получать стабильные гранулы ила в аэробных условиях, то можно было бы существенно повысить производительность аэробных реакторов с минимальным выносом взвешенных веществ из реакторов и вторичных отстойников, обеспечить повышение качества очистки и хорошие фильтрационные свойства ила при его обезвоживании и реализовать, например, высокоинтенсивный двухстадийный непрерывный анаэробно-аэробный процесс для очистки стоков с высокой концентрацией органических загрязнений, в котором гранулированный ил использовался бы на обеих стадиях [1583-1587].

Как уже отмечалось в главе 1 при рассмотрении путей совершенствования систем биологической очистки, гранулированный ил может образовываться, если микроорганизмы относительно медленно растут: при нитрификации, окислении сульфидов, т.е. когда микробиологический процесс в меньшей степени лимитируется диффузией кислорода в аэробные гранулы по сравнению с ограничениями, возникающими при быстро протекающих реакциях аэробного окисления органических веществ. При окислении органических веществ в аэробных непроточных условиях возможно образование гранул размером 1–5 мм в отъемно-доливном режиме работы SB-реактора. Имеются скудные сообщения о возможности образования гранул аэробного ила и в проточных условиях. Гранулы образуются в режиме восходящего потока, аналогичном используемому в реакторе со взвешенным слоем загрузки с фиксированной биопленкой. Однако образованные гранулы нестабильны и распадаются через 2–3 мес. с момента новообразования [1687].

В этой связи как элемент совершенствования аэробной биологической очистки нами выявлялась возможность формирования гранул аэробного ила, изучалось влияние условий очистки на формирование и стабильность гранул и качество очистки, включая использование контролируемого окислительного воздействия.

Надо отметить, что при проведении очистки в лабораторном биореакторе в проточном режиме с полным рециклом ила, как это описано в разделе 6.1.3, проводимой на протяжении всего срока работы биореактора в течение более 2-х лет, наблюдалось образование зародышей гранул в толще среды в биореакторе уже спустя 2–2,5 мес. после старта очистки. Зачатки гранул были образованы большей частью грибами. Новообразованные гранулы имели размер от 0,1 до 2 мм, были неустойчивыми, неправильной формы, что обусловлено, возможно, механическим разрушением лопастями мешалки биореактора. Несмотря на свою нестабильность образующиеся зачатки гранул повышали седиментационные характеристики ила и фильтруемость, уменьшали пенообразование в системе, унос взвешенных веществ и их содержание в выходящей воде. Однако нам удалось наблюдать лишь образование зачатков, а не полноценных гранул ила, как это первоначально ожидалось. Вместо них образовывалась биопленка на стенках реактора и вторичного отстойника. Поэтому основные эксперименты с формированием гранул проводились в колбах на качалке с отъемно-доливным режимом очистки. Типично после очистки очередной порции стока в аэробных условиях в течение от 1 до 3 суток содержимое колбы отстаивалось в течение от 10 до 60 мин, 0,5–0,7 объема надосадочной жидкости сливали, к осевшему илу добавляли новую порцию стока, и цикл вновь повторяли – аналогично тому, как это использовали при изучении отъемно-доливного режима очистки в SB-реакторе (см. раздел 6.3.1).

Использовались модельные и реальные стоки, а именно:

- сток на основе пива «Балтика 0», разбавленного в 100 раз; активный ил был сформирован в лабораторном проточном биореакторе, в котором были получены результаты исследований, описанные в разделе 6.1.3;

- модельные хозяйственно-бытовые стоки с очисткой сформированным активным илом (см. раздел 6.3.1);

- сток лабораторного UASB-реактора, на вход которого подавался модельный сток на основе пива «Балтика 0» (см. раздел 6.1.1);

- первая сливная вода из чанов после замачивания ячменя на солодовне (Вороновский завод по производству солода, пос. Вороново, Московская обл., см. раздел 6.1.2). Изначально очистка проводилась с активным илом, отобранным из очистных сооружений Вороновского завода по переработке солода; активность ила постоянно поддерживалась путем пересевов на стоки ВЗПС или модельный сток и аэрирования ила со стоком в колбах на качалке;

- сток переработки сои, полученный из соевого лепестка экстракцией этанолом для извлечения углеводов. Этанол из полученного экстракта отгонялся. Полученная после отгонки этанола меласса разбавлялась в 20 раз и подвергалась аэробной ферментации с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса XII. Полученная после ферментации суспензия сепарировалась (фуговалась) для отделения дрожжей. Надосадочная жидкость представляла собой сток для переработки в системе биологической очистки с ХПК 10000–15000, pH 4,0–5,0.

С указанными стоками было изучено влияние на очистку и гранулообразование условий очистки (на свету и в темноте), физико-химических и химических показателей сточной воды, содержания загрязнений, действия тяжелых металлов. В ряде опытов с аэробным илом по ходу процесса в среду вносили различные добавки, а также пероксид водорода в виде 10%  $H_2O_2$  и анолит электрохимического разложения раствора  $Na_2CO_3$ , использовали УФА-излучение. Дозы и время внесения пероксида водорода и анолита описаны ниже при обсуждении результатов экспериментов.

Во всех вариантах при проведении аэробной очистки в отъемно-доливном режиме в колбах на качалке наблюдалось образование полноценных гранул ила, независимо от стока и происхождения активного ила (рис. 6.25). В большинстве случаев гранулы начинают образовываться уже после 2–3 циклов (пассирований) в колбах, затем постепенно увеличиваются в размере по мере роста числа циклов очистки стока. Режимы отъема-долива мало влияют на седиментационные свойства ила. Однако вид стока и условия очистки влияют на морфологию и цвет формирующихся гранул. Ти-

пично образуются черные, бурые, серые, белые гранулы. Примечателен тот факт, что переходные формы гранул в аэробных условиях встречаются крайне редко.



При добавлении  $H_2O_2$



Без добавления  $H_2O_2$

Рисунок 6.25 – Гранулы активного ила, образующиеся при очистке стоков при отъемно-доливном методе с удерживанием ила седиментацией.

Результаты исследования влияния условий очистки на грануляцию аэробного ила приведены в обобщенном виде в табл. 6.11.

При проведении очистки в качалочных колбах образование гранул наблюдается в том случае, когда процесс очистки проводят в периодических отъемно-доливных условиях без отвода ила. Гранулы ила образуются в наибольшем количестве, с наибольшей скоростью и компактностью:

- при создании селективных условий для гранулообразующих микроорганизмов;
- при достаточной аэрации среды;
- при уровне ХПК до 7000 мг/л;
- при рН в диапазоне 7–8,5;
- в условиях с периодами голодания активного ила по субстрату;
- в условиях отсутствия избытка минеральных солей.

Присутствие в небольшом количестве таких водонерастворимых компонентов, как  $CaCO_3$ , не влияет на грануляцию ила. Повышенное содержание микроэлементов ( $Mn^{2+}$  и др.) в среде и внесение органических добавок, таких как дрожжевой экстракт, отрицательно влияет на гранулообразование. Наблюдается повышение стабильности и компактности уже существующих гранул ила в присутствии  $(NH_4)_2SO_4$ , что можно объяснить возрастанием ионной силы раствора, экранированием отрицательного заряда поверхности клеток положительно заряженными ионами и уменьшением силы отталкивания между клетками.

Таблица 6.11 – Факторы, влияющие на грануляцию аэробного ила

Фактор	Условия	Влияние на грануляцию
Отсутствие аэрации	прочно закрытая герметичная пробка, без перемешивания	Гранулы размельчаются, в иле начинают доминировать бурый и белый цвета. Образуются пузырьки газа.
Низкий уровень аэрации	аэрация колбы со 150 мл среды	Скорость образования новых гранул падает, сокращается общее количество гранул. Сформировавшийся ил сохраняет преимущественно черный цвет.
Средний уровень аэрации	аэрация колбы со 100 мл среды	Биомасса ила нарастает, гранулы образуются. Происходит почернение и постепенное укрупнение гранул.
Высокий уровень аэрации	аэрация колбы с 50 мл среды	Биомасса ила быстро нарастает, образуется большое количество новых гранул. Средние размеры гранул меньше, чем при среднем уровне аэрации, но количество гранул в среде выше.
Низкая концентрация субстрата	ХПК от 300 до 1000 мг/л	Наблюдается укрупнение гранул. Поверхность гранул становится более шероховатой, развитой. Этот признак может сохраняться и при повышении концентрации субстрата, и в случае длительного пребывания при низкой концентрации субстрата.
Средний уровень концентрации субстрата	ХПК от 1000 до 5000 мг/л	Ил растет с обычной скоростью с нормальным соотношением фракций гранул. При увеличении концентрации субстрата наблюдается лаг-фаза в росте гранул.
Высокая концентрация субстрата	ХПК выше 7000 мг/л	После лаг-фазы наблюдается повышение скорости роста гранул. Однако при отсутствии гранул в исходной среде начальная стадия грануляции протекает очень медленно.
Длительное голодание ила	Аэрация в течение 1–2 сут. без внесения субстрата	Инициирование образования гранул из накопленного ила
Низкий уровень pH	Уровень pH 6 и ниже	Гранулообразование почти не происходит. Идет измельчение имеющихся гранул, повышается шероховатость поверхности.
Нейтральный уровень pH	Уровень pH 7–8,5	Оптимальный pH для развития гранул и биомассы.
Высокий уровень pH	Уровень pH выше 8,5	Большого влияния на гранулы не оказывает. Идет саморегуляция биоценозом уровня pH с понижением pH до нейтрального.
Влияние пероксида водорода	100 мг/л H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Увеличение фракции крупных гранул (4–7мм) от контрольной пробы. Незначительное уменьшение количества мелких гранул, рост концентрации биомассы вне гранул.
Влияние пероксида водорода	200 мг/л H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Уменьшение количества гранул всех фракций, кроме мелких белых, которые по прошествии времени переходят во фракцию мелких черных.
Влияние Mn <sup>2+</sup>	10 мг/л Mn <sup>2+</sup>	Гранулы образуются медленно. Почернения гранул не происходит. В среде находится небольшое количество фракции белых гранул.
Влияние Fe <sup>3+</sup>	20 мг/л Fe <sup>3+</sup>	Происходит почернение гранул.
Влияние (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	500 мг/л	Гранулы становятся более компактными, приобретая гладкую поверхность. Число гранул не увеличивается.
Влияние нерастворимых добавок	добавление мела как возможного источника центров грануляции	Мел не оказывает воздействие на скорость гранулообразования
Окисление загрязнений надильовой жидкости после анаэробного сбраживания	Окисление загрязнений стока переработки сои после прохождения через UASB-реактор	Гранулообразование идет с нормальной скоростью. Имеющиеся гранулы не разрушаются.
Влияние неагрегированной биомассы	Добавление суспензии неагрегированного ила к гранулам	Увеличение лаг-фазы гранулообразования, затем рост гранул, превышающий по скорости рост в стандартных условиях.

Увеличение лаг-фазы гранулообразования при добавлении неагрегированной биомассы, возможно, обусловлено присутствием в среде большого количества негранулирующих микроорганизмов, мешающих развиваться гранулирующим. Таким образом, для начала образования гранул требуется некоторый критический уровень доли биомассы гранулообразующих микроорганизмов в среде. Наличие гранул в среде ускоряет процессы новообразования. В то же время в большинстве случаев гранулы нестабильны, становятся более рыхлыми и распадаются через 50–120 сут. после начала гранулообразования, при этом качество очистки постепенно падает. Начало стадии распада может спровоцировать резкое изменение ХПК среды, pH, степени аэрации и добавление ионов  $Mn^{2+}$ .

Микроскопирование показало, что состав микроорганизмов меняется в различные периоды развития гранул. Гранулы на первой стадии развития образованы большей частью грибами. Эти гранулы мало устойчивы и разрушаются в течении нескольких дней из-за лизиса во внутренней части гранул. Однако в ходе развития грибных гранул-колоний к ним присоединяются и на них закрепляются бактериальные формы: гетеротрофные бактерии, окисляющие сложные органические субстраты, нитрификаторы и денитрификаторы.

Гранулы ила формируются и в затемненных, и в незатемненных условиях, причем в последнем случае большую долю биоценоза ила составляют микроводоросли. В вариантах с большим содержанием водорослей образовывались гранулы зеленого цвета размером до 3 мм, однако гранулы с водорослями хуже очищали среду.

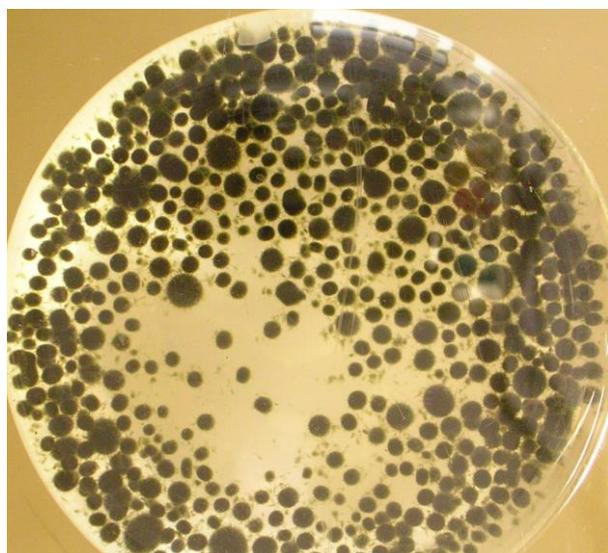
Моделирование пиковых нагрузок по ХПК с последующим голоданием активного ила позволило подобрать режим, в котором формировались гранулы диаметром от 2 до 5 мм с хорошей очищающей способностью.

Добавление пероксида водорода в сублетальных концентрациях к неадаптированному к  $H_2O_2$  илу снижало скорость гранулообразования и увеличивало время развития гранул, однако не приводило к их разрушению.

В связи с тем, что внесение  $H_2O_2$  может способствовать повышению качества очистки сточных вод, было проведено более детальное исследование аэробной очистки с гранулированным илом в качалочных колбах при комплексном воздействии на гранулообразующий ил активных форм кислорода и видимого света низкой интенсивности.

Исследования по воздействию АФК проводили с предварительной адаптацией ила к внесению сублетальных доз  $H_2O_2$ . Адаптация велась при комнатной температуре на модельной среде на основе пива «Балтика 0». Освещенность на поверхности стола, на котором стояли шейкеры с колбами, составляла в среднем 500 Лк, что соответствует удельной величине энергии падающего света не более 100 мВт/л.

Из рис. 6.26 наглядно видно, что на фоне воздействия пероксида водорода наблюдается намного более активное гранулообразование. Гранулы формировались в большем количестве, компактными, механически прочными и стабильными. В данном случае адаптация велась в режиме с дробным внесением  $H_2O_2$  сначала в дозе 100–175 мг/л в середине экспоненциальной фазы роста ила, а затем в дозе 250–350 мг/л в предстационарной фазе роста. После того как начали вносить  $H_2O_2$ , уже к 3-му проходу улучшилась осаждаемость ила (замерялось осаждение в течение 30 мин части ила, не входящего в состав гранул и находящегося в среде в форме суспензии). Адаптированный к действию  $H_2O_2$  ил на фоне освещения среды видимым светом выдерживал в 3–5 раз большие концентрации пероксида водорода (до 1 г/л разового внесения) по сравнению с неадаптированным илом.



Гранулы ила, образованные при очистке в колбе с внесением  $H_2O_2$



Гранулы ила, образованные при очистке в колбе без внесения  $H_2O_2$

Рисунок 6.26 – Формирование гранул ила, преадаптированного к  $H_2O_2$  и ила, не подвергавшегося воздействию  $H_2O_2$ , в условиях отъемно-доливного режима очистки и освещения содержимого колб.

Для оценки эффективности очистки модельного стока гранулами вели различные линии формируемого гранулированного ила с внесением и без внесения  $H_2O_2$ . Опыт проводился в трех-пяти повторностях с освещением и без освещения содержимого колб. Пероксид водорода вносился первоначально только в момент пересева аэробного ила. Во всех случаях проба отбиралась до внесения  $H_2O_2$ .

Данные по изменению ХПК в экспериментах с освещением содержимого колб фоновым светом представлены на рис. 6.27.

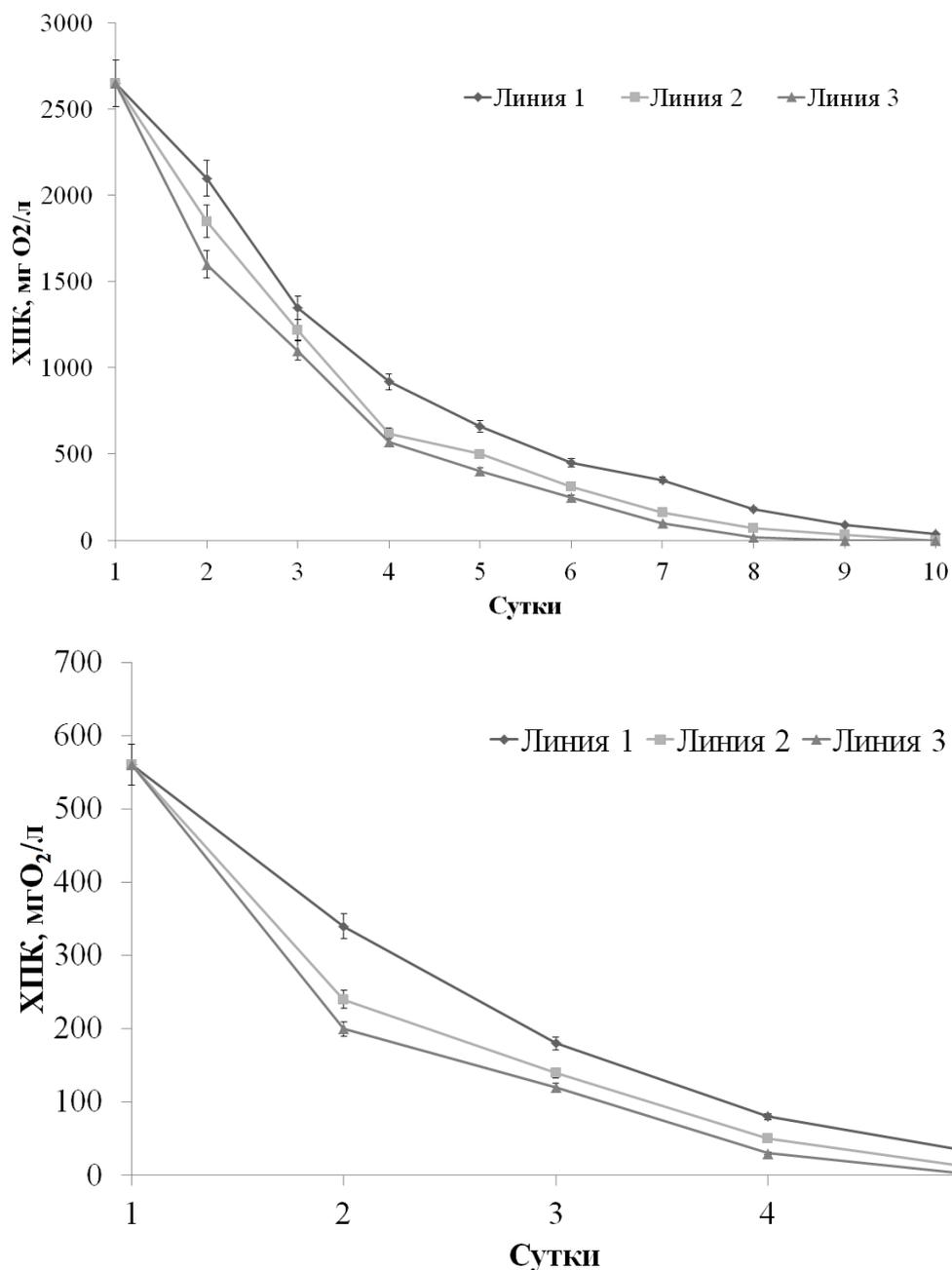


Рисунок 6.27 – Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления (сут) и линии аэробного ила при разовом внесении  $H_2O_2$  и освещении содержимого колб. А –  $XPK_{исх.} = 2650$  мг  $O_2$ /л. Б –  $XPK_{исх.} = 560$  мг  $O_2$ /л.

Линия 1: Аэробный ил неадаптированный к  $H_2O_2$ , очистка без внесения  $H_2O_2$ .

Линия 2: Аэробный ил адаптированный к  $H_2O_2$ , концентрация  $H_2O_2$  в среде при разовом внесении 25 мг/л.

Линия 3: Аэробный ил адаптированный, концентрация  $H_2O_2$  в среде при разовом внесении 50 мг/л.

Как видно из этих данных, в вариантах с внесением  $H_2O_2$  (линии 2 и 3) при  $XPK_{исх.} 2650$  мг/л на 9–10 сутки с момента внесения ила остаточное ХПК стремится к нулю. Такой результат наблюдался во всех 4 повторностях. Наиболее резкое снижение ХПК относительно контрольного варианта без внесения  $H_2O_2$  наблюдалось на вторые сутки. Аналогично при  $XPK_{исх.} 560$  мг/л снижение ХПК в вариантах с линиями 2 и 3 было существеннее, чем в контрольной линии без внесения  $H_2O_2$ , при этом в вариантах с внесением пероксида водорода ХПК падало до непромеряемых величин на пятые сутки во всех повторно проведенных опытах. В контроле без внесения  $H_2O_2$  ХПК не достигало уровня ниже 30 мг/л.

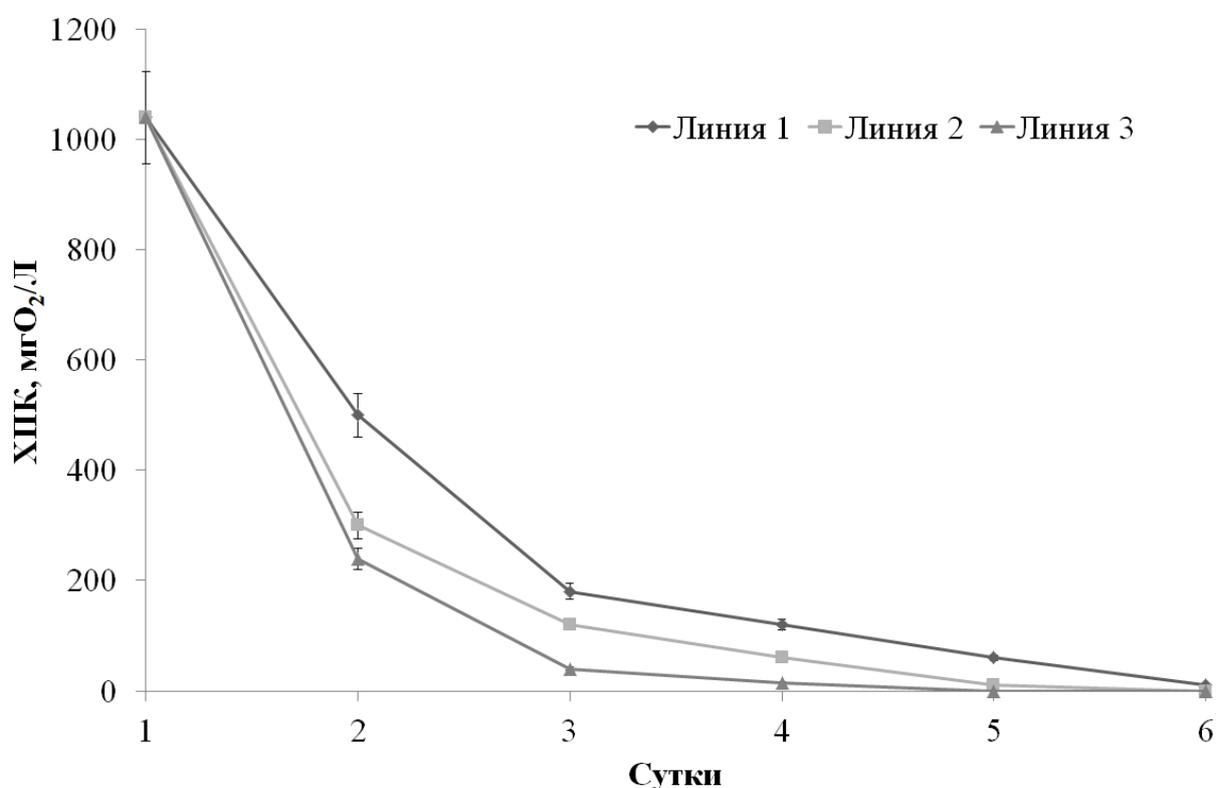


Рисунок 6.28 – Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления (сут) и линии аэробного ила при дробном внесении  $H_2O_2$  и освещении содержимого колб.  $XPK_{исх.} = 1040$  мг  $O_2$ /л.

Линия 1: Аэробный ил неадаптированный к  $H_2O_2$ , очистка без внесения  $H_2O_2$ .

Линия 2: Аэробный ил адаптированный к  $H_2O_2$ , концентрация  $H_2O_2$  в среде при разовом внесении 25 мг/л.

Линия 3: Аэробный ил адаптированный, концентрация  $H_2O_2$  в среде при разовом внесении 50 мг/л.

Повышение дозы вносимого  $\text{H}_2\text{O}_2$  ускоряло падение ХПК, при этом внесение пероксида по частям оказалось эффективнее, чем внесение эквивалентной дозы однократно в момент пересева. Так, в линии 2 при разовом внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$  ХПК за 4 сут. падало с 560 до 50 мг/л (рис. 6.27), а при дробном внесении такого же количества с 1040 до 60 мг/л (рис. 6.28); в линии 3 ХПК за 4 сут. падало при разовом внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$  с 560 мг/л до 30 (рис. 6.27), а при дробном – с 1040 до 15 (рис. 6.28). Таким образом, можно предполагать, что при дробном внесении гранулы аэробного ила испытывают меньшее стрессовое воздействие, быстрее адаптируются и лучше удаляют остаточные загрязнения.

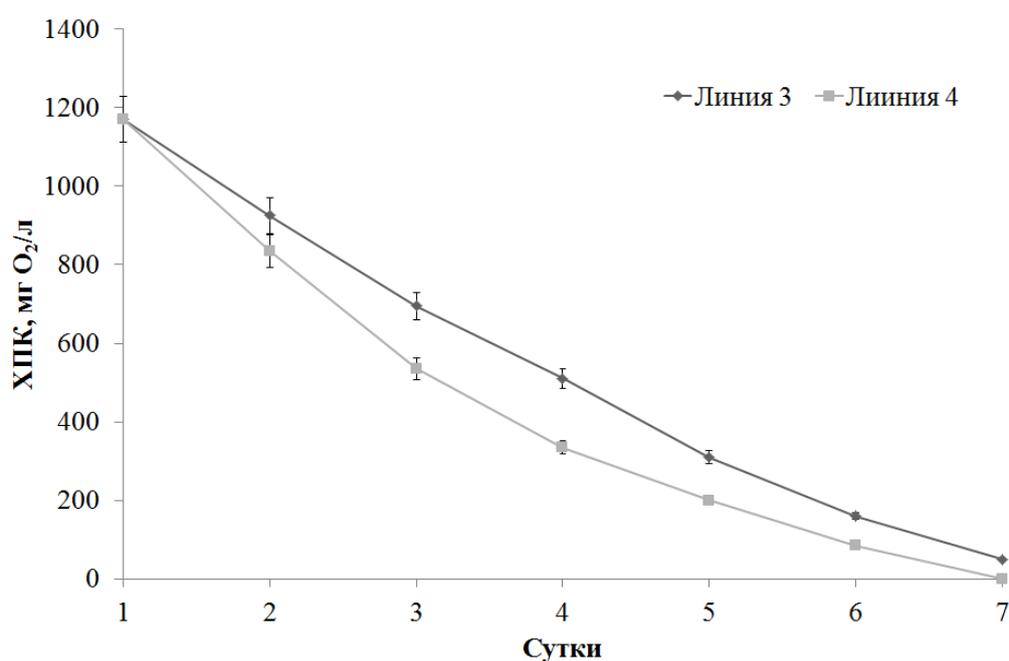
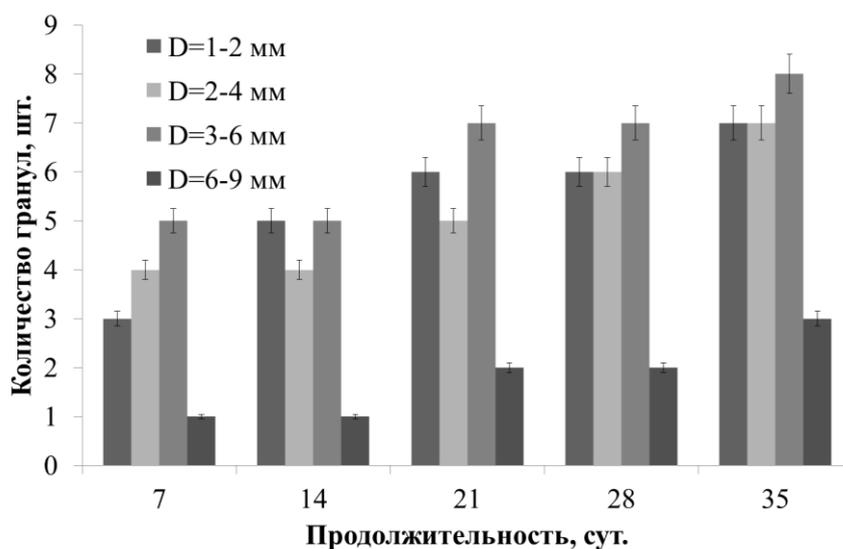


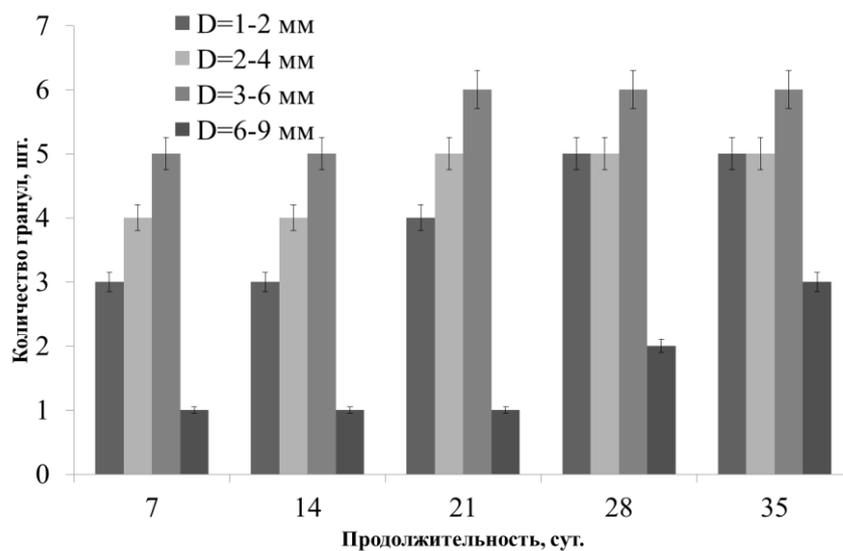
Рисунок 6.29 – Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления и линии аэробного ила при дробном внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$  равными долями каждые сутки при освещении и без освещения содержимого колб.  $\text{ХПК}_{\text{исх.}} = 1170$  мг  $\text{O}_2/\text{л}$ .

Линия 3 – без освещения среды. Линия 4 – при освещении среды.

Как и в предыдущих вариантах очистки в условиях контролируемого оксидативного воздействия значимым фактором, влияющим на результат адаптации и показатели очистки, было освещение очищаемой среды с аэробным илом видимым светом при внесении  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Из рис. 6.29 хорошо видно, что в колбах, которые освещались (линия 4), падение ХПК гораздо более интенсивное – ХПК в пяти повторно проведенных опытах на 7-ые сутки падало до непромеряемых величин.



А



Б

Рисунок 6.30 – Изменение размера и числа гранул аэробного ила по ходу пересевов в условиях освещения и при затемнении колб и внесении пероксида водорода.

А – при освещении, Б – в условиях затемнения.

Параллельно в ходе проведения представленной серии экспериментов фиксировались развитие и изменение числа гранул аэробного ила при освещении и без освещения среды. Результаты этих измерений приведены на рис. 6.30. Видно, что наблюдается заметное превышение скорости накопления и размера гранул ила в вариантах с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  в количестве 25 мг/л при освещении. Таким образом, фактор освещения существенен при воздействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  на гранулообразование. В условиях освещения гранулы были с хорошо развитой поверхностью. Их накопление при затемнении замедлялось.

Таким образом, совместное воздействие на аэробный АИ факторов оксидативного стресса (пероксида водорода) и низкоинтенсивного видимого света может существенно повысить качество очистки, в частности, в отношении снижения ХПК, удаления фосфатов, устойчивости гранул аэробного АИ, получаемых в условиях отъемно-доливного режима. При этом необходимо учитывать дозу добавляемого  $\text{H}_2\text{O}_2$ , фазу развития АИ, концентрацию ила при пассивировании к пероксиду водорода, условия освещения среды с илом видимым светом, характер нагрузки по загрязнениям на АИ. Поскольку пероксид водорода достаточно вносить в среду в относительно малых дозах на фоне ее освещения низкоинтенсивным видимым светом, то такой подход может быть относительно легко реализован на практике.

Интересно было сопоставить эффект действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  с действием других активных форм кислорода. Как уже отмечалось в разделе 2.4, механизмы воздействия различных АФК и ответа клеток на эти воздействия во многом аналогичны, поэтому можно было ожидать сходных эффектов при использовании различных форм АФК и видимого света в процессах биологической очистки. Сходные положительные эффекты позволили бы более гибко подходить к выбору различных форм АФК в целях оптимизации технологических решений и затрат на очистку.

Для проверки предположения о возможности схожих положительных эффектов при использовании различных форм АФК были проведены исследования аэробной биологической очистки стоков с внесением анолита электрохимической активации водного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>1</sup>. В анолите могут содержаться пероксид водорода и другие реакционно активные частицы – перекиси, надперекиси, озон и др. Сопоставление действия анолита и пероксида водорода представляет интерес и с точки зрения возможных экономических затрат на обеспечение положительного эффекта снижения ХПК. Как и в опытах с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , было обращено внимание на фактор освещения среды видимым светом.

Анолит готовился в проточном диафрагменном электрохимическом генераторе в лаборатории на кафедре промышленной экологии РХТУ.

Приготовление анолита – это преобразование воды в активированный раствор при помощи трех компонентов:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , воды и электрического тока. Если через воду протекает постоянный электрический ток, то поступление электронов в воду у катода, так же как и удаление электронов из воды у анода, сопровождается серией электрохимических реакций на поверхности катода и анода, в результате которых

---

<sup>1</sup> В работе с использованием анолита принимали участие сотрудники кафедры промышленной экологии РХТУ им. Д.И. Менделеева

образуются новые вещества, а система вода-растворенные вещества переходит в термодинамически неравновесное состояние.

Свойства воды, подвергнутой электрохимической обработке, определяются составом минеральных солей в исходном растворе, видом электрохимического воздействия, конструкцией и характеристиками электрохимического проточного аппарата. В период релаксации весь сложный комплекс химических и физических возмущений в полученных анолите и католите постепенно рассеивается, что проявляется в закономерном приближении физико-химических параметров к равновесным значениям. В слабоминерализованных водных растворах (до 5 г/л), пресной (до 1 г/л) и дистиллированной (до 5 мг/л) воде высокоактивные продукты разнообразных электрохимических реакций могут существовать одновременно длительное время.

Как и в опытах с внесением  $H_2O_2$ , при проведении экспериментов с внесением анолита использовались различные линии аэробного ила:

Линия 1: Аэробный ил неадаптированный к  $H_2O_2$ , без внесения анолита, первоначальное значение ХПК стока 560 мг/л.

Линия 2: Аэробный ил адаптированный к внесению  $H_2O_2$ , анолит вносился только в момент пересева, на колбу с 80 мл ила и стока добавлялся 1 мл анолита, первоначальное значение ХПК стока 560 мг/л.

Линия 3: Аэробный ил адаптированный к внесению  $H_2O_2$ , анолит вносился только в момент пересева, на колбу с 80 мл ила и стока добавлялось 2 мл, первоначальное значение ХПК стока 560 мг/л.

При проведении исследований помещение лаборатории большую часть суток освещалось естественным светом через оконные проемы, а также искусственным светом люминесцентных ламп. Интенсивность света, падающего на поверхность колб, составляла в среднем 500 лк. Опыт проводился в четырех повторностях, значения ХПК приведены усредненные по результатам 4-х повторностей.

Все 3 линии выращивались на одном и том же субстрате, представляющем собой модельную сточную воду, получаемую путем разбавления безалкогольного пива «Балтика 0» от 100 до 50 раз по мере адаптации и с учетом плана экспериментов. Температура, аэрация, объем среды и колб, условия освещения во всех линиях были одинаковы.

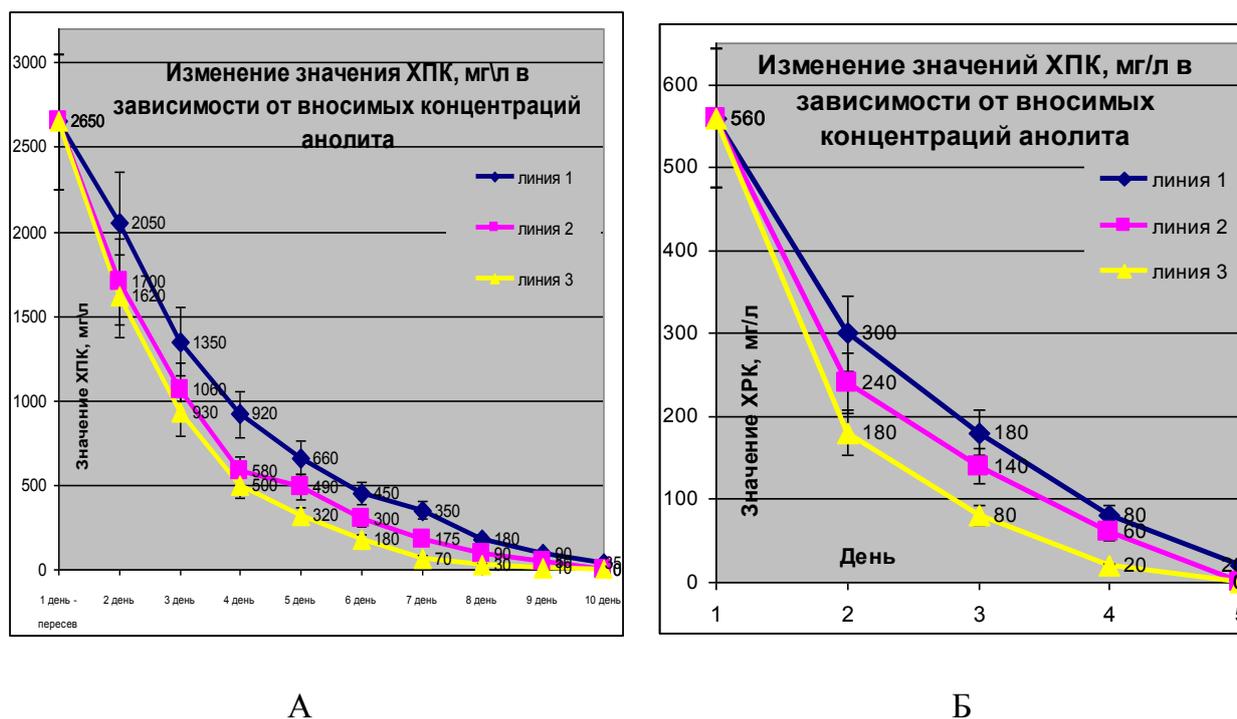


Рисунок 6.31 – Изменение величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления и линии аэробного ила при разовом внесении анолита.

А –  $\text{ХПК}_{\text{исх.}} = 2650 \text{ мг О}_2/\text{л}$ . Б –  $\text{ХПК}_{\text{исх.}} = 560 \text{ мг О}_2/\text{л}$ .

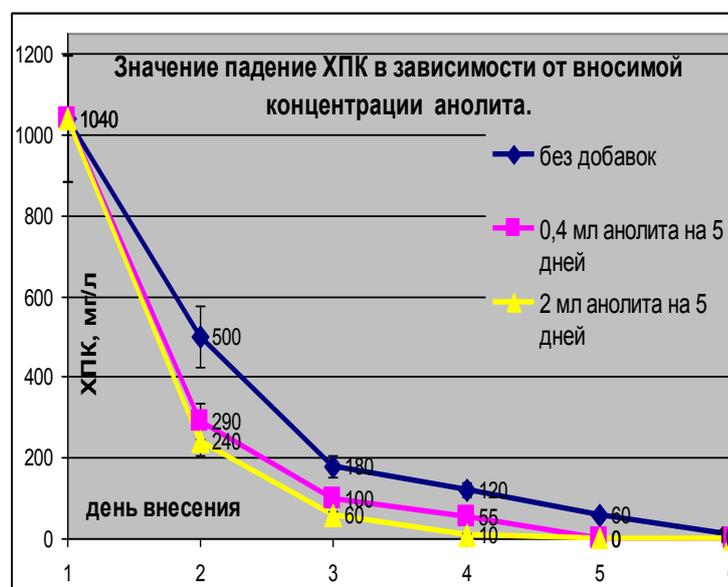
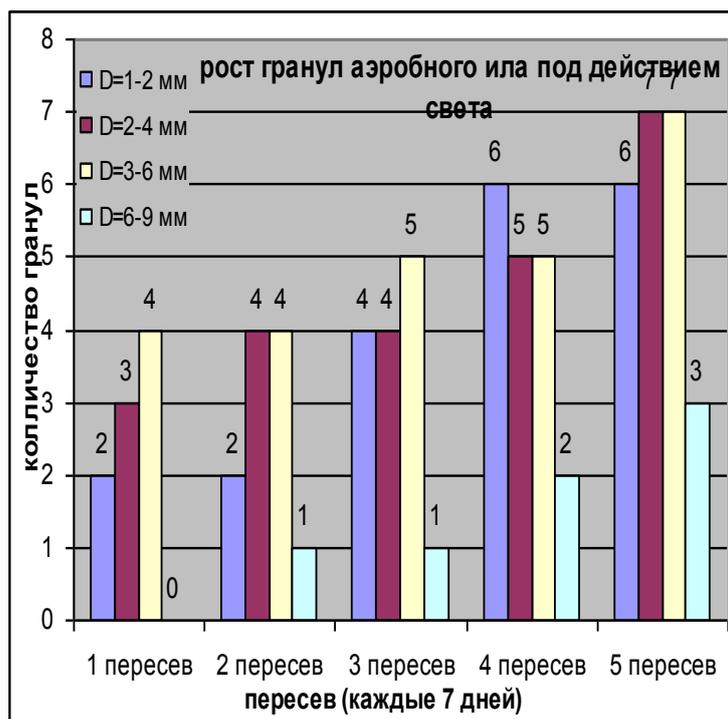
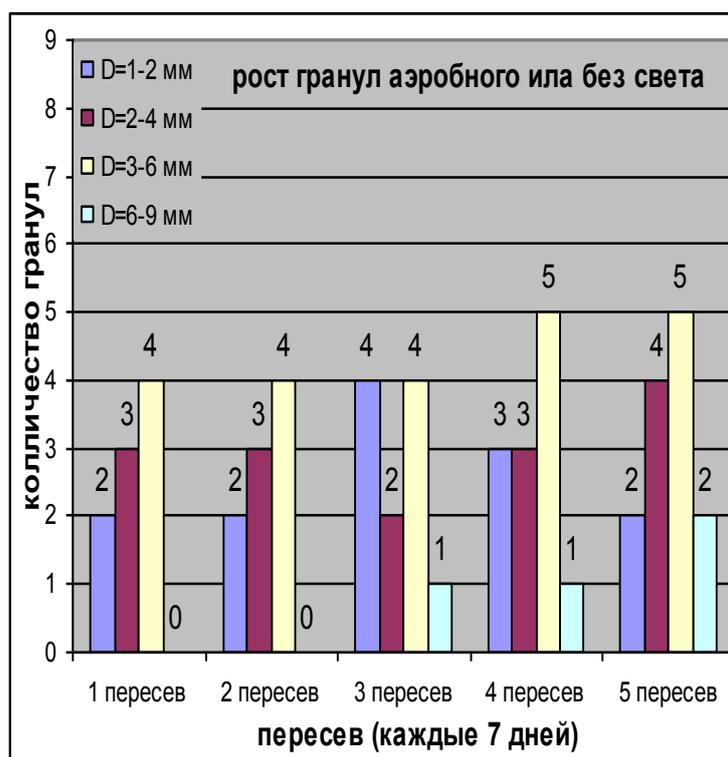


Рисунок 6.32 – Сравнение изменения величины ХПК в зависимости от продолжительности биоокисления и линии аэробного ила при дробном внесении анолита.  $\text{ХПК}_{\text{исх.}} = 1040 \text{ мг О}_2/\text{л}$ .



А



Б

Рисунок 6.33 – Изменение размера и числа гранул аэробного ила по ходу пересевов в условиях освещения (А) и затемнения (Б) среды и внесения анолита.

На рис. 6.31 представлены результаты опытов с определением динамики изменения ХПК во всех трех линиях ила при очистке модельных стоков. Видно, что с увеличением количества вносимого анолита скорость падения ХПК растет (линия 2 и линия 3), превышая контрольный уровень линии 1.

В аналогично проведенных экспериментах с дробным внесением анолита каждый день равными долями очистка сточных вод гранулообразующим аэробным илом протекала более эффективно и существенно превышала показатели очистки без внесения анолита (рис. 6.32).

Параллельно в ходе проведения представленной серии экспериментов фиксировались развитие и изменение числа гранул аэробного ила при освещении и без освещения среды. Результаты этих измерений приведены на рис. 6.33. Видно, что анолит в использованных концентрациях не угнетает развитие аэробного ила. При освещении среды наблюдается тенденция превышения скорости и уровня накопления гранул ила над вариантом с затемнением.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что внесение анолита электрохимической активации водного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , так же как и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , повышает эффективность очистки, т.е. подтвердили предположение о возможности схожих положительных эффектов при биологической очистке с использованием различных форм АФК и освещении очищаемой среды.

Действие анолита, по-видимому, аналогично действию пероксида водорода, что, видимо, обусловлено содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$  и других активных форм кислорода в анолите. Необходимым условием достижения положительного эффекта является освещение очищаемой среды низкоинтенсивным видимым светом. При дробном внесении анолита положительный эффект выражен более ярко, чем при разовом. Добавление оптимальных небольших доз пероксида водорода или анолита электрохимической активации раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  благоприятно влияет на гранулообразование аэробного ила в условиях освещения среды видимым светом, при этом ил должен быть преадаптирован к этим активным окислителям. Однако поскольку пероксид водорода как источник АФК требуется вносить в гораздо меньших дозах, чем анолит, то в практических целях использование  $\text{H}_2\text{O}_2$  предпочтительнее.

Воспроизведение аналогичных положительных эффектов при комбинированном воздействии анолита электрохимического разложения и видимого света свидетельствует в пользу универсальности воздействия агентов оксидативного стресса и, возможно, других стресс- и антистресс-факторов применительно к процессу гранулообразования.

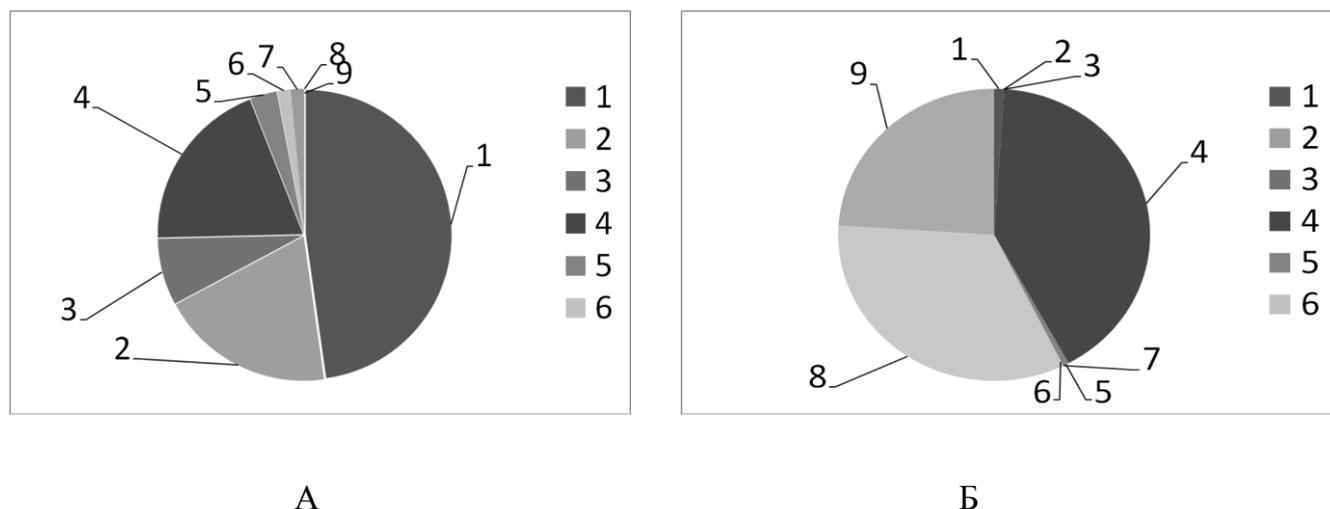


Рисунок 6.34 – Соотношение групп микроорганизмов в образцах АИ, полученных в отъемно-доливном режиме:

А – хлопья АИ; Б – гранулы, адаптированные к пероксиду водорода.

1–3 – палочковидные бактерии, 4 – нитчатые бактерии, 5–7 – кокки, 8 – грибы, 9 – актиномицеты.

Исследование микробиологического профиля микроскопированием, с высевом на селективные среды и методами молекулярно-генетического анализа образцов из различных гранул и их зон, результаты которого подробно описаны в диссертации Н.С. Хохлачева [1937], выполненной под руководством автора, показало следующее:

- гранулы аэробного активного ила формируются при наличии структурообразующих микроорганизмов или точек их иммобилизации;

- на начальном этапе развития биоценоза аэробного активного ила преобладают бактерии;

- в гранулах и в хлопьях активного ила линий без внесения пероксида водорода преобладают бактериальные культуры, в то время как в гранулах, полученных в условиях внесения пероксида водорода, начинают преобладать нитчатые бактерии, актиномицеты и грибные культуры (рис. 6.34); остальные компоненты гранул ила варьируются в широком диапазоне – от бактерий до микроводорослей;

- после длительного воздействия пероксида водорода наблюдается сокращение видового разнообразия. В аэробных гранулах присутствуют 2–3 доминирующих близких по видовой характеристике вида микроорганизмов (рис. 6.34);

- наличие лишь 2–3 доминирующих видов свидетельствует о наличии базового пула микроорганизмов в сформированных линиях ила, относительно устойчивого в процессе биологического окисления;

- наблюдаются некоторые отличия в микробиологическом многообразии в наружных и внутренних слоях гранул ила и между большими и малыми гранулами. Однако во всех случаях обнаруживаются актиномицеты, нитчатые бактерии и грибы, при этом на первых стадиях гранулообразования доминируют актиномицеты, а на последующих (на 3–5 день с момента начала гранулообразования) – нитчатые бактерии и грибы;

- голодание и оксидативный стресс способствуют выработке экзополисахаридов, которые влияют на стабильность и консистенцию гранул [103, 925].

Из того факта, что активный ил, адаптированный к пероксиду водорода, формирует более устойчивые и выраженные гранулы и что при этом в гранулах ила начинают доминировать грибы и нитчатые бактерии, можно сделать вывод, что последние в данном случае играют ведущую роль в процессе гранулообразования. Они скорее всего формируют основу, к которой прикрепляются другие микроорганизмы.

Изменение видового состава хлопьев и гранул АИ с уменьшением общего видового разнообразия и увеличением доли грибных культур при пассировании к  $H_2O_2$  по сравнению с контрольными вариантами свидетельствует об устойчивости этого сообщества с минимальным разнообразием при функционировании гранул.

После продолжительного действия  $H_2O_2$  на гранулированный аэробный активный ил в течение 18 пассажей был произведён газонный рассев микроорганизмов на агаризованную среду и получен ряд изолятов, которые были первично охарактеризованы. С каждым изолятом были проведены исследования, касающиеся способности образовывать структурные элементы, снижать концентрацию фосфатов и ХПК сточной воды. Перечисленным выше требованиям отвечали 5 изолятов, которые были идентифицированы молекулярно-генетическими методами, как *Agrobacterium tumefaciens*, *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium glabrum* и *Trichosporon cutaneum*.

Из всех выделенных изолятов лишь *Penicillium glabrum* при воздействии пероксида водорода во время пересевов с твердой на жидкую среду и в течение пересевов на жидких средах сохранял способность образовывать структурные элементы в виде гранул (рис. 6.35) и являлся гранулообразующим. Изолят *Trichosporon cutaneum* негативно влиял на гранулообразование.

В целом, все выбранные пять изолятов микроорганизмов оказались неэффективны при очистке сточной воды по отдельности.

С целью дополнить представления о формировании сообщества и функционировании гранулы проводилось последовательное введение изолятов в колбах с взаимодействием друг с другом, при этом по мере культивирования в отъемно-доливном ре-

жиме в ряде случаев образовывались стабильные «искусственные» гранулы, отличающиеся видовой структурой. Появление таких гранул зависело от порядка введения компонентов и состава формируемого консорциума.

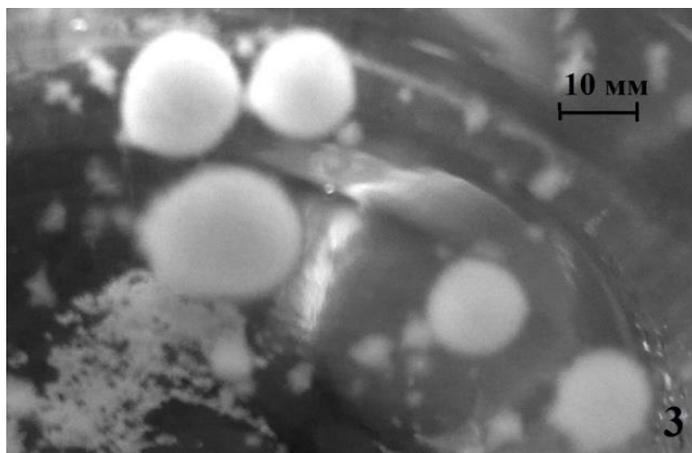


Рисунок 6.35 – *Penicillium glabrum* на второй день при очистке модельной сточной воды с ХПК<sub>нач</sub> 400 мг О<sub>2</sub>/л

Эти результаты еще раз показали, что решающим в формировании гранул является не видовой состав микроорганизмов, формирующих гранулу, а морфология гранулообразующих микроорганизмов, и также процедура и режим формирования гранул. При этом оказалось, что порядок заселения микрогранулы и развития сукцессии в такой микроэкосистеме также играют определенное значение, т.е. эволюция последней может идти по путям различных состояний устойчивости, с различным видовым составом. В пределах диапазона устойчивости эта микроэкосистема относительно стабильна и эволюционирует при сохранении своего видового состава и биоразнообразия.

Из апробированных вариантов формирования искусственных гранул наиболее эффективно метаболизировала загрязнения гранула с последовательностью добавления *Agrobacterium tumefaciens* + *Fusarium oxysporum* + *Penicillium glabrum* + *Fusarium nivale*. Искусственные гранулы, сформированные из 4-х основных штаммов, были исследованы на устойчивость к Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Результаты показали, что такой консорциум сохраняет видовое соотношение и выдерживает в 3–4 раза большую концентрацию Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> по сравнению с отдельными изолятами, что свидетельствует об устойчивости сформированного искусственного биоценоза. Однако качество очистки полученными вариантами гранул было неудовлетворительное, очевидно, из-за того, что в данных гранулах отсутствовали бактериальные культуры, присущие ГААИ, полученному из исходного биоценоза АИ. Таким образом, наличие лишь структурообразующих элемен-

тов гранул недостаточно для обеспечения высокого качества очистки. Дальнейшее ведение лучших и наиболее устойчивых вариантов гранул при взаимодействии с исходным илом приводило к заселению их бактериями ила и повышению качества очистки на фоне адаптации к пероксиду водорода до уровня очистки модельного стока ГААИ, стабилизированным  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В свою очередь, подсев искусственных гранул к сообществу АИ, отобранного из городских очистных сооружений, приводил к намного более быстрому образованию новых гранул, а очистка модельного стока была наиболее эффективной в вариантах со стабилизированным пероксидом водорода ГААИ.

Таким образом, исследования процессов гранулообразования аэробного ила подтвердили возможность значительного улучшения показателей очистки путем совместного воздействия на активный ил оптимальных доз стресс- и антистресс-факторов, а именно низких доз пероксида водорода и видимого света, а также анолита электрохимической активации, т.е. использования подхода, названного нами «контролируемый оксидативный стресс». Для получения положительного эффекта  $\text{H}_2\text{O}_2$  следует вносить в количествах от 25 до 300 мг/л в условиях окисления компонентов среды в периодическом режиме и ее освещения видимым светом с энергетической освещенностью от 40 до не более 100 мВт/л. Такое совместное воздействие также способствует улучшению седиментационных свойств активного ила, обусловленных большим проявлением гранулообразующих свойств, проявляется во всех режимах очистки: для различных стоков, при различных способах очистки, нагрузках, содержании загрязнений (ХПК, биогенных элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Образующиеся стабильные гранулы устойчивые к смене условий культивирования (анаэробно-аэробные, голодание), более глубоко очищают сточную воду (по ХПК, фосфатам) со снижением ХПК вплоть до недетектируемых величин.

Повышенная механическая прочность гранул аэробного активного ила, пассированного к действию стрессора, возможность регулирования размеров гранул при внесении различных доз стрессора, улучшение показателей очистки служат основой для разработки нового подхода к поддержанию устойчивости и работоспособности гранулированного аэробного активного ила. С технологической точки зрения, использование малых доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25–30 мг/л) на фоне освещения среды низко интенсивным видимым светом экономически обосновано, легко реализуется и масштабируется при очистке промышленных и хозяйственно-бытовых стоков. Без освещения среды скорость окисления загрязнений существенно не повышается, а требуемые нормативные показатели очистки не достигаются.

#### **6.4. Биологическая очистка в мембранном биореакторе с оксидативным воздействием**

Показанная повышенная способность активного ила к формированию агрегатов и более эффективного удаления загрязнений в условиях контролируемого оксидативного стресса может быть использована как в наиболее распространенных системах биологической очистки, в частности, в системе аэротенк – вторичный отстойник, так и в появившихся сравнительно недавно. В частности, такой новой системой является мембранный биореактор (МБР), основной проблемой которого при эксплуатации является забивка мембран активным илом и резкое снижение их проницаемости.

Нами было предложено апробировать подход на основе контролируемого оксидативного воздействия для использования в МБР. В таком реакторе рабочая плотность популяции активного ила высокая и можно ожидать существенного эффекта от совместного действия стрессорных и антистрессорных факторов.

Исходя из установленных закономерностей, положительный эффект использования оксидативного воздействия в МБР может быть связан, во-первых, с повышением качества и скорости очистки сточных вод, и, во-вторых, управлением агрегатным состоянием активного ила для нивелирования проблемы кольматации мембран и поддержания стабильности работы МБР. Второе предположение основано на том, что проблема кольматации обусловлена не столько структурой и типом мембран или конструктивными особенностями, сколько агрегатным состоянием и морфологией активного ила. Как было показано в исследованиях с грануляцией ила, оксидативное воздействие способствует его флокуляции и гранулообразованию, укрупняет размеры частиц, что должно положительно сказываться на фильтрационных свойствах адсорбируемого на мембранах слоя ила и рабочей проницаемости мембран.

Для апробации предложенного подхода нами была создана лабораторная установка с МБР (см. рис. 4.3, глава 4) со стеклянной обечайкой, что обеспечивало освещение содержимого биореактора фоновым светом лаборатории. Работы велись в сотрудничестве с НПФ ТЭКО, г. Москва.

При проведении тестовых испытаний первоначально в мембранный биореактор загрузили модельный сток на основе разбавленного пива «Балтика 0» с ХПК стока около 2000 мг/л. Также в реактор загрузили активный ил из лабораторного биореактора, работающего в проточном режиме очистки этого же модельного стока. Концентрация активного ила в МБР составила 2,5 г/л. Однако сразу же после старта эксперимента, первоначально с очисткой стока в циклическом отъемно-доливном режиме с аэрацией и без отвода избыточного ила, выяснилось, что использованный активный

ил быстро забивает поры мембран, и их проницаемость падает до величины, близкой к 0. Причиной полного падения проницаемости мембран была слизь, образуемая загруженным в реактор активным илом и полностью забивающая поры мембран. Эта слизь накапливается и в проточном биореакторе, из которого первоначально был отобран активный ил. Промывка мембран обратным током воды не восстановила проницаемость мембран.

В аналогичном повторном тестовом эксперименте в реактор загрузили сточную воду, но уже не модельный сток пивоварения, а модельный хозяйственно-бытовой сток с исходным ХПК 1000 мг/л. Одновременно в реактор загрузили активный ил, предварительно наработанный на данном модельном хозяйственно-бытовом стоке в емкости с аэрацией. После повторной загрузки активного ила, полученного на модельном хозяйственно-бытовом стоке, в мембранный реактор проницаемость мембран стала вполне приемлемой, поддерживалась на относительно стабильном уровне, достаточном для рабочего режима мембранного биореактора. Ил через 15 циклов очистки образовывал укрупненные хлопья, что, видимо, и обусловило стабильность характеристик мембран.

Таким образом, результаты предварительных испытаний подтвердили предположение, что ключевым лимитирующим фактором в процессе очистки в МБР являются не режимы аэрации, фильтрации и промывки мембран, а характер стока, качество активного ила, его морфологическое состояние, что обуславливает актуальность разработки приемов управления свойствами активного ила в МБР.

На следующем этапе эксперименты в МБР проводили с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$  при объеме среды 4–6 л, температуре 17–25°C, освещенности 150–220 Лк на внешней поверхности стеклянной обечайки биореактора (или около 40 мВт/л среды биореактора). Первоначально процесс вели в циклическом отъемно-доливном режиме.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в виде пергидроля – 33,3%) добавляли однократно по прошествии определенного количества часов (в зависимости от времени цикла) после запуска биореактора с биоокислением модельного стока. В данном случае в МБР был помещен стабилизированный действием пероксида водорода ГАИИ с концентрацией 2,5 г/л, аналогично тому, как это было апробировано в работе Li et al. [1938].

В последующем режим очистки перевели на проточный с постепенным увеличением протока ( $D$ ) с  $0,001 \text{ ч}^{-1}$  до  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  и  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  с 400 до 1200 мг  $\text{O}_2/\text{л}$ . Малые дозы пероксида водорода подавались периодически обратным током через мембранный модуль под небольшим давлением каждые 72 часа. О поступлении  $\text{H}_2\text{O}_2$  в зону реакции судили по датчику  $\text{pO}_2$  – происходил резкий скачок концентрации растворенного кислорода. В ходе эксперимента показания  $\text{pO}_2$  отслеживались программно, при сниже-

нии концентрации растворенного кислорода открывался регулировочный клапан на линии подачи воздуха. Концентрация  $pO_2$  поддерживалась первоначально на уровне не менее 50% от насыщения, однако по мере возрастания концентрации активного ила и окислительной мощности МБР его массообменных способностей уже не хватало, и наступал глубокий лимит по кислороду. В процессе эксплуатации отслеживали зависимость  $XPK_{\text{вых}}=f(D, XPK_{\text{вх}})$ . Как видно из результатов, представленных на рис. 6.36 в отношении показателей очистки ( $XPK_{\text{вых}}$ ), реактор был довольно устойчив в интервале протока от  $0,001 \text{ ч}^{-1}$  до  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  и  $XPK_{\text{вх}}$  от  $400 \text{ мг O}_2/\text{л}$  до  $1200 \text{ мг O}_2/\text{л}$ . В установившемся состоянии  $XPK_{\text{вых}}$  менялся в диапазоне от  $3 \text{ мг O}_2/\text{л}$  до  $15 \text{ мг O}_2/\text{л}$ , что соответствовало степени очистки от 96% до 98%. Концентрация биомассы постепенно увеличивалась и к концу эксперимента достигла  $17 \text{ г/л}$  (рис. 6.37). Окислительная мощность достигла  $115\text{--}120 \text{ мг/л.ч}$  (рис. 6.38). Дальнейший рост окислительной мощности ограничивался поступлением растворенного кислорода в сточную воду, о чем свидетельствовали показания датчика  $pO_2$ , близкие к нулю. Последующее увеличение окислительной мощности оказалось невозможным из-за массообменных ограничений, обусловленных конструктивными особенностями МБР. Проницаемость мембран в течение всего периода функционирования (около 180 сут) поддерживалась на достаточно высоком уровне (рис. 6.39) при отсутствии роста трансмембранного давления, что свидетельствует об успешно выбранной стратегии внесения пероксида водорода для управления сообществом АИ.

Таким образом, в условиях окислительного воздействия МБР работал стабильно. Ил быстро адаптировался к внесению  $H_2O_2$  и увеличению нагрузки, о чем свидетельствовал быстрый выход реактора на достаточный уровень очистки стока. Однако гранулообразования ила не наблюдалось. Напротив, извне внесенные в МБР гранулы АИ в течение нескольких суток разрушались, даже в условиях окислительного воздействия. Вместо них образовывались компактные агломераты с большой скоростью оседания, что было вполне достаточно для поддержания стабильного функционирования МБР.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что одним из вариантов улучшения морфологических и седиментационных свойств активного ила и, как следствие, снижения забиваемости илом полупроницаемых мембран, более эффективного использования мембранных биореакторов, может быть управляемое культивирование ила, при котором активный ил необходимо периодически подвергать воздействию оптимальными дозами пероксида водорода на фоне освещения содержимого биореактора видимым светом при относительно небольшой освещенности.

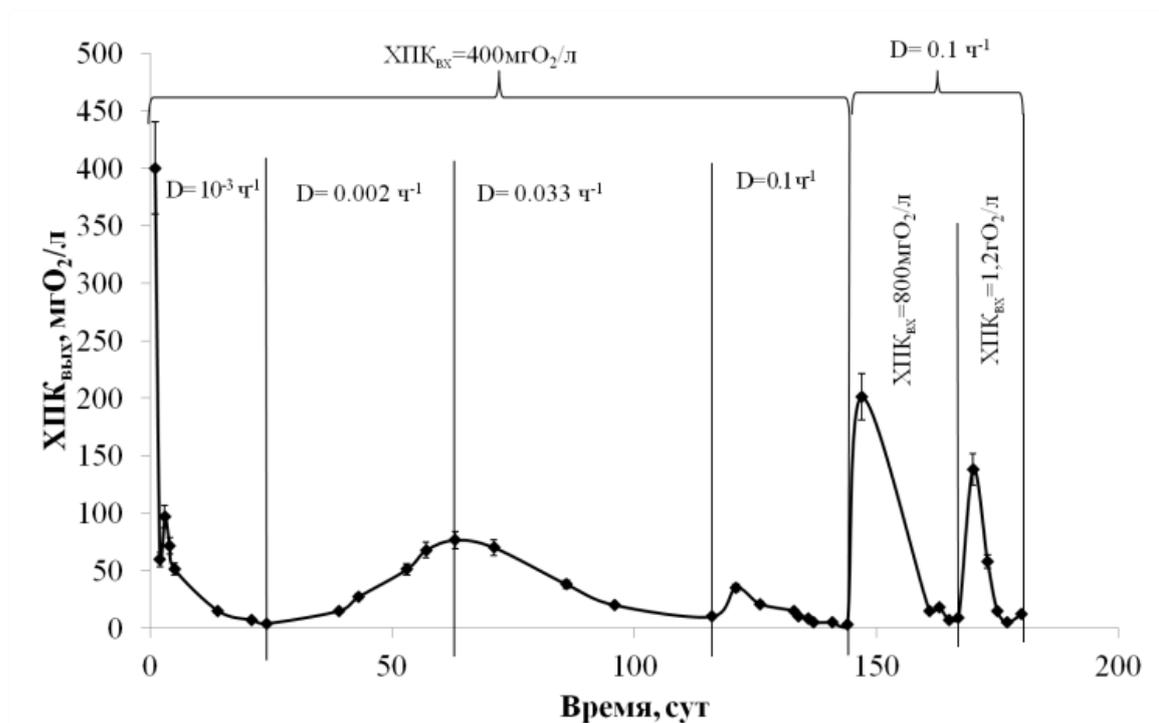


Рисунок 6.36 – Изменение ХПК<sub>вых</sub> в ходе эксплуатации МБР с внесенным ГААИ.

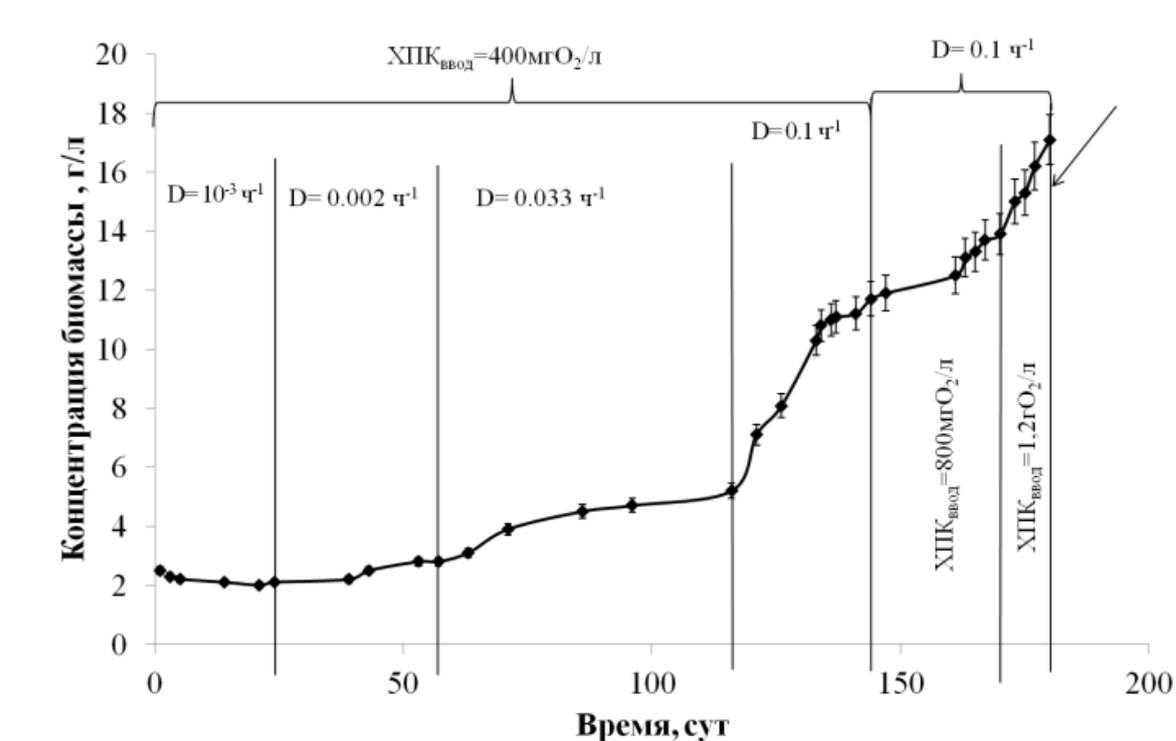


Рисунок 6.37 – Изменение концентрации биомассы в ходе эксплуатации МБР с внесенным ГААИ.

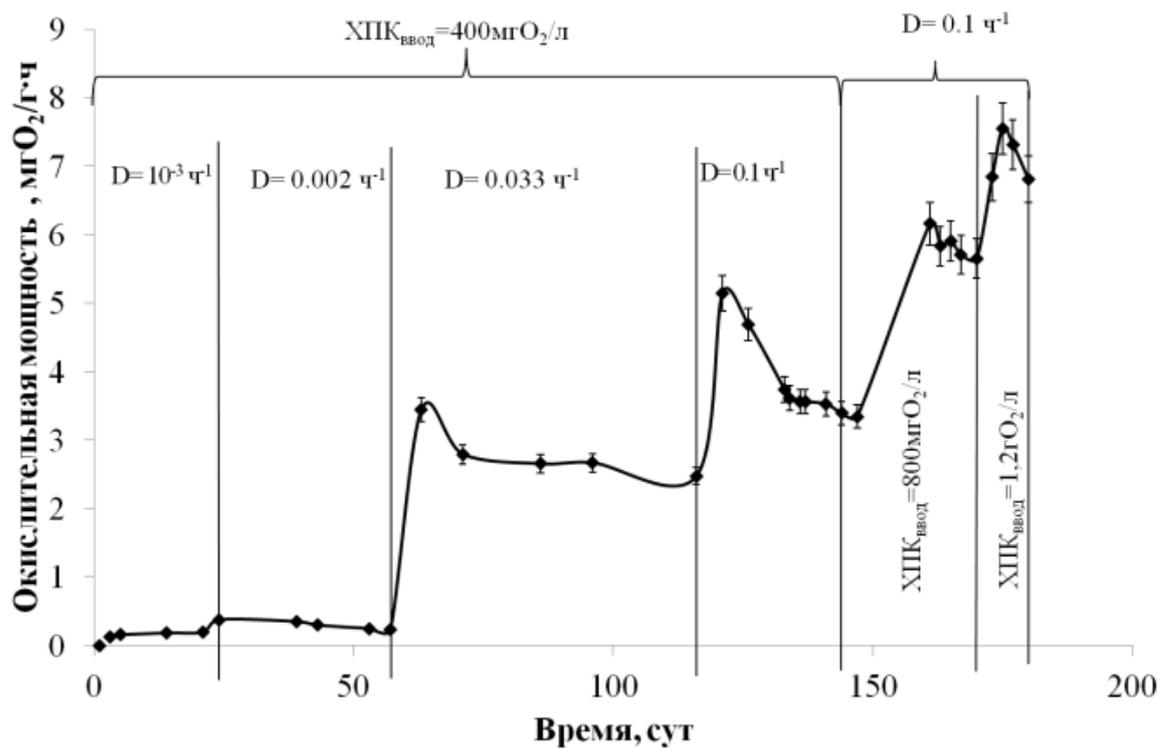


Рисунок 6.38 – Изменение окислительной мощности в ходе эксплуатации МБР с внесенным ГААИ.

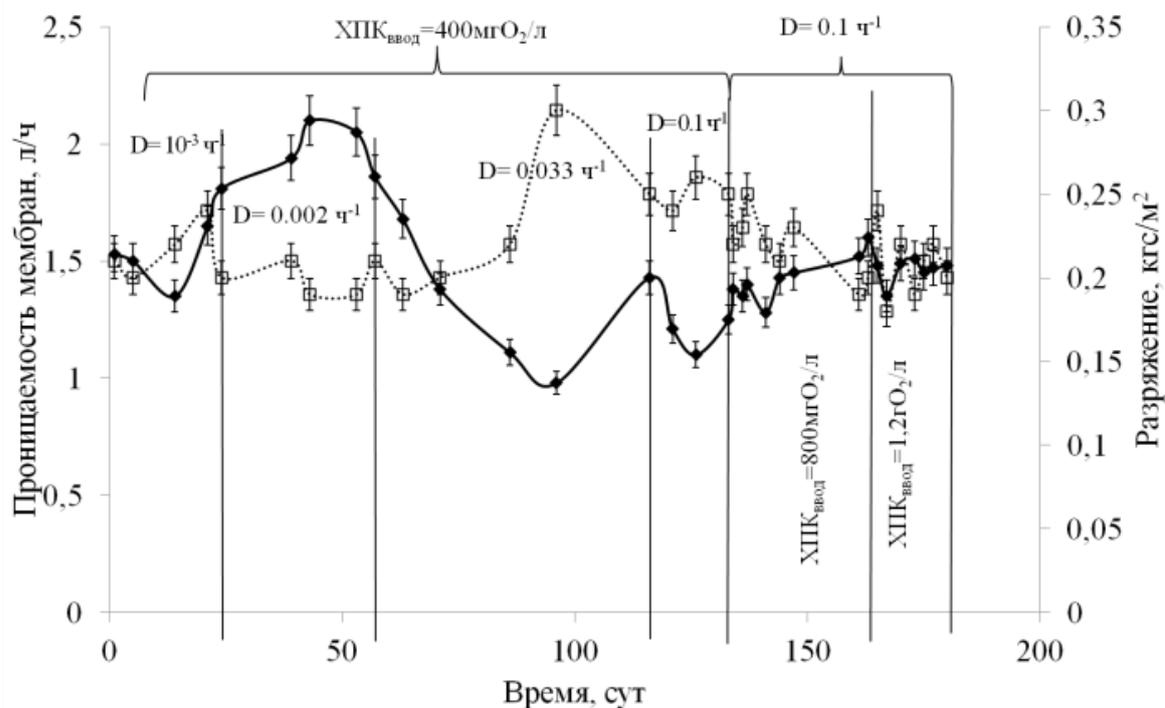


Рисунок 6.39 – Изменение проницаемости мембран и разности межмембранного давления в ходе эксплуатации МБР с внесенным ГААИ.

Мембранный биореактор, работающий в условиях контролируемого оксидативного воздействия с внесением  $H_2O_2$ , нами было предложено назвать «Искусственная перокси-сома». Систему очистки, одновременно сочетающую мембранные и биологические методы в едином объеме и в условиях комплексного воздействия оптимальных доз стресс- и антистресс-факторов можно уподобить пероксисомам эукариотических клеток.

Стресс-факторами в таком методе могут выступать активные формы кислорода (пероксид водорода в концентрации 20–2000 мг/л, анолит электрохимического разложения раствора  $NaHCO_3$ , мягкий ультрафиолет УФА или УФБ диапазона и др.). В качестве антистресс-фактора используется видимый свет, освещающий рабочую зону биореактора (с интенсивностью 10–100 Вт/м<sup>3</sup> водной среды в пересчете на энергию видимого света с длиной волны 555 нм). Оксидативное воздействие позволит уменьшить содержание остаточных субстратов и внеклеточных продуктов метаболизма в очищаемой среде, повысить биодоступность загрязнений, устойчивость микроорганизмов к загрязнениям, обеспечить высокую жизнеспособность клеток микроорганизмов, их физиологическую активность и ее стабильность в условиях недостатка питания, поддерживать на высоком уровне способность микроорганизмов окислять различные загрязнения (фенолы, углеводы, жиры и др.) в режиме высокоплотностной культуры при поддержании относительно высокой проницаемости мембран и увеличении производительности мембранного биореактора.

### **6.5. Исследование роста микроводорослей и цианобактерий применительно к условиям биологической очистки с контролируемым оксидативным воздействием**

Как было отмечено при анализе экспериментов с очисткой модельного стока пивоварения, для повышения качества биологической очистки сточных вод (по показателю ХПК на выходе) в условиях оксидативного воздействия важно контролировать водорослевую и цианобактериальную составляющие в альгобактериальном активном иле. Условия с освещением среды естественным или искусственным видимым светом могут стимулировать рост фототрофов, что нивелирует позитивный эффект. Проведенные нами эксперименты показали, что кислородные микроводоросли, включенные в хлопья активного ила и биопленку, увеличивают концентрацию органического вещества в очищаемой сточной воде с 30–50 мг/л (по ХПК) до 100–120 мг/л, поэтому для снижения численности фототрофов важно ограничивать освещенность очищаемой сре-

ды уровнями, достаточными для протекания фоточувствительных процессов, таких как фоторепарация, но недостаточными для интенсивного протекания фотосинтеза.

В этой связи были проведены дополнительные исследования с оценкой влияния оксидативного воздействия на альгобактериальные и цианобактериальные консорциумы микроорганизмов и возможных методов контроля их численности для предотвращения загрязнения очищаемой воды метаболитами фототрофов.

Основным объектом исследования являлся альгобактериальный ил, взятый из выше описанного лабораторного биореактора, работающего в режиме очистки модельного стока пивоварения.

После 3-х пересевов и 59 суток роста из микроценоза лабораторного биореактора были получены накопительные культуры микроводорослей на среде Тамия. При этом при последовательных пассажах по данным микроскопии наблюдалось снижение видового разнообразия с 7–8 видов в начале пассирования до 3 видов – в конце пассирования. В итоге, после пассирования были получены сообщества микроводорослей с примесью бактерий в количестве 1–2 в поле зрения микроскопа.

Анализ видовой структуры микроводорослей показал, что они, в основном, были представлены зелеными водорослями рр. *Scenedesmus* и *Chlorella*. Цианобактерии – в основном, рр. *Gleocapsa*, *Microcystis* и *Anabaena*. Нитчатые водоросли также присутствовали, но вспухания ила при этом не наблюдалось.

Выделенные накопительные культуры микроводорослей были использованы на дальнейших этапах работы – при изучении их отклика на оксидативный стресс, вызванный добавлением пероксида водорода.

Одновременно с лабораторным альгобактериальным консорциумом в сопоставительных целях использовали образцы цианобактериальных и альгобактериальных консорциумов, взятых из природных источников, а также три штамма бактериально-псевдомонад (см. раздел 3.2.7). Интересно было оценить возможность целенаправленного воздействия на межпопуляционные взаимоотношения в альгобактериальных и цианобактериальных сообществах при использовании контролируемого оксидативного стресса, в данном случае для борьбы с водорослевым зарастанием в биореакторах для очистки сточных вод.

Изоляты микроводорослей, выделенных на среде Тамия из лабораторного консорциума, были преадаптированы к внесению  $H_2O_2$  путем последовательных пассажей, аналогично тому, как это выполнялось с гетеротрофными микроорганизмами. Преадаптация проводилась в колбах Эрленмейера ( $V=250$  мл) с рабочим объемом среды 40 мл на качалке при аэрации с сульфитным числом  $0,19$  г  $O_2/л*ч$  (измерено при  $28$  °C), при комнатной температуре ( $20–22$  °C). Использовалась среда Тамия для

микроводорослей. Объем посевного материала во всех случаях составлял около 2%. Суммарное время роста в каждом пассаже – около 15 сут.

На начальной стадии адаптации вносили 10 мг/л  $H_2O_2$ . В предварительных экспериментах было определено, что внесение пероксида водорода наиболее целесообразно на шестые сутки роста популяции микроводорослей, когда достигается существенная плотность клеток (0,1–0,3 усл. ед.,  $\lambda = 540$  нм,  $l = 3$  мм), они активно размножаются, внесение  $H_2O_2$  не замедляет рост микроводорослей, а напротив, даже несколько стимулирует.

Всего в этих экспериментах путем последовательных пересевов поддерживались 3 линии водорослей, со следующими условиями:

Линия 1: Водоросли выращивались при освещенности 1000 Лк, всего использовалось 10 колб,  $H_2O_2$  вносился в дозах 0, 30, 90, 150, 210 мг/л в двух повторностях.

Линия 2: Водоросли выращивались при освещенности 1400 Лк, всего использовалось 8 колб,  $H_2O_2$  вносился в дозах 0, 10, 30, 60 мг/л в двух повторностях.

Линия 3: Водоросли выращивались при затемнении колб алюминиевой фольгой, всего использовалось 6 колб,  $H_2O_2$  вносился в концентрации 0, 10 и 30 мг/л в двух повторностях.

Эксперименты показали, что для микроводорослей линии 1 для первых двух пассажей при концентрациях вносимого  $H_2O_2$  30–90 мг/л наблюдается стимулирование роста, при более высоких концентрациях – рост микроводорослей тормозится. Затем по мере пассирования ингибирующий эффект пероксида усиливается, при этом водоросли не адаптируются к  $H_2O_2$ , и степень ингибирования возрастает с пересевами. После прекращения внесения  $H_2O_2$  рост всех линий быстро дерепрессируется и приближается к росту контрольной линии.

В экспериментах с линией 2 при концентрации  $H_2O_2$  10 мг/л наблюдалось небольшое стимулирующее действие пероксида водорода. Это стимулирующее действие более явно проявлялось по ходу преадаптации и стабильно воспроизводилось от пассажа к пассажию. Рост линии, неадаптированной к пероксиду, угнетался при внесении  $H_2O_2$ . Рост микроводорослей не зависел существенно от их численности в момент внесения  $H_2O_2$ .

В процессе адаптации к пероксиду водорода число доминирующих видов микроводорослей, определенное по результатам микроскопирования, снизилось с трех – для неадаптированной накопительной культуры до двух – для адаптированной в конце пассирования.

Отсутствие освещенности при ведении линии 3 на протяжении трех пассажей не привело к полному ингибированию роста микроводорослей, и через 10–14 сут. при естественной освещенности рост клеток и синтез хлорофилла возобновились.

Таким образом, в диапазоне концентраций пероксида водорода 10–90 мг/л возможно небольшое стимулирование роста микроводорослей (не более 5–10% к контрольному варианту без внесения  $H_2O_2$ ). При этом для проявления стимулирующего эффекта важно, чтобы популяция микроводорослей была преадаптирована к пероксиду водорода, устойчивость которых к  $H_2O_2$  повышается по мере увеличения числа пассажей. При концентрациях свыше 90 мг/л пероксид водорода угнетает развитие микроводорослей, при этом со временем эффект угнетения увеличивается. Стимулирование роста коррелирует с увеличением накопления хлорофилла и не сопровождается существенным изменением каталазной активности. В условиях отсутствия освещения среды, при гетеротрофном росте микроводорослей, низкие дозы  $H_2O_2$  также могут стимулировать рост популяции, преадаптированной к пероксиду. Репрессирующее или стимулирующее действие пероксида водорода нивелируется уже после первого пассажа популяции с момента прекращения внесения  $H_2O_2$ .

Эксперименты с примешиванием выделенной накопительной культуры микроводорослей, неадаптированных к пероксиду водорода, к активному илу, взятому из биореактора, с последующей очисткой модельного стока (пиво «Балтика 0» с дополнительно внесенным расчетным количеством азота в виде диаммонийсульфата) полученным смешанным илом показали, что добавление микроводорослей к активному илу приводит к ускорению очистки, причем очистка более полная в условиях затемнения среды. Это свидетельствует о том, что, во-первых, выделенные микроводоросли обладают достаточно высокой способностью к гетеротрофному дыханию как в темноте, так и на свету, и, во-вторых, способны накапливать внеклеточные метаболиты на свету.

При очистке смешанным илом одновременно наблюдалось поглощение фосфатов на свету и их выделение в темноте.

Удельная дегидрогеназная активность ила в рассматриваемых экспериментах при очистке на свету падала с увеличением доли микроводорослей, добавленных к активному илу и времени очистки. В темноте увеличение доли микроводорослей менее существенно сказывалось на удельной дегидрогеназной активности ила.

В пользу двойственной роли выделенных микроводорослей, обладающих способностью к гетеротрофному дыханию как в темноте, так и на свету, и при этом ускоряющих, с одной стороны, процессы окисления, а с другой, снижающих качество очистки на конечном этапе, свидетельствуют и результаты дополнительного

эксперимента при проведении очистки с чистой выделенной накопительной культурой микроводорослей, которые показали, что как адаптированная, так и неадаптированная накопительные культуры окисляют загрязнения при росте в темноте и на свету, а также образуют внеклеточные органические вещества на свету.

Альгицидная активность бактериальных компонентов и ее изменение при оксидативном воздействии оценивалась в исследованиях с образцами сообществ водорослей и цианобактерий, отобранных в районе дельты Волги (г. Астрахань) и из эвтрофицированного озера Диян Чи на юге Китая (г. Куньмин, провинция Юньнань). Наряду с этим для сравнительной оценки использовались бактериальные ризосферные штаммы р. *Pseudomonas*, обладающие альгицидной активностью и предоставленные Институтом молекулярной генетики РАН.

Образцы, отобранные в районе дельты Волги (г. Астрахань), представляли собой цианобактериальные маты с богатой микрофлорой. В них присутствовали и другие фототрофные организмы, а также большое количество бактерий. Однако попытки выделения отдельных цианобактериальных штаммов из исследуемых консорциумов не увенчались успехом. В то же время при высеве на бактериальной среде LA были получены грибной и бактериальные изоляты. Среди последних путем многократных пересевов, повлекших за собой обеднение видового состава сообщества, выделили три доминирующих после пассирования бактериальных грам-положительных штамма: желтый, кремовый и белый. Белый штамм был способен к росту как на богатой органикой бактериальной, так и на минеральной и безазотной среде (среде Кратца-Мейерса без добавления нитратов), а также к вторичному росту на цианобактериальном газоне. Эти штаммы были использованы на дальнейшем этапе работ, на котором проверялась их биологическая активность по отношению к цианобактериям.

В отобранных пробах из оз. Диян Чи по данным микроскопического анализа доминировали микроводоросли. Из этих образцов были получены накопительные культуры, в которых присутствовали сопутствующие виды бактерий, использующие, очевидно, экзометаболиты микроводорослей в качестве компонентов питания.

Выделенные из астраханских и китайских биоценозов изоляты – штаммы бактерий были адаптированы к внесению в культуральную жидкость пероксида водорода по процедуре, аналогичной описанной ранее для других объектов исследования. Целью такой преадаптации была оценка изменений в показателях физиологической активности бактерий и их возможной альгицидной активности.

Количество циклов внесений  $H_2O_2$  и пересевов на свежую питательную среду для штаммов, выделенных из астраханского консорциума, составило 20; для штаммов, предоставленных ИМГ РАН, – 10.

Как адаптированные, так и неадаптированные линии были протестированы на альгицидную активность по отношению к фототрофной составляющей образцов и альгобактериальных, и цианобактериальных консорциумов.

Опыты проводились со всеми исследуемыми бактериальными штаммами, адаптированными и неадаптированными к оксидативному стрессу, с внесением бактерий в разных концентрациях, в микроаэрофильных условиях: в пробирках малого диаметра, при отсутствии перемешивания. В этом случае аэрация происходила за счет свободной диффузии атмосферного кислорода через поверхность жидкой питательной среды. Пробирки оставались в лабораторном помещении при температуре окружающего воздуха, смешанном освещении днем и искусственном ночью. Такие условия можно считать приближенными к условиям существования цианобактериальных консорциумов и бактерий-антагонистов в малых закрытых водоемах (при отсутствии интенсивного движения воды).

При постановке эксперимента в пробирки заливали 9 мл стерильной питательной среды для микроводорослей или цианобактерий (типично среда BG-11), вносили 1 мл суспензии клеток соответствующих изолятов фототрофов, и выдерживали при комнатной температуре в течение примерно 2,5 недель. Затем в пробирки с выросшими микроводорослями или цианобактериями вносили по 0,5 мл культуральной жидкости предполагаемых бактерий антагонистов и вновь выдерживали 24 часа.

Критерием, по которому оценивалось проявление альгицидной активности, было содержание остаточного хлорофилла *a* в пробах после длительного (1,5–2 недели) непосредственного контакта фототрофных организмов с исследуемыми бактериальными штаммами.

По ходу опыта можно было визуально наблюдать следующие изменения, происходившие с цианобактериями и микроводорослями: в большинстве пробирок их цвет сменился с зеленого на светло-бурый или желтовато-белый, что свидетельствовало об изменении концентрации хлорофилла в пробах. В контрольных пробах, в которые бактерии не добавлялись, видимых изменений не наблюдалось.

Результаты опытов показали, что все выделенные бактерии вызывали лизис как цианобактериальных консорциумов, отобранных в районе дельты Волги, так и альгобактериальных ценозов, отобранных из озера Диян Чи, где доминирует водорослевая составляющая (рис. 6.40). Штаммы, выделенные из консорциума р. Волга, обладали большей альгицидной активностью по отношению к данному консорциуму и проявляли меньшую альгицидную активность по отношению к консорциуму из оз. Диян Чи.

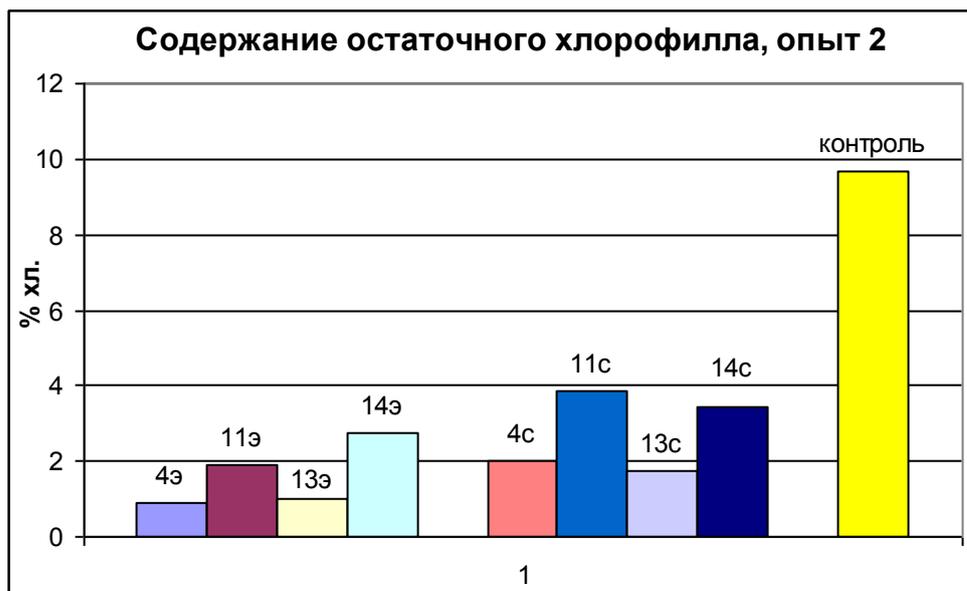


Рисунок 6.40 – Альгицидная активность некоторых штаммов, выделенных из цианобактериальных матов.

Э – внесение бактерий, находящихся в экспоненциальной фазе роста; С – внесение бактерий, находящихся в стационарной фазе роста.

По отношению к консорциумам, отобраным из оз. Диян Чи, наибольшей альгицидной активностью обладал штамм «кремовый», однако его эффективность сильно зависела от количества бактериальных клеток. При больших концентрациях и адаптированные к  $H_2O_2$ , и неадаптированные бактерии проявляли высокую альгицидную активность, а при низких – у адаптированных бактерий альгицидная активность снижалась, неадаптированные же бактерии усиливали рост цианобактерий по сравнению с контрольной пробой.

При длительном непосредственном контакте бактериальной биомассы с автотрофной составляющей исходного консорциума наиболее активные штаммы снижали содержание хлорофилла более чем на 60% (рис. 6.40).

Бактерии демонстрировали альгицидную активность при внесении полученной бактериальной суспензии в интервале от 5 до 17% от общего объема суспензии с фототрофами. В большинстве случаев уменьшение количества внесенных бактериальных клеток ниже 5% об. приводило к снижению альгицидной активности. Очевидно, должна быть минимальная пороговая численность бактерий, при которой начинается гибель фототрофов. Это также вытекает из того факта, что в оригинальных альгоцианобактериальных консорциумах выделенные бактерии присутствуют в определенной минимальной численности как компоненты матов. Эксперименты показали, что внесение бактериальной суспензии в количестве 0,5% об. оказывает действие, обратное

ожидаемому: способствуют увеличению количества фототрофных организмов, т.е. дозы ниже пороговых могут не только не вызывать альгицидное действие, но и приводить к увеличению численности цианобактерий и/или микроводорослей.

В большинстве случаев бактерии, находящиеся ко времени начала эксперимента в экспоненциальной фазе развития, демонстрировали немного более высокую альгицидную активность, чем находящиеся в стационарной фазе (рис. 6.40). Фототрофы в равновесной, стационарной фазе развития оказались более устойчивы к альгицидному воздействию бактерий, чем фототрофы в экспоненциальной фазе (рис. 6.41). Это подтверждает то, что выбранные бактериальные штаммы являются антагонистами по отношению к цианобактериям и микроводорослям, а не сапрофитами, осуществляющими разложение мертвого биоматериала автотрофов.

По сравнению со штаммами р. *Pseudomonas*, предоставленными Институтом молекулярной генетики РАН, выделенные штаммы обладали более ярко выраженной альгицидной активностью.

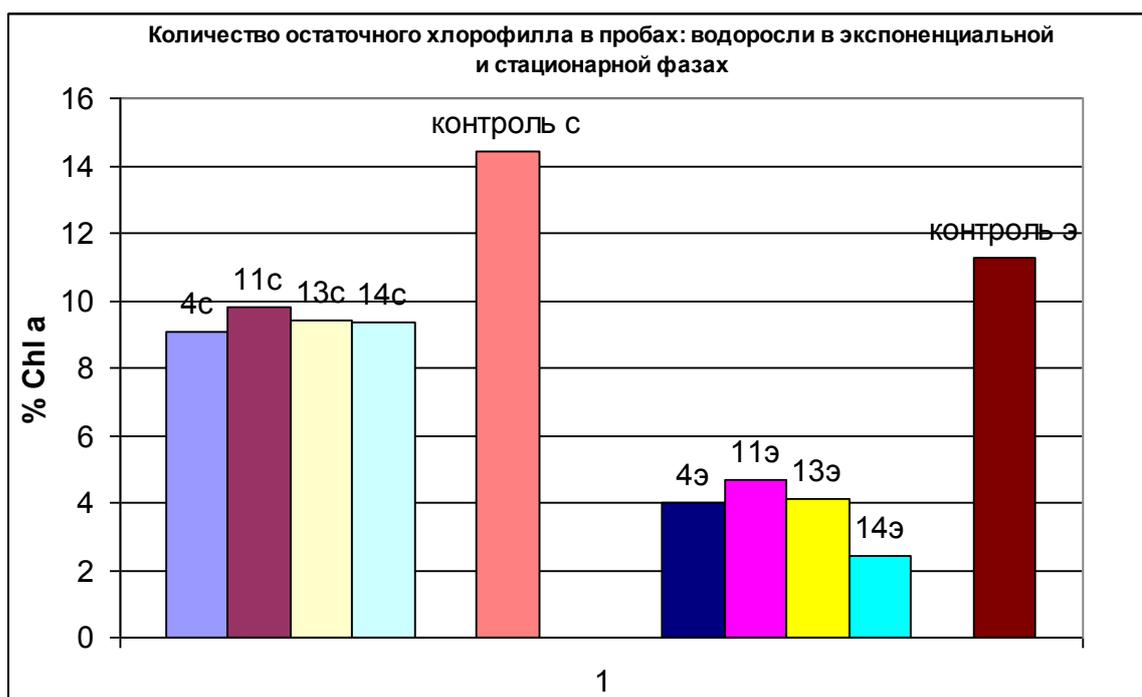


Рисунок 6.41 – Влияние фазы развития автотрофов на альгицидную активность бактерий.

Э – внесение бактерий в момент экспоненциальной фазы роста фототрофов; С – внесение бактерий в момент стационарной фазы роста автотрофов.

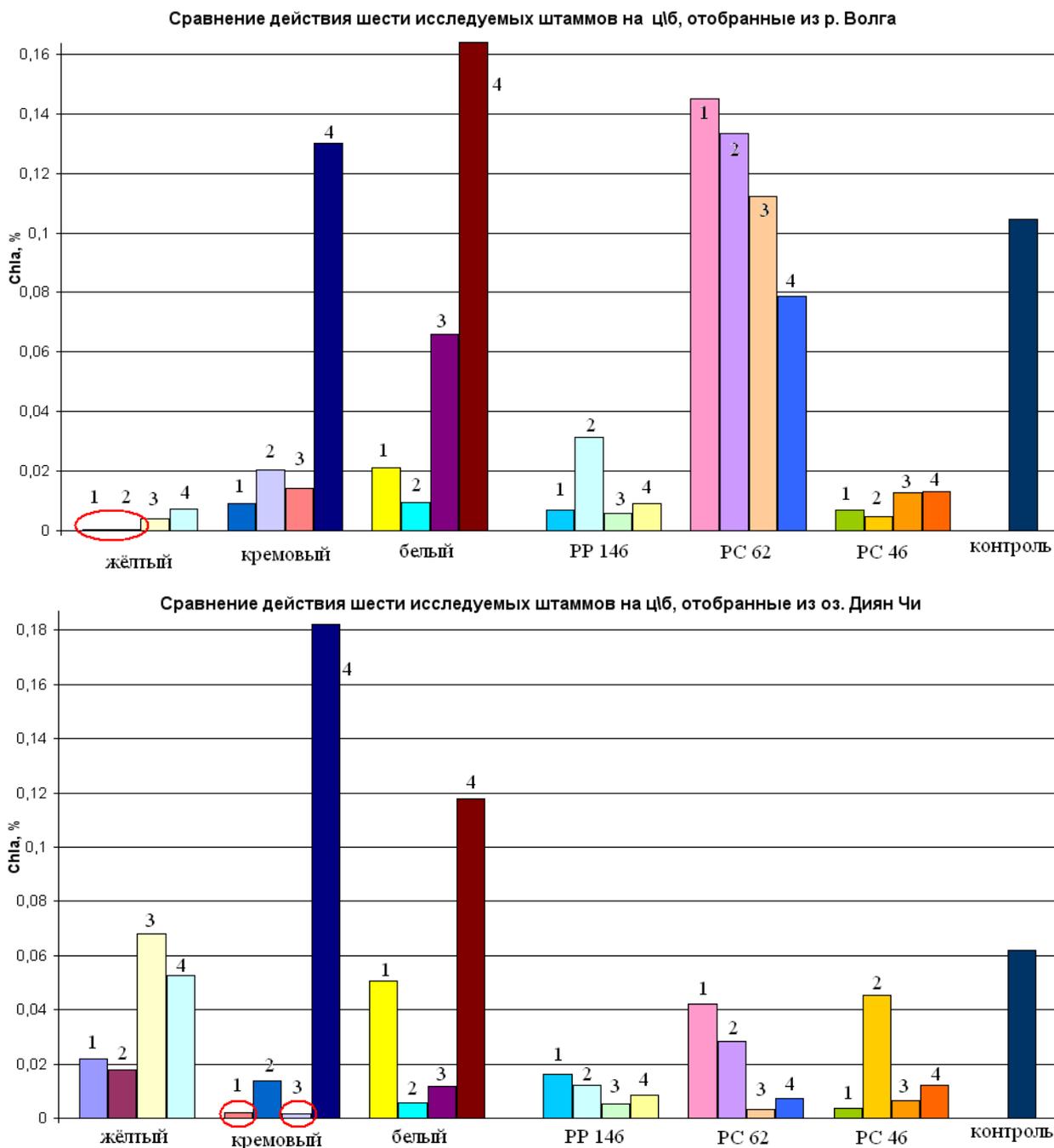


Рисунок 6.42 – Альгицидная активность выделенных и тестируемых штаммов (по результатам экспериментов с определением уровня хлорофилла в клетках цианобактерий и микроводорослей)

1 – адаптированный штамм, концентрация внесенных клеток бактерий 0,28 г/л

2 – адаптированный штамм, концентрация внесенных клеток бактерий 0,07 г/л

3 – неадаптированный штамм, концентрация внесенных клеток бактерий 0,28 г/л

4 – неадаптированный штамм, концентрация внесенных клеток бактерий 0,07 г/л

Красным цветом обведены пробы, в которых наблюдается наилучшая альгицидная активность. PP и PC – ризосферные штаммы псевдомонад, предоставленные ИМГ РАН.

Интересно было выяснить, будет ли альгицидная активность выделенных штаммов в той же степени проявляться по отношению к фототрофной составляющей аллохтонного консорциума. В качестве такового был выбран изолят фототрофных организмов, развившихся на освещаемых поверхностях лабораторного ферментера, моделирующего аэробную очистку сточных вод пивоваренного производства, с которым были проведены эксперименты, описанные в разделе 6.1.3. Проверка показала, что альгицидная активность выделенных штаммов по отношению к аллохтонным автотрофам оказалась ниже, чем по отношению к автотрофам исходного консорциума, и требовалось больше времени для ее проявления.

При прочих равных условиях преадаптация штамма к  $H_2O_2$  резко повышала его альгицидную активность (рис. 6.42). По отношению к цианобактериальным консорциумам из р. Волги выделенный из них бактериальный штамм «желтый», адаптированный к оксидативному стрессу, показал наибольшую альгицидную активность. По отношению к альгобактериальным консорциумам из оз. Диян Чи наибольшей активностью обладал штамм «кремовый». И при высоких, и при низких концентрациях этих бактерий наблюдалось практически полное отсутствие хлорофилла в анализируемых пробах (рис. 6.42). Наиболее активные штаммы, адаптированные к оксидативному стрессу, снижали содержание остаточного хлорофилла *a* в образце из р. Волга в 500 раз, а в образце из оз. Диян Чи – в 30 раз. Таким образом, преадаптация штаммов-антагонистов к оксидативному стрессу существенно повышает их альгицидную активность.

После того, как была показана альгицидная активность исследуемых бактериальных штаммов и ее возрастание при адаптации к оксидативному стрессу, возник вопрос: по какому из механизмов бактериального лизиса цианобактерий/микроводорослей происходит взаимодействие между исследуемыми альгоцианобактериальными консорциумами и бактериальными штаммами.

Известны три механизма, по которым бактерии осуществляют лизис цианобактерий: продуцирование внеклеточных лизирующих веществ, контактный лизис – присоединение бактерий к цианобактериям и захватный лизис – захват цианобактерий бактериальными клетками [1928]. Так, было показано, что один из бактериальных штаммов, выделенный из озера Диян Чи, относится к представителям р. *Pseudomonas*. Он продуцирует лизирующее вещество, наиболее эффективно разрушающее клетки *Microcystis viridis*, *Selenastrum capricornutum* и др. при низких температурах и отсутствии освещения [1960]. Кроме того, было показано, что бактерии вида *Pseudomonas mendocina* продуцируют вещества, вызывающие сильный оксидативный стресс у исследо-

ванных цианобактерий вида *Aphanizomenon flosaquae*, при этом псевдомонады обладают высокой активностью ферментов, ответственных за разложение активных форм кислорода [1910]. Оксидативный стресс для цианобактериальных клеток способны вызывать также бактерии рода *Achromobacter*; фильтрат культуральной жидкости после автоклавирования и обработки протеиназой сохраняет альгицидную активность, т.е. лизирующие внеклеточные метаболиты термостабильны и имеют небелковую природу.

Для определения типа механизма альгицидного действия выбранных бактериальных штаммов были проведены эксперименты, в которых в непосредственный контакт с фототрофными организмами была приведена культуральная жидкость бактерий, не содержащая самих клеток бактерий (КЖ была центрифугирована при 7000 об/мин в течение 30 мин). Ранее все опыты, в которых была доказана альгицидная активность штаммов, проводились в присутствии бактериальных клеток. Также были проведены опыты по диализному культивированию цианобактерий.

При проведении экспериментов с диализным культивированием цианобактерий в качалочные колбы было внесено по 50–70 мл цианобактериальной суспензии (среда Кратца-Мейерса + измельченные образцы альгоцианобактериальных матов, как из р. Волги, так и из оз. Диян Чи). В целлофановые диализные мешки было внесено одинаковое количество стерильно отцентрифугированной биомассы исследуемых бактериальных культур (количество биомассы соответствует концентрации 0,28 г/л). Диализные мешки помещены в колбы с цианоальгобактериальной суспензией и выдержаны в течение полутора-двух недель при комнатной температуре и освещении лампами дневного света. В течение времени проведения опыта, как и для предыдущего опыта с определением типа взаимодействия бактерий с цианобактериями, можно было наблюдать постепенное изменение цвета проб с зеленого на светло-бурый, что свидетельствовало о проявлении альгицидной активности выделенных штаммов.

По окончании опыта было определено содержания хлорофилла в пробах (рис. 6.43), а также проведено микроскопирование суспензий в диализном мешке и вне его.

Результаты микроскопирования показали значительное присутствие исследуемых бактерий в диализном мешке и незначительное – вне его. Наличие бактерий вне мешка лишь в минорном, фоновом количестве, в котором они могут присутствовать в исходных цианобактериальных матах, в то время как основная масса бактерий находится внутри диализного мешка, свидетельствует не в пользу их антагонистического действия за счет прямого контакта. Поскольку цианобактериальная суспензия и биомасса бактерий были разделены полупроницаемой мембраной, препятствующей непосредственному контактированию, но не препятствующей выходу бактериальных ме-

таболитов, то скорее всего альгицидное действие обусловлено низкомолекулярными бактериальными метаболитами. Об этом же свидетельствуют результаты экспериментов с удалением бактериальных клеток центрифугированием, когда наблюдается столь же высокая альгицидная активность, как и в не центрифугированных пробах. Возможно, что какие-то бактериальные метаболиты, выходя из диализного мешка, могут инициировать развитие соответствующих бактерий-антагонистов, неизбежно присутствующих в цианобактериальном консорциуме (например, через механизм *quorum sensing*).

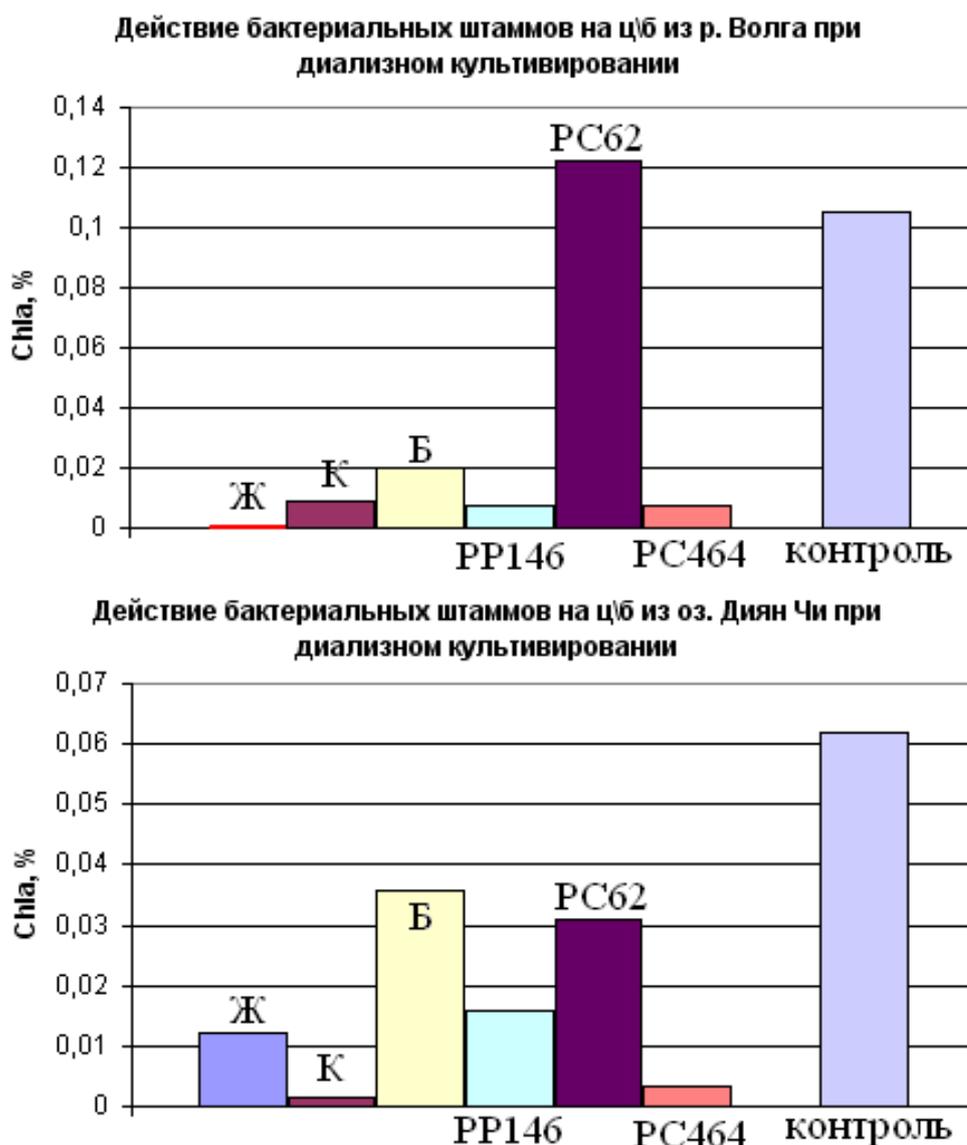


Рисунок 6.43 – Содержание хлорофилла после диализного культивирования цианобактерий и адаптированных к оксидативному стрессу бактериальных штаммов.

Ж – штамм «желтый», К – штамм «кремовый», Б – штамм «белый», PP и PC – штаммы псевдомонад.

Таким образом, результаты диализного культивирования свидетельствуют, что альгицидное действие выделенных бактерий обусловлено в первую очередь образуемыми ими низкомолекулярными экзометаболитами.

Эксперименты с биологической очисткой модельных стоков в условиях добавления пероксида водорода, освещения очищаемой среды низкоинтенсивным видимым светом, когда возможно появление и неблагоприятное воздействие на биологическую очистку фототрофов, показали, что в этих условиях основным способом борьбы с избыточным ростом микроводорослей может быть поддержание освещения обрабатываемой среды на уровне, достаточном лишь для протекания фоторепарации у микроорганизмов активного ила, но недостаточном для интенсивного роста микроводорослей. С учетом быстрой скорости генерации бактериальных клеток активного ила, низкой скорости генерации и быстрой скорости деадаптации фототрофов, элиминированию последних может также способствовать дробный режим внесения  $H_2O_2$  с интервалами 2–4 сут. Усиление альгицидной активности бактериальных компонентов при оксидативном воздействии также может способствовать элиминированию фототрофной составляющей из состава активного ила очистного сооружения и повышению качества очистки сточной воды.

#### **6.6. О возможных причинах позитивных изменений при оптимальных воздействиях пероксида водорода и других АФК**

Улучшение показателей биосинтеза и биологической очистки, наблюдаемое нами при оптимальных условиях воздействия АФК, и подтвержденный приоритет разрабатываемого подхода в определенной степени противоречат сложившемуся и господствующему мнению о негативной роли оксидативного стресса по отношению к живым организмам. В этой связи возникает вопрос о причинах наблюдаемых позитивных эффектов и роли, в частности, пероксида водорода. Позитивные изменения, обусловленные действием  $H_2O_2$ , в принципе, могут быть объяснены как следствие следующего:

- 1)  $H_2O_2$  непосредственно окисляет субстрат с образованием более доступных для микроорганизмов продуктов;
- 2) пероксид водорода окисляет внеклеточные метаболиты – ингибиторы роста и биосинтеза;
- 3) снижение ХПК при добавлении  $H_2O_2$  обусловлено непосредственным окислением субстратов пероксидом водорода;

4) под действием  $H_2O_2$  токсичные субстраты (фенол) трансформируются с образованием нерастворимых полимеров;

5) пероксид водорода служит дополнительным источником кислорода при своем разложении, что важно для процессов с лимитированием роста и жизнедеятельности кислородом;

6) синтез защитных веществ в клетках микроорганизмов в ответ на оксидативный стресс;

7) вследствие оксидативного стресса, индуцируемого  $H_2O_2$ , происходит общая перестройка метаболизма микроорганизмов;

8) повышение индукции ферментов окисления субстрата, что приводит к более полному окислению его и интермедиатов;

9)  $H_2O_2$  выступает как регулятор физиологического состояния популяции и внутриклеточных процессов;

10)  $H_2O_2$  воздействуют на процессы аэробно-анаэробно в клетках, например, замедляя падение активности ферментов аэробного метаболизма в отсутствие аэрации среды;

11) изменение фенотипической стабильности или, напротив, гетерогенности популяций, состава консорциума и трофических взаимоотношений, ведущие к благоприятным изменениям.

Предположения 1) и 2) о роли  $H_2O_2$  как химического агента, способного разлагать субстрат и/или ингибиторы метаболизма субстрата и участвовать, таким образом, в процессе «самоочищения» среды культивирования, представляются маловероятными, поскольку, как уже отмечалось, при добавления пероксида водорода наблюдается безингибиторное разложение субстрата (фенола) без накопления внеклеточных ингибиторов и остаточных продуктов метаболизма во внеклеточной среде при окислении достаточно больших количеств фенола – в интервале его суммарного внесения от 40 до 100 г/л (см. рис. 6.14). Кроме того, позитивные изменения наблюдаются и при росте дрожжей *C. tropicalis* на сахарозе – субстрате, легко доступном для микроорганизмов.

Участие  $H_2O_2$  в окислении субстратов и снижении ХПК возможно (предположение 3), однако вносимые дозы пероксида водорода несравненно ниже, чем наблюдаемая разница в падении ХПК по сравнению с вариантом без внесения  $H_2O_2$ , т.е. позитивные эффекты не связаны с прямой химической, фотохимической или фотокаталитической деструкцией органических загрязнений под действием АФК.

Образование нерастворимых полимерных производных из избыточных количеств токсичного субстрата в экспериментах с биодеструкцией фенола (предположение 4)

также представляется неосновной причиной наблюдаемого эффекта, поскольку их количество по данным анализа составляет не более 17 г на 100 г внесенного фенола.

Поскольку в среду вносится малое количество пероксида водорода и соответственно может образовываться лишь незначительное количество дополнительного кислорода, то предположение 5 также следует исключить из рассмотрения.

Стимулирование образования защитных веществ (предположение 6) скорее всего не является основной причиной позитивных воздействий контролируемого оксидативного стресса, поскольку в противном случае сложно объяснить универсальность наблюдаемых изменений и факт улучшения многих показателей биосинтеза и биологической очистки.

Предположения 7–10 могут быть объединены в общую группу «изменение метаболизма популяции под действием  $H_2O_2$ ». В пользу этих предположений свидетельствует универсальность обнаруженных эффектов, показанная на примере различных модельных систем. Для проявления положительного эффекта пероксид водорода достаточно вносить в среду в количестве 10–25 мг/л. Эффект таких относительно малых доз  $H_2O_2$  на фоне воздействия видимого света в отношении повышения качества очистки свидетельствует не о непосредственном химическом воздействии пероксида водорода на загрязнение, а о регуляторной, физиологической роли комбинированного воздействия  $H_2O_2$  и видимого света. Предположения об определенных системных изменениях во внутриклеточном метаболизме и участии пероксида водорода (в общем случае оксидативного стресса) в стимулировании биосинтеза и биодеструкции, в регуляции физиологического состояния популяции микроорганизмов опираются и на литературные данные, рассмотренные в главе 2.

Основываясь на существующих данных можно утверждать, что обнаруженная возможность определенного положительного совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов на микроорганизмы, на показатели биосинтеза обусловлена протеканием двух разнонаправленных процессов метаболического ответа: 1) изменением внутриклеточного метаболизма под действием факторов оксидативного стресса и 2) индукцией фоточувствительных систем ответа на оксидативный стресс, вероятно, системы фоторепарации и кросс-реакций метаболически связанных с фоторепарацией других систем ответа на стресс. Также в ответ на оксидативный стресс могут быть вовлечены внутриклеточные системы и процессы, связанные с голоданием, сменой субстратов, тепловым шоком, осмотическим воздействием, репарацией ДНК, с кворум-сенсингом, переходом в активное или покоящееся состояние, с катаболитной депрессией, одновременно активируемыми при стрессовых воздействиях и функционирующими в тесной связи друг с другом. О наличии перекрестных кросс-реакций

свидетельствуют и данные о схожей реакции микроорганизмов на действие мягкого УФА излучения и видимого света, пероксида водорода и видимого света, анолита электрохимического разложения и видимого света.

Популяционные изменения (предположение 11), видимо, имеют место, поскольку путем адаптации микробных клеток к постепенно повышающимся дозам окислительных стресс-факторов можно добиться повышения их устойчивости. На уровне фенотипа устойчивость обеспечивается спустя несколько часов «запуском» систем ответа на оксидативный стресс. Изменения на уровне генотипа могут заключаться в отборе клонов с повышенным количеством ферментов и протекторов, участвующих в защите клеток. Наряду с этим в замкнутых непрерывных системах культивирования с частичным или полным рециклом биомассы, когда высокие скорости роста не имеют большого значения, возможен дрейф физиологических свойств популяций в сторону более полного использования субстрата. Для таких микроорганизмов, как этанолсинтезирующие дрожжи, молочнокислые бактерии, выделение продуктов брожения в окружающую среду играет важное физиологическое значение для поддержания жизнедеятельности, поскольку трансмембранный перенос этих продуктов обеспечивает клетки дополнительной энергией – до 30% от совокупной энергии гликолиза в условиях анаэробноза. Поэтому автоселекция в таких замкнутых системах благоприятна для клеток, более полно и экономично использующих субстрат и более активно продуцирующих внеклеточные продукты гликолиза (этанол, молочную кислоту и др.). Также автоселекция в этих условиях должна быть более благоприятна для клеток, устойчивых к голоданию и к другим стрессам. Такая устойчивость повышается в условиях образования микробными клетками агрегатов, флокул, биопленок, гранул [1583, 1693, 1694]. В последнем случае отбор также идет в сторону более полного использования субстрата и, как следствие, повышения эффективности очистки сточных вод. Этому же способствуют сукцессионные изменения в сообществах очистных сооружений.

При использовании продуцентов-сверхсинтетиков, полученных традиционными методами селекции или методами геной и метаболической инженерии, во всех случаях при отсутствии направленного селективного давления отбор не благоприятствует сохранению их целевой биосинтетической активности, в норме не нужной клеткам. Мутанты-ревертанты, утратившие внедренные изменения генотипа или генетическую конструкцию, всегда будут либо более эффективно использовать субстрат для своего роста и сохранения жизнедеятельности, либо расти с более высокой скоростью. Любой процесс, ведущий к нестабильности генома, будет способствовать быстрой утрате микробной популяцией внедренных изменений. В аэробных условиях этому может

способствовать воздействию активных форм кислорода, всегда образующихся в качестве побочных продуктов аэробного дыхания и провоцирующих образование мутантных или модифицированных форм [332, 348]. Таким образом, для рекомбинантных продуцентов единственная стратегия сохранения их биосинтетической активности в условиях культивирования в биореакторе – использование методов, повышающих стабильность измененного генома. При аэробном культивировании методами стабилизации, в частности, могут быть фоторепарация, внесение антиоксидантов в ферментационную среду или нейтрализация веществ – компонентов питательной среды с оксидантной или прооксидантной активностями.

Иными словами, в условиях оксидативного стресса ускорение микроэволюционного процесса, который сопровождается появлением субпопуляций с различиями по морфологическим, физиологическим, биохимическим и генетическим признакам, может компенсироваться повышением устойчивости субпопуляций к факторам оксидативного стресса. Эти совместные процессы могут нивелировать стрессовые воздействия у адаптированной популяции. Применение антистрессоров – факторов, нивелирующих действие стрессоров, в частности с антиоксидантной активностью, может замедлить скорость микроэволюции и повысить устойчивость заданных свойств популяции. Напротив, наличие в среде факторов с оксидантной и прооксидантной активностями способствует микроэволюционному процессу. Вместе с тем, сами по себе адаптационные или эволюционные изменения без физиологических, биохимических и регуляторных изменений на клеточном уровне не приведут к положительным эффектам. Лишь совместные изменения метаболизма и популяционные изменения при целенаправленном оксидативном воздействии на культивируемые микроорганизмы могут вносить вклад в улучшение выходных показателей. Для аэробных и факультативных микроорганизмов, использованных в нашей работе, это проявляется в приобретении способности более полно окислять вещества с уменьшением количеств остаточных концентраций субстратов и/или побочных метаболитов, накапливаемых в среде культивирования и ингибирующих рост популяции. Эффективность минерализации органического субстрата в данном случае близка к 100% (без учета небольшой части субстрата, перешедшей в биомассу). Доли жизнеспособных и физиологически активных клеток, преадаптированных к  $H_2O_2$  на фоне освещения среды культивирования, способность к их совместной адгезии и агрегации повышаются, клетки сохраняют свою измененную физиологию в течение достаточно длительного времени. Их активность мало меняется после длительного субстратного голодания и сохраняется в течение достаточно длительного времени без внесения  $H_2O_2$ .

Наконец, еще одно обстоятельство, которое надо учитывать, – возможность одновременного прооксидантного и антиоксидантного действия факторов окружения: видимого света и химических веществ, в том числе компонентов питательных сред и продуктов метаболизма, находящихся в среде.

Прооксидантное действие, проявляющееся как эффект старения среды, наблюдалось нами в опытах с галобактериями и с продуцентом рибофлавина. Свет в этом случае также может выступать как фактор с прооксидантными и антиоксидантными свойствами. Прооксидантное действие света может проявляться в виде увеличения количества окисленных продуктов фотохимической трансформации веществ, в частности, каротиноидов. Антиоксидантное действие света может проявляться через механизм стимулирования синтеза каротиноидов и фоторепарацию. При участии фоторепарации эффект будет зависеть от свойств фотолиазы, как ключевого компонента фоторепарации, максимум активности которой наблюдается при освещении среды светом в диапазоне спектра 380–450 нм.

Прооксидантное действие может быть также устранено обработкой ферментационной среды адсорбентами, как у галобактерий, или добавлением химических антиоксидантов.

Все это свидетельствует о важности оптимальных воздействий факторов оксидативного стресса (перекисей, радикалов, УФ-излучения) на популяции микроорганизмов.

## **6.7. Опытные испытания технологии биологической очистки сточных вод с использованием регулируемого оксидативного воздействия**

Основываясь на полученных экспериментальных данных по биологической очистке сточных вод с использованием совместного воздействия  $H_2O_2$  и видимого света, названной нами РОВ-технология [1940], с февраля 2020 г. при поддержке фирмы ТДС, Министерства ЖКХ Московской области, администрации Коломенского района Московской области и администрации города Клин были проведены испытания предложенной технологии на действующих очистных сооружениях.

### **6.7.1. Опытные испытания РОВ-технологии на поселковых очистных сооружениях**

Опытные испытания разработанной технологии биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) проводились в период с 20.02.2020 по 18.06.2020 по согласованной про-

грамме на поселковых Черкизовских очистных сооружениях Коломенского района (Московская обл.).

Характеристика очистных сооружений.

Место локализации – д. Черкизово, Коломенский р-н, Московская обл.

Схема биологической очистки – аэротенк-смеситель с вторичным отстойником.

Объем очистных сооружений – 150 м<sup>3</sup>.

Глубина толщ воды в аэротенке – 3,5 м.

Поток сточной воды – 160–240 м<sup>3</sup>/сут.

Время пребывания воды в очистных сооружениях – 15–23 час.

Подача сточной воды – в автоматическом отъемно-доливном режиме с включением подачи новой порции воды в течение 20 мин через каждый час в объеме 8–10 м<sup>3</sup> на вход в очистные сооружения и отводом соответствующего количества воды из вторичного отстойника.

Среднее содержание загрязнений в период испытаний:

- взвешенные вещества  $ВВ_{ср.вход}$  – 257 мг/л,

- ХПК<sub>ср.вход</sub> – 609 мг/л,

- аммонийный азот  $N-NH_{4ср.вход}$  – 19,4 мг/л,

- азот нитратов  $N-NO_{3ср.вход}$  – 0,3 мг/л,

- фосфор фосфатов  $P-PO_{4ср.вход}$  – 4,3 мг/л.

В приложении 1 к диссертационной работе более подробно описаны подготовка очистных сооружений к испытаниям, содержание технологического и химико-аналитического контроля, этапность испытаний и изменение показателей очистки в ходе испытаний.

На рис. 6.44 представлены изменения содержания взвешенных веществ и ХПК в ходе проведения испытаний, а в табл. 6.12 – результаты испытаний в обобщенном виде.

Из рис. 6.44 видно, что внесение РОВ-активатора с постепенным увеличением суточной дозы приводит к адаптации активного ила к оксидативному воздействию реагента. После адаптации ила внесение активатора в дозах 12 л/сут (в пересчете на активное вещество – 4 г/м<sup>3</sup>.сут) приводит к снижению показателя ХПК в выходной воде до недетектируемых величин (менее 10 мг/л), т.е. до значений, близких к нулю. Эффект снижения ХПК до минимально возможных значений был стабилен и наблюдался на протяжении более чем 30 суток, когда активатор (пероксид водорода) вносился в оптимальных дозах.

Одновременно наблюдалось повышение скорости и степени нитрификации и снижение содержания фосфатов в выходящей воде, а также возрастание удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды. При пре-

кращении внесения активатора (этап 3 испытаний) показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до его внесения (на этапе 1 испытаний).

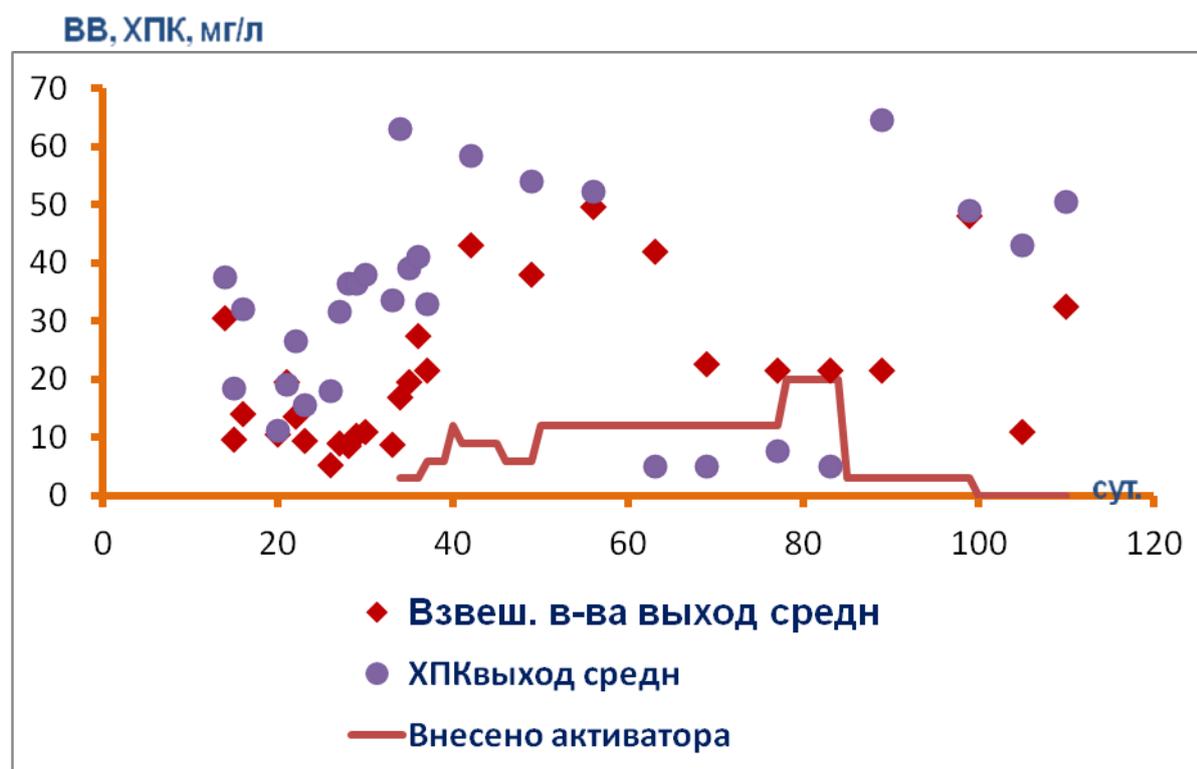


Рисунок 6.44 – Изменение во времени содержания взвешенных веществ и ХПК на выходе из очистных сооружений.

Таблица 6.12 – Усредненные показатели очистки на выходе из ОС

Вариант	ВВ <sub>вых</sub>	ХПК <sub>вых</sub>	N- NH <sub>4</sub> <sub>вых</sub> х	N- NO <sub>3</sub> <sub>вых</sub> х	P- PO <sub>4</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт- ть ила по удале- нию N-NH <sub>4</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт- ть ила по нитри- фикации N-NO <sub>3</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт- ть ила по дефосфа- тации P-PO <sub>4</sub> <sub>вых</sub>
Без реаген- та, среднее, мг/л	28,3	51,8	7,9	7,9	2,2	3,6	7,7	0,5
С реаген- том, среднее, мг/л	26,9	<b>5,7</b>	<b>6,0</b>	<b>10,8</b>	<b>1,6</b>	<b>5,2</b>	<b>10,5</b>	<b>1,1</b>

Испытания показали, что внесение реагента в оптимальных дозах приводит к снижению остаточного содержания загрязнений в выходящей сточной воде: по ХПК –

оценочно в 8–10 раз, по фосфатам – в 1,3–1,5 раз с одновременным повышением нитрифицирующей и денитрифицирующей активностей в 1,1–1,3 раз, возрастанием скорости денитрификации, удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды.

Таким образом, применительно к поселковым сооружениям биологической очистки сточных вод проведенные испытания технологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) показали высокую эффективность в отношении удаления органических загрязнений с возможностью достижения степени очистки в одностадийном процессе по показателю ХПК 99,2%, что обеспечивает абсолютные значения ХПК в очищенной воде близкие к нулю с одновременным повышением степени удаления биогенных элементов из сточных вод.

### **6.7.2. Опытные испытания РОВ-технологии на городских очистных сооружениях**

Опытные испытания разработанной технологии биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) проводились в период с 15.06.2020 по 17.08.2020 по согласованной программе на городских очистных сооружениях г. Клин (Московская обл.).

Характеристика очистных сооружений.

Место локализации – деревня Ямуга Клинского района, Московская обл.

Схема биологической очистки очистных сооружений (ОС) – 2 линии аэротенков одинаковой конструкции с общим вторичным отстойником.

Конструкция аэротенка – трехкоридорный аэротенк вытеснительного типа объемом 6500 м<sup>3</sup> с зоной интенсивного смешения объемом 430 м<sup>3</sup> и усиленной аэрации поступающей с первичного отстойника сточной воды и поступающего с вторичного отстойника возвратного активного ила с очисткой в режиме вытеснения.

Особенность схемы очистки – очищенная вода с обеих линий аэротенков поступает в общий вторичный отстойник, откуда часть осевшего активного ила направляется на вход аэротенков обеих линий.

Проектная суточная производительность ОС – 30000 м<sup>3</sup>.

Фактическое поступление – 22000–25000 м<sup>3</sup>/сутки.

Поток сточной воды на каждый аэротенк – 11000–13000 м<sup>3</sup>/сутки.

Время пребывания воды в ОС – 10–12 часов.

Глубина водной толщи воды в аэротенке – 4,5 м.

Подача сточной воды – непрерывно.

Среднее содержание загрязнений во входной воде после первичного отстойника перед входом в аэротенки в период испытаний:

- взвешенные вещества  $ВВ_{\text{ср.вход}}$  – 81,9 мг/л,
- ХПК $_{\text{ср.вход}}$  – 173,8 мг/л,
- аммонийный азот  $N-NH_{4\text{ср.вход}}$  – 13,5 мг/л,
- нитраты  $N-NO_{3\text{ср.вход}}$  – 0,4 мг/л,
- фосфаты  $PO_{4\text{ср.вход}}$  – 10,0 мг/л.

В приложении 2 к диссертационной работе более подробно описаны подготовка очистных сооружений к испытаниям, содержание технологического и химико-аналитического контроля, этапность испытаний и изменение показателей очистки в ходе опытно-промышленных испытаний. В ходе испытаний избыточный активный ил, осевший во вторичном отстойнике, не отводился. Часть ила вымывалась лишь в виде взвешенных веществ, отводимых из вторичного отстойника с осветленной сточной водой.

На рис. 6.45 сопоставлено изменение содержания взвешенных веществ, на рис. 6.46 – содержания  $N-NH_4^+$  на выходе из аэротенков (усредненно по двум аэротенкам) в зависимости от суточной дозы реагента.

Обращает на себя внимание явное влияние дозы РОВ-активатора на снижение содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений (рис. 6.45), при этом в отдельные моменты при внесении реагента в количестве 1,5–2,4 мг/л наблюдалось снижение взвешенных веществ на выходе вплоть до величин 0,5–1,5 мг/л. Аналогичная зависимость наблюдается между дозой РОВ-активатора и  $N-NH_{4\text{вых}}$  (рис. 6.46). Среднее содержание  $N-NH_4$  по данным аналитической лаборатории очистных сооружений, предоставленным до начала испытаний, в выходящей сточной воде составляло около 1,5 мг/л. Внесение же реагента в период испытаний приводило к снижению  $N-NH_4$  до величин 0,3–0,5 мг/л. На выходные показатели очистки по ХПК,  $N-NO_3$ ,  $P-PO_4$  явного влияния РОВ-активатора в суточных дозах до 2,4 г/м<sup>3</sup> не прослеживалось.

Таким образом, результаты опытно-промышленных испытаний РОВ-технологии на городских очистных сооружениях подтвердили возможность существенного улучшения выходных показателей очистки, в данном случае по взвешенным веществам – вплоть до снижения их содержания в выходящей воде до 0,5–1,5 мг/л, а содержания ионов аммония с 1,5 мг/л до 0,3 мг/л. Эффект снижения содержания  $N-NH_4$  в выходящей воде был стабилен и наблюдался на протяжении всего периода внесения реагента. При прекращении регулируемого окислительного воздействия показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до воздействия.

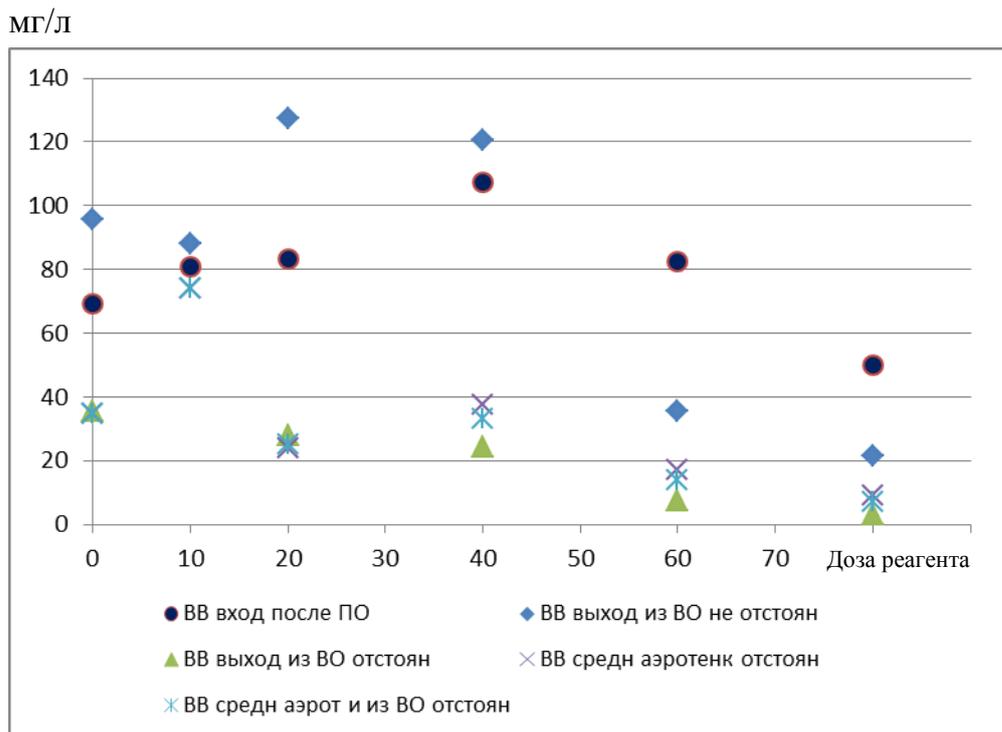


Рис. 6.45. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

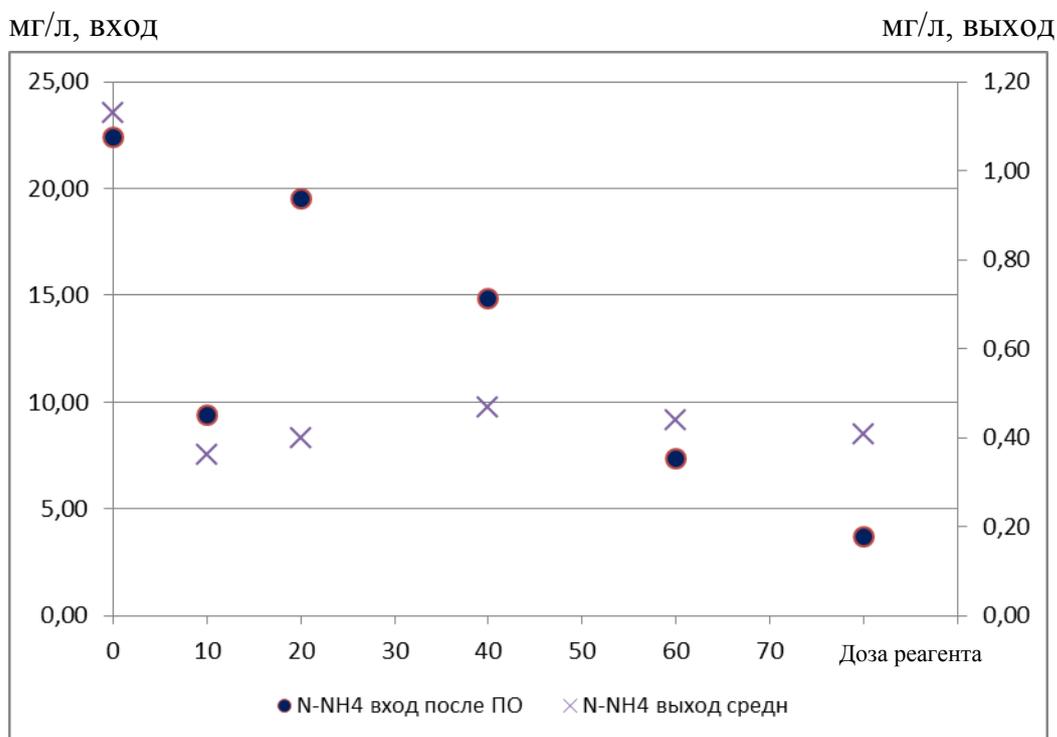


Рис. 6.46. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания N-NH<sub>4</sub> на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

### 6.7.3. Оценка затрат при использовании РОВ-технологии

В табл. 6.13 приведена сравнительная характеристика показателей очистки для различных стоков при совместном воздействии  $H_2O_2$  и видимого света.

Таблица 6.13 – Сравнение показателей очистки для различных стоков при совместном воздействии  $H_2O_2$  и видимого света

Характеристика стока	Режим очистки	Без $H_2O_2$ и освещения	С $H_2O_2$ и освещением
Сток солодовни, $XPK_{\text{вх.}}$ 2000 мг/л	Периодический режим, после: 1 сут. очистки 2 сут. очистки 3 сут. очистки	$XPK_{\text{вых.}}$ , мг/л	
		125–260	90–230
		90–200	40–100
		70–100	20–60
Модельный сток пивоварения, $XPK_{\text{вх.}}$ 1000–2000 мг/л	Проточный с активным илом и биопленкой с полным возвратом ила; 1–3 сут. очистки	$XPK_{\text{вых.}}$ , мг/л	
		50–200 мг/л	не детектируется – 40 мг/л
Модельный сток с фенолом, содержание фенола на входе не более 3 г/л	Проточный с активным илом с доминированием дрожжей или бактерий	Содержание фенола на выходе	
		не менее 0,1 г/л	не более 0,01 г/л
		Окислительная мощность	
		не более 0,13 г/л.ч	до 0,22 г/л.ч
Коломна, хозяйственно-бытовые стоки, поселковые ОС	Отъемно-доливной с рециклом активного ила	$XPK_{\text{вых.}}$ – 51,8 мг/л $N-NH_{4\text{вых}}$ – 7,9 мг/л $P-PO_{4\text{вых}}$ – 2,2 мг/л	$XPK_{\text{вых.}}$ – 5,7 мг/л $N-NH_{4\text{вых}}$ – 6,0 мг/л $P-PO_{4\text{вых}}$ – 1,6 мг/л
Клин, хозяйственно-бытовые стоки, городские ОС	Проточный в аэротенке-вытеснителе с полной нитрификацией без отвода избыточного ила	Взвеш. в-ва на выходе – 20–40 мг/л $N-NH_{4\text{вых}}$ – 1–1,5 мг/л	Взвеш. в-ва на выходе – 0,5–10 мг/л $N-NH_{4\text{вых}}$ – 0,3–0,5 мг/л

На основании полученных данных были оценены экономические затраты на реализацию предлагаемого метода очистки сточных вод в промышленных масштабах. Они включают затраты на пероксид водорода и на освещение. Ниже приведена оценка затрат при условии использования в качестве реагента пероксида водорода и освеще-

ния очищаемой среды видимым светом люминесцентных ламп или естественным видимым светом Солнца.

#### Затраты на освещение.

Закрытые сооружения аэробной биологической очистки необходимо освещать искусственным светом. Сооружения, работающие под открытым небом, в дневное время суток освещаются естественным солнечным светом, но могут освещаться дополнительно лампами дневного света в ночное время.

В лабораторных экспериментах в качалочных колбах типичная освещенность поверхности колб дневным естественным светом и люминесцентными лампами составляла приблизительно 500–600 Лк. Поскольку энергия кванта падающего света зависит от длины волны, то и с изменением длины волны меняется коэффициент пересчета из единиц освещенности в единицы энергии. Международным оптическим обществом в качестве стандарта перевода единиц принята длина волны  $\lambda = 555$  нм (зеленая область видимого света, на которую приходится максимальная энергия падающего солнечного излучения в спектре видимого диапазона). При этой длине волны коэффициент перевода:  $683 \text{ лк} = 1 \text{ Вт/м}^2$  [1941]. При пересчете энергии падающего света на единицу объема с учетом освещаемой поверхности колб (около  $100 \text{ см}^2$ ) и объема среды в колбах (около 80 мл) количество падающей энергии света на единицу объема составит при уровне освещенности 500 Лк около 90 мВт/л. Более высокий уровень освещенности очищаемой среды нежелателен, поскольку это приведет к избыточному накоплению в биоценозе очистных сооружений микроводорослей и цианобактерий и, соответственно, к возрастанию содержания загрязнений (по ХПК) в очищаемой воде.

Опыты в проточном режиме очистки в биореакторе показали, что для проявления положительного эффекта достаточно освещать биореактор с 2 л среды видимым светом при освещенности 10–200 Лк, что соответствует интенсивности подачи энергии света около 0,5–10 мВт/л.

Для умеренной климатической зоны энергия естественного солнечного освещения в видимом диапазоне, падающего на поверхность Земли, меняется в зависимости от зенитного угла, погоды, высоты местности. Для уровня моря расчетная облученность от Солнца в ясный день в зависимости от зенитного угла меняется в диапазоне  $100\text{--}865 \text{ Вт/м}^2$  [1941].

Согласно замерам использованного в работе люксметра-УФ-радиометра ТКА-01/3, интенсивность видимого солнечного освещения на территории Москвы на открытом воздухе летом в ясную погоду в 12 ч составила 65000 Лк, что соответствует энергетической освещенности  $95 \text{ Вт/м}^2$ .

Стандартная глубина аэротенков открытого типа, используемых в промышленности, составляет 4 м. Принимая облученность естественным дневным светом  $100 \text{ Вт/м}^2$ , энергия солнечного света, поглощаемая  $1 \text{ м}^3$  очистного сооружения с учетом освещенности поверхности аэротенка естественным дневным светом в течение половины времени суток усредненно, составит:

$$100 * 0,5 / 4 = 12,5 \text{ Вт/м}^3,$$

т.е. намного превышающую требуемую

При времени пребывания воды 12 час (0,5 сут), потоке очищаемой воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$  понадобится аэротенк объемом  $500 \text{ м}^3$  с глубиной рабочей зоны с водой 4 м площадь зеркала воды составит около  $125 \text{ м}^2$ .

Как было показано выше, кратковременное отсутствие освещения на период ночного времени суток не приводит к существенной потере положительного действия  $\text{H}_2\text{O}_2$  в отношении качества очистки воды. Таким образом, энергия естественного освещения Солнцем  $12,5 \text{ Вт/м}^3$  соответствует энергии требуемого диапазона для работы фоторепарационных систем, то есть вполне достаточна для системы очистки на основе аэротенка, работающего под открытым небом, в который добавляется пероксид водорода. В этом случае можно отказаться от дополнительного искусственного освещения и соответствующих энергозатрат.

В варианте расположения очистных сооружений на открытом воздухе с подсветкой в ночное время с минимальной энергетической освещенностью около  $0,5 \text{ Вт/м}^3$  и при толщине воды в очистном сооружении 4 м понадобится энергетическая освещенность на поверхности зеркала воды  $2 \text{ Вт/м}^2$ , что соответствует освещенности зеркала очищаемой воды около 1500 Лк.

При времени пребывания воды в биореакторе 12 час, времени освещения сооружения искусственным светом лишь в ночное время (0,5 сут.) требуемая энергетическая освещенность составит  $0,5 * 12 / 2 = 3 \text{ Втч/м}^3$ . При использовании светодиодных прожекторов с к.п.д. преобразования в видимый свет 80% и при условии, что весь излучаемый свет поглощается толщиной воды (вариант погружных ламп) затраты электроэнергии на освещение составят  $3 / 0,8 = 3,75 \text{ Втч}$  на  $1 \text{ м}^3$  воды.

При искусственном освещении закрытого аэротенка с потоком очищаемой воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$  в варианте погружных ламп, времени пребывания воды в очистном сооружении 12 час потребуются установленные мощности около:

$$3,75 / 12 = 0,31 \text{ кВт.}$$

При цене на электроэнергию 7 руб. за 1 кВт.ч затраты электроэнергии на освещение в варианте с погружными лампами составят около  $7 * 3,75 * 10^{-3} = 0,026 \text{ руб./м}^3$  воды или 26 руб. на  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$ .

При монтаже ламп над зеркалом воды необходимо учесть светорассеивание и убыль освещенности с расстоянием от зеркала воды. Примем, что до поверхности воды доходит лишь 10% от излучаемого света, тогда при искусственном освещении закрытого аэротенка с объемом очищаемой воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$  в варианте размещения ламп над зеркалом воды, времени пребывания воды в очистном сооружении 12 час потребуются установленные мощности около:

$$3,75/(12*0,1) = 3,1 \text{ кВт.}$$

При цене на электроэнергию 7 руб. за 1 кВт.ч затраты электроэнергии на освещение составят около  $7*3,75 * 10^{-3}/0,1 = 0,26 \text{ руб./м}^3$  воды или 260 руб. на  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$ .

Для очистных сооружений закрытого типа необходимо круглосуточное освещение аэротенка. В этом случае затраты на освещение увеличатся в 2 раза – до  $0,05\text{--}0,5 \text{ руб./м}^3$  воды.

#### Затраты на пероксид водорода.

Лабораторные исследования показали, что при нагрузке по сточной воде на биореактор  $0,5\text{--}1 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{сут}$  с ХПК<sub>вх.</sub> 700–2000 мг/л для поддержания необходимого физиологического состояния предадаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$  ила и его биодеструкционной активности в очищаемую среду с илом достаточно вносить  $\text{H}_2\text{O}_2$  порциями 1 раз в 2–5 сут. в дозе 20–30 мг/л (в пересчете на 100%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). С учетом всего объема воды, проходящей через биореактор за 2–5 сут, средний расход пероксида водорода составит  $4\text{--}15 \text{ г/м}^3$ , т.е. для аэротенка с потоком сточной воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$ . всего  $4\text{--}15 \text{ кг/сут}$ .

По результатам опытных испытаний РОВ-технологии на поселковых очистных сооружениях в Коломенском районе оптимальная доза пероксида водорода (в пересчете на 100% действующего вещества) составляет  $4 \text{ г/м}^3$  сточных вод или 4 кг на поток сточной воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$ .

Типичная рыночная цена 30% технического пероксида водорода марки Б по ОСТ 301-02-2005-99 составляет 60 рублей за 1 кг, в пересчете на 100% действующего вещества – 200 рублей за 1 кг.

Затраты на реагент составят  $0,004*200 = 0,8 \text{ руб./м}^3$  или 800 руб. на  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$ .

Затраты за установленную мощность, на техобслуживание, поддержание оборудования в рабочем состоянии, технологический надзор не принимаем во внимание.

Тогда операционные затраты составят:

Для варианта погружных ламп:

$$0,026 + 0,8 = 0,83 \text{ руб. на } 1 \text{ м}^3 \text{ очищаемой воды или } 830 \text{ руб. на } 1000 \text{ м}^3/\text{сут.}$$

Для варианта размещения ламп над зеркалом очищаемой воды:

$0,26 + 0,8 = 1,06$  руб. на  $1 \text{ м}^3$  очищаемой воды или 1060 руб. на  $1000 \text{ м}^3/\text{сут.}$

Таким образом, суммарные суточные эксплуатационные затраты на очистку сточных вод в аэротенке с потоком сточной воды  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$  с искусственным освещением будут составлять от 830 до 1060 руб./сут., а при работе аэротенка под открытым небом без дополнительного освещения светодиодными лампами около 800 руб./сут. (требуются затраты только на пероксид водорода).

Сопоставим данные оценочные затраты с эксплуатационными затратами на аэрацию.

При использовании наиболее экономичных аэраторов мембранного типа (на основе гибких мембран из специального полимерного материала с лазерной перфорацией) расход энергии на окисление 1 кг ХПК составляет около 0,5 кВт.ч.

При потоке стоков  $1000 \text{ м}^3/\text{сут}$  и  $\text{ХПК}_{\text{вх}}$  стоков около  $1000 \text{ мг/л}$ , типичном времени пребывания стоков в аэротенке 0,5 сут. затраты электроэнергии на аэрацию составят около 500 кВт.ч/сутки. При стоимости электроэнергии 7 руб. за 1 кВт.ч затраты на аэрацию составят около 3500 руб. в сутки.

Таким образом, суммарные дополнительные затраты на реагент и освещение составят 23–30% от затрат на электроэнергию при использовании наиболее экономичных аэраторов, однако при этом качество очистки сточных вод по показателю ХПК повысится от 1,5 до 3 раз без ухудшения других показателей очистки, без падения скорости биологического окисления и окислительной мощности сооружений или обеспечат одно и то же качество очистки при повышении нагрузки и окислительной мощности сооружений биологической очистки в 1,5–2 раза, снижении площадей, занимаемых новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также снижении совокупных эксплуатационных и капитальных затрат на 10–15% при одном и том же качестве очистки.

В табл. 6.14 сопоставлены некоторые показатели работы очистных сооружений традиционного типа с активным илом и разработанной системы.

При использовании разработанного метода на практике с обеспечением повышения качества очистки воды по ХПК в 1,5–3 раза при минимальном образовании избыточного ила в режиме с полным его рециклом потребуются минимальная модернизация аэротенков; суммарные дополнительные эксплуатационные затраты составят 0,8–1,1 руб./ $\text{м}^3$  очищаемой воды или 0,4–0,6 руб./кг удаленного ХПК при минимальных капитальных затратах. В этом случае потребуются:

Таблица 6.14 – Сравнение показателей работы очистных сооружений традиционного типа с активным илом с оценочными характеристиками разработанной системы

Тип сооружения	Показатели работы							
	Время пребывания сточной воды в сооружении, сут.	Рабочие концентрации активного ила, кг/м <sup>3</sup>	Содержание загрязнений на входе, по ХПК, г/м <sup>3</sup>	Окислительная мощность, г/м <sup>3</sup> .сут	Удельная нагрузка на ил по органическому веществу, г/кг.сут	Степень удаления ХПК	Выход ила, кг/кг удаляемого ХПК	Степень нитрификации
Низконагружаемый аэротенк	2–5	1–4	200–2500	40–1000	10–1000	90–95%	0,2–0,3	От полной нитрификации на нижней границе интервала нагрузки до отсутствия нитрификации на его верхней границе
Стандартный аэротенк	1–2	1–4	200–2500	100–2500	50–2500	85–90%	0,3–0,4	Низкая
Высоконагружаемый аэротенк	0,2–1	1–4	500–2500	1000–5000	1000–5000	40–85%	0,3–0,4	Нет нитрификации
Перколяционный биофильтр	0,5–2	10–20	50–300	20–600	2–60	90–98%	0,05–0,1	От полной нитрификации на нижней границе интервала нагрузки до отсутствия нитрификации на его верхней границе
<b>Разработанная система</b>	<b>1–2</b>	<b>1–4</b>	<b>200–2500</b>	<b>100–2500</b>	<b>200–10000</b>	<b>95–99,7%</b>	<b>0,05–0,2</b>	<b>Полная нитрификация</b>

– полиэтиленовая емкость для хранения  $H_2O_2$ , насос, трубопроводы и форсунки или патрубки для равномерного внесения  $H_2O_2$  в аэротенк; или внесение  $H_2O_2$  в виде пергидроля или в разбавленном виде вручную небольшими порциями равномерно в зону аэрации аэротенка;

– дооборудование аэротенков закрытого типа с потоком очищаемой воды 1000 м<sup>3</sup>/сут светодиодными лампами дневного света с суммарной установленной мощностью потребляемой энергии в зависимости от варианта исполнения от 0,3 до 3 кВт, освещающих равномерно зеркало воды в аэротенке;

– контроль и измерение в системе мониторинга работы очистных сооружений и поддержания трофности поверхностных замкнутых водоемов наряду с традиционными параметрами и показателями очистки (Т, рН,  $pO_2$ , ХПК и др.): инсоляции зеркала воды солнечным светом в видимом и ультрафиолетовом диапазонах спектра; содержания в очищаемой воде  $H_2O_2$  и/или других активных форм кислорода естественного происхождения и/или добавленных в очистное сооружение; примесей водорослей и цианобактерий в составе консорциумов микроорганизмов активного ила и биопленок; степень адаптированности активного ила и его основных групп к оксидативным стрессорам, а также использование, при необходимости, генетических маркеров ответа популяции микроорганизмов на оксидативный стресс (рис. 6.47).

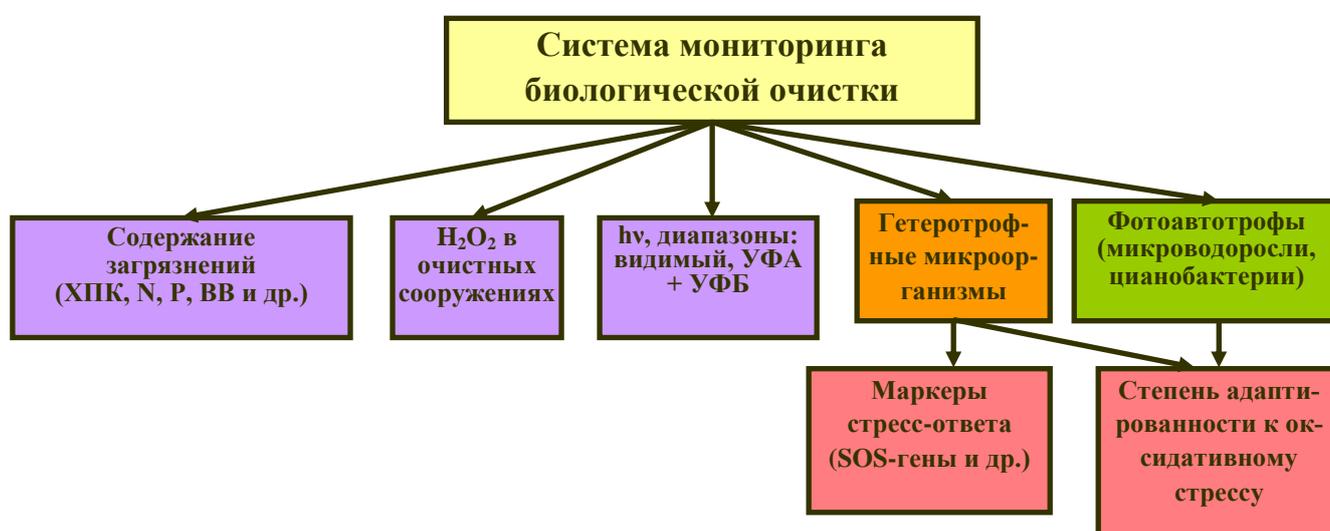


Рисунок 6.47 – Схема системы мониторинга хода биологической очистки в условиях контролируемого оксидативного стресса.

Организация такой системы мониторинга позволит более тщательно контролировать ход биологической очистки, отслеживать роль всех упомянутых факторов в повышении качества очистки сточных вод при их совместном действии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работы, проведенные нами в области управляемого культивирования микроорганизмов, показали новые возможности для повышения эффективности микробиологического синтеза, микробиологической деструкции органических веществ, переработки отходов и очистки сточных вод. Эти возможности появляются при совмещении по месту и времени биологических процессов с физико-химическими и химическими методами выделения продуктов биосинтеза, при высокоплотностном культивировании микроорганизмов, в результате микроэволюционных изменений в специфических, стрессорных условиях длительного культивирования микроорганизмов: в замкнутых системах, в частности, в мембранных биореакторах, при образовании биопленок и гранул, при пассировании к комбинированному воздействию оптимальных доз стрессорных и антистрессорных факторов.

Положительные изменения могут проявляться через повышение жизнеспособности микробных популяций, их физиологической активности, устойчивости к неблагоприятным факторам окружения, снижение расхода компонентов питания, количества остаточных субстратов и побочных продуктов жизнедеятельности и, как следствие, улучшение выходных показателей биосинтеза, биоконверсии и биологической очистки.

Лабораторные эксперименты, проведенные с галобактериями, молочнокислыми бактериями, дрожжами, рекомбинантными штаммами *B. subtilis* – трансформантами по рибофлавиновому оперону показали следующие экологически и экономические рациональные пути совершенствования методов ферментации *при получении продуктов биосинтеза*:

– сочетание биосинтеза и механического, физико-химического фракционирования компонентов ферментационной среды по месту и времени, в мембранных биореакторах с повышением уровня накопления биомассы и продуктивности биореакторов в десятки раз, снижением расхода дорогостоящих компонентов питания в несколько раз, повышением выхода целевого продукта от субстрата – на примере получения молочной кислоты с использованием молочнокислых бактерий (высокоплотностное непрерывное отъемно-доливное культивирование в мембранном биореакторе);

– высокоплотностное аэробное культивирование дрожжей – продуцентов микробного белка и других продуктов биосинтеза – с подпиткой субстратом без отвода отработанных питательных сред с получением в качестве целевых продуктов суспензии клеток микроорганизмов со скоростями прироста биомассы не менее 7 г/л.ч до конечной концентрации 150–170 г асв/л; в этом случае при использовании высоко-

концентрированных субстратов (сахаров, этанола, упаренной молочной сыворотки и др.) отпадает необходимость в энергоемких стадиях сгущения биомассы;

– периодическое высокоплотностное культивирование с доливом питательной среды и с адсорбентом, поглощающим продукты химического и фотохимического окисления с повышением уровня накопления биомассы и целевого продукта. При культивировании галобактерий накопление биомассы за цикл ферментации повышается в 10–15 раз, синтезируемого ими бактериородопсина в 20–30 раз (суммарное содержание бактериородопсина в среде культивирования увеличивается до 1700–1750 мг/л), а продуктивность биореактора в 10–30 раз, при этом содержание каротиноидов в биомассе минимально, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина (в составе пурпурных мембран) и резко снижает его стоимость;

– периодическое, высокоплотностное с подпиткой субстратом или отъемно-доливное культивирование кормовых дрожжей, этанолпродуцирующих дрожжей, молочнокислых бактерий, в том числе в мембранном реакторе, с использованием преадаптированного к воздействию сублетальных доз  $H_2O_2$  посевного материала и дальнейшим периодическим внесением небольших количеств пероксида водорода в ферментационную среду на фоне освещения зоны ферментации видимым светом. Такое комплексное и одновременное окислительное воздействие существенно улучшает показатели биосинтеза в аэробных и микроаэрофильных процессах: повышает выход биомассы дрожжей и содержание белка в них на 5–20%, способствует длительному поддержанию высокой физиологической активности клеток и высокой продуктивности биореактора в высокоплотностных популяциях, повышает бродильную активность дрожжей-сахаромицетов на 10–40%, снижает содержание остаточных субстратов и побочных экзометаболитов в постферментационных средах от 2 до 10 раз;

– культивирование с комбинированным воздействием мягкого ультрафиолетового и видимого излучения на бактериальные и дрожжевые клетки. В этом случае наиболее благоприятным для роста дрожжей является облучение ультрафиолетом с интенсивностью 1 Вт/л и видимым светом с интенсивностью около 40 мВт/л. При этом наблюдается ускорение роста популяции и увеличение выхода биомассы на 5–15%. Без видимого света ультрафиолет даже умеренной интенсивности (1 Вт/л) репрессирует рост дрожжей. Видимый свет без действия ультрафиолета не действует на рост дрожжей;

– культивирование рекомбинантных микроорганизмов с воздействием видимого света низкой интенсивности. С учетом перекрестных стресс-реакций фотовоздействие на популяцию продуцентов может сказаться позитивно на накоплении целевого про-

дукта при проведении ферментации в периодическом режиме и в режиме с подпиткой субстратом.

Предложенные решения позволяют снизить:

– количество жидких стоков (в виде отработанной культуральной жидкости) – до 10 раз при высокоплотном культивировании с подпиткой субстратом; от 5 до 20 раз – при ферментации галобактерий и получении бактериородопсина;

– количество твердых отходов – от 10 до 100 раз – для молочнокислых бактерий;

– совокупные эксплуатационные и капитальные затраты – на 1,5–20% – для дрожжей и получения биоэтанола; от 10 до 1000 раз – при получении бактериородопсина галобактерий.

*При проведении процессов микробиологической переработки отходов и очистки сточных вод* часть из апробированных подходов моделирует экологические условия и процессы самоочищения, сочетание абиотических и биотических реакций в едином объеме и времени, как это наблюдается в природных средах – на поверхности твердых субстратов и водных сред, подверженных инсоляции Солнца, в толще природных водоемов с участием пероксида водорода, реакционно активных радикалов и других АФК, ионов переходных металлов, что обеспечивает их экологическую чистоту и сочетаемость с традиционными схемами очистки сточных вод.

С использованием селекционированных физиологически активных культур и консорциумов микроорганизмов, выдерживающих высокие концентрации токсичных загрязнений, устойчивых к оксидативному стрессу, по результатам исследования биологической очистки стоков с высоким содержанием фенола, предприятий спиртовой и пивоваренной промышленности, хозяйственно-бытовых, а также биологического удаления неорганических соединений азота и фосфора показаны следующие экологически рациональные пути совершенствования методов биологической очистки и биодеструкции *при аэробной очистке*:

– ведение процесса с активным илом, адаптированным к оксидативному стрессу (к пероксиду водорода, анолиту электрохимического разложения, УФА-излучению), при воздействии малых доз АФК и освещении среды низкоинтенсивным видимым светом, при котором наблюдается: в периодическом режиме повышение скорости биоокисления в 1,1–2 раза, снижение количества остаточных загрязнений (по ХПК) на выходе из очистных сооружений в 1,5–3 раза – при очистке модельных фенолсодержащих стоков, стоков солодовен, хозяйственно-бытовых стоков; в периодическом режиме с подпиткой токсичным субстратом повышение скорости окисления в 2–3 раза и количества суммарно минерализованного загрязнения в среде биологического культивирования на протяжении рабочего цикла биодеструкции в 10–20 раз (до 100 г/л и бо-

лее), снижение содержания остаточных загрязнений по сравнению с традиционными процессами биологического окисления, без накопления ингибиторов метаболизма, оттока среды и избытка биомассы из биореактора – при биодеструкции фенола. Эффект обусловлен повышением концентрации биомассы деструкторов в биореакторе, изменением их физиологического состояния, сохранением физиологической активности на протяжении всего цикла биодеструкции и после прекращения внесения  $H_2O_2$ . В этом состоянии процесс биоокисления лимитируется только массообменными возможностями биореакторов;

– применительно к биоочистке в мембранном биореакторе внесение  $H_2O_2$  и освещение зоны биоокисления с повышением окислительной мощности, качества очистки сточных вод, повышением ресурса мембран вследствие изменения морфологического состояния активного ила, способствующего снижению его адсорбции на поверхности мембран (система «искусственная пероксисома»);

– в применении к ведению процесса в проточном режиме в аэротенке с частичным или полным рециклом активного ила внесение  $H_2O_2$  в дозах 2–100 мг/л.сут и освещении среды видимым светом при интенсивности подводимой энергии 0,5–100 мВт/л (по видимому диапазону спектра), что повышает окислительную мощность аэротенка в 1,5–2 раза, снижает остаточную концентрацию загрязнений в 1,5–3 раза с удалением 97,5–99,7% ХПК в одну стадию, отсутствием вспухаемости ила, более легким последующим обезвоживанием его, с типичной нагрузкой по  $XPK_{вх}$  700–2000 мг/л.сут. Так, при использовании традиционных одностадийных систем аэробной биологической очистки в аэротенках и биофильтрах сочетанное воздействие небольших доз  $H_2O_2$  и видимого света приводит к улучшению качества очистки сточных вод по ХПК с 500–1000 мг/л на входе до 10–20 мг/л на выходе при времени пребывания сточной воды в системе не более двух суток, в то время как без сочетанного воздействия  $XPK_{вых}$  не падает ниже 50–100 мг/л. Технология с использованием такого метода может быть отнесена к наилучшей доступной из существующих на сегодня технологий одностадийной аэробной биологической очистки;

– применительно к ведению процесса биологической очистки в аэробных реакторах с биопленкой или с гранулированным активным илом комбинированное воздействие АФК и видимого света, способствующее повышению скорости образования и стабильности биопленок и гранул в процессе биологической очистки различных стоков, степени удаления фосфора на 10–50% в аэробно-анаэробном отъемно-доливном режиме в SBR.

Сочетанное воздействие небольших доз  $H_2O_2$  и видимого света повышает альгцидную активность бактерий по отношению к примесным микроводорослям и цианобактериям в системах водоочистки.

Учет таких факторов окружающей среды как содержание АФК, УФ-излучение Солнца, интенсивность освещения среды естественным видимым светом (солнечной инсоляции) и искусственным освещением, количество микроводорослей и цианобактерий в очистном сооружении повышает качество мониторинга за состоянием активного ила и работы очистных сооружений.

Подход к совершенствованию процессов ферментации и биологической очистки, при котором на популяцию микроорганизмов одновременно воздействуют оптимальными дозами факторов оксидативного стресса (активные формы кислорода –  $H_2O_2$ , ультрафиолетовое излучение УФА и УФБ диапазонов спектра) и антистресс-факторами (видимый свет, антиоксиданты, адсорбенты, поглощающие продукты химического и фотохимического окисления, другие факторы, нивелирующие отрицательное воздействие продуктов химического и фотохимического окисления) названы нами «контролируемый оксидативный стресс» или «регулируемое оксидативное воздействие». В соответствии с ним и в зависимости от конкретных условий оптимальная фаза микробного роста для внесения  $H_2O_2$  – экспоненциальная, доза внесения  $H_2O_2$  – от 0,002 до 10 г/л (по 100%  $H_2O_2$ ), концентрация клеток микроорганизмов в популяции, при которой не наблюдается приостановка их роста – не ниже 0,3–0,5 г асб/л, интенсивность освещения 0,5–100 мВт/л (в пересчете на энергию видимого света с длиной волны 555 нм). При таком сочетании путем последовательных пересевов с постепенным повышением доз АФК до физиологически приемлемого уровня на фоне освещения среды видимым светом могут быть получены культуры микроорганизмов, устойчивые к воздействию повышенных доз  $H_2O_2$ , при этом для адаптации микробных популяций и получения положительных эффектов требуется от 3 до 8 пассажей (10–30 микробных генераций). Преадаптированное к оксидативному стрессу состояние сохраняется, в среднем, на протяжении 2–3 пассажей (около 6–10 микробных генераций), что позволяет снизить расход  $H_2O_2$  при ведении процесса биосинтеза или биологической очистки.

В условиях оксидативного стресса такие микроорганизмы как дрожжи *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, бактерии *B. subtilis*, *Lactobacillus paracasei*, гетеротрофные компоненты активного ила биологической очистки сточных вод, адаптированные к сублетальным воздействиям стрессоров, приобретают чувствительность к видимому свету низкой интенсивности (предположительно через механизм фоторепарации). При этом в ряде случаев комбинированное воздействие субингибиторных доз факторов оксида-

тивного стресса и видимого света низкой интенсивности приводит к улучшению показателей биосинтеза и биологической очистки. Найденные позитивные результаты во многих отношениях не вписываются в традиционные представления лишь об отрицательном воздействии стрессорных факторов на живые организмы и могут в дальнейшем послужить удобными моделями для уточнения значимости, в частности, таких стрессоров, как реакционные формы кислорода, важности совместного действия стрессорных и антистрессорных факторов в регуляции метаболизма и жизнедеятельности клеток, отдельных организмов и их сообществ, поддержании редокс статуса среды обитания микробных популяций. Для микробиологического синтеза и катализа это указывает на возможность целенаправленного создания условий с оптимальным балансом стресс-антистрессовых воздействий и регулированием на этой основе активности микробных ферментов и клеток. Разработанный подход универсален в отношении биоценозов очистных сооружений и удаляемых органических биодоступных загрязнений, обладает патентной чистотой, не имеет мировых аналогов.

В области биологической очистки наиболее близким аналогом являются технологии каталитической очистки, активированного (развитого) химического и фотокаталитического окисления, в которых используются сильные окислители, например, такие как пероксид водорода, реактив Фентона, озон, кислород в синглетном состоянии, мягкое УФ-излучение или комбинация УФ-излучения и фотокаталитического действия  $TiO_2$ . В отличие от указанных технологий, в методе, предложенном нами, речь идет не об использовании АФК для прямой химической, фотохимической или фотокаталитической деструкции органических загрязнений, а об использовании АФК в качестве факторов, в низких дозах стимулирующих процесс биологической очистки и биодеструкции при найденных нами условиях.

Обобщая, можно выделить следующие ключевые особенности «контролируемого оксидативного стресса»:

1. Значимость оксидативного стресса, оксидантов, прооксидантов, антиоксидантов в поддержании статуса, физиологического состояния, фенотипической и генетической гетерогенности микробной популяции в ферментационных процессах (при культивировании в биореакторах), при биологической переработке отходов и очистке сточных вод.

2. Получение положительных эффектов в отношении улучшения показателей биосинтеза и биологической очистки, что отличает разработанный подход от общепринятых представлений о стрессе, как неблагоприятном для живых систем состоянии.

3. Учитываются такие факторы окружающей среды, как АФК, УФ-излучение, видимый свет.

4. Моделируются условия природных сред, в частности на поверхностях воды и твердых тел, приводящие к самоочищению водоемов.

5. Использование антистресс-факторов для минимизации негативных и максимизации позитивных эффектов у стресс-индуцированных культур.

6. При отсутствии в нестрессированном состоянии возникновения чувствительности микроорганизмов после воздействия стресса к видимому свету; видимый свет, по-видимому, можно отнести к наиболее универсальным антистрессором для микроорганизмов, обладающих системой фотореактивации (фоторепарации).

7. В одних случаях используется комбинированное, сопряженное воздействие стрессоров и антистрессоров, в других – используются лишь антистрессорные, протекторные факторы. Необходимыми задачами являются выбор комбинации стресс- и антистрессорных факторов, их количественных сочетаний и условий воздействия, при которых проявляются положительные эффекты. Так, в условиях контролируемого оксидативного стресса положительные эффекты наблюдались при воздействии различных форм АФК (пероксид водорода, УФА-излучение, анолит электрохимического разложения) на фоне освещения среды видимым светом низкой интенсивности. В отсутствие видимого света такие показатели микробиологических процессов, как выход биомассы и других целевых продуктов, физиологическая активность микроорганизмов, эффективность потребления субстратов ухудшаются, что и должно происходить в соответствии с классическими представлениями о стрессе.

8. Необходимость воздействия оптимальных доз стресс- и антистресс-факторов.

9. Достаточность использования малых доз стресс-факторов, низкоэнергетических воздействий.

10. Возможность одновременного прооксидантного и антиоксидантного действия факторов окружения: видимого света и химических факторов, в том числе компонентов питательных сред и продуктов метаболизма.

11. Необходимость преадаптации микробной популяции к сублетальному стрессу путем последовательного пассирования клеточных линий в присутствии стрессоров и антистрессоров, при этом повышение устойчивости преобработанных клеток к стрессорам может быть временным и полностью прекращаться в отсутствие стрессора, что характеризует процесс как временную адаптацию, но не селекцию резистентных субпопуляций, т.е. возникает адаптивная устойчивость популяции к стрессору. Во многих случаях для преадаптации необходимо провести от 3 до 8 пассажей (10–30 микробных генераций) на среды с постепенным повышением вносимой дозы стресс-

факторов, например, с внесением  $H_2O_2$  в дозе 1–10 мг/л (для первого пассажа) до 100–500 мг/л (для 5-го пассажа) на фоне освещения сосудов с культивируемыми микроорганизмами фоновым светом лаборатории. В процессе адаптации изменения могут быть обусловлены индукцией и поддержанием в течение некоторого времени систем стресс-ответа и репарации, помогающим клеткам преодолевать неблагоприятное воздействие стрессоров.

12. Необходимость определения длительности сохранения адаптационных свойств в отсутствие воздействия стресс-фактора. После прекращения воздействия устойчивость к стрессору сохраняется лишь на протяжении 1–3-х последовательных пассажей (около 8–12 микробных генераций), и культура возвращается к исходному состоянию. Соответственно, достижение положительных эффектов нивелируется нестабильностью полученных клонов в процессе пассирования, сопровождающейся утратой адаптивных преимуществ и потерей приобретенных свойств.

13. Возможность перекрестных реакций между различными системами ответа на оксидативный стресс, например, клетки дрожжей, стрессированные замораживанием-размораживанием, становятся чувствительными к видимому свету; клетки дрожжей, приобретающие адаптивную устойчивость к  $H_2O_2$ , более устойчивы к закислению среды; клетки дрожжей приобретают чувствительность к видимому свету и после облучения мягким ультрафиолетом, и после воздействия на них пероксидом водорода; клетки молочнокислых бактерий, подвергнутые тепловому шоку, становятся чувствительными к видимому свету.

14. Зависимость положительных эффектов от плотности популяции, оптимального физиологического состояния, фазы роста микроорганизмов, дозы стрессоров, концентрации субстрата, условий аэрации, циклов адаптации микроорганизмов к воздействию стрессора. Так, чем больше плотность дрожжевой популяции и активнее ее рост, тем выше активность каталазы и быстрее происходит распад  $H_2O_2$ . Совместное позитивное действие  $H_2O_2$  и видимого света проявляется в наибольшей степени, если плотность популяции микроорганизмов превышает 0,4–0,6 г асв/л и микроорганизмы находятся в активной фазе роста.

Таким образом, на основе выявленных особенностей разработаны высокоинтенсивные, экологически чистые, малоотходные, экономически рациональные методы ферментации для получения биомассы микроорганизмов с высоким содержанием целевых компонентов, уровнем накопления внеклеточных продуктов. Предложены различные варианты культивирования: в мембранном биореакторе, системы культивирования «Гибридный биореактор», «Искусственная пероксисома» и «Солнечный биореактор», моделирующие условия обитания и совмещенные процессы, протекающие в

природных средах. Применительно к очистке сточных вод обнаруженные эффекты позволяют вести разработку как высокопроизводительных малосточных систем аэробной очистки и биологической переработки высококонцентрированных стоков с повышением компактности очистных реакторов в несколько раз, так и совершенствовать традиционные технологии биологической очистки на основе активных илов и биопленок очистных биореакторов (аэротенков, биотенков, биофильтров и др.) со снижением количеств остаточных загрязнений в потоке сточной воды на выходе в 2–3 раза, избыточного ила, биогенных элементов, устранением проблемы вспухаемости ила, при высокой устойчивости к перерывам в подаче субстрата, к лимитированию биоокисления кислородом, компонентами питания, при снижении площадей, занимаемых новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также эксплуатационных и капитальных затрат.

Реализация предложенных решений в промышленных условиях не потребует больших затрат и существенной модернизации биореакторов или очистных сооружений. Например, при культивировании галобактерий и выделении бактериородопсина потребуются монтаж узла адсорбции для извлечения адсорбентом из среды непосредственно в ходе ферментации прооксидантов – продуктов фотохимического и химического окисления компонентов среды, ингибирующих рост галобактерий и синтез бактериородопсина, монтаж линии подготовки адсорбента, модернизация системы контроля и управления ферментационным процессом, а также модернизация процедуры хранения культуры-продуцента и подготовки посевного материала. Для биореакторов с освещением ферментационной среды – возможно оснащение ферментера внешним циркуляционным контуром со стеклянной трубой (прозрачной оболочкой) и освещением содержимого через стеклянную трубу. Для аэротенков очистных сооружений или мембранных биореакторов – установка дополнительной емкости для реагента – источника АФК, монтаж дополнительных источников света, ведение мониторинга за солнечной инсоляцией или искусственным освещением на поверхности аэротенков.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые системно изучено и показано, что совмещение по месту и времени абиотических и биотических процессов трансформации веществ в единой экологической нише, стрессорных и антистрессорных факторов с использованием направленных адаптационных изменений в популяциях микроорганизмов позволяет существенно расширить возможности управляемого культивирования микроорганизмов и улучшить технологические, экологические и экономические показатели биосинтеза и биодеструкции органических веществ.

2. Основываясь на существующих литературных и собственных экспериментальных данных выдвинуто предположение, что обнаруженная возможность определенного положительного совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов на микроорганизмы, на показатели биосинтеза обусловлена: 1) адаптивной эволюцией и внутривидовыми изменениями; 2) изменением внутриклеточного метаболизма под действием факторов оксидативного стресса; 3) регуляторными функциями низких концентраций пероксида водорода и других АФК; 4) индукцией фоточувствительных систем ответа на оксидативный стресс, вероятно, системы фоторепарации и кросс-реакций метаболически связанных с фоторепарацией других систем ответа на стресс.

3. Научно обоснованы пути совершенствования микробиологических систем культивирования и биологической очистки с использованием совмещенных процессов и гибридных биореакторов: высокоплотностного культивирования, мембранного биореактора, адсорбционной культуры, воздействия пероксида водорода и видимого света, мягкого ультрафиолета и видимого света, средств, которые подавляют абиотические реакции, протекающие в ходе ферментации, и тем самым устраняют неблагоприятное воздействие продуктов фотохимических и химических реакций на клетки микроорганизмов или, напротив, индуцируют у микроорганизмов системы ответа на оксидативный стресс.

4. Экспериментально установлены диапазоны доз стрессоров ( $H_2O_2$  и других АФК) и антистрессоров, другие условия для достижения наибольшего положительного эффекта, при которых наблюдаемые физиологические изменения в популяциях микроорганизмов улучшают технико-экономические и экологические показатели процессов биосинтеза и биодеструкции.

5. Положительный эффект совместного воздействия стресс- и антистресс-факторов в отношении биологической очистки сточных вод проявляется при использовании различных активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , анолит электрохимического разложения раствора  $NaHCO_3$  и др.), при различных способах очистки, нагрузках, содер-

жании загрязнений (ХПК, биогенных элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения  $H_2O_2$ , с флокулами и гранулами активного ила, биопленками.

б. В условиях совмещенных процессов и селективного оптимального оксидативного стрессового воздействия в ходе ферментации возможно:

– получение биомассы кормовых дрожжей в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом с содержанием биомассы 150–170 г/л (по асд) с повышением продуктивности биореактора по биомассе дрожжей с 2,5–3 г асд/л.ч – в периодическом без подпитки субстратом или в непрерывном хеостатном режиме и до 4–7 г асд/л.ч – в высокоплотностном режиме с подпиткой субстратом, повышением выхода биомассы от субстрата на 5–15%, содержания белка в биомассе на 7–10%, устойчивости к высоким концентрациям субстратов и другим стресс-факторам без появления признаков ингибирования роста и физиологической активности продуктами метаболизма с одновременным снижением содержания остаточных концентраций субстратов и внеклеточных продуктов метаболизма, обеспечением 30–50%-ой экономии питательных солей, снижением количества сточных вод и концентрации остаточных загрязнений в них в 5–10 раз, без необходимости в энергоемких стадиях сгущения биомассы, что позволяет снизить суммарные затраты на сырье и энергию на 15–20%;

– повышение жизнеспособности клеток дрожжей-сахаромицетов в процессе спиртового брожения до 95–99% и их бродильной активности на 10–40%, выхода этанола на 2–5%, при одновременном сокращении времени брожения в периодических условиях на 30%, повышении устойчивости дрожжей к закислению среды, более длительном сохранении физиологической активности клеток и продуктивности биореактора, снижении общей обсемененности и содержания остаточных субстратов и примесей в сброженном сусле в 1,5–3 раза и совокупных эксплуатационных затрат на 1,5–20%;

– повышение производительности биореакторов до 10 раз с достижением продуктивности до 50 г/л.ч при культивировании молочнокислых бактерий – продуцентов молочной кислоты в мембранном биореакторе в отъемно-доливном режиме при содержании молочной кислоты 100 г/л, степени конверсии глюкозы в молочную кислоту 95–97%, с одновременным повышением выхода молочной кислоты из углеводного субстрата на 2–5%, снижением расхода дорогостоящих ростовых факторов в 2–3 раза, снижением содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, безостановочным ведением процесса в течение несколько недель и более без отвода накапливаемой избыточной биомассы, упрощением поддержания асептических условий и доминированием культуры в мембранном биореакторе, снижением количества образуемой избыточной биомассы до величин не более 4,5 г/кг молочной кислоты, что ниже в 10 раз по

сравнению с традиционным методом периодического культивирования при полном отсутствии гипса как отхода, и, как следствие, улучшением экономических и экологических показателей процесса и достижением конкурентоспособной цены – не выше 900–1200 EUR за тонну МК;

– повышение производительности биореакторов до 20 раз при культивировании галобактерий и биосинтезе бактериородопсина по варианту адсорбционной культуры с подпиткой субстратом с минимальным содержанием каротиноидов, что позволяет за один цикл повысить: уровень накопления биомассы в среде культивирования с 4–4,5 г/л (по асб) с суммарным содержанием БР 70–75 мг/л за 6–7 сут. для обычной периодической ферментации до 30–50 г/л биомассы и 1700–1750 мг/л БР за 8 сут. ферментации, с удельным содержанием бактериородопсина в биомассе 2–4%, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина, а также в несколько раз снижает объем высокоминерализованных жидких стоков, затраты на выделение бактериородопсина в составе пурпурных мембран и стоимость бактериородопсина от нескольких десятков до нескольких сотен раз (до 1 руб/мг) при обеспечении высокого качества получаемых образцов пурпурных мембран;

– повышение устойчивости биосинтетической активности рекомбинантных штаммов за счет снижения скорости реверсии к прототрофным вариантам из-за прооксидантного действия компонентов среды культивирования, в частности, рибофлавина.

7. Проведение биологической очистки в условиях селективного и оптимального оксидативного стрессового воздействия активными формами кислорода позволяет:

– перерабатывать высококонцентрированные токсичные стоки, в частности фенолсодержащие, в режиме интенсивного культивирования с подпиткой субстратом (суммарно до 100 г/л и более по фенолу), лимитируемого только массообменными возможностями биореакторов, с полной минерализацией органического вещества без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение, с минимальным образованием избыточного активного ила, вторичных сточных вод и остаточных загрязнений;

– при типичной нагрузке по ХПК<sub>вх</sub> 500–2000 мг/л.сут. снижать ХПК<sub>вых</sub> в процессах одностадийной аэробной биологической очистки сточных вод в аэротенках проточного типа с вторичным отстойником до величин, близких к нулю с одновременным повышением степени удаления соединений азота и фосфора;

– повышать скорость образования и стабильность биопленок и гранул активного ила в аэробных условиях и SB-реакторах, эффективность удаления органических загрязнений и биогенных элементов в SB-реакторах;

– поддерживать агрегатное состояние и морфологию активного ила, снижающих кольматацию мембран в системах биологической очистки на основе мембранных биореакторов (система «искусственная пероксисома»), что важно для поддержания стабильности работы и проницаемости МБР;

– реализовать процесс с оптимальным оксидативным стрессовым воздействием с улучшением показателей аэробной биологической очистки по ХПК<sub>вых.</sub> в 1,5–3 раза на действующих сооружениях с активным илом, биопленкой, гранулами ила без их существенной модернизации, при этом в наиболее экономичном варианте при фактическом отсутствии капитальных затрат дополнительные суммарные эксплуатационные затраты на очистку сточных вод составят не более 10–30% от затрат на аэрацию. При одном и том же качестве очистки – повысить нагрузку и окислительную мощность сооружений в 1,5–2 раза, снизить площади, занимаемые новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также совокупные эксплуатационные и капитальные затраты на 10–15%. Разработанная технология с регулируемым оксидативным стрессовым воздействием может быть отнесена к наилучшей доступной из существующих на сегодня технологий одностадийной аэробной биологической очистки.

#### 8. На основе полученных результатов:

– разработан разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты в виде лактата аммония в составе постферментационной среды (бесклеточной культуральной жидкости, КЖ) методом микробиологического синтеза из различных видов глюкозосодержащего сырья для последующего производства L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе. Получаемая бесклеточная КЖ предназначена для последующего выделения молочной кислоты (в виде бутиллактата), получения лактида и полилактида в количестве 500 т/год по полилактиду;

– проведены опытно-промышленные испытания на сооружениях биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков, подтвердившие эффективность технологии с оптимальным оксидативным стрессовым воздействием с достижением ХПК и содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений, близких к нулю, а также поддержанием высокой эффективности нитрификации в режиме с полным возвратом ила.

Часть исследований проведена: с участием фирмы «Энви́ро-Хеми ГмбХ» (Германия) – при очистке сточных вод предприятий ОАО «Пивоваренная компания «Балтика» в гг. Самара и Хабаровск, Вороновского завода по производству солода (Моск. обл.); Серебряно-Прудского биохимического завода (Моск. обл.) – при

изучении процессов спиртового брожения и обезвреживании зерно-спиртовой барды в анаэробных и аэробных системах с гранулированным илом; с Университетом Тонцзи (г. Шанхай, КНР) – при изучении процессов биологического удаления азота и методов борьбы с микроводорослями и цианобактериями с использованием оксидативного стрессового воздействия при эвтрофикации водоемов; с ФГУП НПО «Астрофизика» – при изучении воздействия АФК и видимого света на процессы культивирования дрожжей и биологической очистки сточных вод; с ГосНИИСинтезбелок – при изучении процессов культивирования кормовых дрожжей и получения галобактерий; с ФГУП ГосНИИгенетика – при изучении процессов культивирования галобактерий и биосинтеза бактериородопсина (Складнев Д.А.), а также процессов культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов рибофлавина (Миронов А.С.); с ИМГ РАН – при изучении процессов образования биопленок (Хмель И.А.); с НПФ ТЭКО – при изучении процессов биологической очистки в мембранном реакторе (Свитцов А.А.); с ООО «ТДС» – при проведении испытаний биологической очистки хозяйственно-коммунальных стоков на поселковых и городских очистных сооружениях (Мелиоранский А.В.), а также в сотрудничестве с кафедрой нефтехимического синтеза РХТУ – при разработке технологии получения молочной кислоты и кафедрой промышленной экологии РХТУ – при изучении процессов гранулообразования с воздействием активных форм кислорода.

Часть из предложенных решений не имеют отечественных и мировых аналогов. На разработанные способы совершенствования биотехнологических процессов получены патенты РФ: № 2188164 от 27.08.02, № 2209186 от 26.12.2003, № 2268924 от 23.11.2004 г., № 2323226 от 30.05.2006, № 2323251 от 30.05.2006, № 2394098 от 10.06.2009, № 2586155 от 05.03.2015, № 2712703 от 30.01.2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экологически чистое производство. / Учебный курс Организации ООН по промышленному развитию (ЮНИДО). – ЮНИДО, 1996, ч. 1–10 (электронная версия).
2. Кузнецов А. Е. Прикладная экобиотехнология / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова, С. В. Лушников и др. // Учебное пособие: в 2 тт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – т. 1 – 629 с., т 2 – 485 с. Переиздание 2012, 2015 гг.
3. Инструктивно-методические указания по взиманию платы за загрязнение окружающей природной среды. (утв. Минприроды РФ от 26.01.1993) (ред. от 15.02.2000, с изм. от 12.07.2011) (Зарегистрировано в Минюсте РФ 24.03.1993 N 190) (утратил силу с 02.09.2014 на основании приказа Минприроды России от 04.07.2014 N 302).
4. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.
5. Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию – М.: Высш. шк., 1994. – 400 с.
6. Богдановский Г.А. Химическая экология. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 273 с.
7. Bioavailability of organic xenobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. // In Proceedings of the Meeting on Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment. Prague, 18-29 August, 1997 / Eds. Ph. Baveye, J.-C. Block, V.V. Goncharuk. – NATO Advanced Study Institute, Series 2: Environment. – Kluwer Academic Publishers, 1999. – 64. – 503 p.
8. Синельников В.Е. Механизм самоочищения водоемов. – М.: Стройиздат, 1980. – 112 с.
9. Зайцев Ю.П. Жизнь морской поверхности. – Киев, Наукова думка, 1974. – 112 с.
10. Хакен Г. Синергетика. – М.: Мир, 1980. – 808 с.
11. Шустер Г. Детерминированный хаос. Введение. – М.: Мир. 1988. – 240 с.
12. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. – М.: Наука, 1968. – 288с.
13. Электромагнитные поля в биосфере. Т.1. Электромагнитные поля в атмосфере Земли и их биологическое значение / Под ред. Н.В. Красногорской – М.: Наука, 1984. – 375 с.; Т.2. Биологическое действие электромагнитных полей / Под ред. Н.В. Красногорской – М.: Наука, 1984. – 326 с.
14. Биологические часы / Пер. с англ. Под ред. С.Э. Шноля – М.: Мир, 1964. – 694 с.
15. Блехман И.И. Синхронизация в природе и технике. – М.: Наука, 1981. – 352 с.

16. Биологические ритмы / Пер. с англ. Под ред. Ю. Ашоффа. В 2-х т. – М.: Мир, 1984. – Т.1 – 414 с.; Т.2 – 262 с.

17. Кузнецов А.Е. Синхронизация биосинтетической активности микробных продуцентов ритмами космогеофизического происхождения // Биофизика. – 1992. – Т.37.– №4. – С. 772-784.

18. Кухаренко А.А., Винаров А.Ю. Безотходная технология этилового спирта. – М.: Энергоатомиздат, 2001. – 272 с.

19. Кузнецов А. Е. Регулирующее воздействие экзогенных метаболитов и ритмов естественного происхождения на рост и продуктивность промышленных микроорганизмов / Дисс... канд. техн. наук. – М., 1988, РХТУ им. Д.И. Менделеева.

20. Авт.свид. СССР № 1367493. Способ получения L-лизина / Кузнецов А.Е., Свитцов А.А., Манаков М.Н, Быков В.А. – 1987.

21. Подобрый О.С. Влияние фракции культуральной жидкости 5-50 кД на рост дрожжей *Candida utilis* / О.С. Подобрый, А.Е. Кузнецов, М.Н. Манаков // Биотехнология. – 1991. – № 6. – С. 40-43.

22. Подобрый О.С. Изучение высокомолекулярных аутоstimуляторов биосинтеза у дрожжей *Candida utilis* и бактерий *Corynebacterium* / О.С. Подобрый, В.М. Лахтин, А.Е. Кузнецов и др. // Биотехнология. – 1993. – № 4. – С. 10-13.

23. Подобрый О.С. Изучение закономерностей выделения и механизмов воздействия ауторегуляторов из дрожжей *Candida utilis* / О.С. Подобрый, А.П. Белов, А.Е. Кузнецов, Г.А. Зинченко // Микробиология. – 1993. – т.62. – № 6. – С. 1056-1063.

24. Bernardete R. Adaptive DO-based control of substrate feeding in high cell density cultures operated under oxygen transfer limitation. / R. Bernardete, F.R. Albrecht, A. Dobnikar et al. / In Adaptive and Natural Computing Algorithms. Proceedings of the International Conference in Coimbra, Portugal. – 2005. – P. 300-303.

25. Sun Z. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 / Z. Sun, J.A. Ramsay, M. Guay, B.A. Ramsay // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – 71. – No 4. – P. 423-431.

26а. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям. – М.: Бюро НДТ Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии, 2015. – 395 с.

26б. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям. ИТС 10–2019. Очистка сточных вод с использованием централизованных систем водоотведения поселений, городских округов. – М.: Бюро НДТ Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии, 2019. – 434 с.

26в. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям. ИТС 8–2015. Очистка сточных вод при производстве продукции (товаров), выполнении работ и оказании услуг на крупных предприятиях. – М.: Бюро НДТ Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии, 2015. – 129 с.

27. Perez-Elvira S.I. Sludge minimisation technologies / S.I. Perez-Elvira, P. Nieto Diez, F. Fdz-Polanco // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2006. – 5. – P. 375-398. DOI 10.1007/s11157-005-5728-9

28. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. – М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.

29. *Biological wastewater treatment. Principles, modelling and design.* /Eds: M. Henze, M.C.M. van Loosdrecht, G.A. Ekama, D. Brdjanovic. – IWA Publishing, 2008. – 528 p.

30. Яковлев С.В. Биологическая очистка производственных сточных вод / Яковлев С.В., Скирдов И.В., Швецов В.Н. и др. / Под ред. С. В. Яковлева. – М.: Стройиздат, 1985. – 408 с.

31. Orhon D. *Industrial wastewater treatment by activated sludge* / D. Orhon, F.G. Babuna, O. Karahan // IWA Publishing, 2009. – 400 p.

32. Grady C.P.L. *Biological wastewater treatment 3rd ed.* / C.P.L. Grady, G.T. Daigger, N.G. Love // IWA Publishing, 2010. – 565 p.

33. Сироткина А.С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А.С. Сироткин, Г.И.Шагинурова, К.Г. Ипполитов // Казань, Издательство "ФЭН" АНРТ, 2007. – 164 с.

34. Stephenson T. *Membrane bioreactors for wastewater treatment* / T. Stephenson, S.J. Judd, B. Jefferson, K. Brindle // IWA Publishing, London. – 2000. – 192 pp.

35. Le-Clech P. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment / P. Le-Clech, V. Chen, T.A.G. Fane // *J. Membr. Sci.* – 2006. – 284(1-2). – P. 17-53.

36. Chang I.-S. Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment / I.-S. Chang, P. Le Clech, B. Jefferson, S. Judd // *J. Environ. Engin. ASCE*. – 2002. – 128. – P. 1018-1029.

37. Judd S.J. A review of fouling of membrane bioreactor in sewage treatment // *Water Sci. and Technol.* – 2004. – 49 (2). – P. 229-235.

38. German E. Biomass characteristics, aeration and oxygen transfer in membrane bioreactors: Their interrelations explained by a review of aerobic biological processes / E. German, T. Stephenson // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2005. – 4. – P. 223-233. DOI 10.1007/s11157-005-2097-3

39. Lewandowski Z. Biofilms: their structure, activity, and effect on membrane filtration / Z. Lewandowski, H. Beyenal // *Water Sci Technol.* – 2005. – 51. – P. 181–192.

40. Brookes A. Sustainable flux fouling in a membrane bioreactor / A. Brookes, B. Jefferson, G. Guglielmi, S. J. Judd // *Separation Science and Technology*. – 2006. – 41(7). – P. 1279-1292.
41. Cirja M. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR) / M. Cirja, P. Ivashechkin, A. Schaffer, P. F.X. Corvini // *Rev Environ Sci Biotechnol*. – 2008. – 7. – P. 61-78. DOI 10.1007/s11157-007-9121-8
42. Membrane bioreactors. Operation and results of an MBR wastewater treatment plant / Eds: A.G.N. van Bentem, C.P. Petri, P.F.T. Schyns, H.F. van der Roest. – IWA Publishing, 2007. – 100 p.
43. Meng F. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material / F. Meng, S.-R. Chae, A. Drews et al. // *Water Research*. – 2009. – 43(6). – P. 1489-1512.
44. Xiong Y.H. / Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling / Y.H. Xiong, Y. Liu // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. – 2010. – 86. – P. 825–837.
45. Нибусина В.И. Анализ основ мембранного загрязнения и последних достижений в области стратегии смягчения последствий загрязнений в МБР // *Современные научные исследования и инновации*. 2017. № 1 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2017/01/77164> (дата обращения: 25.03.2019).
46. Леонова В.Е. Использование химического мутагенеза в селекции микроорганизмов активного ила / В.Е. Леонова, С.В. Васильева, В.Ф. Карпухин // *Микробиологические методы защиты окружающей среды*. – Пушкино, 1988. – С. 36.
47. Путилина Н.Т. и др. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровье, 1964 – 120 с.
48. Гвоздяк П.И. Пространственная сукцессия микроорганизмов в очистке промышленных сточных вод // *Биоценоз в природе и промышленных условиях*. – 1987. – С. 54-57.
49. Стабникова Е.В. Применение активных микроорганизмов – деструкторов для очистки НЗП / Е.В. Стабникова, Н.В. Селезнева // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1995. – 31. – № 5. – С. 534-539.
50. Карпухин В.Ф. Проблема очистки сточных вод производства антибиотиков // *Водные ресурсы*. – 1975. – № 3. – С. 151-156.
51. Пааль Л.Л. Справочник по очистке природных и сточных вод / Л.Л. Пааль, Я.Я. Кару, Х.А. Мельдер, Б.Н. Репин – М.: Высшая школа, 1994. – 336 с.

52. Экологическая биотехнология: Пер. с англ./ Под ред. К. Ф. Форстера, Д. А. Дж. Вейза. – Л.: Химия, 1990. – 384с.

53. Данилович Д.А. Новые достижения в области анаэробной биологической очистки концентрированных сточных вод. Обзорная информация. – М.: Институт экономики жилищно-коммунального хозяйства АКХ им К. Д. Памфилова, 1991. – 70с.

54. Сеницын А.В. Анаэробно-аэробная технология очистки сточных вод пивоваренных предприятий России / А.В. Сеницын, А.Е. Кузнецов, М.В. Чеботаева // Экология и промышленность России. – 2005. – № 12. – С. 22-25.

55. Van Haandel A. Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater / A. Van Haandel, M.T. Kato, P.F.F. Cavalcanti, L. Florencio // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2006. – 5. – P. 21-38. DOI 10.1007/s11157-005-4888-y

56. Chernicharo C.A.L. Post-treatment option for the anaerobic treatment of domestic wastewater // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2006. – 5. – P. 73-92. DOI 10.1007/s11157-005-5683-5

57. Lettinga G. Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment / G. Lettinga, A.F.M. van Velsen, S.W. Homba, W. de Zeeuw, A. Klapwijk // Biotechnol. Bioeng. – 1980. – 22. – P. 699–734.

58. Hulshoff P.L.W. Granulation in UASB reactors / P.L.W. Hulshoff, W.J. De Zeeuw, C.T.M. Velzeboer, G. Lettinga // Water Sci. Technol. – 1983. – 15. – No 8/9. – P. 291–304.

59. Van der Hoek J.P. Granulation of denitrifying sludge // In: Granular aerobic sludge, ed. G. Lettinga, A.J.B. Zehnder, J.T.C. Grotenhuis, P.L.W. Hulshoff / Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 1988. – P. 203-210.

60. Lettinga G. UASB-process design for various types of wastewaters / G. Lettinga, P.L.W. Hulshoff // Wat. Sci. Tech. – 1991. – 24. – No 8. – P. 87-107.

61. Lettinga G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems // Anthonie van Leeuwenhoek. – 1995. – 67. – P. 3-28.

62. Lettinga G. Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future / G. Lettinga, J. Field, J. van Lier et al. // Wat. Sci. Tech. – 1995. – 35. – No 10. – P. 5-12.

63. Seghezzi L. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors / L. Seghezzi, G. Zeeman, J.B. van Lier et al. // Bioresource Technology. – 1998. – 65. – P. 175–190.

64. Hulshoff Pol L.W. Anaerobic sludge granulation / L.W. Hulshoff Pol, S.I. de Castro Lopes, G. Lettinga, P.N.L. Lens // Water Research. – 2004. – 38. – P. 1376–1389.

65. Калюжный С.В. Высокоинтенсивные анаэробные биотехнологии очистки промышленных сточных вод // Катализ в промышленности. – 2004. – № 6. – С. 42-50.

66. Хенце М. Очистка сточных вод. Биологические и химические процессы / М. Хенце, П. Армоэс, Й. Ля-Кур-Янсен, Э. Арван // Пер. с англ. – М.: Мир, 2004. – 480 с.
67. Shrihari S. Anaerobic-aerobic treatment of distillery wastes / S. Shrihari, V. Tare // *Water Air Soil Pollut.* – 1989. – 43. – P. 95-108.
68. Malaspina F. Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic-aerobic process / F. Malaspina, L. Stante, C.M. Cellamare, A. Tilche // *Water Sci. Technol.* – 1995. – 32. – No 12. – P. 59–72.
69. Rajeshwari K.V. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment / K.V. Rajeshwari, M. Balakrishnan, A. Kansal et al. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2000. – 4. – P. 135–156.
70. Sklyar V. Combined biologic (anaerobic-aerobic) and chemical treatment of starch industry wastewater / V. Sklyar, A. Epov, M. Gladchenko et al. // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2003. – 109. – P. 253–262.
71. Wilkie A.C. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks / A.C. Wilkie, K.J. Riedesel, J.M. Owens // *Biomass and Bioenergy.* – 2000. – 19. – P. 63–102.
72. Ruggiero P. Abiotic transformations of organic xenobiotics in soils: a compounding factor in the assessment of bioavailability // In: *Bioavailability of organic xenobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. NATO ASI Series /Kluwer Academic Publishers.* – 1999. – 64. – P. 159-206.
73. Van der Roest H.F. Membrane Bioreactors for Municipal Wastewater Treatment / H.F.van der Roest, D.P. Lawrence, A.G.N. van Bentem // *STOWA Report IWA Publishing, London.* – 2002. – 141 p.
74. Judd S. The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment / S. Judd, C. Judd // Oxford. – 2006. – 325 p.
75. Yang W. State-of-the-art of membrane bioreactors: Worldwide research and commercial applications in North America / W. Yang, N. Cicek, J. Ilg // *J. Membr. Sci.* – 2006. – 270. – P. 201-211.
76. Buntner D. Hybrid and other membrane bioreactor Technologies /D. Buntner, A. Sánchez, J.M. Garrido et al. // *Innovative Technologies for Urban Wastewater.* – 2010. – P. 139-160.
77. Brepols C. Operating large scale membrane bioreactors for municipal wastewater treatment // *IWA Publishing.* – 2011. – 156 p.
78. Сравнение типов мембранных биореакторов. [Электронный ресурс]. – <http://onlinembr.info/Membrane%20process/iMBR%20vs%20sMBR.html> (дата обращения 5.03.2014 )

79. Andersson E.  $\alpha$ -Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis* / E. Andersson, A.-Ch. Johansson, B. Hahn-Hägerdal // Enzyme and Microb. Technol. – 1985. – 7. – No 7. – P. 333-338.

80. Minier M. Ethanol production by extractive fermentation / M. Minier, G. Goma // Biotechnol. and Bioeng. – 1982. – 24. – N 7. – P. 1565-1579.

81. Taya M. Monitoring and control for extractive fermentation of *Clostridium acetobutylicum* / M. Taya, S. Ishi, T. Kobayshi // J. Ferment. Technol. – 1985. – 63. – N 2. – P.181-187.

82. Boontawan P. Extractive fermentation of L(+)-lactic acid by *Pedococcus pentosanes* using electrodeionization (EDI) technique / P. Boontawan, S. Kanchanathawee, A. Boontawan // Biochem. Engin. J. – 2011. – 54(3). – P. 192-199.

83. Kaul R. Extractive bioconversion in aqueous two-phase systems. Production of prednisolone from hydrocortisone using *Arthrobacter simplex* as catalyst / R. Kaul, Bo Mattiasson // Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 1986. – 24. – N 4. – P. 259-265.

84. Gössi A. *In-situ* recovery of carboxylic acids from fermentation broths through membrane supported reactive extraction using membrane modules with improved stability / A. Gössi, F. Burgener, D. Kohler et al. // Separation and Purification Technology. – 2020. – 241. doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116694

85. Янчевский В.К. Сбраживание мелассного сусла дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при пониженном давлении / В.К. Янчевский, А.Д. Коваленко // Микробиологический журнал. – 1983. – 45. – № 1. – С.35-39.

86. Groot W.J. Pervaporation for simultaneous product recovery in the butanol/isopropanol batch fermentation / W.J. Groot, C.E. Van den Oever, N.W.F. Kossen // Biotechnol. Lett. – 1984. – 6. – N 1. – P.709-714.

87. Lee S.S. Repeated fed-batch fermentation using yeast cells and activated carbon extraction system / S.S. Lee, H.Y. Wang // Biotechnol. and Bioeng. Symp. – 1982. – N 12. – P.221-231.

88. Knoop B. Adsorbenskultur – ein Weg zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion in pflanzlichen suspensions Kulturen / B. Knoop, R. Beiderbeck // Z. Naturforsch. – 1983. – C38. – N 5-6. – S. 484-486.

89. Robins R.J. The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polimeric adsorbents / R.J. Robins, M.J.C. Rhodes // Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 1986. – 24. – N 1. – P.35-41.

90. Davison et al. A proposed biparticle fluidized-bed for lactic acid fermentation and simultaneous adsorption // Biotechnol. Bioeng. – 1992. – 39. – P. 365-368.

91. Srivasrava A. Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin / A. Srivasrava, P.K. Roychoudhury, V. Sahai // *Biotechnol. Bioeng.* – 1992. – 39(6). – 607-613.
92. Yabannavar V.M. Extractive fermentation for lactic acid production V.M. Yabannavar, D.I.C. Wang // *Biotechnol. Bioeng.* – 1991. – 37. – P. 1095-1100.
93. Ye K. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation / K. Ye. S. Jin, K. Shimizu // *J. of Ferment. Bioeng.* – 1996. – 81(3). – P. 240-246.
94. Maiorella B. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* / B. Maiorella, H. Blanch, C.R. Wilke // *Biotechnol. Bioeng.* – 1983. – 25. – N 1. – P. 103-121.
95. Holst O. Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited cultures: cultivation of *Streptococcus lactis* for production of superoxide dismutase / O. Holst, L. Hansson, A.C. Berg, B. Mattiasson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1985. – 23. – N 1. – P.10-14.
96. РАКИТИН В.Ю. Регулирование состава ферментационной среды как метод управляемого культивирования микроорганизмов.: Обзор / В.Ю. Ракитин, В.А. Чугасова, Б.П. Финогенов, А.В. Жженова // М.: ВНИИСЭНТИМинмедмикробиопрома. – 1986. – 36 с.
97. Hahn-Hägerdal B. Shift in metabolism towards ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* using alterations of the physical-chemical microenvironment / B. Hahn-Hägerdal, M. Larsson, B. Mattiasson // *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* – 1982. – N 12. – P. 199-202.
98. Strazdis J.R. Reproducible and rapid methods for the isolation and assay of a-factor, an yeast mating hormone / J.R. Strazdis, V.L. Mackay // *J. Bacteriol.* – 1982. – 151. – N 3. – P. 1153-1161.
99. Wase D.A.J. Inhibitor of  $\beta$ -D-glucosidase and endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase produced by *Aspergillus fumigatus* IMI225091 / D.A.J. Wase, S. Raymahasay, S. Geen // *Enzyme and Microb. Technol.* – 1986. – v.8. – N 1. – P. 48-52.
100. Градова Н.Б. Физиологические особенности углеводородокисляющих дрожжей рода *Candida* и селекция производственных штаммов / Дис... докт. биол. наук. – М., 1976.
101. Швецов В.Н. Перспективы применения биосорбционного метода для очистки сточных вод / В.Н. Швецов, К.М. Морозова, О.Э. Захарова, Л.А. Петрова // Механическая и биологическая очистка сточных вод и обработка осадков предприятий агропромышленного комплекса. Тр. института ВОДГЕО. – М., 1986 – С. 85-94.

102. Абрамов А.В. Биологическая и биосорбционная доочистка сточных вод на гранулированной и волокнистой загрузках / А.В. Абрамов, Н.И. Куликов // Исследования в области механической и биологической очистки производственных сточных вод – М.: ВНИИ ВОДГЕО, 1991. – с. 24–49.

103. Сироткин А. С. Технологические и экологические основы биосорбционных процессов очистки сточных вод / Дис... докт. техн. наук. – Казань, 2003. – 283 с.

104. Persson I. Semicontinues cellulase production in an aqueous two-phase system with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 / I. Persson, F. Tjerneld, B. Hahn-Hägerdal // Enzyme and Microb. Technol. – 1984. – 6. – N 9. – P. 415-418.

105. Hongo M. Novel method of lactic acid production by electro dialysis fermentation / M. Hongo, Y. Nomura, M. Iwahara // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – 52. – P. 314-319.

106. Nomura Y. Lactic acid production by electro dialysis fermentation using immobilized growing cells / Y. Nomura, M. Iwahara, M. Hongo // Biotechnol. Bioengin. – 1987. – 30. – No 6. – P. 788-793.

107. Vonktaveesuk P. Stimulation of the rate of L-lactate fermentation using *Lactococcus lactis* IO-1 by periodic electro dialysis / P. Vonktaveesuk, M. Tonokawa, A. Ishizaki // J. Fermentation Bioeng. – 1994. – 77. – P. 508-512.

108. Xuemei L. L-lactic acid production using immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized-bed with simultaneous product separation by electro dialysis / L. Xuemei, L. Jiaping, L. Mo'e, C. Peilin // Bioprocess Engineering. – 1999. – 20. – P. 230-237.

109. Danner H. Thermophilic production of lactic acid using integrated membrane bioreactor systems coupled with monopolar electro dialysis / H. Danner, L. Madzingaidzo, C. Thomasser, M. Neureiter, R. Braun // J. of Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 59. – Issue: 2-3. – P. 160-169.

110. Madzingaidzo L. Process development and optimisation of lactic acid purification using electro dialysis / L. Madzingaidzo, H. Danner, R. Braun // Journal of Biotechnology. – 2002. – 96(3). – P. 223-239.

111. Gao M. T. Production of L-lactic acid by electro dialysis fermentation (EDF) / M. T. Gao, M. Hirata, M. Kode // Process. Biochem. – 2004. – 39. – P. 1903–1907.

112. Wang X. *In situ* combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: Operational compatibility and uniformity / X. Wang, Y. Wang, X. Zhang, T. Xu // Bioresource Technology. – 2012. – 125. – P. 165–171.

113. The biotechnology of ethanol. Classical and future application / Ed. by M. Roehr // WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001. – 232 p.

114. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 334 с.

115. Hamer G. Recycle in fermentation processes // *Biotechnol. and Bioeng.* – 1982. – 24. – N 3. – P. 511-531.
116. Dostalek M. A filter fermenter apparatus and control equipment / M. Dostalek, M. Häggstrom // *Biotechnol. and Bioeng.* – 1982. – 24. – N 9. – P. 2077-2086.
117. Mandel D.K. The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production / D.K. Mandel, D.K. Dea, H.W. Blanch, C.R. Wilke // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – 5. – N 10. – P. 665-670.
118. Cheryan M. A high-performance membrane bioreactor for continuous fermentation of lactose to ethanol / M. Cheryan, M.A. Mehaia // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – 5. – N 8. – P. 519-524.
119. Cheryan M. Ethanol production in a membrane recycle bioreactor. Conversion of glucose using *Saccharomyces cerevisiae* / M. Cheryan, M.A. Mehaia // *Process Biochem.* – 1984. – 19. – N 3. – P. 204-208.
120. Ohleyer E. Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor / E. Ohleyer, H.W. Blanch, Ch.R. Wilke // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* – 1985. – 11. – N 4. – P. 317-332.
121. Damiano D. Performance kinetics and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membranes / D. Damiano, Ch.S. Shin, N.H. Yu, S.S. Wang // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 1985. – 21. – N 1-2. – P. 69-77.
122. Frank G.T. Alcohol production by yeast fermentation and membrane extraction / G.T. Frank, K.K. Sirkar // *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* – 1985. – N 15. – P. 621-631.
123. Nanba A. Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module / A. Nanba, K. Kimura, S. Nagai // *J. Ferment. Technol.* – 1985. – 63. – N 2. – P. 175-179.
124. Park T.H. Hollow-fibre fermenter using ultrafiltration / T.H. Park, I.H. Kim // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 1985. – 22. – N 3. – P. 190-194.
125. Кузнецов А.Е. Проведение и изучение процессов биосинтеза в мембранном биореакторе / А.Е. Кузнецов, Н.С. Марквичев, А.А. Свитцов, М.Н. Манаков // *Труды РХТУ им. Д.И. Менделеева.* – 1985. – 135. – С. 12-20.
126. Свитцов А.А. Мембранные биореакторы в биотехнологии. Обзор / А.А. Свитцов, Н.С. Марквичев, В.В. Кураков. – М.: ВНИИСЭНТИМинмедмикробиопрора, 1986. – 36 с.
127. Манаков М.Н. Мембранные реакторы в биотехнологии / М.Н. Манаков, А.Е. Кузнецов, Н.С. Марквичев, А.А. Свитцов // *Биотехнология.* – 1988. – 4. – № 2. – С. 162-175.

128. Cicek N. Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular weight compounds / N. Cicek, J.P. Franco, M.T. Suidan et al. // Water Environ. Res. –1999. – 71. – Issue 1. – P. 64-70.

129. Schultz J.S. Dialysis culture of microorganisms: design, theory and results / J.S. Schultz, P. Gerhardt // Bacteriol. Rev. – 1969. – 33. – N 1. – P. 1-47.

130. Landwall P. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture / P. Landwall, T. Holme // J. Gen. Microbiol. – 1977. – 103. – N 2. – P. 345-352.

131. Portner R. Dialysis Culture / R. Portner, M. Markl // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – 50. – No. 4. – P. 403-414.

132. Nakano K. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor / K. Nakano, M. Rischke, S. Sato, H. Märkl // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1997. – 48. – Issue 5. – P. 597-601.

133. Aida T. Studies on the utilization of hydrocarbons by yeasts. Part IV. – On the dialysis culture of *Mycotorula japonica* and “growth-inhibitory” factor in the dialysable material / T. Aida, H. Yamaguchi // Agr.Biol.Chem. – 1969. – 33. – N 9. – P. 1244.

134. Паников Н.С. Энергетические траты на поддержание *Debaryomyces formicarius* в хемостатной и непрерывной диализной культуре / Н.С. Паников, А.Г. Дорофеев, Д.Г. Звягинцев // Микробиология. – 1982. – 51. – № 5. – С. 723-729.

135. Хванг С.-Т., Каммермейер Л. Мембранные процессы разделения. – М.: Химия, 1981. – 464 с.

136. Mueded H. Membrane bioreactor for lactic acid production / H. Mueded, J. Sanchez, C. Bardot, M. Fick // J. Membr. Sci. – 1996. – 114. – 55-71.

137. Giorno L. Study of a cell-recycle membrane fermentor for the production of lactic acid by *Lactobacillus bulgaricus* / L. Giorno, K. Chojnacka, L. Donato, E. Drioli // Ind. Eng. Chem. Res. – 2002. – 41 (3). – P. 433-440.

138. Nishiwaki A. Comparison of lactic acid productivities at high substrate conversions in a continuous two-stage fermenter with cell recycle using different kinetic models / A. Nishiwaki, I. Dann // Chem. Engin. Communications. – 2005. – 192(2). – P. 219-236.

139. Xu G. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei* / G. Xu, J. Chu, Y.-H. Wang et al. // Proc. Biochem. – 2006. – 41(12). – P. 2458-2463.

140. Pal P. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes / P. Pal, J. Sikder, S. Roy, L. Giorno // Chem. Eng. Prog. – 2009 – 48. – P. 1549-1559.

141. Lu Z. Enhancement of pilot scale production of l(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor / Z. Lu, M. Wei, L. Yu // *Process Biochem.* – 2012. – 47(3). – 419-415.

142. Dey P. Direct production of L(+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions / P. Dey, P. Pal // *J. of Membr. Scie.* – 2012. – 389. – P. 355-362.

143. Fan R. Anaerobic membrane bioreactor for continuous lactic acid fermentation / R. Fan, M. Ebrahimi, P. Czermak // *Membranes.* – 2017. – 7(2). – P. 26. DOI: 10.3390/membranes7020026.

144. Schlote D. Effect of cell recycle on continuous butanol-acetone fermentation with *Clostridium acetobutylicum* under phosphate limitation / D. Schlote, G. Gottschalk // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 1986. – 24. – N 1. – P. 1-5.

145. Pierrot P. Continuous acetone-butanol fermentation with high productivity by cell ultrafiltration and recycling / P. Pierrot, M. Fick, J.M. Engasser // *Biotechnol. Lett.* – 1986. – 8. – N 4. – P. 253-256.

146. Ferras E. Acetonobutylic fermentation: improvement of performances by coupling continuous fermentation and ultrafiltration / E. Ferras, M. Minier, G. Goma // *Biotechnol. and Bioeng.* – 1986. – 28. – N 4. – P. 523-533.

147. Reed W.M. Application of cell recycle to continuous fermentative acetic acid production / W.M. Reed, M.E. Bogdan // *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* – 1985. – N 15. – P. 641-647.

148. Robertson C.R. Dual aerobic hollow-fiber bioreactor for cultivation of *Streptomyces aureofaciens* / C.R. Robertson, I.H. Kim // *Biotechnol. and Bioeng.* – 1985. – 27. – N 7. – P. 1012-1020.

149. Taniguchi M. Continuous cellulase production by cell-holding culture / M. Taniguchi, T. Kato, R. Matsuno, T. Kamikubo // *Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 1983. – 18. – N 4. – P. 218-224.

150. Spira W.M. Enterotoxin production by *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* growth in continuous culture with microbial cell recycle / W.M. Spira, P.J. Fedorka-Cray // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1983. – 46. – N 3. – P. 704-709.

151. Lee W. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors / W. Lee, S. Kang, H. Shin // *J. Membr. Sci.* – 2003. – 216. – Issues 1-2. – P. 217-227.

152. Ognier S. Membrane bioreactor fouling in sub-critical filtration conditions: a local critical flux concept / S.Ognier, C.Wisniewski, A.Grasmick // *J. Membr. Sci.* – 2004. – 229 (1-2). – P. 171-177.

153. Kimura K. Membrane fouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater / K. Kimura, N. Yamato, H. Yamamura, Y. Watanabe. // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – 39 (16). – P. 6293-6299.

154. Meng F. Fouling mechanisms of deflocculated sludge, normal sludge, and bulking sludge in membrane bioreactor / F. Meng, F. Yang // *J. Membr. Sci.* – 2007. – 305. – Issues 1-2. – P. 48-56.

155. Liao B.Q. A review of biofouling and its control in membrane separation bioreactors / B.Q. Liao, D.M. Bagley, H.E. Kraemer et al. // *Water Environ. Res.* – 2004. – 76. – P. 425–436.

156. Дытнерский Ю.И. Обратный осмос и ультрафильтрация. – М.: Химия, 1978. – 352 с.

157. Bruin S. Overview of concentration polarization in ultrafiltration / S. Bruin, A. Kikkert, J.A.G. Weldring // *Desalination.* – 1980. – 35. – N 1-3. – P. 223-242.

158. Matthiasson E. The role of macromolecular adsorption in fouling of ultrafiltration membranes // *J. Membrane Sci.* – 1983. – 16. – P. 23-26.

159. Suki A. Flux decline in protein ultrafiltration / A. Suki, A.G. Fane, C.J.D. Fell // *J. Membr. Sci.* – 1984. – 21. – N 3. – P. 269-283.

160. Zierdt C.H. Adherence of bacteria, yeast, blood cells and latex spheres to large-porosity membrane filters // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1979. – 38. – N 6. – P. 1166.

161. Errede L.A. Effect of molecular adsorption in fouling of ultrafiltration membranes // *J. Membrane Sci.* – 1984. – 20. – P. 45-61.

162. Ma H. Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing / H. Ma, L.F. Hakim, C.N. Bowman, R.H. Davis. // *J. Membr. Sci.* – 2001. – 189. – P. 255–270.

163. Zita A. Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs / Zita A., Hermansson M. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – 63. – P. 1168-1170.

164. Van der Marela P. Influence of membrane properties on fouling in submerged membrane bioreactors / P. Van der Marela, A. Zwijnenburg, A. Kemperman et al. // *J. Membr. Sci.* – 2010. – 348. – P. 66–74.

165. Yu H. Y. Surface modification of polypropylene microporous membranes to improve their antifouling property in MBR: NH<sub>3</sub> plasma treatment / H.Y. Yu, M.X. Hu, Z.K. Xu et al. // *Separation and Purification Technology.* – 2005. – 45. – P. 8-15.

166. Kim J.S. Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor / J.S. Kim, C.H. Lee, I.S. Chang // *Water Research.* – 2001. – No 35. – P. 2137-2144.

167. Liu R. Hydrodynamic effect on sludge accumulation over membrane surfaces in a submerged membrane bioreactor / R. Liu, X. Huang, Y.F. Sun. // *Process Biochemistry*. – 2003. – No 39. – P. 157-163.

168. Monclu`s H. Criticality of flux and aeration for a hollow fiber membrane bioreactor / H. Monclu`s, S. Zacharias, M. Pidou et al. // *Separation Science and Technology*. – 2010. – 45(7). – P. 956-961.

169. Pollice A. Sub-critical flux fouling in membrane bioreactors – a review of recent literature / A. Pollice, A. Brookes, B. Jefferson, S. Judd // *Desalination*. – 2005. – 174. – P. 221-230.

170. Cho B.D. Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor / B.D. Cho, A.G. Fane // *J. Membr. Sci.* – 2002. – 209 (2). – P. 391-403.

171. Sofia A. Engineering design approaches for minimum fouling in submerged MBR / A. Sofia, W. J. Ng, S. L. Ong // *Desalination*. – 2004. – 160. – P. 67-74.

172. Qiyong Y. Контроль загрязнения погружных мембран в мембранных биореакторах с пористой плавающей загрузкой / Y. Qiyong, C. Jihua, Z. Feng // *Вода и экология. Проблемы и решения*. – 2008. – № 1. – С. 33–46.

173. Yamamoto K. Direct solide-liquid separation using hollow fibre membrane in an activated sludge aeration tank / K. Yamamoto, M. Hiasa, T. Mahmood, T. Matsuo // *Water Sci. Technol.* – 1989. – 21(10). – P. 43-54.

174. Bouillot P. Membrane bioreactors for the evaluation of maintenance phenomena in wastewater treatment / P. Bouillot, A. Canales, A. Pareilleux et. al. // *J. Ferment. Bioeng.* – 1990. – 49. – P. 601-610.

175. Muller E.B. Aerobic domestic waste-water treatment in a pilot-plant with complete sludge retention by cross-flow filtration / E.B. Muller, A.H. Stouthamer, H.W. Vanversveld, D.H. Eikelboom // *Water Research*. – 1995. – 29. – P. 1179-1189.

176. Brindle K. The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewater of special interest / K. Brindle, T. Stephenson // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – 49. – P. 601-610.

177. Gander M. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations / M. Gander, B. Jefferson, S. Judd // *Separation and Purification Technology*. – 2000. – 18. – P. 119-130.

178. Cicek N. Effect of solids retention time on the performances and biological characteristics of a membrane bioreactor / N. Cicek, J. Macomer, J. Davel et al. // *Water Sci Technol*. 2001. – 43(11). – P. 43-50.

179. Galil N.I. Membrane bioreactors for final treatment of wastewater / N.I. Galil, Ch. Sheidorf, N. Stahl et al. // *Water Sci Technol*. – 2003. – 48(8). – P. 103-110.

180. Melin T. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse / T. Melin, B. Jefferson, D. Bixio et al. // *Desalination*. – 2006. – 187. – No 1–3. – P. 271–282.

181. Clara M. Comparison of the behaviour of selected micropollutants in a membrane bioreactor and a conventional wastewater treatment plant / M. Clara, B. Strenn, N. Kreuzinger // *Water Sci Technol*. – 2004. – 50(5). – P. 29-36.

182. Clara M. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants / M. Clara, B. Strenn, O. Gans et al. // *Water Res*. – 2005. – 39(19). – P. 4797-4807.

183. Kimura K. Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sludge system and membrane bioreactor / K. Kimura, Hiroe H., Y. Watanabe // *Environ. Sci. and Technol*. – 2007. – 41. – No 10. – P. 3708–3714.

184. Lesjean B. Outcomes of a 2 year investigation on enhanced biological nutrients removal and trace pollutants elimination in membrane bioreactor (MBR) / B. Lesjean, R. Gnirss, H. Buisson et al. // *Water Sci. Technol*. – 2005. – 52(10-11). – P. 453-460.

185. Cornel P. Membrane bioreactors in industrial wastewater treatment – European experiences, examples and trends / P. Cornel, S. Krause // *Water Sci Technol*. – 2006. – 53(3). – P. 37-44.

186. Kang I.J. Characteristics of microfiltration membranes in a membrane coupled sequencing batch reactor system / I.J. Kang, C.H. Lee, K.J. Kim // *Water Research*. – 2003. – 37. – P. 1192-1197.

187. Ince O. Composition of the microbial population in a membrane anaerobic reactor system during start-up / O. Ince, G.K. Anderson, B. Kasapgil // *Wat. Res*. – 1997. – 31. – No 1. – P. 1-10.

188. Hernandez A.E. Retention of granular sludge at high hydraulic charges in an anaerobic membrane bioreactor with immersed filtration / A.E. Hernandez, L.C. Belalcazar, M.S. Rodrigues, E. Giraldo // *Water Sci Technol*. – 2002. – 45(10). – P. 169-174.

189. Pressman J.G. Demonstration of efficient trichloroethylene biodegradation in a hollow-fiber membrane bioreactor / J.G. Pressman, G. Georgiou, G.E. Jr. Speitel // *Biotechnol Bioeng*. – 1999. – 62(6). – P. 681-92.

190. Bitton G. *Wastewater microbiology* (3-rd ed). – John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005. – 746 p.

191. Young T. MBR vs. CAS: Capital and Operating Cost Evaluation / T. Young, M. Muftugil, S. Smoot, J. Peeters // *Water Practice Technol*. – 2012. – 7(4). – P. 1–8.

192. Theilen U. Membranen in grosstechnischen Anlagen // *Wasserwirt. Wassertechn*. – 2006. – No 7–8. – S. 8–16.

193. Hackner T. Membranbelebungs anlage in Spanien // *Wasserwirt. Wassertechn.* – 2006. – No 7–8. – S. 55–56.
194. Zein M.M. Bioremediation of groundwater contaminated with gasoline hydrocarbons and oxygenates using a membrane-based reactor / M.M. Zein, M.T. Suidan, A.D. Venosa // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – 40 (6). – P. 1997-2003.
195. Gnirss R. Einsatz hochfeiner Membranen / R. Gnirss, B. Lesjean // *Wasserwirt. Wassertechn.* – 2006. – No 7–8. – S. 27.
196. Richter S. Membranbelegung der Container // *Wasserwirt. Wassertechn.* – 2006. – No 7–8. – S. 57–59.
197. Velizarov S. Removal of inorganic anions from drinking water supplies by membrane bio/processes / S. Velizarov, J.G. Crespo, M.A. Reis // *Reviews in Environmental Science&Bio/Technology.* – 2004. – 3. – P. 361-380. DOI: 10.1007/s11157-004-4627-9
198. Ben Aim R.M. Membrane bioreactors for wastewater treatment and reuse: A success story / R.M. Ben Aim, M.J. Semmens // *Water Sci. Technol.* – 2002. – 47. – P. 1-5.
199. Delanghe B. Biological denitrification with ethanol in a membrane bioreactor / B. Delanghe, F. Nakamura, H. Myoga, Y. Magara // *Environ. Technol.* – 1994. – 15. – P. 61-70.
200. Wisniewski C. Use of a membrane bioreactor for denitrification of brine from an electro dialysis process / C. Wisniewski, F. Persin, T. Cherif et al. // *Desalination.* – 2002. – 149. – P. 331-336.
201. Bouhabila E.H. Microfiltration of activated sludge using submerged membrane with air bubbling (application to wastewater treatment) / E.H. Bouhabila, R. Ben Aim, H. Buisson. // *Desalination.* – 1998. – 118. – P. 315–322.
202. Cornel P. Investigation of oxygen transfer rates in full scale membrane bioreactor / P. Cornel, M. Wagner, S. Krause // *Water Sci. Technol.* – 2003. – 47. – P. 313-319.
203. Fan X.J. Nitrification in a membrane bioreactor (MBR) for wastewater treatment / X.J. Fan, V. Urban, J. Manem et al. // *Water Sci Technol.* 2000. – 42(3-4). – P. 289-294.
204. Li H. Comparison of nitrification performance and microbial community between submerged membrane bioreactor and conventional activated sludge system / H. Li, M. Yang, Y. Zhang et al. // *Water Sci. Technol.* – 2005. – 51. – P. 193-200.
205. McAdam E. J. Fate and impact of organics in an immersed membrane bioreactor applied to brine denitrification and ion exchange regeneration / E.J. McAdam, M. Pawlett, S.J. Judd // *Water Research.* – 2010. – 44(1). – P. 69-76.
206. Li X. Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system / X. Li, Y. Li, H. Liu et al. // *J. Membrane Sci.* – 2007. – 287. – No 2. – P. 294-299.

207. Li X. Treatment of synthetic wastewater by a novel MBR with granular sludge developed for controlling membrane fouling / X. Li, F. Gao, Zh. Hua et al. // *Sep. Purif. Technol.* – 2005. – 46. – No 1–2. – P. 19-25.

208. Krampe J. Sequencing batch reactor with submerged hollow fibre membranes for the biomass separation / J. Krampe, K. Krauth // In: *Proceedings of 2nd international symposium on sequencing batch reactor technology.* – 2000. – 2. – P. 109-15.

209. *Sequencing Batch Reactor Technology* / Eds: P.A. Wilderer, R.L. Irvine, M.C. Goronszy. – IWA Publishing, 2001. – 100 p.

210. Zhang B. Floc size distribution and bacterial activities in membrane separation activated sludge processes for small-scale wastewater treatment/reclamation / B. Zhang, K. Yamamoto, S. Ohgaki, N. Kamiko // *Water Sci. Technol.* – 1997. – 35. – P. 37-44.

211. Sua B. Optimal cultivation and characteristics of aerobic granules with typical domestic sewage in an alternating anaerobic/aerobic sequencing batch reactor / B. Sua, X. Cuib, J. Zhu // *Bioresource Technology.* – 2012. – 110. – P. 125–129.

212. Wisniewski C. Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling / C. Wisniewski, A. Grasmick // *Colloids Surfaces.* – 1998. – №.138. – P. 403-411.

213. Nagaoka H. Influence of bacterial extracellular polymers on the membrane separation activated sludge process / H. Nagaoka, S. Ueda, A. Miya // *Water Sci. Technol.* – 1996. – 34. – P. 165-172.

214. Nagaoka H. Modeling of biofouling by extracellular polymers in a membrane separation activated sludge system / H. Nagaoka, S. Yamanishi, A. Miya // *Water Sci. Technol.* – 1998. – 38. – 497–504.

215. Cammarota M.C. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation / M.C. Cammarota, G.L. Sant'Anna Jr. // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – 20. – P. 1-4.

216. Jarusutthirak C. Role of soluble microbial products (SMP) in membrane fouling and flux decline / C. Jarusutthirak, G. Amy // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – 40 (3). – P. 969-974.

217. Cosenza A. The role of EPS in fouling and foaming phenomena for a membrane bioreactor / A. Cosenza, G.D. Bella, G. Mannina, M. Torregrossa // *Bioresource Technology.* – 2013. – 147. – P. 184-192.

218. Bugge T.V. Filtration properties of activated sludge in municipal MBR wastewater treatment plants are related to microbial community structure / T.V. Bugge, P. Larsen, A.M. Saunders et al. // *Water Research.* –2013. – 47. – Issue 17. – P. 6719-6730.

219. Huang X. Effect of sludge retention time on microbial behaviour in a submerged membrane bioreactor / X. Huang, P. Gui, Y. Qian // *Process Biochem.* – 2001. – 36. – P. 1001-1006.

220. Ahmed Z. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor / Z. Ahmed, Jinwoo C., B.-R. Lim et al. // *J. Membr. Sci.* – 2007. – 287. – № 2. – P. 211–218.

221. Han S. S. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system / S.S. Han, T.H. Bae, G.G. Jang, T.M. Tak // *Process Biochemistry.* – 2005. – 40. – P. 2393-2400.

222. Hwang B.K. Correlating TMP increase with microbial characteristics in the bio-cake in the membrane surface in a membrane bioreactor / B.K. Hwang, W.N. Lee, K.M. Yeon et al. // *Environ Sci Technol.* – 2008. – 42(11). – P. 3963–3968.

223. Trussel R.S. The effect of organic loading on process performance and membrane fouling in a submerged membrane bioreactor treating municipal wastewater / R.S. Trussel, R.P. Merlo, S.W. Hermanowicz, D. Jenkins // *Water Research.* – 2006. – No 40. – P. 2675-2683.

224. Trussell R. Sh. Influence of mixed liquor properties and aeration intensity on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor at high mixed liquor suspended solids concentrations / R.S. Trussell, R.P. Merlo, S.W. Hermanowicz, D. Jenkins // *Water Research.* – 2007. – 41. – Issue 5. – P. 947-958.

225. Guo J. Filamentous and non-filamentous bulking of activated sludge encountered under nutrients limitation or deficiency conditions / J. Guo, Y. Peng, S. Wang et al. // *Chem. Engin. J.* – 2014. – 255. – P. 453-461.

226. Zhang K. Identifying pioneer bacterial species responsible for biofouling membrane bioreactors / K. Zhang, H. Choi, D.D. Dionysiou et al. // *Environmental Microbiology.* – 2006. – 8(3). – P. 433-440.

227. Rosenberger S. Operation of different membrane bioreactors: Experimental results and physiological state of the microorganisms / S. Rosenberger, R. Witzig, W. Manz et al. // *Water Sci. Technol.* – 2000. – 41. – P. 269-277.

228. Lu S.G. A model for membrane bioreactor process based on the concept of formation and degradation of soluble microbial products / S.G. Lu, T. Imai, M. Ukita et al. // *Water Res.* – 2001. – 35. – P. 2038-2048.

229. Ma Z. Effect of temperature variation on membrane fouling and microbial community structure in membrane bioreactor / Z. Ma, X. Wen, F. Zhao et al. // *Bioresource Technology.* – 2013. – 133. – P. 462-468.

230. Oliveira-Esquerre K.P. Incorporation of the concept of microbial product formation into ASM3 and the modeling of a membrane bioreactor for wastewater treatment / K.P. Oliveira-Esquerre, H. Narita, N. Yamato et al. // *Braz. J. Chem. Eng.* – 2006. – 23. – No 4. – P. 461–471.

231. Feng D. Ultrasonic defouling of reverse osmosis membranes used to treat wastewater effluents / D. Feng, J.S.J. Van Deventer, C. Aldrich // *Separ. and Purif. Technol.* – 2006. – 50. – No 3. – P. 318–323.

232. Chang S. The effect of fibre diameter on filtration and flux distribution-relevance to submerged hollow fibre modules / S. Chang, A.G. Fane // *J. Membr. Sci.* – 2001. – 184. – P. 221–231.

233. Hong S.-H. The effects of intermittent aeration on the characteristics of bio-cake layers in a membrane bioreactor / S.-H. Hong, W.-N. Lee, H.-S. Oh et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – 41 (17). – P. 6270-6276.

234. Psoch C. Critical flux aspect of air sparging and backflushing on membrane bioreactors / C. Psoch, S. Schiewer // *Desalination.* – 2005. – 175. – No 1. – P. 61–71.

235. Rosenberger S. Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water / Rosenberger S., Kruger U., Witzig R. et al. // *Water Res.* – 2002. – 36. – P. 413–420.

236. Ma H. Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing / H. Ma, L.F. Hakim, C.N. Bowman, R.H. Davis // *J. Membr. Sci.* – 2001. – 189. – P. 255–270.

237. Seo G.T. Domestic wastewater reclamation by submerged membrane bioreactor with high concentration powdered activated carbon for stream restoration / G.T. Seo, H.I. Ahan, J.T. Kim et al. // *Water Sci. Technol.* – 50. – 2004. – P. 173–178.

238. DE 102004057383. Wastewater microfilter comprises carrier with main sewer, diaphragms held at the carrier, pure water connection and overfall basin floating in the wastewater basin. – 08.06.2006.

239. Wozniak T. MBR design and operation using MPE-technology (Membrane Performance Enhancer) // *Desalination.* – 2010. – 250. – Issue 2. – P. 723-728.

240. Carberry J.B. Peroxide pre-oxidation of recalcitrant toxic waste to enhance biodegradation / J.B. Carberry, T.M. Benzing // *Water Sci. Technol.* – 1991. – 23. – P. 367-376.

241. Lee S.H. Biodegradation of PCP enhanced by chemical oxidation pretreatment / S.H. Lee, J.B. Carberry // *Water Environ. Res.* – 1992. – 64. – P. 682–690.

242. Koyama O. Degradation of chlorinated aromatics by Fenton oxidation and methanogenic digester sludge / O. Koyama, Y. Kamagata, K. Nakamura // *Water Res.* – 1994. – 28. – P. 885-899.

243. Scott J.P. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations / J.P. Scott, D.F. Ollis // *Environ. Prog.* – 1995. – 14. – P. 88–103.

244. Кузнецов А.Е. Биотехнологическая деструкция ионообменных смол / А.Е. Кузнецов, О.В. Князев, И.Ю. Мареев, М.Н. Манаков // *Биотехнология.* – 2000. – № 1. – С. 66-77.

245. Князев О.В. Изучение условий микробной деструкции катионита КУ-2-8 / О.В. Князев, А.Е. Кузнецов // *Биотехнология.* – 2000. – № 1. – С. 78-84.

246. Büyüksönmez F. Simultaneous abiotic-biotic mineralization of perchlorethylene (PCE) / F. Büyüksönmez, T.F. Hess, R.L. Crawford, R.J. Watts // In: *Designing and applying treatment technologies: remediation of chlorinated and recalcitrant compounds.* / G.B. Wichramanayake, R.E. Hinchee (ed.). Battelle Press, Columbus, Ohio. – 1998. – P. 277-282.

247. Büyüksönmez F. Optimization of simultaneous chemical and biological mineralization of perchlorethylene / F. Büyüksönmez, T.F. Hess, R.L. Crawford et al. // *Appl. and Env. Microbiol.* – 1999. – 65. – No 6. P. 2784–2788.

248. Lee B-D. A hybrid Fenton oxidation–microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene / B-D. Lee, M. Hosomi // *Chemosphere.* – 2001. – 43. – No 8. – P. 1127-1132.

249. Кузнецов А.Е. Разработка высокоинтенсивной замкнутой гибридной системы биодеструкции с использованием биологически агрессивного химического реагента / А.Е. Кузнецов, В.В. Сафронов // В сб.: *Научные исследования высшей школы в области химии и химических продуктов: Межвузовский сборник научных трудов.* Вып. 179. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001. – С. 227-241.

250. Kouznetsov A.Ye. Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of microorganisms and biodestruction of pollutants / A.Ye. Kouznetsov, S.V. Kalyonov // In: *New Research on the Environment and Biotechnology.* – Nova Science Publishers Inc, New York, 2006. – P. 105-113.

251. Tyre B.W. Treatment of four biorefractory contaminants in soils using catalyzed hydrogen peroxide / B.W. Tyre, R.J. Watts, G.C. Miller // *J. Environ. Qual.* – 1991. – 20. – P. 832–838.

252. Martens D.A. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil treated with an advanced oxidative process Fenton's reagent / D.A. Martens, Frankenberger W.T. // *J. Soil Contam.* – 1995. – 4. – P. 1-16.

253. Miller R.M. Photolysis primes biodegradation of benzo[a]pyrene / R.M. Miller, G.M. Singer, J.D. Rosen, R. Bartha // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1988. – 54. – No 7. – P. 1724-1730.

254. Разложение гербицидов / Под ред. П. Керни и Д. Кауфмана. 1971. – М.: Мир. – 358 с.
255. Walling C. Fenton's reagent revised // *Acta Chem. Res.* – 1975. – 8. – P. 125-131.
256. Cohen G. The Fenton reaction // In: *CRC handbook of methods for oxygen radical research* / R.A. Greenwald (ed.). – CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. – 1987. – P. 55–64.
257. Venkatardi R. Chemical oxidation technologies: ultraviolet light/hydrogen peroxide, Fenton's reagent, and titanium dioxide-assisted photocatalysis / R. Venkatardi, Peters R.W. // *Hazard. Waste Hazard. Mater.* – 1993. – 10. – 107-149.
258. Acher A.J. Sunlight photooxidation of organic pollutants in wastewater // *Water Sci. Technol.* – 1985. – 17(4/5). – P. 623-632.
259. Goi A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: the Fenton reagent versus ozonation / A. Goi, M. Trapido // *Environ. Technol.* – 2004. – 25. – P. 155-164.
260. Khoufi S. Application of electro-fenton oxidation for the detoxification of olive mill wastewater phenolic compounds / S. Khoufi, H. Aouissaoui, M.J. Penninck, S. Sayadi // *Water Sci Technol.* – 2004. – 49. – P. 97-102.
261. Gimeno O. Removal of emerging contaminants from a primary effluent of municipal wastewater by means of sequential biological degradation-solar photocatalytic oxidation processes / O. Gimeno, J.F. García-Araya, F.J. Beltrán et al. // *Chem. Eng. J.* – 2016. – 290. – P. 12–20.
262. Chen S.F. Study on the photocatalytic degradation of glyphosate by TiO<sub>2</sub> photocatalyst / S.F. Chen, Y.Z. Liu // *Chemosphere.* – 2007. – 67. – P. 1010-1017.
263. Zheng H. Oxidation of acidic dye Eosin Y by the solar photo-Fenton processes / H. Zheng, Y.X. Pan, X.Y. Xiang // *J. Hazard. Mater.* – 2007. – 141. – 457-464.
264. Stephenson F.A. Chemical oxidizers treat wastewater // *Environment protection.* – 1992. – 3. – No 10. – P. 23–27.
265. Kusic H. Photo-assisted Fenton type processes for the degradation of phenol: a kinetic study / H. Kusic, N. Koprivanac, A.L. Bozic, I. Selanec // *J. Hazard Mater.* – 2006. – 136. – P. 632-644.
266. US Patent 5382337. Process for oxidizing organic materials with hydrogen peroxide under conditions of irradiation in aqueous phase / I. Wlassics, M. Alfieri, W. Visentin. – 17.01.1995.
267. KR 20040106910. Remediation method of oil contaminated soil and groundwater by sequentially combined treatment of hydrogen peroxide, ultraviolet ray and oil degradable microorganisms satisfying both superior purification and economic efficiency / Y.S. Kim, J.M. Lee, T J. Lee, J.H. Park. – 20.12.2004

268. JP 2006272080. Ultrahigh-level method for treating water and water treatment system to be used therein / M. Sakagami, K. Shishida, T. Doi, T. Sato.– 12.10.2006.
269. JP 2000312895 Sludge reducing method and apparatus in biological treatment of organic waste water / T. Yamamoto, S. Matsumoto. – 14.11.2000.
270. Патент РФ № 2060967. Способ глубокой биохимической очистки сточных вод и установка для его осуществления. / В.Ф. Гавриков, А.Ш. Недува – 27.05.1996.
271. Weemaes M. Anaerobic digestion of ozonized biosolids / M. Weemaes, H. Grootaerd, F. Simoens, W. Verstraete // *Wat. Res.* – 2000. – 34. – No 8. – P. 2330-2336.
272. WO 2007053110. Treatment of wastewater / E.J. Juergensen. – 10.05.2007.
273. Ravikumar J.X. Effectiveness of chemical oxidation to enhance the biodegradation of pentachlorophenol in soils: a laboratory study / J.X. Ravikumar, M.D. Gurol // In: *Hazardous and industrial wastes. Proceedings of the Twenty-Third Mid-Atlantic Industrial Waste Conference* / R.D. Neufeld, L.W.Casson (ed.). Technomic Publishing Company, Lancaster, Pa. – 1991. – P. 211-221.
274. Barton D.A. Biodegradability of blow heat condensates with and without hydrogen peroxide / D.A. Barton, E.P. Drake // *Water Sci. Technol.* – 1994. – 29. – P. 229-238.
275. Larking D.M. Enhanced degradation of polyvinyl alcohol by *Pycnoporus cinnabarinus* after pretreatment with Fenton's reagent / D.M. Larking, R.J. Crawford, G.B.Y. Christie, G.T. Lonergan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – 65. – No. 4. – P. 1798-1800.
276. US Patent 5955350. Sequential biological/chemical/biological treatment of organic waste / B.K. Soni, K. Kayser, R.L. Kelley, V.J. Srivastava. – 21.09.1999.
277. Anagiotou C. Leachate treatment by chemical and biological oxidation / C. Anagiotou, A. Papadopoulus, M. Loizidou // *J. Environ. Sci. Health. Part A.* – 1993. – 28. – P. 21-35.
278. Bowers A.R. Treatment of toxic or refractory wastewaters with hydrogen peroxide / A.R. Bowers, P. Gaddipati, W.W. Eckenfelder, R.M. Monsen // *Water Sci. Technol.* – 1989. – 21. – P. 477–486.
279. Bowers A.R. Chemical oxidation of aromatic compounds: comparison of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub> and O<sub>3</sub> for toxicity reduction and improvements / A.R. Bowers, S.H. Cho, A. Singh // In: *Biodegradability in chemical oxidation technologies for the nineties.* / Eds: W.W. Eckenfelder, A.R. Bowers, J.A. Roth. – Technomic Publishing Company, Lancaster, Pa. – 1991. – P. 11–25.
280. Di Iaconi C. Combined chemical and biological degradation of tannery wastewater by a periodic submerged filter (SBBR) / C. Di Iaconi, A. Lopez, R. Ramadori et al. // *Water Research.* – 2002. – 36. – P. 2205-2214.

281. DE 4119144. Biological, chemical and physical processing of contaminated water involves pretreatment with oxidising agents including hydrogen peroxide and catalysts. – 17.12.1992.

282. JP 2001340894 High-degree treatment method for sweeping water of landfilling disposal plant. – 11.12.2001.

283. GB 2359302 Treatment of waste water with ozone / K. Hirano, T. Taira, J. Tanaka, S. Yoshida – 22.08.2001.

284. US Patent 6884355. Process for treating organic wastewater and apparatus for treating the organic wastewater / T. Kamiya, J. Hirotsuji, N. Yasunaga N. et al. – 26.04.2005.

285. Jochimsen J.C. Combined oxidative and biological treatment for separated streams of tannery wastewater / J.C. Jochimsen, H. Schenk, M.R. Jekel, W. Hegemann // Water Sci. Technol. – 1997. – 36(23). – P. 209-216.

286. Sato C. Decomposition of perchloroethylene and polychlorinated biphenyls with Fenton's reagent / C. Sato, S.W. Leung, H. Bell et al. // In: Emerging technologies in hazardous waste management III. / Eds. D.W. Tedder, F.G. Pohland. – American Chemical Society, Washington, D.C. – 1993. – P. 343–356.

287. Leung S.W. Degradation of perchlorethylene by Fenton's reagent: speciation and pathway / S.W. Leung, R.J. Watts, G.C. Miller // J. Environ. Qual. – 1992. – 21. – P. 377-381.

288. Watts R.J. Oxidation of sorbed hexachlorobenzene in soils using catalyzed hydrogen peroxide / R.J. Watts, S. Kong, M. Dipre, W.T. Barnes // J. Hazard. Mater. – 1994. – 39. – P. 33-47.

289. Fiorenza S. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons / S. Fiorenza, C.H. Ward // J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol. – 1997. – 18. – No 2/3. – P. 140-151.

290. Büyüksönmez F. Toxic effects of modified Fenton reactions on *Xanthobacter flavus* FB71 / F. Büyüksönmez, T.F. Hess, R.L. Crawford, R.J. Watts // Appl. and Env. Microbiol. – 1998. – 64. – No 10. – P. 3759-3764.

291. Li Z.M. Destruction of 2,4,6-trinitrotoluene by Fenton oxidation / Z.M. Li, S.D. Comfort, P.J. Shea // J. Environ. Qual. – 1997. – 26. – P. 480-487.

292. Murphy A.P. A Fenton-like reaction to neutralize formaldehyde waste solutions / A.P. Murphy, W.J. Boegli, M.K. Price, C.D. Moody // Environ. Sci. Technol. – 1989. – 23. – P. 166-169.

293. Watts R.J. Evaluation of iron catalysts for the Fenton-like remediation of diesel-contaminated soils / R.J. Watts, S.E. Dilly // J. Hazard. Mater. – 1996. – 51. – P. 209-224.

294. FR 9811738. Procédé de traitement de substances organiques en milieu aqueux, notamment d'effluents et dispositif électrochimique pour mettre en œuvre le procédé. / Conservatoire national des arts et métiers. – 24.03.2000.

295. Пат. РФ 2158713. Способ очистки сточных вод и устройство для его осуществления / И.Н. Быков, Г.А. Марков, Г.А. Сафонов и др. – 2000.11.10.

296. Синельников В.Е. Проблемы чистой воды. – М.: Знание, 1978. – 64 с.

297. Brown R.A. Oxygen transport in contaminated aquifers with hydrogen peroxide / R.A. Brown, R.D. Norris, R.L. Raymond // In Proceedings of the NWWA/API Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Groundwater. Prevention, detection and restoration. – National Water Well Association, Worthington, Ohio, 1994. – P. 441–450.

298. Pardieck D.L. Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for *in-situ* bioremediation of contaminated soils and aquifers: a review / D.L. Pardieck, E.J. Bouwer, A.T. Stone // J. Contam. Hydrol. – 1992. – 9. – P. 221–242.

299. Jieven B.J. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification / B.J. Jieven, M.D. Pierson // J. Food Protection. – 1996. – 11. – P. 1233-1241.

300. Sakai A. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli* / A. Sakai, M. Nakanishi, K. Yoshiyama, H. Maki // Genes Cells. – 2006. – 11. – P. 767-778.

301. Uytingco M.S. Waste stream cleanup by enzymatically-catalyzed reaction in an organic solvent / M.S. Uytingco, S. Parida, J.M. Wiencek // Sci. Conf. Chem. Def. Res., Aberdeen, Md, 16-19 Nov., 1993: Abstr. Dig. / US Army Edgewood Res., Dev. and Eng. Cent. – 1993. – P. 61.

302. JP 2001170672. Waste water treatment method / M. Nishimura, Y. Shimada. – 26.06.2001.

303. АС СССР 1381077. Способ биохимической очистки сточных вод фабрик первичной обработки шерсти / В.В. Найденко, Ю.Ф. Колесов, М.Л. Мушников, А.Л. Васильев. – 15.03.1988.

304. АС СССР 1717549. Способ биологической очистки сточных вод / В.В. Найденко, Ю.Ф. Колесов, М.Л. Мушников. – 07.03.1992.

305. US Patent 6780319. Method and installation for treating effluents, comprising an additional treatment of the sludge by ozonization / E. Thieblin, A. Mechineau, R. Pujol. – 24.08.2004.

306. Пат. РФ 2146231. Способ биологической очистки сточных вод / А.А. Степкин, Ю.А. Степкина – 10.03.2000.

307. Sakai Y. An activated sludge process without excess sludge production / Y. Sakai, T. Fukase, H. Yasui, M. Shibata // *Water Sci. Technol.* – 1997. – 36(11). – P. 163-170.

308. JP 2001259675. Sludge amount reducing method and its device / S. S. Matsumoto . – 25.09.2001.

309. JP 2006314911. Sludge treatment method and waste water treatment system for biological treatment tank / M. Sato, H. Inaba, N. Okamura et al. – 24.11.2006.

310. EP 03000623.3. Method for sludge reduction in a water treatment system. – 2003.

311. Пат. РФ 2119460. Способ биологической очистки сточных вод / И.И. Дамиров, А.А. Денисов, В.И. Феоктистов. – 27.09.1998.

312. Пат. РФ 2069642. Способ формирования биоценоза активного ила и биоценоз активного ила / В.Ф. Гавриков, А.Ш. Недува. – 27.11.1996.

313. Steinle P. Aerobic mineralization of 2,6-dichlorophenol by *Ralstonia sp.* strain RK1 / P. Steinle, G. Stucki, R. Stettler, K.W. Hanselmann // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1998. – 64. – No 7. – P. 2566-2571.

314. US patent 2006000770. Method and device for reducing production of wastewater treatment station sludge with fixed biological cultures. / S. Deleris, T. Lebrun – 01.05.2006.

315. FR 0212593. Procédé de réduction des boues d'un traitement biologique de l'eau mettant en oeuvre de l'ozone / P. Campo, J. Cluzeau, C. Jalbert. – 16.04.2004.

316. Пат. РФ 2253627. Способ биологической очистки воды / Р.И. Хангильдин, Г.М. Шарафутдинова, В.А. Мартяшова и др. – 10.06.2005.

317. Park S.J. Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain / S.J. Park, G. Georgiou, S.Y. Lee // *Biotechnol. Prog.* – 1999. – 15. – No 2. – P. 164.

318. Cino J. High yield protein production from *Pichia pastoris* yeast: a protocol for benchtop fermentation. – [http://www.nbsc.com/papers/ABL\\_Pichia.htm](http://www.nbsc.com/papers/ABL_Pichia.htm)

319. АС СССР № 998382. Способ биохимической очистки сточных вод от органических соединений / Т.А. Носикова, С.И. Саенко, А.Г. Захоржевская и др. – 23.02.1983.

320. АС СССР 1255585. Способ биохимической очистки сточных вод от органических соединений / Т.А. Носикова, С.И. Саенко, А.Г. Захоржевская. – 07.09.1986.

321. Пат. РФ 2031859. Способ биохимической очистки сточных вод активным илом / А.Р. Семенов, В.А. Баканов, М.Г. Вотякова. – 27.03.1995.

322. Артемов А.В. Каталитический распад пероксидных соединений и их стабилизация / А.В. Артемов, Г.И. Елфимова // *Катализ в химической и нефтехимической промышленности.* – 2003. – № 5. – С. 13–27.

323. ГОСТ Р 50632-93. Водорода пероксид высококонцентрированный. Технические условия (с Изменениями N 1, 2). Дата введения 1995-01-01.

324. Mahar E. Пероксид водорода и озон: новая технология очистки воды для повторного использования в питьевом и техническом водоснабжении / E. Mahar, A. Salveson, N. Pozos, F. Shawn, Ch. Borg // Вода и экология. Проблемы и решения. – 2007. – № 4. – С. 10–18.

325. Эль Ю.Ф. Сравнительная оценка методов дезинфекции сточных вод / Ю.Ф. Эль, Е.В. Филимонова // Водоснабжение и санитарная техника. – № 6. – 1996. – С. 24-25.

326. Eistner E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity // *Ann. Rev. Pl. Physiol.* – 1982. – 33. – P. 73-96.

327. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – М.: ВИНТИ. – 1992. – т.52. – 250 с.

328. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20-26.

329. Blough N.V. Reactive oxygen species in natural waters // In: *Reactive oxygen species in chemistry and biochemistry* / N.V. Blough, R.G. Zepp / C.S. Foote, J.S. Valentine (Eds). Chapman & Hall: New York. – 1995. – P. 280-333.

330. Finkel T. Oxygen radicals and signaling // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1998. – 10. – P. 248-253.

331. Finkel T. Reactive oxygen species and signal transduction // *IUBMB Life.* – 2001. – 52. – P. 3-6.

332. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, J. Gutteridge // Edition 4. Oxford University Press Inc., N.-Y. – 2007. – 888 p.

333. Krinsky N.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants // Ed. T. Ozben. N. Y.: Plenum Press. – 1998. – P. 323-332.

334. Hoigne J. Aquatic humic substances as source and sink of photochemically produced transient reactants / J. Hoigne, B.C. Faust, W.R. Haag et al. // In: *Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants* / I. Suffet, P.L. McCarty (ed.). American Chemical Society, Washington, D.C. – 1989. – P. 363-381.

335. Lesser M.P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology // *Annu. Rev. Physiol.* – 2006. – 68. – P. 253-278.

336. Sakugawa H. Atmospheric hydrogen peroxide / H. Sakugawa, I.R. Kaplan, W. Tsai, Y. Cohen // *Environ. Sci. Technol.* – 1990. – 24. – P. 1452-1462.

337. Zepp R. G. Hydroxyl Radical Formation in Aqueous Reactions (pH 3-8) of Iron (II) with Hydrogen Peroxide: The Photo-Fenton Reaction // Environ. Sci. Technol. – 1992. – 26. – 1992. – P. 313-319.

338. Рэнби Б., Рабек Я. Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров. – М.: Мир, 1978. – 675 с.

339. Cooper W.J. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight / W.J. Cooper, R.G. Zika // Science. – 1983. – 220. – P. 711-712.

340. Giannakis S. Solar disinfection is an augmentable, *in situ*-generated photo-Fenton reaction – Part 1: a review of the mechanisms and fundamental aspects of the process / S. Giannakis, M.I. Polo Lopez, D. Spuhler et al. // Appl. Catal. B. Environ. – 2016. – 199. – P. 199-223.

341. Cheng M.L. Humic acid induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human promaty fibroblasts / M.L. Cheng, H.Y. Ho, Y.W. Huang et al. – 2002. – 228. – P. 413-423.

342. Thannickal V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.J. Fanburg // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol. – 2000. – 279. – L1005-1028.

343. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2-7.

344. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский образовательный журнал. 1996. – № 3. – С. 4-10.

345. Turrens J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain // Biosci. Rep. – 1997. – 17. – P. 3-8.

346. Imlay J.A. Path ways of oxidative damage // Annual review of microbiology. – 2003. – 57. – P. 395–418.

347. Imlay J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress lessons from a model bacterium // Nat Rev Microbiol. – 2013. – 11. – p. 443-454.

348. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. – 2002. – 82. – No. 1. – P. 47-95.

349. Scully N.M. Photochemical formation of hydrogen peroxide in lakes: effects of dissolved organic carbon and ultraviolet radiation / N.M. Scully, D.R.S. Lean, D.J. McQueen, W.J. Cooper // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1995. – 52. – P. 2675-2681.

350. Scully N.M. Hydrogen peroxide formation: the interaction of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon in lake waters along a 43-45° N gradient / N.M. Scully, D.J. McQueen, D.R.S. Lean, W.J. Cooper // Limnol. Oceanogr. – 1996. – 41. – P. 540-548.

351. Wilson C.L. Hydrogen peroxide formation and decay in iron-rich geothermal waters: the relative roles of abiotic and biotic mechanisms / C.L. Wilson, N.W. Hinman, R.P. Sheridan // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – 71. – 691-699.

352. Самуилов В.Д. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ингибирует рост цианобактерий / В.Д. Самуилов, Д.В. Безряднов, М.В. Гусев и др. // *Биохимия.* – 1999. – 64. – № 1. – С. 60-67.

353. Kirk T.K. Enzymatic «combustion»: the microbial degradation of lignin / T.K. Kirk, R.L. Farrell // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1987. – 41. – P. 465–505.

354. Lovley D.R. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction // *J. Ind. Microbiol.* – 1995. – 14. – № 2. – P. 85-93.

355. Hengge-Aronis R. The general stress response in *Escherichia coli* // In *Bacterial stress responses* /G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.). – ASM Press, Washington, D.C. – 2000. – P. 161-178.

356. Farr S.B. Oxidative stress responses in *E. coli* and *S. typhimurium* / S.B. Farr, T. Kogoma // *Microbiol. Rev.* – 1991. – 55. – 561-585.

357. Fridovich I. The biology of oxygen radicals // *Science.* – 1978. – 201. – P. 875-880.

358. Duwat P. Stress response pathways in *Lactococcus lactis* // *Recent Res. Devel. Microbiol.* – 1999. – 3. – P. 335-348.

359. Соколовский В. Ю. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* / В. Ю. Соколовский, Т.А. Белозерская // *Успехи биологической химии.* – 2000. – 40. – С. 85-152.

360. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.

361. Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2004. – Т. 40. – № 3. – С. 217-224.

362. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных: Учеб. пособие. – М.: Высш. шк., 2004. – 549 с.

363. Allen R.G. Oxidative stress and gene regulation / R.G. Allen, M. Tressini // *Free Radical Biol. Med.* – 2000. – 28. – P. 463-499.

364. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Под ред. В.К. Мазурика, М.Ф. Ломанова. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004. – 488 с.

365. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

366. Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review // *Comprehensive reviews in food science and food safety.* – 2004. – 3(1). – P. 1-20. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x

367. Proctor P.H. Free Radicals and Human Disease // *Handbook of Free Radicals and Antioxidants.* – 1989. – 1. – P. 209-221.

368. Häussler S. The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations / S. Häussler, T. Becker // PLoS Pathog. – 2008. – 4. – e1000166. DOI 10.1371/journal.ppat.1000166

369. El-Agamey A. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties / A. El-Agamey, G.M. Lowe, D.J. McGarvey et al. // Arch. Biochem. and Biophys. – 2004. – 430. – P. 37-48.

370. Соловьёва М.Е. Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетании с витамином В<sub>12</sub> // М.Е. Соловьёва, В.В. Соловьёв, А.А. Фасхутдинова и др. / Цитология. – 2007. – 2(49). – С.70-78.

371. Besaratinia A. Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C / A. Besaratinia, S. Kim, S.E. Bates, G.P. Pfeifer // PNAS. – 2007. – 104. – N 14. – P. 5953–5958.

372. Oxidants and Antioxidants: Ultrastructure and Molecular Biology Protocols / Edited by: D. Armstrong // Methods in Molecular Biology, vol. 196: Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 2002. – 356 p.

373. Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols / Edited by: D. Armstrong // Methods in Molecular Biology, vol. 186: Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 2002.

374. Denisov E.T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology / E.T. Denisov, I.B. Afanas'ev. – 2005. – 992 p. – URL: <http://www.tryphonov.ru/tryphonov/donat.htm>

375. Cadenas E. Handbook of Antioxidants, (Oxidative Stress and Disease), 2nd ed. / E. Cadenas, L. Packer, Eds. – 2007. – 602 p. – URL: <http://www.tryphonov.ru/tryphonov/donat.htm#0>

376. Хочачка А. Биохимическая адаптация / А. Хочачка, Д. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 586 с.

377. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – 373 с.

378. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. Учебн. пособие. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. – 248 с.

379. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. Популяционные аспекты биотехнологии. – Новосибирск: Наука, 1990. – 173 с.

380. Rallu F. *Lactococcus lactis* and stress. / F. Rallu, A. Gruss, E. Maguin // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1996. – 70. – P. 243-251.

381. Ricciardi A. Metabolic profiling and stress response of anaerobic and respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 grown in a chemically defined medium / A. Ricciardi, M.A. Castiglione Morelli, R.G. Ianniello et al. // Ann. Microbiol. – 2014. – 65. – P. 1639-1648. DOI 10.1007/s13212-014-1003-z.

382. Hosseini N.M. Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei* / N.M. Hosseini, M.A. Hussain, M.L. Britz // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2015. – 55. – 740-749. doi: 10.1080/10408398.2012.675601

383. Schott A-S. MALDI-TOF mass spectrometry enables a comprehensive and fast analysis of dynamics and qualities of stress responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 / A-S. Schott, J. Behr, J. Quinn, R.F. Vogel // PLOS ONE. – 2016. – 2016. – 11. – No 10. DOI:10.1371/journal.pone.0165504,

384. Kivisaar M. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress // Environ. Microbiol. – 2003. – 5. – No 10. – P. 814-827.

385. Feofilova E.P. Deceleration of vital activity as a universal biochemical mechanism ensuring adaptation of microorganisms to stress factors: a review // Appl. Biochem. Microbiol. – 39. – No 1. – 2003. – P. 1-18.

386. Hartke A. Starvation induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403/ A. Hartke, S. Bouché, X. Gansel et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – 60. – No 9. – P. 3474-3478.

387. Ganesan B. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis* / B. Ganesan, M.R. Stuart, B.C. Weimer // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – 73. – P. 2498-2512.

388. Joseleau-Petit D. Unstable *Escherichia coli* L Forms Revisited: Growth Requires Peptidoglycan Synthesis / D. Joseleau-Petit, J.C. Liébart, J.A. Ayala, R. D'Ari // J. Bacteriol. – 2007. – 189 (18). – P. 6512–20

389. Mattman L.H. Cell wall deficient forms: stealth pathogens // Boca Raton: CRC . – 2001.

390. Leaver M. Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis* / M. Leaver, P. Domínguez-Cuevas, J.M. Coxhead et al. // Nature. – 2009. – 457. – P. 849-853.

391. Kim W.S. Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation / W.S. Kim, J.H. Park, J. Ren et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – 67. – № 10. – P. 4594-4602.

392. Giraffa G. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin / G. Giraffa, C. Andrighetto, C. Antonello et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – 91. – № 2. – P. 129-139.

393. Симон Н. А. Биотехнологические аспекты внутривидовой вариативности молочнокислых бактерий / Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук. – М: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009.

394. Golod N.A. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions / N.A. Golod, N.G. Loiko, A.L. Mulyukin et al. // *Microbiology*. – 2009. – 78. – P. 280-289.
395. Kovács Á.T. *Rok* regulates *yuaB* expression during architecturally complex colony development of *Bacillus subtilis* 168 / Á.T. Kovács, O.P. Kuipers // *J. Bacteriol.* – 2011. – 193(4). – P. 998–1002.
396. Головлев Е.Л. Метастабильность фенотипа у бактерий // *Микробиология*. – 1998. – 59. – № 2. – С. 149 – 155.
397. Woude M.V. Phase and antigenic variation in bacteria / M.V. Woude, A.J. Baumber // *Clin. Rev. Microbiol.* – 2004. – 17. – No 3. – P. 581- 611.
398. Van Bokhorst-van de Veen H. Transcriptome signatures of class I and III stress response deregulation in *Lactobacillus plantarum* reveal pleiotropic adaptation / H. Van Bokhorst-van de Veen, R.S. Bongers, M. Wels et al. // *Microbial Cell Factories*. – 2013. – 12. – No 1. – P. 112.
399. Милько Е. С., Егоров Н. С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 143 с.
400. Дорошенко Е.В. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* / Е.В. Дорошенко, Н.Г. Лойко, О.Н. Ильинская и др. // *Микробиология*. – 2001. – 70. – № 6. – С. 811-819.
401. Chou L.S. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* / L.S. Chou, B. Weimer // *J. Dairy Sci.* – 1999. – 82. – No 1. – P. 23-31.
402. Demple B. Inductible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli* // B. Demple, J. Halbrook / *Nature*. – 1983. – 304. – 466-468.
403. Demple B. Regulation of bacterial oxidative stress genes // *Annu. Rev. Genet.* – 1991. – 25. – P. 315-337.
404. Galhardo R.S. Mutation as a stress response and regulation of evolvability / R.S. Galhardo, P.J. Hastings, S.M. Rosenberg // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – 42. – P. 399-435. <http://dx.doi.org/10.1080/10409230701648502>
405. Querol A. Adaptive evolution of wine yeast. Review / A. Querol, M.T. Fernandez-Espinar, M. del Olmo, E. Barrio // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – 86. – Issues 1-2. – p. 3 -10. 23rd International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY-23).
406. Fong S.S. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states / S.S. Fong, S.S. Fong, A.R. Joyce, B.O. Palsson // *Genome Res.* – 2005. – 15(10). – P. 1365-1372. doi:10.1101/gr.3832305

407. Lenski R.E. Rates of DNA sequence evolution in experimental populations of *Escherichia coli* during 20,000 generations / R.E. Lenski, C.L. Winkworth, M.A. Riley // *J. Mol. Evolution.* – 2003. – 56. – P. 498-508.

408. Lenski R.E. Phenotypic and genomic evolution during a 20000-generation experiment with the bacterium *Escherichia coli* // *Plant Breeding Reviews.* – 2004. – 24. – Part 2. – P. 225-265.

409. Wu C. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria / C. Wu, J. Huang, R. Zhou // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – Published online 15 December 2013. DOI 10.1007/s00253-013-5435-3

410. Wang G. Coexpression of bile salt hydrolase and catalase gene remarkably improves oxidative stress and bile salt resistance in *Lactobacillus casei* / G. Wang, S. Yin, H. An // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – 3. – 8. – P. 985-990. Doi: 10.1007/si0295-010-0871-x.

411. Mozzetti V. New method for selection of hydrogen peroxide adapted bifidobacteria cells using continuous culture and immobilized cell technology / V. Mozzetti, F. Grattepanche, D. Moine et al. // *Microbial Cell Factories.* – 2010. – 9. – P. 60.

412. / Lowe S.E., Jain M.K., Zeikus J.G. 1993. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates // *Microbiol. Rev.* – 57. – P. 451-509.

413. Upadrasta A. Improving the stress tolerance of probiotic cultures: recent trends and future directions / A. Upadrasta, C. Stanton, C. Hill // In: *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, eds E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (New York: Springer). – 2011. – P. 395-438.

414. Ye L. Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification / L. Ye, H. Zhao, Z. Li, J.C. Wu // *Bioresour. Technol.* – 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotech2012.10.042>

415. Branco M.R. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae* // M.R. Branco, H.S. Marinho, L. Cyrne, F. Antunes / *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279. – Issue 8. – P. 6501-6506.

416. Zhang J. Enhanced acid tolerance in *Lactococcus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress / J. Zhang, C. Wu, G. Du, J. Chen // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – 73. – P. 5268-5275.

417. Drake J.W. Rates of spontaneous mutation / J.W. Drake, B. Charlesworth, D. Charlesworth, J.F. Crow // *Genetics.* – 1998. – 148. – P. 1667-1686.

418. Aertsen A. Diversity or die: Generation of diversion in response to stress / A. Aertsen, C.W. Michiels // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2005. – 31. – P. 69-78.

419. De Angelis M. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200 / M. De Angelis, S. Siragusa, D. Campanella et al. // Proteomics. – 2015. – 15. – P. 2244-2257. DOI 10.1002/pmic.201400363.

420. Lin H.Y. Cellular responses to the induction of recombinant genes in *Escherichia coli* fed-batch cultures // Dissertation Dr. rer. nat., Halle (Saale), Germany. – 1999.

421. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 66. – No 2. – 2002. – P. 300-372. DOI: 10.1128/MMBR 66.2.300-371.2002

422. Yura T. Regulation of the heat-shock response / T. Yura, K. Nakahigashi // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – 2. – P. 153-158.

423. Glaasker E. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress / E. Glaasker, F.S.B. Tjan, P.F. Ter Steeg et al. // J. Bacteriol. – 1998. – 180. – P. 4718-4723.

424. Derzelle S. Changes in *cspL*, *cspP*, and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum* / S. Derzelle, B. Hallet, K. Francis et al. // J. Bacteriol. – 2000. – 182. – P. 5105-5113.

425. McCann M.P. The putative  $\sigma$  factor *KatF* has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli* / M.P. McCann, J.P. Kidwell, A. Martin // J. Bacteriol. – 1991. – 73. – P. 4188-4194.

426. Hecker M. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria / M. Hecker, U. Volker // Adv. Microb. Physiol. – 2001. – 44(1). – P. 35-91.

427. Hecker M. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis* / M. Hecker, W. Schumann, U. Volker // Mol. Microbiol. – 1996. – 19. – P. 417-428.

428. Hengge-Aronis R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli* // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – 2. – P. 148-152.

429. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – 66(3). – P. 373-395.

430. Grossman A.D. Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins / A.D. Grossman, W.E. Taylor, S.F. Burton et al. // J. Mol. Biol. – 1985. – 186. – P. 357-365.

431. Muffler A. Heat shock regulation of  $\sigma^S$  turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma^S$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli* / A. Muffler, M. Barth, C. Marschall, R. Hengge-Aronis // J. Bacteriol. – 1997. – 179. – P. 445-452.

432. Tsakalidou E. Stress responses of lactic acid bacteria, responses of lactic acid bacteria to starvation / E. Tsakalidou, K. Papadimitriou // New York Dordrecht Heidelberg London. Springer Publishing. – 2011. – P. 199-218.

433. Jenkins D.E. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli* / D.E. Jenkins, J.E. Schultz, A. Matin // J. Bacteriol. – 1988. – 170. – P. 3910-3914.

434. Loewen P.C. The role of sigma factor  $\sigma^S$  (katE) in bacterial global regulation / P.C. Loewen, R. Hengge-Aronis // Ann. Rev. Microbiol. – 1994. – 48. – P. 53-80.

435. Henard C.A. Control of redox balance by the stringent response regulatory protein promotes antioxidant defenses of *Salmonella* / C.A. Henard, T.J. Bourret, M. Song, A. Vázquez-Torres // J. Biol. Chem. – 2010. – 285. – No 47. – P. 36785-36793.

436. Chatterji D. Revisiting the stringent response ppGpp and starvation signaling / D. Chatterji, K.A. Ojha // Curr. Opin. Microbiol. – 2001. – 4. – 160-165.

437. Gong L. Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria / L. Gong, K. Takayama, S. Kjelleberg // Microbiology. – 2002. – 148. – P. 559-570.

438. Camilli A. Bacterial small-molecule signaling pathways / A. Camilli, B.L. Bassler // Science. – 2006. – 311. – P. 1113–1116.

439. Beloin C. *Escherichia coli* Biofilms / C. Beloin, A. Roux, J.-M. Ghigo // In: Bacterial Biofilms. /Ed. Romeo T. // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2008. – 322. – P. 249-290. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 292 p. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

440. Spormann A.M. Physiology of Microbes in Biofilms // In: Bacterial Biofilms. /Ed. Romeo T. // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2008. – 322. – P. 17-37. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 292 pp. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

441. Boehm A. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress / A. Boehm, S. Steiner, F. Zaehring et al. // Mol. Microbiol. – 2009. – 72. – P. 1500–1516.

442. Lange R. Complex transcriptional control of the  $\sigma^S$ -dependent stationary phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*cst-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex and integration host factor in the stationary phase responses of *Escherichia coli* / R. Lange, M. Barth, R. Hengge-Aronis // J. Bacteriol. – 1993. – 75. – P. 7910-7917.

443. Hengge-Aronis R. Back to log phase:  $\sigma^S$  as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. – 1996. – 21. – P. 887-893.

444. Schweder T. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses / T. Schweder, E. Krüger, B. Xu et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – 65. – P. 151-159.
445. Плакунов В.К.. *ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ.* – М.: Логос, 2001 –128 с.
446. Artsimovitch I. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp / I. Artsimovitch, V. Patlan, S. Sekine et al. // *Cell.* – 2004. – 117. – P. 299-310.
447. Magnusson L.U. PpGpp: a global regulator in *Escherichia coli* / L.U. Magnusson, A. Farewell, T. Nyström // *Trends Microbiol.* – 2005. – 13(5). – P. 236-42.
448. Papadimitriou K. Stress physiology of lactic acid bacteria / K. Papadimitriou, A. Alegria, P.A. Bron et al. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2016. – 80. – No. 3. – P. 837-890. Doi: 10.1128/MMBR.00076-15
449. Teich A. Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators  $\sigma^S$  and ppGpp in glucose limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli* / A. Teich, S. Meyer, H.Y. Lin et al. // *Biotechnol. Prog.* – 1999. – 15. – P. 123-129.
450. Gong L. Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria / L. Gong, K. Takayama, S. Kjelleberg // *Microbiology.* – 2002. – 148. – P. 559-570.
451. Prasad J. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying / J. Prasad, P. McJarrow, P. Gopal // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – 69. – No 2. – P. 917-925. DOI: 10.1128/AEM.69.2.917-925.2003
452. Hutkins R.W. Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus* / R.W. Hutkins, W.L. Ellefson, E.R. Kashket // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – 53. – P. 2275-2281.
453. Guillot A. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress / A. Guillot, D. Obis, M.Y. Mistou // *International Journal of Food Microbiology.* – 2000. – 55. – P. 47-51.
454. Van der Heide T. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity / T. Van der Heide, B. Poolman // *J. Bacteriol.* – 2000. – 182. – P. 203-206.
455. Xu K. Betaine and beet molasses enhance L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* / K. Xu, P. Xu // *PLoS One.* – 2014. – 9. – No 6. – e100731.
456. Kets E.P.W. Protective effect of betaine on survival of *L. plantarum* subjected to drying / E.P.W. Kets, J.A.M. de Bont // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1994. – 116. – P. 251-256.
457. Kets E.P.W. Carnitine: a novel compatible solute in *L. plantarum* / E.P.W. Kets, E.A. Galinski, J.A.M. de Bont // *Arch. Microbiol.* – 1994. – 162. – P. 243-248.

458. Soto T. Accumulation of trehalose by overexpression of *tpsI*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* / T. Soto, J. Fernande, J. Vicente-Soler et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65. – P. 2020-2024.

459. Welsh D.T. Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli* / D.T. Welsh, R.A. Herbert // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. – 174. – P. 57-63.

460. Glaasker E. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *L. plantarum* / E. Glaasker, E.H.M.L. Heuberger, W.N. Konings, B. Poolman // J. Bacteriol. – 1998. – 180. – P. 5540-5546.

461. Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more // Cell. – 1995. – 80. – P. 187-197.

462. Shiozaki K. Cell cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast / K. Shiozaki, P. Russel // Nature. – 1995. – 378. – P. 739-743.

463. Samejima I. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast / I. Samejima, S. Mackie, P.A. Fantes // EMBO J. – 1997. – 16. – P. 6162-6170.

464. Posas F. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast / F. Posas, M. Takekawa, H. Saito // Curr. Opin. Microbiol. – 1998. – 1. – P. 175-182.

465. Gustin M.C. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M.C. Gustin, J. Albertyn, M. Alexander, K. Davenport // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – 62. – P. 1264-1300.

466. Thevelein J.M. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast / J.M. Thevelein, L. Cauwenberg, S. Colombo et al. // Enzyme Microb. Technol. – 2000. – 26. – P. 819– 825.

467. Keyse S.M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling // Curr. Opin. Cell Biol. – 2000. – 12. – P. 186-192.

468. Wojda I. Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways / I Wojda, R. Alonso-Monge, J.P. Bebelman et al. // Microbiology. – 2003. – 149. – P. 1193-1204.

469. Krantz M. Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock / M. Krantz, B. Nordlander, H. Valadi et al. // Eukaryotic Cell. – 2004. – 3. – Issue 6. –P. 1381-1390.

470. Rep M. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes / M. Rep, M. Krantz, J.M. Thevelein, S. Hohmann // J. Biol. Chem. – 2000. – 275. – P. 8290–8300.

471. Rep M. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage / M. Rep, M. Proft, F. Remize et al. // Mol Microbiol. – 2001. – 40(5). – 1067–1083.

472. Martinez-Pastor M.T. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE) / M.T. Martinez-Pastor, G. Marchler, C. Schuller et al. // EMBO J. – 1996. – 15. – P. 2227-2235.

473. Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – 24. – P. 469-486.

474. Imazu H. *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor regulates cell wall remodeling in response to heat shock / H. Imazu, H. Sakurai // Eukaryot. Cell. – 2005. – 4. – P. 1050–1056.

475. Akira A. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* / A. Akira, T. Fumiko, M. Yoshinori et al. // FEMS Yeast Res. – 2006. – 6 (2). – P. 249-267. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00035.x>

476. Kets E.P.W. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying / E.P.W. Kets, P.J.M. Teunissen, J.A.M. de Bont // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – 62. – P. 259-261.

477. Le Marrec C. Responses of lactic acid bacteria to osmotic stress // In: Stress responses of lactic acid bacteria. / Tsakalidou E., Papadimitriou K. (ed). – Springer, New York, NY. – 2011. – P. 67-90.

478. Tian X. L-Lactic acid production benefits from reduction of environmental osmotic stress through neutralizing agent combination / X. Tian, Y. Wang, J. Chu et al. // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2014. – 9. – P. 1917-1923.

479. De Angelis M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review / M. De Angelis, M. Gobbetti // Proteomics. – 2004. – No 4. – P. 106–122. DOI 10.1002/pmic.200300497.

480. Schmidt G. Molecular characterisation of the dnaK operon of *Lactobacillus sakei* LTH681 / G. Schmidt, C. Hartel, W.P. Hammes // Syst. Appl. Microbiol. – 1999. – 22. – P.321-328.

481. O'Sullivan E. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and stresses in *Lactococcus lactis* / E. O'Sullivan, S. Condon // Appl. Environ. Microb. – 1997. – 63. – P. 4210-4215.

482. Rallu F. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals / F. Rallu, A. Gruss, S.D. Ehrlich, E. Magnin // Mol. Microbiol. – 2000. – 35. – P. 517-528.

483. De Angelis M. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 / M. De Angelis, L. Bini, V. Pallini et al. // Microbiol. – 2001. – 147. – P. 1863-1873.

484. Sanchez B. Proteomics of stress response in bifidobacterium / B. Sanchez, L. Ruiz, C.G. De Los Reyes-Gavilan, A. Margolles // Front. Biosci. – 2008. – 13. – P. 6905.

485. Broadbent J.R. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress / J.R. Broadbent, R.L. Larsen, V. Deibel, J.L. Steele / J. Bacteriol. – 2010. – 192. – P. 2445-2458. Doi: 10.1128/JB.01618-09

486. Wu C. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality / C. Wu, J. Zhang, M. Wang et al. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – 39. – P. 1031-1039.

487. Koponen J. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG / J. Koponen, K. Laakso, K. Koskenniemi et al. // J. Proteomics. – 2012. – 75. – P. 1357-1374. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.009

488. Papadimitriou K. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches / K. Papadimitriou, G. Zoumpoulou, B. Foligné et al. // Frontiers in Microbiology. 17 February, 2015. Doi: 10.3389/fmcb.2015.00058

489. Van de Guchte M. Stress response in lactic acid bacteria / M. Van de Guchte, P. Serror, C. Chervaux et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – 82. – P. 187-216. Doi: 10.1023/A:1020631532202

490. Cotter P.D. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH / P.D. Cotter, C. Hill // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – 67. – P. 429-453.

491. Azcarate-Peril M.A. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus* / M.A. Azcarate-Peril, O. McAuliffe, E. Altermann et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – No. 10. – P. 5794-5804.

492. Sánchez B. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach / B. Sánchez, M.C. Champomier-Verges, B. Stuer-Lauridsen et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – 73. – 6757-6767. Doi: 10.1128/AEM.00637-07.

493. Corcoran B.M. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated / B.M. Corcoran, C. Stanton, G. Fitzgerald, R.P. Ross // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – 14. – 1382-1399.
494. Heunis T. Proteomic profiling of the acid stress response in *Lactobacillus plantarum* 423 / T. Heunis, S. Deane, S. Smit, L.M.T. Dicks // *J. Proteome Research.* – 2014. – 13. – 4028-4039.
- 494a. Wu R. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress / R. Wu, W. Zhang, T. Sun et al. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – 147. – 181-187.
495. Wu C. Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation / C. Wu, G. He, J. Zhang // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – 41. – P. 1533-1540. DOI 10.1007/s10295-014-1487-3
496. Sanders J.W. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis* / J.W. Sanders, G. Vemena, J. Kok // *FEMS Microbiology Reviews.* – 1999. – 23(4). – P. 483-501.
497. Giannattasio S. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death / S. Giannattasio, N. Guaragnella, M. Corte-Real et al. // *Gene.* – 2005. – 354. – P. 93-98.
498. Hartke A. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / A. Hartke, S. Bouché, J.C. Giard et al. // *Curr. Microbiol.* – 1996. – 33(3). – P. 194-199.
499. Lee P.C. AppA, heat shock stress and cell oxidation / P.C. Lee, B.R. Bochner, B.N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1983. – 80. – P. 7596-7600.
500. Craig E.A. The heat shock response // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1985. – 18. – P. 239-280. <http://dx.doi.org/10.3109/10409238509085135>
501. Schlesinger M.J. Heat shock proteins // *J. Biol. Chem.* – 1990. – 265. – P. 12111-12114.
502. Ang D. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins / D. Ang, K. Liberek, D. Skowrya et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – 266. – P. 24233-24236.
503. Yura T. Regulation of the heat-shock response in bacteria / T. Yura, N. Nagai, H. Mori // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1993. – 47. – P. 321-350.
504. Sugimoto S. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties / S. Sugimoto, A.-M. Abdullah, K. Sonomoto // *J. Biosci. Bioeng.* – 2008. – 106. – P. 324-336. Doi: 10.1263/jbb.106.324
505. Varmanen P. Responses of lactic acid bacteria to heat stress / P. Varmanen, K. Savijoki // In: Tsakalidou E., Papadimitriou K. (ed). *Stress responses of lactic acid bacteria.* Springer, New York, NY. – 2011. – P. 55-66.

506. Бухарин О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова, Г.И. Эль-Регистан. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.

507. Praekelt U.M. HSP12 a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function / U.M. Praekelt, P.A. Meacock // Mol. Gen. Genet. – 1990. – 223. – P. 97–106.

508. Wakter S. Molecular chaperones – Cellular machines for protein folding / S. Wakter, J. Buchner // Angew. Chem. Int. Ed. – 2002. – 41. – P. 1098-1113.

509. Gupta R.S. Evolution of HSP70 gene and its implication regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes / R.S. Gupta, G.B. Golding // J. Mol. Evol. – 1993. – 37. – P. 573-582.

510. Georgopoulos C. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones / C. Georgopoulos, W.J. Welch // Annu. Rev. Cell Biol. – 1993. – 9. – P. 601-634.

511. Turgay K. Role of proteolysis and chaperones in stress response and regulation // In G. Storz, R. Hengge (ed). Bacterial stress responses, 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC. – 2011. – P. 75-90.

512. Eaton T. Cloning and sequence analysis of the dnaK gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / T. Eaton, C. Shearman, M. Gasson // J. Gen. Microbiol. – 1993. – 139(12). – P. 3253-3264.

513. Ventura M. Gene structure and transcriptional organization of the dnaK operon of *Bifidobacterium* tracing / M. Ventura, R. Zink, G.F. Fitzgerald, D. van Sinderen // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71. – P. 487-500.

514. Vorob'eva L.I. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A review // Appl. Biochem. Microbiol. – 2004. – 40. – No 3. – P. 217-224.

515. Rockabrand D. An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance, and reductive division / D. Rockabrand, T. Arthur, G. Korinek et al. // J. of Bacteriol. – 1995. – 177. – No 13. – P. 3695-3703.

516. Narberhaus F. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum* / F. Narberhaus, H. Bahl // J. Bacteriol. – 1992. – 174. – P. 3282-3289.

517. Georgellis D. Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protein complex in *Escherichia coli* / D. Georgellis, B. Sohlberg, F.U. Hartl, A. Von Gamain // Mol. Microbiol. – 1995. – 16. – P. 1259-1268.

518. Yuan G. Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE) / G. Yuan, S.I. Wong // J. Bacteriol. – 1995. – 177. – P. 5427-5433.

519. Torok Z.I. Evidence for a lipochaperonin: association of active protein folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions / Z.I. Torok, I. Horvath, P. Goloubinoff et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – 94. – P. 2192-2197.

520. Kusakawa N. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress / N. Kusakawa, T. Yura // Gen Dev. – 1988. – 2. – P. 874-882.

521. Desmont C. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 / C. Desmont, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, R.P. Ross // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70. – No. 10. – P. 5929-5936. DOI: 10.1128/AEM.70.10.5929-5936.2004

522. Kitsrup M. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis* / M. Kitsrup, S. Jacobsen, K. Hammer, F.K. Vogensen // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63. – P. 1826-1837.

523. Salotra P. Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress / P. Salotra, D.K. Singh, K.P. Seal et al. // FEMS Microbiology Letters. – 1995. – 131(1). – P. 57-62. Doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07754.x

524. Wang J. Domain motions in GroEL upon binding of an oligopeptide / J. Wang, L. Chen // J. Mol. Biol. – 2003. – 334. – P. 489-499.

525. Ingmer H. Disruption and analysis of the clpB, clpC, and clpE genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria / H. Ingmer, F.K. Vogensen, K. Hammer, M. Kilstrup // J. of Bacteriol. – 1999. – 181. – P. 2075-2083.

526. Skinner M.M. Expression of ClpX, an ATPase subunit of the Clp protease, is heat and cold shock inducible in *Lactococcus lactis* / M.M. Skinner, J.E. Trempey // J. of Dairy Science. – 2001. – 84. – P. 1783-1785.

527. Suokko A. ClpL is essential for induction of thermotolerance and potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasseri* / A. Suokko, M. Poutanen, K. Savijoki et al. // Proteomics 2008. – 8. – P. 1029-1041. DOI 10.1002/pmic.200700925

528. Schirmer E.C. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions / E.C. Schirmer, J.R. Glover, M.A. Singer, S. Lindquist // Trends Biochem Sci. – 1996. – 21. P. 289-296. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)10038-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10038-4).

529. Frees D. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis* / D. Frees, H. Ingmer // Molecular Microbiol. – 1999. – 31. – P. 79-87.

530. Frees D. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria / D. Frees, K. Savijoki, P. Varmanen, H.

Ingmer // *Molecular Microbiol.* – 2007. – 63(5). – P. 1285-1295. Doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x

531. Han M.J. Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology / M.J. Han, H. Yun, S.Y. Lee // *Biotechnol. Adv.* – 2008. – 26. – P. 591-609. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.004>.

532. Maitre M. Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity / M. Maitre, S. Weidmann, F. Dubois-Brissonnet et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – 80. – P. 2973-2980. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04178-13>.

533. Lee Y.J. Analysis of heat-shock transcription factor and element-binding activity // *Methods in Molecular Biology*, vol. 196: Oxidants and Antioxidants: Ultrastructure and Molecular Biology Protocols / Edited by: D. Armstrong. Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 2002. – P. 131-138.

534. Parsell D.A. The Function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins / D.A. Parsell, S. Lindquist // *Annu. Rev. Genet.* – 1993. – 27. – P. 437-496.

535. Bukau B. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines / B. Bukau, A.L. Horwich // *Cells.* – 1998. – 92. – P. 351-366.

536. Veinger L. The small heat shock protein lbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network / L. Veinger, S. Diamant, J. Buchner, P. Goloubinoff // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273. – P. 11032-11037.

537. Abee T. Microbial stress response in minimal processing / T. Abee, J.A. Wouters // *Int. J. Food Microbiol.* – 1999. – 50. – No 1-2. – P. 65-91.

538. Jaenicke R. Life at high temperature / R. Jaenicke, R. Sterner // *Prokaryotes.* – 2006. – 2. – P. 167-209. DOI: 10.1007/0-387-30742-7\_7

539. Yaglom J.A. The function of Hsp72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase. Activation can be dissociated from it's role in prevention of protein damage / J.A. Yaglom, V.L. Gabai, A.B. Meriin // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274(29). – P. 20223-20228.

540. Van der Vies S.M. Regulation of chaperonin gene expression. / S.M. Van der Vies, C. Georgopoulos // *Chaperonins (Series: Cell Biology, A Series of Monographs).* – 1996. – P. 137-166.

541. Schmidt A. Cloning, sequencing, mapping, and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis* / A. Schmidt, M. Schiesswohl, U. Volker et al. // *J. Bacteriol.* – 1992. – 174. – P. 3393-3999.

542. Walker D.C. The *groESL* chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii* / D.C. Walker, H.S. Girgis, T.R. Klaenhammer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – 65. P. 3033-3041.
543. Schumann W. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon // *Cell Stress Chaperones.* – 2003. – 8(3). – P. 207-217.
544. Kroos L. Regulation of  $\sigma$  factor activity during *Bacillus subtilis* development / L. Kroos, Y.-T. N. Yu // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2000. – 3. – P. 553-560.
545. Helmann J.D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors // *Adv. Microbiol. Physiol.* – 2002. – 46. – P. 47-110.
546. Zuber U. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis* / U. Zuber, W. Schumann // *J. Bacteriol.* – 1994. – 176. – P. 1359-1363.
547. Price C.W. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis* / C.W. Price, P. Fawcett, H. Ceremonie et al. // *Mol. Microbiol.* – 2001. – 41. P. 757-774.
548. Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E.coli* // *Cell.* – 1993. – 72(2). – P. 165-168. Doi:10.1016/0092-8674(93)90655-a
549. Bernhardt J. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two-dimensional protein electrophoresis study / J. Bernhardt, U. Volker, A. Volker et al. // *Microbiology.* – 1997. – 143(Pt 3). – P. 999-1017. Doi: 10.1099/00221287-143-3-999
550. Derré I. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria / I. Derré, G. Rapoport, T. Msadek // *Mol. Microbiol.* – 1999. – 31. – P. 117-131. Doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01152.x
551. Fiocco D. The *Lactobacillus plantarum* *ftsH* gene is a novel member of the CtsR stress response regulon / D. Fiocco, M. Collins, L. Muscariello et al. // *J. Bacteriol.* – 2009. – 191. P. 1688-1694. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01551-08>.
552. Fiocco D. ). Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum* / D. Fiocco, V. Capozzi, M. Collins et al. // *J. Bacteriol.* – 2010. – 192. – P. 896-900.
553. Castaldo C. CcpA affects expression of the *groESL* and *dnaK* operons in *Lactobacillus plantarum* / C. Castaldo, R.A. Siciliano, L. Muscariello et al. // *Microbial Cell Factories.* – 2006. – 5. – No 1. – P. 35. doi: 10.1186/1475-2859-5-35.
554. Helmann J.D. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock / J.D. Helmann, F.W. Winston Wu, P.A. Kobel et al. // *J. Bacteriol.* – 2001. – 183. – P. 7318-7328.

555. Rossi F. Theoretical insight into the heat shock response (HSR) regulation in *Lactobacillus casei* and *L. rhamnosus* / F. Rossi, T. Zotta, L. Iacumin, A. Reale // J. Theor. Biol. – 2016. – 402. – P. 21–37.

556. Fiocco D. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum* / D. Fiocco, V. Capozzi, P. Goffin et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 77. – P. 909-915. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-1228-x>.

557. Derzelle S. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins / S. Derzelle, B. Hallet, T. Ferain et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 69. – 2003. – 4285-4290. Doi:10.1128/AEM.69.7.4285-4290.2003

558. Trent J.D. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea // FEMS Microbiol. Rev. – 1996. – 18. – No 2-3. P. 249-258.

559. Brock Biology of Microorganisms /Ed. M. T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker. Illinois: Illinois University Inc. – 2002. – ch. 14. – P. 569.

560. Macario A.J.L. Stress genes and proteins in archaea / A.J.L. Macario, M. Lange, B.K. Ahring, E. Conway de Macario // Microbiol. Molec. Biol. Rev. – 1999. – 63. – P. 923-967.

561. Shiozaki K. Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAP kinase by a MEKK-independent mechanism / K. Shiozaki, M. Shiozaki, P. Russell // Mol. Biol. Cell. – 1998. – 9. – P. 1339-1349.

562. Morano K.A. Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae* / K.A. Morano, P.C. Liu, D.J. Thiele // Curr. Opin. Microbiol. – 1998. – 1. – P. 197-203.

563. Boy-Marcotte E. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msp2n/Msn4p and Hsf1p regulons / E. Boy-Marcotte, I G. Lagnie, M. Perrot et al. // Mol. Microbiol. – 1999. – 33. – P. 274-283.

564. Эль-Регистан Г. И. Роль мембранных ауторегуляторных факторов в процессах роста и развития микроорганизмов. Автореферат докторской диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук – М., 1988.

565. Мартиросова Е.И. Использование алкилокси-бензолов для повышения активности и стабильности ферментов / Е.И. Мартиросова, Ю.А. Николаева, Г.И. Эль-Регистан и др. // Химическая технология. – 2007. – №6. – С. 250-256.

566. El-Registan G.I. The role of low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance to radiation and heat shock / G.I. El-Registan, A.L. Mulyukin, Yu.A. Nikolaev et al. // Advances in Space Reseach. – 2005. – 36. – 1718-1728.

567. Nikolaev Yu.A. Autoregulation of stress response in microorganisms / Yu.A. Nikolaev, A.I. Mulyukin, I.Yu. Stepanenko, G.I. El-Registan // *Microbiology*. – 2006. – 75. – No 4. – P. 420-426. DOI: 10.1134/S0026261706040096

568. Fonseca F. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage / F. Fonseca, C. Béal, G. Corrieu // *Cryobiology*. – 2001. – 43. – P. 189-198.

569. Song S. Cold stress improves the ability of *Lactobacillus plantarum* L67 to survive freezing / S. Song, D.W. Bae, K. Lin et al. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2014. – 191. – 135-143.

570. Izawa S. Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides / S. Izawa, K. Ikeda, N. Takahashi, Y. Inoue // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – 75. – P. 533-537. DOI 10.1007/s00253-007-0855-6

571. Panoff J.M. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 / J.M. Panoff, B. Thammavongs, J.M. Laplace et al. // *Cryobiology*. – 1995. – 32. – P. 516-520.

572. Fernandez Murga M.L. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus* / M.L. Fernandez Murga, G.M. Cabrera, G. Font De Valdez et al. // *J. Applied Microbiology*. – 2000. – 88. – P. 342-348

573. Wang Y. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758 / Y. Wang, J. Delettre, A. Guillot et al. // *Cryobiology*. – 2005. – 50. – P. 294-307.

574. Phadtare S. Cold-shock response and cold-shock proteins / S. Phadtare, J. Alsina, M. Inouye // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – 2. P. 175-180.

575. Thieringer H.A. Cold shock and adaptation / H.A. Thieringer, P.G. Jones, M. Inouye // *BioEssays*. – 1998. – 20. – P. 49-57.

576. Graumann P. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures / P. Graumann, T.M. Wendrich, M.H. Weber et al. // *Molecular Microbiol.* – 1997. – 25. – P. 741-756.

577. Capozzi V. Responses of lactic acid bacteria to cold stress / V. Capozzi, D. Fiocco, G. Spano // In: Tsakalidou E., Papadimitriou K. (ed). *Stress responses of lactic acid bacteria*. Springer, New York, NY. – 2011. – P. 91-110.

578. Broadbent J.R. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization / J.R. Broadbent, C. Lin // *Cryobiology*. – 1999. – 39. – P. 88-102. Doi:10.1006/cryo.1999.2190.

579. Beaufils S. The cold shock response of *Lactobacillus casei*: relation between HPr phosphorylation and resistance to freeze/thaw cycles / S. Beaufils, N. Sauvageot, A. Mazé et al. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 13. – P. 65-75. doi: 10.1159/000103598

580. Sahara T. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cell to low temperature / T. Sahara, T. Goda, S. Ohgiya // J. Biol. Chemistry. – 2002. – 277. – No 51. – P. 50015-50021.

581. Parrou J.L. Effect of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose / J.L. Parrou, M.A. Teste, J. Francois // Microbiology. – 1997. – 143. – P. 1891-1900.

582. Kondo K. *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae* // K. Kondo, M. Inouye / J. Biol. Chem. – 1995. – 266. – P. 17537-17544.

583. Rodriguez-Vargas S. Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast / S. Rodriguez-Vargas, F. Estruch, F. Randez-Gil // Appl. Env. Microbiol. – 2002. – 68. – No. 6. – P. 3024-3030. DOI: 10.1128/AEM 68.6.3024-3030.2002

584. Piper P.W. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold / P.W. Piper, K. Talreja, B. Panaretou et al. // Microbiology. – 1994. – 140. – P. – 3031-3038.

585. Cai L. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role / L. Cai, M. Satoh, C. Tohyama, M.G. Cherian // Toxicology. – 1999. – 132. – P. 85-98.

586. Salin M.L. Dealing with active oxygen intermediates: A halophilic perspective / M.L. Salin, N.J. Brown-Peterson // Experientia. Birkhauser Verlag, CH-4010. Basel/Switzerland. – 1993. – 49. – P. 523-528.

587. Imlay J.A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? // Environ. Microbiol. – 2018. Doi: 10.1111/1462-2920.14445

588. Klein J.A. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration / J.A. Klein, S.L. Ackerman // J. Clin. Invest. – 2003. – 111. – P. 785-793. DOI:10.1172/JCI200318182.

589. Лушак В.И. Окислительный стресс у дрожжей (Обзор) // Биохимия. – 2010. – 75. – № 3. – С. 281-296.

590. Ruis H. Stress signaling in yeast / H. Ruis, C. Schüller // Bioessays. – 1995. – 17. – P. 959-965.

591. van Bokhorst-van de Veen H. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum* / H. van Bokhorst-van de Veen, T. Abee, M. Tempelaars // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77. – P. 5247-5256. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00515-11> (Epub 2011 Jun 24)

592. Murphy M.G. Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures / M.G. Murphy, S. Condon // Arch. Microbiol. – 1984. – 138. – P. 44-48. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00425405>

593. González-Flecha B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli* / B. González-Flecha, B. Demple // J. Biol. Chem. – 1995. – 270. – P. 13681-13687.

594. Seki M. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate / M. Seki, K. Iida, M. Saito // J. Bacteriol. – 2004. – 186. – P. 2046-2051.

595. Kang T.S. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance system in *Lactobacillus panis* / T.S. Kang, D. Korber, T. Tanaka // AMB Express. – 2013. – 3. – P. 10. doi:10.1186/2191-0855-3-10.

596. Chen S-X. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase / S-X. Chen, P. Schopfer // Eur. J. Biochem. – 1999. – 260. P. 726-735.

597. Mead J.F. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes // In: Free radicals in biology / W.A.Pryor (ed.). Academic Press, Inc., New York, N.Y. – 1976. – p.51-68.

598. Brot N. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide / N. Brot, L. Weissbach, J. Wearth, H. Weissnach // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. – 1981. – 78. – P. 2155-2158.

599. Storz G. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium* / G. Storz, M.F. Christman, H. Sies, B.N. Ames // Proc.Natl.Acad.Sci. USA. – 1987. – 84. – P. 8917-8921.

600. Storz G. Oxidative stress / G. Storz, J.A. Imlay // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – 2. – No 2. – P. 188-194. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80033-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80033-2)

601. Storz G. Oxidative stress / G. Storz, M. Zheng // In Storz G and Hengge-Aronis R. (Eds). Bacterial Stress Responses. ASM Press, Washington, DC. – 2000. – P. 47-59.

602. Pomposiello P.J. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress / P.J. Pomposiello, B. Demple // Adv. in Microbial Physiol. – 2002. – 46. – P. 320-341.

603. Thomas E.L. Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide / E.L. Thomas, K.A. Pera // J. Bacteriol. – 1983. – 154. – P. 1236-1244.

604. Fridovich I. Biological effects of superoxide radical // Arch. Biochem. Biophys. – 1986. – 247. – P. 1-11.

605. Imlay J.A. DNA damage and oxygen radical toxicity / J.A. Imlay, S. Linn // *Science*. – 1988. – 240. – P. 1302-1309.
606. Imlay J.A. How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv. in Microbial Physiology*. – 2002. – 46. – P. 112-155.
607. Duwat P. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival / P. Duwat, B. Cesselin, S. Sourice, A. Gruss // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – 55(103). – P. 83-86. Doi:10.1016/S0168-1605(00)00179.3
608. Островский Д.Н. Окислительный стресс у бактерий. 53-е Баховское чтение. – М.: ИНБИ РАН, 1997. – 24с.
609. Crawford D.R. Assessing gene-expression during oxidative stress / D.R. Crawford, C.A. Edbauer-Nechamen, C.V. Lowry et al. // *Methods Enzymol.* – 1994. – 234. – P. 175-217.
610. Crawford D.R. Oxidant-modulated gene expression / D.R. Crawford, T. Suzuki, K.J.A. Davies // *In Antioxidant and Redox Regulation of Genes* (C.K. Sen, H. Sies, P.A. Baeurle, eds.), Academic Press, San Diego, CA. – 2000. – P. 21-45.
611. Flahaut S. The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress proteins / S. Flahaut, J. M. Laplace, J. Frere, Y. Auffray // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1998. – 26. – P. 259-264.
612. Mostertz J. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress / J. Mostertz, C. Scharf, M. Hecker, G. Homuth // *Microbiology*. – 2004. – 150. – P. 497–512.
613. Wolf C. Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: diverse responses to different oxidants / C. Wolf, F. Hochgräfe, H. Kusch et al. // *Proteomics*. – 2008. – 8. – P. 3139-3153.
614. Woojin S.K. A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses / S.K. Woojin, J.H. Park, J.E. Tandianus et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – 212. – P. 203-208.
615. Баату С. Изменения физиологии четырех штаммов бактерий после окислительного стресса / Баату С., Де Бевер П., Мерже М. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2006. – 42. – № 4. – С. 418-427.
616. Folmer V. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* / V Folmer, N Pedroso, AC Matias et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – 1778(4). – P. 1141-1147.
617. Oberg T.S. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species / T.S. Oberg, J.L. Steele, S.C. Ingham et al. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – 38. – № 12. – P. 1947-1953.

618. Stevens M.J.A. Involvement of the mannose phosphotransferase system of *Lactobacillus plantarum* WCFSI in peroxide stress tolerance / M.J.A. Stevens, D. Molenaar, A. de Jong et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – 76. – P. 3748-3752. doi: 10.1128/AEM.00073-10.

619. Karyl I.M. Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast / I. M. Karyl, McA.-H. Lee // Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – 31. – Issue 6. – P. 832-843.

620. Cap M. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities / M. Cap, L. Va'chova', Z. Palkova' // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2012. – DOI:10.1155/2012/976753

621. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – 7. – № 6. – С. 4-10.

622. Long L.H. Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media / L.H. Long, B. Halliwell // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – 286. – P. 991-994.

623. Grzelak A. Reactive oxygen species are formed in cell culture media. Letter to the Editor / A. Grzelak, G. Bartosz // Acta Biochimica Polonica. – 2000. – 47. – N. 4. – P. 1197–1198.

624. Silva E. Biological implications of riboflavin sensitized photoproducts of triptophan. A review // Quimica Nova. – 1993. – 16(4). – P. 301-303.

625. Ito K. 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin / K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto, S. Kawanishi // J. Biol. Chem. – 1993. – 268 (18). – P. 13221-13227.

626. Piazena H. Penetration of solar UV irradiation in coastal lagoons of the southern Baltic sea and its effect on phytoplankton communities / H. Piazena, D.-P. Häder // Photochem. Photobiol. – 1994. – 60. – No 5. – P. 463-469.

627. Martin E.L. The effects of ultraviolet radiation on the moderate halophile *Halomonas elongata* and extreme halophile *Halobacterium salinarum* / E.L. Martin, R.L. Reinhardt, L.L. Baum et al. // Can. J. Microbiol. – 2000. – 46. – P. 180-187.

628. Baliga N.S. Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1 / N.S. Baliga, S.J. Bjork, , R. Bonneau et al. // Genome Res. – 2004. – 14. – No 6. – P. 1025-1035.

629. Tyagi R. Differential effect of ultraviolet-B radiation on certain metabolic processes in a chromatically adapting *Nostoc* / R. Tyagi, G. Srinivas, D. Vyas et al. // Photochem. Photobiol. – 1992. – 55. – No 3. – P. 401-407.

630. Cunningham M.L. Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290-405) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes / M.L. Cunningham, J.S. Johnson // *Photochem. Photobiol.* – 1985. – 42. – P. 125-128.

631. Strakhovskaya M.G. Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl / M.G. Strakhovskaya, A.O. Shumarina, G.Ya. Fraikin, A.B. Rubin // *J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology.* – 1999. – 49. – P. 18-22.

632. Miller R.V. Bacterial response to solar ultraviolet light / R.V. Miller, W. Jeffrey, D. Mitchell, M. Elasri // *ASM News.* – 1999. – 65. – 535-541.

633. Heck D.E. UVB light stimulates production of reactive oxygen species. Unexpected role for catalase / D.E. Heck, A.M. Vetrano, T.M. Mariano, J.D. Laskin // *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278. – No 25. – 22432-22436.

634. Benaroudj N. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. / N. Benaroudj, D.H. Lee, A.L. // *Goldberg Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – 276. – Issue 26. – P. 24261-24267.

635. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. – М.: Наука, 1988. – 241 с.

636. Sies H. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids / H. Sies, W. Stahl, A.R. Sundquist // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1992. – 669. – Issue 1. – P. 7-20.

637. Edge R. The carotenoids as antioxidants—a review / R. Edge, D. McGarvey, T. Truscott // *J. of Photochem. and Photobiol. B. Biology.* – 1997. – 41. – No 3. – P. 189-200.

638. Krinsky N. I. The antioxidant and biological properties of the carotenoids // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1998. – 854. – P. 443-447.

639. Anjem A. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli* / A. Anjem, S. Varghese, J.A. Imlay // *Mol. Microbiol.* – 2009. – 72. – No 4. – P. 844-858.

640. Zotta T. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17 / T. Zotta, A. Guidone, R.G. Ianniello et al. // *Applied Microbiol.* – 2013. – 115. – P. 848-858. Doi:10.1111/jam.12285

641. Calderini E. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine *de novo* synthesis / E. Calderini, H.U. Celebioglu, J. Villarroel et al. // *Proteomics.* – 2017. – 17. – No 5. – P. 1-10. Doi: 10.1002/pmic.201600178.

642. Scott C. Zn uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins in *Lactococcus lactis* / C. Scott, H. Rawsthorne, M. Upadhyay et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – 192. – No 1. – P. 85-89.
643. Guerzoni M.E. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus* / M.E. Guerzoni, R. Lanciotti, P.S. Cocconcelli // Microbiology. – 2001. – 147. – No 8. – P. 225-2264.
644. Меньщикова Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биол. – 1993. – 113. – № 4. – С. 442-455.
645. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – М.:Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
646. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи Современ. Биологии. – 1993. – 113. - № 4. – С. 456-470.
647. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – 7. – P. 405-410.
648. Blokhina O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // Ann. Bot. – 2003. – 91. – P. 179-194.
649. Becker B. Towards the physiological function of uric acid // Free Radical Biology and Medicine. – 1993. – 14 (6). – P. 615–631.
650. Padayatty S.J. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention / S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang et al. // J. of the American College of Nutrition. – 2003. – 22 (1). – P. 18–35.
651. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals // J. Biol. Chem. – 1994. – 269 (13). – P. 9397–9400.
652. Shigeoka S. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes / S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi et. al. // J. of Experimental Botany. – 2002. – 53. – 372. – P. 1305–1319.
653. Young A.J. Carotenoids and oxidative stress / A.J. Young, G. Britton // In M. Baltscheffsky, ed. Current Research in Photosynthesis, vol IV. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands. – 1991. – P. 587-612.
654. Jeong J.-Ch. Stimulation of  $\beta$ -carotene synthesis by hydrogen peroxide in *Blakeslea trispora* / J.-Ch. Jeong, I-Y. Lee, S-W. Kim, Y-H. Park // Biotechnology Letters. – 1999. – 21. – P. 683–686.

655. Гуринович Е.С. Влияние ультрафиолетовых лучей на биосинтез каротиноидов дрожжами *Rhodotorula gracilis* / Е.С. Гуринович, И.Ф. Королева. – Минск : Наука и техника, 1968. – С. 35-49.

656. Kobayashi M. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, T. Kakizono, S. Nagai // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – 59. – P. 867–873.

657. Hurst J.S. Toxicity of carotenoid oxidative breakdown products to cultured human retinal pigmented epithelial cells / J.S. Hurst, G.–F. Jin, M. Saini et al. // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2004. – 45 (13). – P. 1297-1308.

658. Herrera E. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives / E. Herrera, C. Barbas // J. of Physiology and Biochemistry. – 2001. – 57 (2). – P. 43–56.

659. Traber M.G. Vitamin E, antioxidant and nothing more / M.G. Traber, J. Atkinson // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – 43 (1). – P. 4–15.

660. Azzi A. Molecular mechanism of  $\alpha$ -tocopherol action // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – 43 (1). – P. 16–21.

661. Gottersman S. Protein quality control: triage by chaperones and proteases / S. Gottersman, S. Wickner, M.R. Maurizi // Genes Dev. – 1997. – 11. – No 7. – P. 815-823.

662. Rennenberg H. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants // Phytochemistry. – 1982. – 21. – P. 2771-2781.

663. May M.J. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures / M.J. May, C.J. Leaver // Plant Physiology. – 1993. – 103. – P. 621-627.

664. Douglas K.T. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. – 1987. – 59. – P. 103–67.

665. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals // J. Biol. Chem. – 1994. – 269 (13). – P. 9397–9400.

666. Sundquist A.R. Evolution of antioxidant mechanisms: thiol-dependent peroxidases and thioltransferase among procaryotes / A.R. Sundquist, R.C. Fahey // J. Mol. Evol. – 1989. – 29. – P. 429-435.

667. Carmel-Harel O. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress / O. Carmel-Harel, G. Storz // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – 54. – P. 439-461.

668. Collinson E.J. Role of yeast glutaredoxins as glutathione-S-transferases / E.J. Collinson, C.M. Grant // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – No. 25. – P. 22492-22497.

669. Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems // Antioxid. Redox Signal. – 2000. – 2. – P. 811-820.

670. Song J.J. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress / J.J. Song, J.G. Rhee, M. Suntharalingam et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277. – No 48. – P. 46566-46575.

671. Toledano M. Oxidative stress responses in yeast / M. Toledano, A. Delaunay, B. Biteau et al. // *In Topics in Current Genetics. Yeast Stress Responses*, vol 1. Hohmann S, Mager PWH (eds). Springer-Verlag: Heidelberg. – 2003. – P. 241–303. DOI 10.1007/3-540-45611-2

672. Toledano M.B. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: Differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis / M.B. Toledano, C. Kumar, N. LeMoan et al. // *FEBS Lett.* – 2007. – 581. – 3598-3607.

673. Wiederholk K.M. Glutathione accumulation in lactococci / K.M. Wiederholk, J.L. Steele // *J. Dairy Sci.* – 1993. – 77. – P. 1183-1188.

674. Zotta T. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry / T. Zotta, E. Parente, A. Ricciardi // *J. Appl. Microbiol.* – 2017. – 122. – No 4. – P. 857-869. Doi: 10.1111/jam.13399

675. Takemoto T. Different mechanisms of thioredoxin in its reduced and oxidized forms in defense against hydrogen peroxide in *Escherichia coli* / T. Takemoto, Q.M. Zhang, S. Yonei // *Free Radical Biol. and Med.* – 1998. – 24. – P. 556-562.

676. Scharf C. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis* / C. Scharf, S. Riethdorf, H. Ernst et al. // *J. Bacteriol.* – 1998. – 180. – P. 1869-1877.

677. Arnér E. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase / E. Arnér, A. Holmgren // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – 267 (20). – P. 6102–6109.

678. Ross S.J. Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast / S.J. Ross, V.J. Findlay, P. Malakai, B.A. Morgan // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – 11. – P. 2631-2642.

679. Jeong W. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family / W. Jeong, M.K. Cha, I.H. Kim // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275. – P. 2924-2930.

680. Vido K. Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis* / K. Vido, H. Diemer, A. Van Dorsselaer et al. // *J. Bacteriol.* – 2005. – 187. – P. 601-610.

681. Zeller T. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes / T. Zeller, G. Klug // *Naturwissenschaften.* – 2006. – 93. – P. 259-266.

682. Serrano I.M. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFSI / I.M. Serrano, D. Molenaar, M. Wels et al. // *Microb. Cell Fact.* – 2007. – 6. – P. 29. Doi: 10.1186/1475-2859-6-29

683. Serata M. Role of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei* / M. Serata, T. Lino, E. Yasuda, T. Sako // *Microbiol.* – 2012. – 58. – No 4. – P. 953-962.

684. Zotta T. Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group / T. Zotta, A. Ricciardi, R.G. Ianniello et al. // *PLOS one.* – 2014. – 9. – No 6. – e99189.

685. Miyoshi A. Oxidative stress in *Lactococcus lactis* / A. Miyoshi, T. Rochat, J-J. Gratadoux et al. // *Genet. Mol. Res.* – 2003. – 2 (4). – P. 348-359.

686. Kirsch M. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? / M. Kirsch, H. De Groot // *FASEB J.* – 2001. – 15. – P. 1569-1574. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0823hyp>.

687. Yamasaki H. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / H. Yamasaki, Y. Sakihama, N. Ikehara // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 1405-1412.

688. Fraikin G.Y. Involvement of near-UV-induced synthesis of serotonin in photoprotection and in potentiation of far-UV lethality in the yeast *Candida guilliermondii* / G.Y. Fraikin, M.G. Strakhovskaya, L.B. Rubin // *Photochem. Photobiol.* – 1981. – 33. – No. 6. – P. 839-843.

689. Fraikin G.Y. Photomimetic effect of serotonin on yeast cells irradiated by far-UV radiation / G.Y. Fraikin, M.G. Strakhovskaya, L.B. Rubin // *Photochem. Photobiol.* – 1982. – 35. – No. 6. – P. 799-802.

690. Munday R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species // *Free Radic. Biol. Med.* – 1989. – 7. – P. 659-673.

691. Buettner G.R. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid / G.R. Buettner, B.A. Jurkiewicz // *Radiat. Res.* – 1996. – 145. – P. 532-541.

692. Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? // *Free Radic. Res.* – 1996. – 25. – P. 439-454.

693. Hu M.I. Ascorbic acid inhibits lipid peroxidation but enhances DNA damage in rat liver nuclei incubated with iron ions / M.I. Hu, M.K. Shin // *Free Radic. Res.* – 1997. – 26. – P. 585-592.

694. Carr A. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? / A. Carr, B. Frei // *FASEB J.* – 1999. – 13. – P. 1007-1024.

695. Zheng Q.S. Ascorbic acid induces redifferentiation and growth inhibition in human hepatoma cells by increasing endogenous hydrogen peroxide / Q.S. Zheng, Y.T. Zhang, R.L. Zheng // *Pharmazie*. – 2002. – 57(11). – P. 753-757.

696. Nofsinger J. B. Aggregation of eumelanin mitigates photogeneration of reactive oxygen species / J. B. Nofsinger, Y. Liu, J.D. Simon // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – 32. – Issue 8. – P. 720-730.

697. Rao M.V. Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes. Salicylic acid mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / M.V. Rao, G. Paliyath, D.P. Ormrod et al. // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 137-149.

698. Vorob'eva L.I. Protective and reactivate effects of bacterial peptides in the organisms inactivated by different stress factors / L.I. Vorob'eva, U.Yu. Khodzhaev, G.M. Ponomareva // *Resources, Conservation and Recycling*. – 1996. – 18. – P. 151-159.

699. Vorob'eva L.I. The extracellular protein of *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* reactivates cells inactivated by UV irradiation or heat shock / L.I. Vorob'eva, U.Yu. Khodzhaev, G.M. Ponomareva // *Mikrobiologiya*. – 2003. – 72. – No. 4. – P. 482-487.

700. Vorob'eva L.I. Cross-effects of extracellular factors of adaptation to stress in *Luteococcus casei* and *Saccharomyces cerevisiae* / L.I. Vorob'eva, U.Yu. Khodzhaev, G.M. Ponomareva // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* – 2005. – 41. – No. 2. – P. 171-175.

701. Yashpe-Purer Henis Y. Regulation of catalase level in *Escherichia coli* K12 / Y. Yashpe-Purer Henis, J.J. Yashpe // *Microbiol.* – 1977. – 23. – P. 84-91.

702. Jamieson D.J. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress / D.J. Jamieson, S.L. Rivers, D.W.S. Stephen // *Microbiology*. – 1994. – 140. – P. 3277-3283.

703. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dimutases // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – 64. – P. 97-112.

704. Benov L. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli* / L. Benov, I. Fridovich // *J. Bacteriol.* – 1995. – 177. – No. 11. – P. 3344-3346.

705. Izawa S. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae* / S. Izawa, Y. Inoue, A. Kimura // *J. Biochem.* – 1996. – 320. – P. 61-67.

706. Elkins G.J. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide / G.J. Elkins, D.J. Hassett, P.S. Stewart et al. // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1999. – 65. – No.10. – P. 4594-4600.

707. Kvint K. The bacterial universal stress protein: function and regulation / K. Kvint, L. Nachin, A. Diez, T. Nyström // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003. – 6. – P. 140-145. Doi: 10.1016/S1369-5274(03)00025-0

708. Bowler C. Superoxide dismutase and stress tolerance / C. Bowler, M.V. Montagu, D. Inzé // *Ann. Rev. of Physiol. and Plant Molecular Biol.* – 1992. – 43. – P. 83-116.

709. Briokhanov A.I. Catalase and superoxide dismutase in the cells of strictly anaerobic microorganisms / A.I. Briokhanov, R.K. Thauer, A.I. Netrusov // *Microbiologiya.* – 2002. – 71. – No. 3. – P. 330-335.

710. May B.P. Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum* / B.P. May, P.P. Dennis // *J. Biol. Chem.* – 1989. – 264. – P. 12253-12258.

711. May B.P. The expression of the superoxide dismutase gene in *Halobacterium cutirubrum* and *Halobacterium volcanii* / B.P. May, P. Tam, P.P. Dennis // *Can. J. Microbiol.* – 1989. – 35. – P. 171-175.

712. Sheng Y. Superoxide dismutases and superoxide reductases / Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli et al. // *Chem. Rev.* – 2014. – 114. – P. 3854-3918.

713. Hassan H.M. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli* / H.M. Hassan, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1977. – 252. – P. 7667-7672.

714. Hassan H.M. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds / H.M. Hassan, I. Fridovich // *Arch. Biochem. – Biophys.* – 1979. – 196. – P. 385-395.

715. Asada K. Phylogenic distribution of three types of superoxide dismutation in organisms and cell organelles / K. Asada, S. Kanematsu, S. Okada, T. Hayakawa // In: *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase* / Eds J.V. Bannister and H.A.O. Hill. Elsevier Press, Amsterdam. – 1980. – P. 136-153.

716. Bannister J.V. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase / J.V. Bannister, W.H. Bannister, G. Rotilio // *CRC Critical Reviews in Biochemistry.* – 1987. – 22. – P. 111-180.

717. Salin M.L. Purification of a manganese-containing superoxide dismutase from *Halobacterium halobium* / M.L. Salin, D. Oesterhelt // *Archs Biochem. Biophys.* – 1988. – 260. – P. 806-810.

718. Sanders J.W. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene / J.W. Sanders, K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman et al. // *J. Bacteriol.* – 1995. – 177. – P. 5254-5260.

719. Bruno-Barcenz J.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal *Lactobacilli* provides protection against hydrogen peroxide toxicity / J.M. Bruno-Barcenz, J.M. Andrus, S.L. Libby et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – 70. – P. 4702-4710.

720. Hassan H.M. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli* / H.M. Hassan, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1978. – 253. – P. 6445-6450.

721. Brown-Peterson N.J. Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of some unique properties of the halophilic enzyme / N.J. Brown-Peterson, M.L. Salin // J. Bact. – 1993. – 175. – P. 4197-4202.

722. Fukumori Y. Purification and properties of a peroxidase from *Halobacterium halobium* L-33 / Y. Fukumori, T. Fujiwara, Y. Okada-Takahashi et al. // Biochem. – 1985. – 98. – P. 1055-1061.

723. Pericone C.D. Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction / C.D. Pericone, S. Park, J.A. Imlay, J.N. Weiser // J. Bacteriol. – 2003. – 185. – P. 6815-6825.

724. Рогожин В.В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – СПб.: ГИОРДб 2004. – 240 с.

725. Goffin P. Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth / P. Goffin, L. Muscariello, F. Lorquet et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – 72. – P. 7933-7940.

726. Lee M.H. Lipid peroxidation products mediate damage of superoxide dismutase / M.H. Lee, J.W. Park // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1995. – 35(5). – P. 1093-102.

727. Wolf G. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli / G. Wolf, A. Strahl, J. Meisel, W.P. Hammes // Int. J. Food Microbiol. – 1991. – 12. – P. 133-140.

728. Zamocky M. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis / M. Zamocky, F. Koller // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1999. – 72. – P. 19-66. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3).

729. Martins D. Catalase activity is stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rich culture medium and is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance and adaptation in yeast / D. Martins, A.M. English // Redox Biology. – 2014. – 2. – P. 308-313

730. Loewen P.C. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently / P.C. Loewen, J. Switala, B.L. Triggs-Raine // Arch. Biochem. Biophys. – 1985. – 243. – P. 144-149.

731. An H. Coexpression of the superoxide dismutase and the catalase provides remarkable oxidative stress resistance in *Lactobacillus rhamnosus* / H. An, Z. Zhai, S. Yin et al. // J. Agr. Food Chem. – 2011. – 59. – P. 3851-3856, doi:10.1186/2191-0855-3-10.

732. Martinez A. Protection of DNA during oxidative stress by the non-specific DNA-binding protein Dps / A. Martinez, R. Kolter // J. Bacteriol. – 1997. – 179. – P. 5188-5194.

733. Varghese S. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli* / S. Varghese, A. Wu, S. Park et al. // Mol. Microbiol. – 2007. – 64. – P. 822-830.

734. Chiancone E. Dps proteins, an efficient detoxification and DNA protection machinery in the bacterial response to oxidative stress // Rendiconti Lincei. – 2008. – 19. – P. 261-270. DOI: 10.1007/s12210-008-0018-4

735. Liu Y. The YaaA protein of the *Escherichia coli* OxyR region lessens hydrogen peroxide toxicity by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron / Y. Liu, S.C. Bauer, J.A. Imlay // J. Bacteriol. – 2011. – 193. – P. 2186-2196.

736. Higuchi M. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress / M. Higuchi, Y. Yamamoto, Y. Kamio // J. of Biosci. and Bioengin. – 2000. – 90. – No. 5. – P. 484-493.

737. Setlow B. Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spore to hydrogen peroxide / B. Setlow, P. Setlow // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – 59. – No 10. – P. 3418-3423.

738. Archibald F.S. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria / F.S. Archibald, I. Fridovich // J. Bacteriol. – 1981. – 146. – No 3. – P. 928-936.

739. Archibald F.S. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum* / F.S. Archibald, I. Fridovich // J. Bacteriol. – 1981. – 145. – P. 442-451.

740. Casselin B. Responses of lactic acid bacteria to oxidative stress. Chapter 6. / B. Casselin, A. Derrè-Bobillot, A. Fernandez et al. // In Stress Responses in Lactic Acid Bacteria, eds Tsakalidou E. and Papadimitriou K. New York, NY: Springer. – 2011. – P. 111-127. doi: 10.1007/978-0-387-92771-8.

741. Kono Y. Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum* / Y. Kono, I. Fridovich // J. Bacteriol. – 1983. – 155. – P. 742-746.

742. Kono Y. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* / Y. Kono, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1983. – 258. – No 10. – P. 6015-6019.

743. Zotta T. Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance *Lactobacillus plantarum* WCFS1 / T. Zotta, A. Ricciardi, A. Guidone et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – 155. – P. 51-59. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.017.

744. Knauf H.J. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677 / H.J. Knauf, R.F. Vogel, W.P. Hammes // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – 58. – P. 832-839.

745. An H. High-level expression of heme-dependent catalase gene *katA* from *Lactobacillus sakei* protects *Lactobacillus rhamnosus* from oxidative stress / H. An, H. Zhon, Y. Huang et al. // Mol. Biotechnol. – 2010. – 45. – P. 155-160. Doi: 10.1007/s12033-010-9254-9.

746. Rochat T. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk / T. Rochat, J. Gratadoux, A. Gruss et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – 72. – P. 5143-5149. Doi:10.1128/AEM.00482-06.

747. Lin J. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei* / J. Lin, Y. Zou, K. Cao et al. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2016. DOI 10.1007/s10295-016-1752-8.

748. Guidone A. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group / A. Guidone, R.G. Ianniello, A. Riccardi et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – 29. – P. 1713-1722. Doi: 10.1007/s11274-013-1334-0.

749. Zotta T. Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 / T. Zotta, R.G. Ianniello, A. Guidone et al. // J. Appl. Microbiol. – 2013. – 116. P. 632-643. doi: 10.1111/jam.12398.

750. Engesser D.M. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria / D.M. Engesser, W.P. Hammes // Syst. Appl. Microbiol. – 1994. – 17. – P. 11-19.

751. Watanabe M. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 / M. Watanabe, S. van der Veen, H. Nakajima, T. Abee // Microbiol. – 2012. – 158. – P. 293-300. Doi: 10.1099/mic.0.051250-0.

752. Alcantara C. Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus spp.* and its involvement in stress resistance / C. Alcantara, A. Blasco, M. Zuniga, V. Monedero // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – 80. – P. 1650-1659. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03997-13>

753. Gray M.J. Oxidative stress protection by polyphosphate – new roles for an old player / M.J. Gray, U. Jacob // Curr. Opin. Microbiol. – 2015. – 24. – P. 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.004>

754. Cochran W. L. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine / W.L. Cochran, G.A. McFeters, P.S. Stewart // J. Appl. Microbiol. – 2000. – 88. – Issue 1. – P. 22-30. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00825.x

755. Huang C-T. Effects of quorum sensing signal on the hydrogen peroxide resistance against planktonic *Pseudomonas aeruginosa* / C-T. Huang, P-C. Shin // J. Microbiol. Immunol. Infect. – 2000. – 33. – P. 154-158.

756. Fujiya M. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter / M. Fujiya, M.W.

Musch, Y. Nakagawa et al. // *Cell Host Microbe*. – 2007. – 1. – No 4. – P. 299-308. doi:10.1016/j.chom.2007.05.004

757. Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide // *Annu Rev Biochem*. – 2008. – 77. – P. 755-776.

758. Mai-Prochnow A. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria / A. Mai-Prochnow, P. Lucas-Elio, S. Egan // *J. Bacteriol*. – 2008. – 190 (15). – P. 5493–5501.

759. Harmsen M. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal / M. Harmsen, L. Yang, S.J. Pamp, T. Tolker-Nielsen // *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. – 2010. – 59. – P. 253–268.

760. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation // *Int. J. Artif. Organs*. – 2011. – 34. – P. 737-751.

761. Стрелкова Е.А. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биоплёнок / Е.А. Стрелкова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев // *Микробиология*. – 2012. – 81. – № 2. – С. 282–285.

762. Hassett D.J. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide / D.J. Hassett, J.-F. Ma, J.G. Elkins et al. // *Molecular Microbiology*. – 1999. – 34. – No 5. – P. 1082-1093(12). DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01672.x

763. Quinones B. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae* / B. Quinones, G. Dulla, S.E. Lindow // *MPMI* – 2005. – 18. – No 7. – P. 682-693. DOI: 10.1094/MPMI-18-0682

764. Goller C.C. Environmental influences on biofilm development / C.C. Goller, T. Romeo // In: *Bacterial Biofilms*. Ed. T. Romeo. Current Topics in Microbiology and Immunology. 292 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2008. – 322. – P. 37-67. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

765. Wu R. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made koumiss in inner Mongolia of China / R. Wu, W. Wang, D. Yu et al. // *Mol. Cellul. Proteomics*. – 2009. – 8. – No 10. – P. 2321-2338.

766. Galle S. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria / S. Galle, E.K. Arendt // *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutrit*. – 2013. DOI:10.1080/10408398.2011.617474

767. Torino M.I. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages / M.I. Torino, G. Font de Valdez, F. Mozzi // *Frontiers in Microbiology*. – 2005. – 11 Sep. Doi: 10.3389/fmicb.2015.00834.

768. Caggianiello G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms / G. Caggianiello, M. Kleerebezem, G. Spano // *Appl. Microbiol Biotechnol.* – 2016. DOI 10.1007/s00253-016-7471-2
769. Storz G. Bacterial defenses against oxidative stress / G. Storz, L.A. Tartaglia, S.B. Farr, B.N. Ames. // *Trends Genet.* – 1990. – 6. – P. 363-368.
770. Storz G. OxyR regulon / G. Storz, S. Altuvia // *Methods Enzymol.* – 1994. – 234. – 217-223.
771. Crawford D.R. Adaptive response and oxidative stress / D.R. Crawford, K.J.A. Davies // *Environ Health Perspect.* – 1994. – 102 (Suppl 10). – P. 25-28.
772. Dowds B.C. Regulation of the oxidative stress response by *hpr* gene in *Bacillus subtilis* / B.C. Dowds, J.A. Hoch // *J. Gen. Microbiol.* – 1991. – 137. – P. 1121-1125.
773. Zheng M. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation / M. Zheng, F. Aslund, G. Storz // *Science.* – 1998. – 279. – P. 1718-1721.
774. Michan C. *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress / C. Michan, M. Machado, G. Dorado, C. Pucyo // *J. of Bacteriology.* – 1999. – 181. – P. 2759-2764.
775. Slund F. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thioldisulfide status / F. Slund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1999. – 96. – P. 6161-6165.
776. Cho Y.-H. The *pqrAB* operon is responsible for paraquat resistance in *Streptomyces coelicolor* / Y.-H. Cho, E.-J. Kim, H.-J. Chung et al. // *J. of Bacteriology.* – 2003. – 185. – No 23. – P. 6756-6763.
777. Semchyshyn H.M. Involvement of *soxRS* regulon in response of *Escherichia coli* to oxidative stress induced by hydrogen peroxide / H.M. Semchyshyn, T.V. Bagnyukova, V.I. Lushchak // *Biochemistry (Moscow).* – 2005. – 70. – P. 1238-1244.
778. Hong M. Structure of an *OhrR-ohrA* operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family / M. Hong, M. Fuangthong, J.D. Helmann, R.G. Brennan // *Mol. Cell.* – 2005. – 20(1). – P. 131-141.
779. Lee J.-W. The *PerR* transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation / J.-W. Lee, J.D. Helmann // *Nature.* – 2006. – 440(7082). – 363-367.
780. You C.-H. *Spx* mediates oxidative stress regulation of the methionine sulfoxide reductases operon in *Bacillus subtilis* / C.-H. You, A. Sekowska, O. Francetic et al. // *BMC Microbiology.* – 2008. – 8 (128). doi:10.1186/1471-2180-8-128.
781. Soonsanga S. Conversion of *Bacillus subtilis OhrR* from a 1-Cys to a 2-Cys peroxide sensor / S. Soonsanga, J.-W. Lee, J.D. Helmann // *J. of Bacteriology.* – 2008. – 190. – No 17. – P. 5738–5745.

782. Zuber P. Management of oxidative stress in *Bacillus* // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – 63(1). – 575-597.

783. Kumar S.R. How *Escherichia coli* tolerates profuse hydrogen peroxide formation by a catabolic pathway / S.R. Kumar, J.A. Imlay // *J. Bacteriol.* – 2013. – 195. – P. 4569-4579.

784. Zheng M. Redox sensing by prokaryotic transpiration factors / M. Zheng, G. Storz // *Biochem Pharmacol.* – 2000. – 59. – P. 1-6.

785. Seaver L.C. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli* / L.C. Seaver, J.A. Imlay // *J. Bacteriol.* – 2001. – 183. – P. 7182-7189.

786. Zheng M. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide / M. Zheng, X. Wang, L.J. Templeton et al. // *J. Bacteriol.* – 2001. – 183/ – P. 4562-4570.

787. Sobota J.M. Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese / J.M. Sobota, J.A. Imlay // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – 108. – P. 5402-5407.

788. Li X. Improved measurements of scant hydrogen peroxide enable experiments that define its threshold of toxicity for *Escherichia coli* / X. Li, J.A. Imlay // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – 120. – P. 217-227.

789. Christman M.F. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium* / M.F. Christman, R.W. Morgan, F.S. Jacobson et al. // *Cell.* – 1985. – 41. P. 753-762.

790. Dimple B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* sox RS oxidative stress regulon – a review // *Gene.* – 1996. – 179. – P. 53-57.

791. Aslund F. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status / F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – 96. – P. 6161-6165.

792. Choi H. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor / H. Choi, S. Kim, P. Mukhopadhyay et al. // *Cell.* – 2001. – 105. – P. 103-113.

793. Greenberg J.T. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli* / J.T. Greenberg, P. Monach, J.H. Chou et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – 87. – P. 6181-6185

794. Tsaneva I.R. *SoxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12 / I.R. Tsaneva, B. Weiss // *J. Bacteriol.* – 1990. – 172. – P. 4197-4205.

795. Pomposiello P.J. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate / P.J. Pomposiello, M.H.J. Bennik, B.

Demple // J. of Bacteriol. – 2001. – 183. – No 13. P. 3890-3902. DOI: 10.1128/JB.183.13.3890-3902

796. Wu J. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli* / J. Wu, W.R. Dunahm, B. Weiss // J. Biol. Chem. – 1995. – 270. – P. 10323-10327.

797. Fuangthong M. *OhrR* is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis* / M. Fuangthong, S. Atichartpongkul, S., Mongkolsuk J. D. Helmann // J. Bacteriol. – 2001. – 183(14). – P. 4134-4141.

798. Duarte V. *PerR* vs *OhrR*: selective peroxide sensing in *Bacillus subtilis* / V. Duarte, J.M. Latour // Mol Biosyst. – 2010. – 6(2). – P. 316-23.

799. Thackray P.D. *SigM*, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress / P.D. Thackray, A. Moir // J. of Bacteriology. – 2003. – P. 3491–3498.

800. Nakano S. Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis* / S. Nakano, E. Kuster-Schock, A.D. Grossman, P. Zuber // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2003. – 100. – P. 13603-13608.

801. Chi B. Kh. The paralogous MarR/DUF24-family repressors YodB and CatR control expression of the catechol dioxygenase CatE in *Bacillus subtilis* / B. Kh. Chi, K. Kobayashi, D. Albrecht et al. // J. Bacteriol. – 2010. – 192(18). – P. 4571-4581.

802. Marles-Wright J. Molecular architecture of the “Stressosome,” a signal integration and transduction hub / J. Marles-Wright, T. Grant, O. Delumeau et al. // Science. – 2008. – 322. – No. 5898. – P. 92-96. DOI: 10.1126/science.1159572.

803. Ralser M. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress / M. Ralser, M.M. Wamelink, A. Kowald et al. // J. of Biology. – 2007. – 6. – P. 10 DOI: 10.1186/jbiol61

804. Kruger A. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response / A. Kruger, N.M. Gruning, M.M. Wamelink et al. // Antioxid. Redox. Signal. – 2011. – 15. – P. 311-324. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3797>.

805. Colussi C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis / C. Colussi, M.C. Albertini, S. Coppola et al. / FASEB J. – 2000. – 14. – P. 2266-2276.

806. Deng X. Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* / X. Deng, H. Liang, O.A. Ulanovskaya et al. // J. Bacteriol. – 2014. – 196. – No 14. – P. 2499-2513.

807. Thevelein J.M. Signal transduction in yeast // *Yeast*. – 1994. – 10. – P. 1753-1790.
808. Moradas-Ferreira P. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast / P. Moradas-Ferreira, V. Costa, P. Piper, W. Mager // *Molecular Microbiology*. – 19. – Issue 4. – 1996. – P. 651-658.
809. Trott A. Yeast Stress Responses / A. Trott, K.A. Morano // In *Topics in Current Genetics*, vol.1. S. Hohmann, P.W.H. Mager (eds). Springer-Verlag: Heidelberg. – 2003. – P. 71–119.
810. Moye-Rowley W.S. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences // *Eukaryot. Cell*. – 2003. – 2. – P. 381–389.
811. Godon C. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae* / C. Godon, G. Lagniel, J. Lee et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273. – Issue 35. – P. 22480-22489.
812. Juhnke H. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress / H. Juhnke, B. Krems, P. Kotter, K.D. Entian // *Mol. Gen. Genet.* – 1996. – 252. – P. 456-464.
813. Jamieson D.J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. – 1998. – 14. – P. 1511–1527.
814. Gorsich S.W. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Sacharomyces cerevisiae* / S.W. Gorsich, B.S. Dien, N.N. Nichols et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – 71. – P. 339-349. DOI 10.1007/s00253-005-0142-3
815. Slekar K.H. The yeast copper/zink superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection / K.H. Slekar, D.J. Kosman, V.C. Culotta // *J. Biol. Chem.* – 1996. – 271. – P. 28831-28836.
816. Minard K.I. Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast / K.I. Minard, L. McAlister-Henn // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – 15. – P. 832-843.
817. Minard K.I. Dependence of peroxisomal  $\beta$ -oxidation on cytosolic sources of NADPH / K.I. Minard, L. McAlister-Henn // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274. – No 6. – P. 3402-3406.
818. Valadi H. NADH-reductive stress in *Saccharomyces cerevisiae* induces the expression of the minor isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TDH1) / H. Valadi, A. Valadi, R. Ansell et al. // *Curr. Genet.* – 2004. – 45. P. 90-95. DOI 10.1007/s00294-003-0469-1

819. Flattery-O'Brien J. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide / J. Flattery-O'Brien, L.P. Collinson, I.W. Dawes // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – 139. – P. 501-507.

820. Kuge S. YAP-1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides / S. Kuge, N. Jones // *FMBO J.* – 1994. – 13. – P. 655-664.

821. Stephen D.W. The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae* / D.W. Stephen, S.L. Rivers, D.J. Jamieson // *Mol. Microbiol.* – 1995. – 16. P. 415-423.

822. Fernandes L. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions / L. Fernandes, C. Rodrigues-Pousada, K. Struhl // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – 17(12). – P. 6982–6993.

823. Wemmie J.A. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 Protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide / J.A. Wemmie, S.M. Steggerda, W.S. Moye-Rowley // *IBC.* – 1997. – 272. – No 12. – P. 7908-7914.

824. Izawa S. Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of *Yap1*, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Izawa, K. Maeda, K. Sugiyama // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274. – P. 28459-28465.

825. Lee J. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast / J. Lee, C. Godon, G. Lagniel et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274(23). – P. 16040-16046.

826. Delaunay A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor / A. Delaunay, A.D. Isnard, M.B. Toledano // *EMBO J.* – 2000. – 19. – P. 5157–5166.

827. Gasch A. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes / A. Gasch, P. Spellman, C. Kao et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – 11. – P. 4241–4257.

828. Dumond H. A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast / H. Dumond, N. Danielou, M. Pinto, M. Bolotin-Fukuhara // *Mol. Microbiol.* 2000. – 36. – P. 830-845.

829. Nguyễn D. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants and alkylating agents / D. Nguyễn, A. Alarco, M. Raymond // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276(2). – P. 1138–1145.

830. Costa V. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases / V. Costa, P. Moradas-Ferreira // *Mol. Aspects Med.* – 2001. – 22. – P. 217-246.

831. Costa V.M.V. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7 / V.M.V. Costa, M.A. Amorim, A. Quintanilha, P. Moradas-Ferreira // Free Rad. Biol. Med. – 2002. – 33. – P. 1507-1515.

832. Gasch A.P. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation / A.P. Gasch, M. Werner-Washburne // Funct. Integr. Genomics. – 2002. – 2. – P. 181-192.

833. Rodrigues-Pousada C. Yeast activator proteins and stress response: an overview / C. Rodrigues-Pousada, T. Nevitt, R. Menezes et al. // FEBS Lett. – 2004. – 567. – P. 80–85.

834. Thorpe G.W. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes / G.W. Thorpe, C.S. Fong, N. Alic et al. // PNAS. – 2004. – 101. – No. 17. – P. 6564-6569. DOI: 10.1073/pnas.0305888101

835. Karin M. AP-1 function and regulation / Karin M., Liu Z., Zandi E. // Curr. Opin. Cell Biol. – 1997. – 9. – P. 240-246.

836. Karin M. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death / M. Karin, E. Shaulian // IUBMB Life. – 2001. – 52. – P. 17-24.

837. Toone W.M. AP-1 transcription factors in yeast / W.M. Toone, N. Jones // Curr. Opin. Genet. – 1999. – 9. – P. 55-61.

838. Collinson L.P. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress / L.P. Collinson, I.W. Dawes // J. Gen. Microbiol. – 1992. – 138. – P. 329-335.

839. Izawa S. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Izawa, Y. Inoue, A. Kimura // FEBS Lett. – 1995. – 368. – P. 73-76.

840. Grant C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions // Mol. Microbiol. – 2001. – 39. – P. 533–541.

841. Pedrajas J.R. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity / J.R. Pedrajas, A. Miranda-Vizueté, N. Javanmardy et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – 275. – No 21. – P. 16296-16301.

842. Stephen D.W. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / D.W. Stephen, D.J. Jamieson // FEMS Microbiol Lett. – 1996. – 141. – P. 207-212.

843. Rodriguez-Manzanque M.T. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae* / M.T. Rodriguez-Manzanque, J. Ros, E. Cabisco et al. / Molecular and Cellular Biology. – 1999. – 19. – No. 12. – P. 8180-8190.

844. Sanchez Y. HSP104 required for induced thermotolerance / Y. Sanchez, S.L. Lindquist // *Science*. – 1990. – 248. – P. 1112-1115.

845. Sanchez Y. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress / Y. Sanchez, J. Taulien, K.A. Borkovich, S. Lindquist // *EMBO J*. – 1992. – 11. – No. 6. – P. 2357-2364.

846. Davidson J.F. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* / J.F. Davidson, B. Whyte, P.H. Bissinger, R.H. Schiestl // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. – 93. – No 10. – P. 5116-5121.

847. Sugiyama K. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* / K. Sugiyama, S. Izawa, I. Yoshiharu // *J. Biol. Chem.* – 2000. – 275. – P. 15535-15540.

848. Davidson J.F. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* / J.F. Davidson, R.H. Schiestl // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – 21. – No 24. – P. 8483-8489. DOI: 10.1128/MCB.21.8483-8489.2001

849. Park S.G. Distinct physiological function of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* / S.G. Park, M.-K. Cha, W. Jeong, I.-H. Kim // *J. of Biol. Chem.* – 2000. – 275. – No 8. – P. 5723-5732.

850. Coleman S.T. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion / S.T. Coleman, E.A. Epping, S.M. Steggerda, W.S. Moye-Rowley // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – 19. – P. 8302-8313.

851. Wiatrowski H.A. Yap accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae* / H.A. Wiatrowski, M. Carlson // *Eukaryotic cell*. – 2003. – 2. – No. 1. – P. 19-26. DOI: 10.1128/EC.2.1.19-26.2003

852. Azevedo D. Two redox centres within Yap1 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiol-reactive chemicals signalling / D. Azevedo, F. Tacnet, A. Delaunay et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – 35(8) – P. 889–900.

853. Morgan B.A. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* / B.A. Morgan, G.R. Banks, W.M. Toone et al. // *EMBO J*. – 1997. – 16. – P. 1035-1044.

854. Brown J.L. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway / J.L. Brown, H. Bussey, R.C. Stewart // *EMBO J*. – 1994. – 13. – P. 5186-5194.

855. Nevitt T. YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae* / T. Nevitt, J. Pereira, C. Rodrigues-Pousada // *Yeast*. – 21. – Issue 16. – 2004. – P. 1365-1374. doi.org/10.1002/yea.1188

856. Nevitt T. Expression of YAP4 in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress / T. Nevitt, J. Pereira, D. Azevedo et al. // *Biochem J*. – 2004. – 379. – P. 367–374.

857. Hasan R. The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors / R. Hasan, C. Leroy, A. Isnard et al. // *Mol. Microbiol.* – 2002. – 45(1). – P. 233–241.

858. Amorós M. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner / M. Amorós, F. Estruch // *Mol. Microbiol.* – 2001. – 39(6). – P. 1523–1532.

859. Millar J.B. Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeasts // *Biochem. Soc. Sump.* – 1999. – 64. – P. 49-62.

860. Alic N. Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae* / N. Alic, V.J. Higgins, A. Pichova et al. // *J. Biol. Chem. Vol.* – 2003. – 278. – No 43. – P. 41849-41855.

861. Jamieson D.J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione // *J. Bacteriol.* – 1992. – 174. – Issue 20. – P. 6678-6681.

862. Little J.W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli* / J.W. Little, D.W. Mount // *Cell.* – 1982. – 29. – P. 11-22.

863. Davies J.M.S. Transient adaptation to oxidative stressing yeast / J.M.S. Davies, C.V. Lowry, K.J.A. Davies // *Arch. Biochem. Biophysics.* – 1995. – 317. – Issue 1. – P. 1-6.

864. Lee J. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione / J. Lee, W. Dawes, J.H. Roe // *Microbiology.* – 1995. – 141. – P. 3127-3132.

865. Sousa-Lopes A. Decreased cellular permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress / A. Sousa-Lopes, F. Antunes, L. Cyrne, H.S. Marinho // *FEBS Lett.* – 2004. – 578(1-2). – P. 152-156.

866. Lewis J.C. Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae* / J.C. Lewis, R.P. Learmonth, P.V. Attfield et al. // *J. of Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – 18. – No 1. – P. 30-36.

867. Lee J.S. Adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* resistant to oxidative stress and its global gene expression profiling / J.S. Lee, E.-S. Kim, H.-S. Lee, P. Kim // *Biotechnol Lett.* – 2013. – 35. – P. 709–717.

868. Medentsev A.G. Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress / A.G. Medentsev, A.Yu. Arinbasarova, V.K. Akimenko // *Microbiology.* – 2001. – 70. – No. 1. – 2001. – P. 26–30.

869. Pavlovskaya Zh. I. Resistance of *Penicillium piceum* F-648 to hydrogen peroxide under short-term and prolonged oxidative stress / Zh.I. Pavlovskaya, R.V. Mikhailova, I.V. Moroz, A.N. Eremin // *Appl. Biochem. Microbiology.* – 2003. – 39. – No. 1. – P. 24–29.

870. Sonnleitner B. Robust oxygen supply by controlled addition of hydrogen peroxide to microbial cultures / B. Sonnleitner, U. Hahnemann // *Bioproc. Eng.* – 1997. – 17. – P. 215-219.

871. Attfield P.V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast // *Nature Biotechnology.* – 1997. – 15. – Issue 13. – P. 1351-1357.

872. Corcoran B. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice / B. Corcoran, C. Stanton, G. Fitzgerald, R. Ross // *Microbiology.* – 2007. – 153(1). – P. 291-299.

873. Rowbury R.J. Extracellular sensing and signaling pheromones switch-on thermotolerance and other stress responses in *Escherichia coli* / R.J. Rowbury, M. Goodson // *Sci. Progr.* – 2001. – 84. – P. 205-233.

874. Gomelsky M. cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! // *Mol. Microbiol.* – 2011. – 79. – P. 562-565. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07514.x>

875. Romling U. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger / U. Romling, M.Y. Galperin, M. Gomelsky // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2013. – 77. – P. 1-52. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>

876. Jordan, P.A. FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve / P.A. Jordan, A.J. Thomson, E.T. Ralph et al. // *FEBS Lett.* – 1997. – 416. – P. 349-352.

877. Gostick D.O. A novel regulatory switch mediated by the FNR-like protein of *Lactobacillus casei* / D.O. Gostick, J. Green, A.S. Irvine et al. // *Microbiology.* – 1998. – 144. – P. 705-717.

878. Starostzik C. Functional mapping of the branched signal transduction pathway that controls sporulation in *Physarum polycephalum* / C. Starostzik, W. Marwan // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – 62. – No 5. – P. 930-933.

879. Chang C. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes / C. Chang, R.C. Stewart // *Plant Physiol.* – 1998. – 117. – P. 723-731.

880. Stock A.M. Two-component signal transduction / A.M. Stock, V.I. Robinson, P.N. Goudreau // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – 69. – P. 183-215. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>

881. Zuber P. *Spx*-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress // *J. Bacteriol.* – 2004. – 186(7). – P. 1911-1918. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.7.1911-1918.2004>

882. Buttani V. NTP-binding properties of the blue-light receptor YtvA and effects of the E105L mutation / V. Buttani, W. Gartner, A. Losi // *Eur. Biophys. J.* – 2007. – 36. – P. 831-839.

883. Yoshimura M. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors / Yoshimura M., Asai K., Sadaie Y., Yoshikawa H. // *Microbiology.* – 2004. – 150(Pt 3). – 591-599.

884. Eiamphungporn W. The *Bacillus subtilis* sigma(M) regulon and its contribution to cell envelope stress responses / W. Eiamphungporn, J.D. Helmann // *Mol. Microbiol.* – 2008. – 67(4). – 830-848.

885. Cheville A.M. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7 / A.M. Cheville, K.W. Arnold, C. Buchrieser et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – 62. – P. 1822-1824.

886. Schellhorn H.E. Regulation of *katF* and *katE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids / H.E. Schellhorn, V.L. Stones // *J. Bacteriol.* – 1992. – 174. – P. 4769-4776.

887. Hartke A. Differential induction of the chaperonin GroEL and the Co-chaperonin GroES by heat, acid, and UV-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / A. Hartke, J. Frere, P. Boutibonnes, Y. Auffray // *Curr. Microbiol.* – 1997. – 34. – P. 23-26.

888. Cappa F. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 / F. Cappa, D. Cattivelli, P.S. Cocconcelli // *Res. Microbiol.* – 2005. – 156. – 1039-1047. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.o6.003>

889. Thevelin J.M. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J.M. Thevelin, J.H. de Winde // *Mol. Microbiol.* – 1999. – 33. – P. 904-918.

890. Moskvina E. Stress factors acting at the level of the plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / E. Moskvina, E.M. Imre, H. Ruis // *Mol. Microbiol.* – 1999. – 32. – P. 1263-1272.

891. Morgan R.W. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins / R.W. Morgan, M.F. Christman, F.S. Jacobson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1986. – 83. – P. 8059-8063.

892. Trollmo C. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* / C. Trollmo, L. André, A. Blomberg, L. Adler // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1988. – 56. – P. 321-326.

893. Hengge-Aronis R. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli* / R. Hengge-Aronis, W. Klein, R. Lange et al. // *J. Bacteriol.* – 1991. – 173. – P. 7918-7924.

894. Meury J. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli* / J. Meury, M. Kohiyama // J. Bacteriol. – 1991. – 173. – P. 4404-4410.

895. Volker V. Stress proteins and cross-protection by heat shock and stress in *Bacillus subtilis* / V. Volker, H. Mach, R. Schmid, M. Hecker // J. Gen. Microbiol. – 1992. – 138. – P. 2125-2135.

896. Leyer G.J. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium* / G.J. Leyer, E.A. Johnson // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – 59. – P. 1842-1847.

897. Gounalaki N. Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response / N. Gounalaki, G. Thireos // EMBO J. – 1994. – 13. – P. 4036-4041.

898. Humphrey T.J. *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces / T.J. Humphrey, E. Slater, K. McAlpine et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – 61. – No. 8. – P. 3161-3164.

899. Van Dyk T.K. Synergistic induction of the heat shock response in *Escherichia coli* by simultaneous treatment with chemical inducers / T.K. Van Dyk, T.R. Reed, A.C. Vollmer, R.A. LaRossa // J. Bacteriol. – 1995. – 177. – P. 6001-6004.

900. Lou Y. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors / Y. Lou, A.E. Yousef // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63. – No. 4 – P. 1252-1255.

901. Kawai M. Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature / M. Kawai, A. Nakashima, M. Ueno et al. // Curr. Genet. – 2001. – 39. – P. 166-174.

902. Cabisco E. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae* / E. Cabisco, E. Piulats, P. Echave et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – 275. – No 35. – P. 27393-27398. DOI 10.1074/jbc.M003140200.

903. Desikan R. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress / R. Desikan, A.-H. S. Mackerness, J.T. Hancock, S.J. Neill // Plant Physiol. – 2001. – 127. – P. 159-172.

904. Lee J.H. SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in *Escherichia coli* / J.H. Lee, K.L. Lee, W.S. Yeo et al. // J. Bacteriol. – 2009. – 191. – P. 4441-4450.

905. Palud A. New genes involved in mild stress response identified by transposon mutagenesis in *Lactobacillus paracasei* / A. Palud, H. Scornec, J.-F. Cavin, H. Licandro // Frontiers in Microbiol. – 2018. – 9. Doi: 10.3389/fmcb2018.00535

906. Schroda M. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition / M. Schroda, O. Vallon, F.-A. Wollman, C.F. Beck // *The Plant Cell*. – 1999. – 11. – P. 1165-1178.

907. Aertsen A. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli* / A. Aertsen, P.D. Spiegeleer, K. Vanoirbeek et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71. – P. 2226-2231.

908. Scheyhing C.H. Barotolerance is inducible by preincubation under hydrostatic pressure, cold-, osmotic- and acid-stress conditions in *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T / C.H. Scheyhing, S. Hörmann, M.A. Ehrmann, R.F. Vogel // *Letters in Appl. Microbiol.* – 2004. – 39(3). – P. 284-289. Doi:10.1111/j.1472-765X.2004.015768.x

909. Mutoh N. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide / N. Mutoh, C.W. Nakagawa, Y. Hayashi // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – 132. – No. 1-2. – P. 67-72.

910. Ohnishi K. Heat shock transcription factor, HSF, is activated by ultraviolet irradiation / K. Ohnishi, A. Matsumoto, X. Wang, T. Ohnishi // *Photochem. Photobiol.* – 1996. – 64. – No. 6. – P. 949-952.

911. Madamanchi N.R. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway / N.R. Madamanchi, S. Li, C. Patterson, M.S. Runge // *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* – 2001. – 21. – P. 321-326. DOI: 10.1161/01.ATV.21.3.321

912. Begonia G.B. Elevation of superoxide dismutase in *Halobacterium halobium* by heat shock / G.B. Begonia, M.L. Salin // *J. Bact.* – 1991. – 173. – P. 5582-5584.

913. Noventa-Jordão M.A. Catalase activity is necessary to heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings / M.A. Noventa-Jordão, R.M. Couto, G.H. Goldman et al. // *Microbiology*. – 1999. – 145. – 11. – P. 3229-3234.

914. Volkov R.A. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* / R.A. Volkov, I.I. Panchuk, P.M. Mullineaux, F. Schöffl // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – 61. – P. 733-746. DOI 10.1007/s11103-006-0045-4.

915. Duwat P. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress / P. Duwat, S.D. Ehrlich, A. Gruss // *Mol. Microbiol.* – 1995. – 17. – P. 1121-1131.

916. Piper P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – 134. – P. 121-127.

917. Steels, E.L. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically / E.L. Steels, R.P. Learmonth, K. Watson // *Microbiology*. – 1994. – 140. – Issue 3. – P. 569-576.

918. Kilstrup M.S. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis* / M.S. Kilstrup, S. Jacoben, K. Hammer, F.K. Vogensen // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63. – P. 1826-1837.

919. Tomas C.A. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program / C.A. Tomas, N.E. Welker, E.T. Papoutsakis // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69. – P. 4951-4965.

920. Diamant S. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses / S. Diamant, N. Eliahu, D. Rosenthal, P. Goloubinoff // J. Biol. Chem. – 2001. – 276. – P. 39586-39591.

921. Kioka N. Heat-shock responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1) / N. Kioka, Y. Yamano, T. Komano, K. Ueda // FEBS Lett. – 1992. – 301. – P.37-40.

922. Miyazaki M. Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress / M. Miyazaki, K. Kohno, T. Uchiumi et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1992. – 187. – P. 677-684.

923. Lu F. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress / F. Lu, Y. Wang, D. Bai, L. Du // Process Biochem. – 2005. – 40. – Issue 11. – P. 3614-3618.

924. Van Dijck P. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells / P. Van Dijck, D. Colavizza, P. Smet, J.M. Thevelein // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – 61. – P. 109-115.

925. Herdeiro R.S. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress / R.S. Herdeiro, M.D. Pereira, A.D. Panek, E.C.A. Eleutherio // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – 1760(3). – P. 340-346.

926. Carvalho A.L. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance / A.L. Carvalho, F.S. Cardoso, A. Bohn et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77. – P. 4189-4199.

927. Cansado J. / Characterization of mutants devoid of neutral trehalose activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: partial protection from heat shock and high-salt stress / J. Cansado, T. Soto, J. Fernandes et al. // J. Bacteriol. – 1998. – 180. – P. 1342-1345.

928. Helmann J.D. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors / J.D. Helmann, M.F. Winston, A. Gaballa et al. // J. Bacteriol. – 2003. – 185. – No 1. – P. 243-253.

929. Storz G. Regulation of hydrogen peroxide-inducible genes in bacteria // Abstracts of the 21<sup>st</sup> annual meeting of the American Society for Photobiology / G. Storz, P.T. Baird, M.B. Toledano et. al. // Photochem. Photobiol. – 1993. – P. 47.

930. Hu M.-L. / Hu M.-L., Tappel A.L. Potentiation of oxidative damage to proteins by ultraviolet-A and protection by antioxidants // Photochem. Photobiol. – 1992. – 56. – No 3. – P. 357-363.

931. Fraikin G. Different mechanisms of yeast cell photoinactivation for UV-A and visible radiation. - Abstracts of the 20<sup>th</sup> annual meeting of the American Society for Photobiology // Photochem. Photobiol. – 1992. – 55. – P. 49s.

932. Рощупкин Д.И. Фотобиологические процессы в биомембранах при действии ультрафиолетового излучения на клетки, ткани и органы животных / Д.И. Рощупкин, М.А. Мурина // Биофизика. – 1993. – 38. – № 6. – С. 1053-1068.

933. Willekens H. Ozone, sulphur dioxide and UV B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotina plumbaginifolia* L. / H. Willekens, W.V. Camp, M.V. Montagu et al. // Plant Physiology. – 1994. – 106. – P. 1007-1014.

934. Linetsky M. Quantitation of the reactive oxygen species generated by the UVA irradiation of ascorbic acid-glycated lens proteins / M. Linetsky, B.J. Ortwerth // Photochem. Photobiol. – 1996. – 63. – No 5. – P. 649-655.

935. Knebel A. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants, or alkylating agents / A. Knebel, H.J. Rahmsdorf, A. Ullrich, P. Herrich // EMBO J. – 1996. – 15. – P. 5314-5325.

936. Holmes J.D. Bacterial photoprotection through extracellular cadmium sulfide crystallites / J.D. Holmes, P.R. Smith, R. Evans-Gowing et al. // Photochem. Photobiol. – 1995. – 62. – No 6. – P. 1022-1026.

937. Brennan R.J. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast / R.J. Brennan, R.H. Schiestl // Mutat. Res. – 1996. – 356. – P. 171-178.

938. Huang R.P. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates / R.P. Huang, J.X. Wu, Y. Fan, E.D. Adamson // J. Cell Biol. – 1996. – 133. – P. 211-220.

939. Rosette C. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors / C. Rosette, M. Karin // Science. – 1996. – 274. – P. 1194-1197.

940. Abe J. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease / J. Abe, B.C. Berk // Trends Cardiovasc. Med. – 1998. – 8. – P. 59-64.

941. Singh R.K. Effect of environmental stress on radiation response of *Saccharomyces cerevisiae* / R.K. Singh, N.C. Verma // Indian J. Biochem. Biophys. – 1999. – 36(5). – P. 296-298.

942. Hartke A. UV-inducible proteins and UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / A. Hartke, S. Bouche, J.-M. Laplace et al. // Arch. Microbiol. – 1995. – 163. – No 2. – P. 329-336.

943. Воробьева Л.И. / Л.И. Воробьева, Т.А. Чердынцева, С.К. Абилев // Микробиология. – 1995. – 4. – No 1. – С. 187-192.

944. Harrison C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK // Cell Stress Chaperon. – 2003. – 8. – P. 218-224.

945. Rikhvanov E.G. Heat shock-induced changes in the respiration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / E.G. Rikhvanov, N.N. Varakina, T.M. Rusaleva et al. // Microbiology. – 70. – No. 4. – 2001. – P. 462-465.

946. Arzumanyan V.G. Antagonistic interaction between stress factors during the growth of microorganisms under conditions simulating the parameters of their natural ecotopes / V.G. Arzumanyan, N.A. Voronina, O.V. Geidebrekht et al. // Microbiology. – 2002. – 71. – No 2. – P. 133-138.

947. Bayliak M.M. Possible accumulation of non-active molecules of catalase and superoxide dismutase in *S. cerevisiae* cells under hydrogen peroxide induced stress / M.M. Bayliak, H.M. Semchyshyn, V.I. Lushchak // Central European Journal of Biology (CEJB). – 2007. – 2(3). – P. 326-336. DOI: 10.2478/s11535-007-0021-2.

948. Werner-Washburne B.E. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / B.E. Werner-Washburne, G.C. Johnston, R.A. Singer // Microbiol. Rev. – 1993. – 57. – P. 383-401.

949. Heidebrecht O.V. Influence of the degree of aeration on halotolerance of yeasts of the genera *Candida*, *Rhodotorula*, and *Malasseria* / O.V. Heidebrecht, V.G. Arzumanyan, V.K. Plakunov, S.S. Belyaev // Microbiology. – 2003. – 72. – No 3. – P. 270-276.

950. Shelemekh O.V. “Oxygen regulation” of the respiratory chain composition in the yeast *Debaryomyces hansenii* under multiple stress / O.V. Shelemekh, O.V. Heidebrecht, V.K. Plakunov, S.S. Belyaev / Microbiology. – 2006. – 75. – No. 4. – P. 486-493. DOI: 10.1134/S0026261706040205

951. Sugimoto S. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli dnaK* / S. Sugimoto, A. Al-Mahin, C. Higashi et al. // Appl. Environ. Microb. – 2010. – 76(13). – P. 4277-4285.

952. Svensater G. Multiple stress responses in *Streptococcus* mutants and the induction of general and stress-specific proteins / G. Svensater, B. Sjogreen, I.R. Hamilton // Microbiology. – 2000. – 146(Pt 1)., – No 1. – P. 107-117. Doi:10.1099/0221287-146-1-107

953. Hamon E. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance / E. Hamon, P. Horvatovich, E. Izquierdo et al. // BMC Microbiology. – 2011. – 11. – P. 63.

954. De Angelis M. Stress responses of lactobacilli / M. De Angelis, M. Gobbetti // In: Tsakalidou E., Papadimitriou K. (ed). Stress responses of lactic acid bacteria. Springer, New York. – NY. – 2011. – P. 219-249.

955. Kim J.E. Enhancing acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* with glutathione / J.E. Kim, H.-J. Eom, Y. Kim et al. // Biotechnol. Lett. – 2012. – 34(4). – P. 683-687.

956. Moslehi-Jenabian S. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus spp.* / S. Moslehi-Jenabian, K. Gori, L. Jespersen // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – 135. – P. 295-302. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.011.

957. Lee B. *Lactobacillus casei* low-temperature, dairy-associated proteome promotes persistence in the mammalian digestive tract / B. Lee, S. Tachon, R.A. Eigenheer et al. // J. Proteome Research. – 2015. – 4. – No 8. – P. 3136-3147.

958. Bitoun J.P. Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by *Streptococcus mutans* / J.P. Bitoun, A.H. Nguyen, Y. Fan et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2011. – 320. – P. 110-117.

959. Zhang J. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress / J. Zhang, R.Y. Fu, J. Hugenholtz et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – 73. – P. 5268-5275.

960. Zhang J. Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze thawing, freeze drying, and cold treatment / J. Zhang, G.C. Du, Y. Zhang et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – 76. – P. 2989-2996.

961. Zhang J. Glutathione improves the cold resistance of *Lactobacillus sanfranciscensis* by physiological regulation / J. Zhang, Y. Li, W. Chen et al. // Food Microbiol. – 2012. – 31(2). – P. 285-292.

962. Koskenniemi K. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG / K. Koskenniemi, K. Laakso, J. Koronen et al. // Proteomics. – 2011. – 1. – P. 18. doi:10.1074/mcp.M110.002741

963. Shi F. Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases / F. Shi, Y. Li, Y. Li, X. Wang // Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). – 2009. – 41. – P. 352-361.

964. Aakko J. Assessment of stress tolerance acquisition in the heat-tolerant derivative strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG / J. Aakko, B. Sánchez, M. Gueimonde, S. Salminen // J. Appl. Microbiol. – 2014. doi: 10.1111/jam.12520.

965. Frisk A. GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells / A. Frisk, C.A. Ison, T. Lagergard // Infect. Immun. – 1998. – 66. – P. 1252-1257.

966. Hennequin C. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence / C. Hennequin, F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet et al. // Microbiology. – 2001. – 147. P. – 87-96.

967. Abdullah-Al-Mahin S.S. Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* dnaK / S.S. Abdullah-Al-Mahin, C. Higashi, S. Matsumoto, K. Sonomoto // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – 76. – P. 4277-4285.

968. Giard J.C. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2 / J.C. Giard, A. Hartke, S. Flahaut et al. // Curr. Microbiol. – 1996. – 32. – P. 264-271. Doi: 10.1007/s002849900048

969. De Angelis M. Heat shock reponse in *Lactobacillus plantarum* / M. De Angelis, R. di Cagno, C. Huet et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70. – P. 1336-1346.

970. Shurr B.C. Detection of acid and heat shock induced responses in beer spoiling *Lactobacillus brevis* by MALDI-TOF MS / B.C. Shurr, J. Behr, R.F. Vogel // Food Microbiology. – 2014. – Doi:10.1016/j.fm.2014.09.018.

971. Serrazanetti D.I. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli / D.I. Serrazanetti, M.E. Guerzoni, A. Corsetti, R. Vogel // Food. Microbiol. – 2009. – 26. – P. 700-11.

972. Li C. Proteomic analysis of the response to NaCl stress of *Lactobacillus bulgaricus* / C. Li, Li P.-Z., J.-W. Sun et al. // Biotechnol. Lett. – 2014. – 36. – P. 2263-2269. DOI 10.1007/s10529-014-1601-7

973. Li C. NaCl stress on the key enzymes in glycolysis from *Lactobacillus bulgaricus* during freeze-drying / C. Li, J. Sun, X. Qi, L. Liu // Brazilian Journal of Microbiology – 2015. – 46. – 4. – P. 1193-1199. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140595>

974. McDougald D. Defences against oxidative stress during starvation in bacteria / D. McDougald, L. Gong, S. Srinivasan et al. // Antonie van Leeuwenhoek. – 2002. – 81. – P. 3–13.

975. Al-Naseri A. Impact of lactose starvation on the physiology of *Lactobacillus casei* GCRL163 in the presence or absence of tween 80 / A. Al-Naseri, J.P. Bowman, R. Wilson et al. // J. of Proteome Research. – 2013. – 12. – P. 5313-5322.

976. Cohen D.P.A. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database / D.P.A. Cohen, J. Renes, F.G. Bouwman et al. // Proteomics. – 2006. – 6. – P. 6485-6493. DOI 10.1002/pmic.200600361

977. Parente E. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study / E. Parente, F. Ciocia, A. Ricciardi et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – 144. – P. 270-279.

978. Zotta T. Diversity of responses in dairy thermophilic streptococci / T. Zotta, A. Ricciardi, F. Ciocia et al. // Int. J. Microbiol. – 2008. – 124. – P. 34-42.

979. Watanabe M. Impact of respiration on resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFSi to acid stress / M. Watanabe, S. van der Veen, T. Abee // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – 78. – P. 4062-4064. Doi: 10.1128/AEM.00287-12.

980. Li C. Effect of the absence of the *CcpA* gene on growth, metabolic production, and stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* / C. Li, J.W. Sun, G.F. Zhang, L.B. Liu // J. Dairy Sci. – 2016. – 99. – P. 104-111.

981. Rezaiki L. Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis* / L. Rezaiki, B. Cesselin, Y. Yamamoto et al. // Mol. Microbiol. – 2004. – 53. – P. 1331-1342.

982. Barynin V.V. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum* / V.V. Barynin, M.M. Whittaker, S.V. Antonyuk et al. 2001 // Structure. – 9. – P. 725-738.

983. Marty-Teyssset C. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress / C. Marty-Teyssset, F. de la Torre, J.-R. Carel // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – 66. – No 1. – P. 262-267.

984. Brooijmans R.J.W. *Lactobacillus plantarum* electron transport chain / R.J.W. Brooijmans, W.M. de Vos, J. Hugenholtz // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – 75. – P.3580-3585.

985. Ianniello R.G. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of *Lactobacillus casei* strains / R.G. Ianniello, A. Parente, E. Tramutola et al. // LWT-Food Sci Technol. – 2015. – 60. – P. 817-824.

986. Ianniello R.G. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 / R.G. Ianniello, T. Zotta, A. Matera et al. // Plos ONE. – 2016. – 11. – No 11. – e0164064.

987. Ianniello R.G. Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri* / R.G. Ianniello, J. Zheng, T. Zotta et al. // J. Appl. Microbiol. – 2015. – 119. – No 3. – P. 763-775.

988. Alcántara C. Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23 / C. Alcántara, M. Zúñiga // Microbiology. – 2012. – 158. – P. 1206-1218. DOI 10.1099/mic.0.055657-0

989. Wouters J.A. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302 / J.A. Wouters, F.M. Rombouts, W.M. De Vos et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65. – P. 4436-4442.

990. Pichereau V. Starvation and osmotic stress induced multiresistances: influence of extracellular compounds / V. Pichereau, A. Hartke, Y. Auffray // Int J. Food Microbiol. – 2000. – 55. – P. 19-25.

991. Van Verseveld H.W. Modeling of microbial substrate conversion, growth and product formation in a recycling fermenter / H.W. van Verseveld, J.A. de Hollander, J. Frankena et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1986. – 52. – P. 325-342. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00428644>.

992. Ercan O. Molecular and metabolic adaptation of *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates / O. Ercan, M. Wels, E.J. Smid, M. Kleerebezem // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – 81. – P. 320-331. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02484-14>.

993. Dijkstra A.R. Diversity in robustness of *Lactococcus lactis* strains during heat stress, oxidative stress, and spray drying stress / A.R. Dijkstra, M.C. Setyawati, J.R. Bayjanov et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – 80. – P. 603-611. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03434-13>.

994. Li Y. Glutathione protects *Lactobacillus lactis* against oxidative stress / Y. Li, J. Hugenholtz, T. Abee, D. Molenaar // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69(10). – P. 5739-5745.

995. Casado Muñoz M.C. Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance / M.C. Casado Muñoz, N. Benomar, S. Ennahar et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2016. – 222. – P. 8-15.

996. McCord J.M. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance // Clin. Biochem. – 1993. – 26. – P. 351-357.

997. Khan A.U. Reactive oxygen species as cellular messengers / A.U. Khan, T. Wilson // Chem. Biol. – 1995. – 2. – P. 437-445.

998. Suzuki Y.J. Oxidants as stimulators of signal transduction / Y.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – 22. – P. 269-285.

999. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. // FASEB J. – 1997. – 11. – P. 118-124.

1000. Quillet-Mary A. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis / A. Quillet-Mary, J.P. Jaffrezou, V. Mansat et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – 272. – No 34. – P. 21388-21395.

1001. Adler V. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling / V. Adler, Z. Yin, K.D. Tew, Z. Ronai // *Oncogene* – 1999. – 18. – P. 6104-6111.

1002. Rhee S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger // *Exp. Mol. Med.* – 1999. – 31. – P. 53-59.

1003. Rhee S.G. Cellular regulation by hydrogen peroxide / S.G. Rhee, T.S. Chang, Y.S. Bae et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – 14. – S211-S215.

1004. Hensley K. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury / K. Hensley, K.A. Robinson, S. Prasad Gabbita et al. // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – 28(10). – P. 1456-1462.

1005. Forman H.J. Reactive oxygen species and cell signalling. Respiratory burst in macrophage signaling / H.J. Forman, M. Torres // *Am. J. Respir. Care Med.* – 2002. – 166. – P. S4-S8. DOI: 10.1164/rccm.2206007

1006. Forman H.J. Redox signaling / H.J. Forman, M. Torres, J. Fukuto // *Mol. Cell. Biochem.* – 2002. – 234-235. – P. 49-62.

1007. Sauer H. Reactive oxygen species as intracellular messenger during cell growth and differentiation / H. Sauer, M. Wartenberg, J. Hescheler // *Cell Physiol. Biochem.* – 2001. – 11. – P. 173-186.

1008. Ullrich V. Superoxide as a messenger of endothelial function / V. Ullrich, M. Bachschmid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – 278. – P. 1-8.

1009. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling / *J. Clin. Invest.* – 2003. – 111. – No 6. – P. 769-778. DOI: 10.1172/JCI200318174.

1010. Marinho H.S. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors / H.S. Marinho, C. Real, L. Cyrne et al. // *Redox Biology.* – 2014. – 2. – P. 535-562.

1011. Kroll S.L. Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and heme-containing O<sub>2</sub> sensors in hypoxic regulation of tyrosine hydroxylase gene expression / S.L. Kroll, M.F. Czyzyk-Krzeska // *Am. J. Physiol.* – 1998. – 274 (Cell Physiol. 43). – P. 167-174.

1012. Williams M.S. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species and cell signaling / M.S. Williams, J. Kwon // *Free Rad. Biol. Med.* – 2004. – 37(8)., – P. 1144-1151.

1013. Rhee S.G. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation / S.G. Rhee, Y.S. Bae, S.R. Lee, J. Kwon // *Sci. STKE.* – 2000. – P. E1.

1014. Nindl G. Hydrogen Peroxide - From Oxidative Stressor to Redox Regulator / *Cellscience Reviews.* – 2004. – 1. – No.2. – P. 1-12.

1015. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. – М.: Мир, 1978 – 464 с.

1016. Willekens H. Catalase is a sink for  $H_2O_2$  and is indispensable for stress defence in  $C_3$  plants / H. Willekens, S. Chamnongpol, M. Davey et al. // The EMBO Journal. – 1997. – 16. – No 16. – P. 4806-4816.

1017. Zhang W. The oleate-stimulated phospholipase D, PLD $\delta$ , and phosphatidic acid decrease  $H_2O_2$ -induced cell death in *Arabidopsis* / W. Zhang, C. Wang, C. Qin et al. // The Plant Cell. – 2003. – 15. – P. 2285-2295.

1018. Roth S. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide / S. Roth, W. Dröge // Cell Immunol. – 1987. – 108. P. 417-424.

1019. Burdon R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – 18. – P. 775.

1020. Potikha T.S. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers / T.S. Potikha, C.C. Collins, D.J. Johnson et al. // Plant Physiology. – 1999. – 119. – P. 849-858.

1021. Skulachev V.P.  $H_2O_2$  sensors of lungs and blood vessels and their role in the antioxidant defense of the body // Biochemistry (Moscow). – 2001. – 66. – No 10. – P. 1153-1156.

1022. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation // Nature Immunol. – 2002. – 3(12). – P. 1129-1134.

1023. Mahadev K. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of  $H_2O_2$  and plays an integral role in insulin signal transduction / K. Mahadev, H. Motoshima, X. Wu et al. // Molecular and Cellular Biology. – 2004. – P. 1844-1854. DOI: 10.1128/MCB.24.5.1844-1854.2004.

1024. Arnold R.S. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by mitogenic oxidase Nox1 / R.S. Arnold, J. Shi, E. Murad et al. // PNAS. – 2001. – 98. – No 10. – P. 5550-5555.

1025. Агол В.И. Молекулярная биология (Структура и биосинтез нуклеиновых кислот) / В.И. Агол, А.А. Богданов, В.А. Гвоздев и др. // Под ред. акад. А.С. Спирина. – М: Высшая школа, 1990. – 350 с.

1026. Рубин А. Б. Биофизика. Т. 1. – М., 2002. – 445 с.

1027. Соيفер В.Н. Репарация генетических повреждений // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 8. – С. 4-13.

1028. Peterson A. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis* / A. Peterson, M. Brigulla, S. Haas et al. // J. Bacteriol. – 2001. – 183. –P. 5617-5631. Doi:10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001

1029. Sancar A. Nucleotide excision repair / A. Sancar, M.-S. Tang // Photochem. Photobiol. – 1993. – 57. – No 5. – P. 905-921.

1030. Ogrunc M. Nucleotide excision repair in the third kingdom / M. Ogrunc, D.F. Becker, S.W. Ragsdale, A. Sancar // *J. Bacteriol.* – 1998. – 180. – P. 5796-5798.

1031. Kim J.J. Construction and analysis of photolyase mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: Contribution of photoreactivation, nucleotide excision repair, and mutagenic DNA repair to cell survival and mutability following exposure to UV-B Radiation / J.J. Kim, G.W. Sundin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – 67. – No 4. – P. 1405-1411. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1405-1411.2001

1032. Higgins B.P. Chromosomal context directs high-frequency precise excision of IS492 in *Pseudoalteromonas atlantica* / B.P. Higgins, C.D. Carpenter, A.C. Karls // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – 104. – No 6. – P. 1901-1906.

1033. Sancar A. DNA excision repair // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – 65. – P. 43–81.

1034. / Miller R.V. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance / R.V. Miller, T.A. Kokjohn // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1990. – 44. – P. 365-394.

1035. Walker G.C. The SOS response of *Escherichia coli* // In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F.C., ed.). ASM, Washington, DC, USA. – 1996. – P. 1400-1416.

1036. Schlacher K. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis / K. Schlacher, M.F. Goodman // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2007. – 8. – P. 587-594. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2198>.

1037. Friedberg E.C. DNA repair and mutagenesis, 2<sup>nd</sup> ed. / E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Seide et al. // American Society for Microbiology, Washington, DC. – 2006.

1038. Kidambi S.P. RecA-dependence of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to UVA and UVB irradiation / S.P. Kidambi, M.G. Booth, T.A. Kokjohn, R.V. Miller // *Microbiology.* – 1996. – 142. – P. 1033-1040.

1039. Rahman Md. S. On the induction of protective responses in *Salmonella typhimurium* strain TA1535/pSK1002 by UVA (365 nm) / Md. S. Rahman, B. Bose, S.N. Chatterjee // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – 61. – No 5. – P. 471-478.

1040. Srittmatter C. F. Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei* // *J. Biol. Chem.* – 1959. – 234. – № 10. – P. 2794-2800.

1041. Rubin L.B. Two-photon inactivation, photoreactivation and photoprotection in yeast cells irradiated by 266 nm-laser radiation / L.B. Rubin, T.G. Burchuladze, G.Y. Fraikin // *Photochem. Photobiol.* – 1982. – 35. – No. 6. – P. 789-791.

1042. Yasuhira S. Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus* / S. Yasuhira, A. Yasui // *J. Biol. Chem.* – 1992. – 267. – P. 25644-25647.

1043. Li Y.F. Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans / Y.F. Li, S.T. Kim, A. Sancar // 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4389-4393.

1044. Li H.M. Regulation of gene expression by light / H.M. Li, T. Washburn, J. Chory // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1993. – 5(3). – P. 455-460.

1045. Yasui A. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals / A. Yasui, A.P. Eker, S. Yasuhira et al. // *EMBO J.* – 1994. – 13. – P. 6143–6151.

1046. Sancar A. Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase / A. Sancar, F.W. Smith, G. B. Sancar // *J. Biol. Chem.* – 1984. – 259. – P. 6028-6032.

1047. Sancar G.B. DNA photolyases – Physical properties, action mechanism, and role in dark repair // *Mutat. Res.* – 1990. – 236. – P. 147-160.

1048. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase. – *Biochemistry.* – 1994. – 33. – P. 2-9.

1049. Sancar G.B. Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting // *Mutat. Res.* – 2000. – 451. – 25–37.

1050. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors // *Chem. Rev.* – 2003. – 103. – P. 2203-2237.

1051. Simonson C.S. Inducible UV repair potential of *Pseudomonas aeruginosa* PAO / C.S. Simonson, T.A. Kokjohn, R.V. Miller // *J. Gen. Microbiol.* – 1990. – 136. – P. 1241-1249.

1052. Uchida N. Multiple effects of fluorescent light on repair of ultraviolet-induced DNA lesions in cultured goldfish cells / N. Uchida, H. Mitani, A. Shima // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – 61. – No 1. – P. 79-83.

1053. Kanai S. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family / S. Kanai, R. Kikuno, H. Toh et al. // *J. Mol. Evol.* – 1997. – 45. – P. 535–548.

1054. Weber S. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyases // *Biochem. Biophys. Acta* – 2004. – 1707. – P. 1-23.

1055. Nicholson W. Photoreactivation in the genus *Bacillus* // *Curr. Microbiol.* – 1995. – 31. – P. 361-364.

1056. Wood R.D. 1996. DNA repair in eukaryotes // *Ann. Rev. Biochem.* – 65. – P. 135-167.

1057. Kim S.-T. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase / S.-T. Kim, A. Sancar // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – 57. – No 5. – P. 895-904.

1058. Kim S.T. Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* DNA photolyase / S.T. Kim, K. Malhotra, H. Ryo et al. // *Mutat. Res.* – 1996. – 363. – P. 97-104.

1059. Weinbauer M.G. Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities / M.G. Weinbauer, S.W. Wilhelm, C.A. Suttle, D.R. Garza // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – 63. – No.6. – P. 2200-2205.

1060. Petersen J.L. Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas* / J.L. Petersen, D.W. Lang, G.D. Small // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – 40. – P. 1063–1071.

1061. Kleiner O. Class II DNA photolyase from *Arabidopsis thaliana* contains FAD as a cofactor / O. Kleiner, J. Butenandt, T. Carell, A. Batschauer // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – 264. – P. 161–167.

1062. Essen I.O. Light-driven DNA repair by photolyases / I.O. Essen, T. Klar // *Cell. Mol. Life Sci.* – 63. – 2006. – P. 1266-1277. DOI 10.1007/s00018-005-5447-y.

1063. Berrocal-Tito G. Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene / G. Berrocal-Tito, L. Sametz-Baron, K. Eichenderg et al. // *J. Biol Chem.* – 1999. – 274. – No 20. – Issue of May 14. – P. 14288-14294.

1064. Jorns M.S. DNA photorepair: Chromophore composition and function in two classes of DNA photolyases // *Biofactors* – 1990. – 2. – P. 207-211.

1065. Hitomi K. Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis sp.* PCC6803 / K. Hitomi, K. Okamoto, H. Daiyasu et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – 28. – P. 2353-2362.

1066. Schild D. Cloning and mapping of *Saccharomyces cerevisiae* photoreactivation gene *PHR1* / D. Schild, J. Johnston, C. Chang, R.K. Mortimer // *Mol. Cell. Biol.* – 1984. – 4. – P. 1864–1870.

1067. Eker A.P.M. DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, characterization and comparison with other photolyases / A.P.M. Eker, H. Yajima, A. Yasui // *Photochem. Photobiol.* – 1994. – 60. – No 2. – P. 125-133.

1068. Eker A.P.M. Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus* – IV. On the nature of the chromophoric cofactor in *Streptomyces griseus* photoreactivating enzyme / A.P.M. Eker, R.H. Dekker, W. Berends // *Photochem. Photobiol.* – 1981. – 33. – No. 1. – P. 65-72.

1069. Eker A.P.M. Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus* – VI. Action spectrum and kinetics of photoreactivation / A.P.M. Eker, J.K.C. Hessels, R.H. Dekker // *Photochem. Photobiol.* – 1986. – 44. – No. 2. – P. 197-205.

1070. Eker A.P.M. Photoreactivation in the extreme halophilic archaeobacterium *Halo-bacterium cutirubrum* / A.P.M. Eker, L. Formenoy, L.E.A. De Wit // *J. Photochem. Photobiol.* – 1990. – 53. – P. 643-651.

1071. Takao M. Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium* / M. Takao, T. Kobayashi, A. Oikawa, A. Yasui // J. Bact. – 1989. – 171. – P. 6323-6329.

1072. McCready S. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum* / S. McCready, L. Marcello // Biochem. Soc. Trans. – 2003. – 31. – P. 694-698.

1073. Takao M. Expression of *Anacystis nidulans* photolyase gene in *Escherichia coli*; functional complementation and modified action spectrum of photoreactivation / M. Takao, A. Oikawa, A.P.M. Eker, A. Yasui // Photochem. Photobiol. – 1989. – 50. – No. 5. – P. 633-637.

1074. Jonson R.G. Evidence from photoreactivation kinetics for multiple DNA photolyases in yeast / R.G. Jonson, R.H. Haynes // Photochem. Photobiol. – 1986. – 43. – No. 4. – P. 423-428.

1075. Roth R.M. Sensitivities to monochromatic 254-nm and 365-nm radiation of closely related strains of *Saccharomyces cerevisiae* with differing repair capabilities / R.M. Roth, J.C. Game, M.J. Peak // Photochem. Photobiology. – 1987. – 45. – No. 4. – P. 479-483.

1076. Sancar G. Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* / G. Sancar, F.W. Smith // Mol. Cell. Biol. – 1989. – 9. – P. 4767-4776.

1077. Livingstone-Zatchej M. RNA polymerase II transcription inhibits DNA repair by photolyase in the transcribed strand of active yeast genes / M. Livingstone-Zatchej, A. Meier, B. Suter, F. Thoma // Nucleic Acids Research. – 1997. – 25. – P. 3795–3800.

1078. Thoma F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair // The EMBO J. – 1999– 18. – P. 6585-6598.

1079. Suter B. DNA repair in a yeast origin of replication: contributions of photolyase and nucleotide excision repair / B. Suter, R.-E. Wellinger, F. Thoma // Nucleic Acids Res. – 2000. – 28. – P. 2060-2068.

1080. Meier A. Repair of active and silenced rDNA in yeast. The contribution of photolyase and transcription-coupled nucleotide excision repair / A. Meier, M. Livingstone-Zatchej, F. Thoma // J. of Biol. Chem. – 2002. – 277. – No 14. – Issue April 5. – P. 11845-11852.

1081. Morse N.R. Photoreactivation of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* / N.R. Morse, V. Meniel, R. Waters // Nucleic Acids Research. – 2002. – 30. – No 8. – P. 1799-1807.

1082. Fox M.E. A novel role for DNA photolyase: binding to DNA damaged by drugs is associated with enhanced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* / M.E. Fox, B.J. Feldman, G. Chu // Mol. Cell. Biol. – 1994. – 14. – P. 8071–8077.

1083. Ozer Z. The other function of DNA photolyase: stimulation of excision repair of chemical damage to DNA / Z. Ozer, J.T. Reardon, D.S. Hsu, K. Malhotra, A. Sancar // *Biochemistry*. – 1995. – 34. – P. 15886-15889.

1084. Chiganc,as V. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene / V. Chiganc,as, E.N. Miyaji, A.R. Muotri et al. // *Cancer Research*. – 2000. – 60. – P. 2458–2463.

1085. Hsu D.S. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins / D.S. Hsu, X. Zhao, S. Zhao et al. // *Biochemistry* – 1996. – 35. – P. 13871–13877.

1086. Kobayashi K. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells / K. Kobayashi, S. Kanno, B. Smit et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – 26. – P. 5086–5092.

1087. Cashmore A.R. Cryptochromes: blue light receptors for light receptors for plants and animals / A.R. Cashmore, J.A. Jarillo, Y.J. Wu, D. Liu // *Science*. – 1999. – 284. – P. 760-765.

1088. Ozgur S. Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome / S. Ozgur, A. Sancar // *Biochemistry*. – 2003. – 42. – P. 2926-2932.

1089. Funayama T. Overexpression of Medaka (*Oryzias latipes*) photolyase in Medaka cultured cells and early embryos / T. Funayama, H. Mitani, A. Shima // *Photochem. Photobiol.* – 1996. – 63. – No 5. – P. 633-638.

1090. Todo T. Similarity among *Drosophila* (6–4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family // T. Todo, H. Ryo, K. Yamamoto et al. // *Science*. – 1996. – 272. – 109–112.

1091. Selby C.P. A third member of the photolyase/blue-light photoreceptor family in *Drosophila*: a putative circadian photoreceptor / C.P. Selby, A. Sancar // *Photochem. Photobiol.* – 1999. – 69(1). – P. 105-7

1092. Brudler R. Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution / R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu et al. // *Mol. Cell*. – 2003. – 11. – P. 59-67.

1093. Daiyasu H. Identification of cryptochrome DASH from vertebrates / H. Daiyasu, T. Ishikawa, K. Kuma et al. // *Genes Cells*. – 2004. – 9. – P. 479-495.

1094. Rattray A.J. Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead / A.J. Rattray, J.N. Starthorn // *Ann. Rev. Genet.* – 2003. – 37. – P. 31-66.

1095. Dunaeva M. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display / M. Dunaeva, I. Adamska // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – 268. – P. 5521-5529.

1096. Kozubek S. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by heavy ions / S. Kozubek, E.A. Krasavin, J. Soska et al. // *Mutat. Res.* – 1989. – 215. – P. 49-53.
1097. Koudelu K. Induction of SOS repair by ionizing radiation / K. Koudelu, L. Ryznar, S. Kozubek, J. Slotova // *Radiat. Environ. Biophys.* – 1992. – 31. – P. 343-348.
1098. Palma M. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide / M. Palma, D. DeLuca, S. Worgall, L.E.N. Quadri // *J. Bacteriol.* – 2004. – P. 248-252. DOI: 10.1128/JB.186.1.248-252.2004
1099. Schuster G. Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat-shock / G. Schuster, D. Even, K. Kloppstech, I. Ohad // *EMBO J.* – 1988. – 7. – P. 1-6.
1100. Stapel D. The protective effect of heat shock proteins against photoinhibition under heat shock in barley (*Hordeum vulgare*) / D. Stapel, E. Kruse, K. Kloppstech // *J. Photochem. Photobiol.* – 1993. – 21. – P. 211-218.
1101. Mitani H. Induction of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in cultured fish cells by fluorescent light and oxygen stress / H. Mitani, A. Shima // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – 61. – No 4. – P. 373-377.
1102. Fukui A. Modifying factors of the cellular concentration of photolyase molecules in *Saccharomyces cerevisiae* cells – I. Effects of temperature and light / A. Fukui, W. Laskowski // *Photochem. Photobiol.* – 1984. – 39. – No. 5. – P. 613-617.
1103. Fukui A. Modifying factors of the cellular concentration of photolyase molecules in *Saccharomyces cerevisiae* cells – II. Effects of preillumination with light flashes / A. Fukui, W. Laskowski // *Photochem. Photobiol.* – 1984. – 40. – No. 2. – P. 227-230.
1104. Godar D.E. Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis // *Photochem. and Photobiol.* – 1996. – 63. – No 6. – P. 818-824.
1105. Madeo F. Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast / F. Madeo, E. Frohlich, M. Ligr et al. // *J. Cell Biology.* – 1999. – 145. – Issue 4. – P. 757-767.
1106. Nagamune T. Photosensitive phenomena of nitrile hydratase of *Rhodococcus sp.* N-771 / T. Nagamune, H. Kurata, M. Hirata et al. // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – 51. – No. 1. – P. 87-90.
1107. Hellingwerf K.J. The molecular basis of sensing and responding to light in microorganisms // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2002. – 81. – P. 51-59.
1108. Galland P. Forty years of blue-light research and no anniversary // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – 56. – No 5. – P. 847-853.
1109. Ninnemann H. Some aspects of blue light research during the last decade // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – 61. – No 1. – P. 22-31.

1110. Miyamoto Y. Vitamin B<sub>2</sub>-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals / Y. Miyamoto, A. Sancar // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – 95. – P. 6097-6102.

1111. Armitage J.P. Behavioural responses of bacteria to light and oxygen / Arch. Microbiol. – 1997. – 168. – P. 249-261.

1112. Hellingwerf K.J. Current topics in signal transduction in bacteria / K.J. Hellingwerf, W.C. Crielaard, M. J. Teixeira deMattos et al. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – 74. – P. 211–227.

1113. Singh D.P. Response of the wild-type and high light-tolerant mutant of *Anacystis nidulans* against photooxidative damage: differential mechanism of high light tolerance / D.P. Singh, K. Verma // Photochem. Photobiol. – 1995. – 62. – No 2. – P. 314-319.

1114. Whitelam G.C. Damaging effects of light on microorganisms / G.C. Whitelam, G.A. Codd // Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol. – 1986. – 17. – P. 129-169.

1115. Muela A.A. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem / A.A. Muela, J. Iriberry, L. Egea, I. Barcina // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – 58. – No. 12 – P. 3903-3907.

1116. Hockberger P.E. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells / P.E. Hockberger, T.A. Skimina, V.E. Centonze et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – 96. – P. 6255-6260.

1117. Bol'shakova I.V. Photosensitizing and photoprotective properties of extracts from groups of medicinal plants / I.V. Bol'shakova, E.L. Lozovskaia, I.I. Sapezhinskii // Biofizika. – 1997. – 42(4). – P. 926-32.

1118. Lozovskaia E.L. Photosensitization and photoprotection by some drugs, metabolites and other compounds / E.L. Lozovskaia, E.N. Makareeva, I.U. Makedonov // Biofizika. – 1997. – 42(3). – P. 549-57.

1119. Hug D.H. Light activation of enzymes / D.H. Hug, P.S. O'Donnell, J.K. Hunter // Photochem. Photobiol. – 1980. – 32. – No. 6. – P. 841-848.

1120. King G.M. Regulation by light of methane emissions from a wetland // Nature (London). – 1990. – 345. – P. 513-515.

1121. Vanzella A. Effects of CO<sub>2</sub> and light on ammonium and nitrate oxidation by chemolithotrophic bacteria / A. Vanzella, M.A. Guerrero, R.D. Jones // Mar. Ecol. – Prog. Ser. – 1989. – 57. – P. 69-76.

1122. Olson R.J. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum // J. Mar. Res. – 1981. – 39. – P. 227-238.

1123. Philips S. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments / S. Philips, H.J. Laanbroek, W. Verstraete // *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2002. – 1. – P. 115-141.

1124. Aparicio P.J. Photoregulation of nitrate utilization in green algae and higher plants / P.J. Aparicio, T. Balandin, S.G. Mauriño, J.M. Maldonado // *Photochem. Photobiol.* – 1985. – 42. – No. 6. – P. 765-770.

1125. Guerrero M.A. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength-dependent response / M.A. Guerrero, R.D. Jones // *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* – 1996. – 141(1-3). – 183-192.

1126. Vargas M.A. Photoinactivation of spinach nitrate reductase sensitized by flavin mononucleotide. Evidence for the involvement of singlet oxygen / M.A. Vargas, S.G. Mauriño, J.M. Maldonado, P.J. Aparicio // *Photochem. Photobiol.* – 1982. – 36. – No. 2. – P. 223-228.

1127. Paietta J. Blue light responses in nitrate reductase mutants of *Neurospora crassa* / J. Paietta, M.L. Sargent // *Photochem. Photobiol.* – 1982. – 35. – No 6. – P. 853-855.

1128. Roldan J.M. Photoactivation of nitrate reductase from *Neurospora crassa* / J.M. Roldan, W.L. Butler // *Photochem. Photobiol.* – 1980. – 32. – No 3. – P. 375-381.

1129. Fritz B. Photoreactivation by triplet flavin and photoinactivation by singlet oxygen of *Neurospora crassa* nitrate reductase / B. Fritz, H. Ninneman // *Photochem. Photobiol.* – 1985. – 41. – No. 1. – P. 39-45.

1130. Страховская М.Г. Активация роста дрожжей под действием ультрафиолетового света области 280-380 нм / М.Г. Страховская, Н.С. Беленикина, Г.Я. Фрайкин // *Микробиология*. – 1991. – 60. – № 2. – С. 292-297.

1131. Belenikina N.S. Near-UV activation of yeast growth / N.S. Belenikina, M.G. Strakhovskaya, G.Ya. Fraikin // *J. Photochem. Photobiology B: Biology*. – 1991. – 10. – P. 51-55.

1132. Фрайкин Г.Я. Активирующее действие длинноволнового УФ-излучения на ферментативное превращение 5-окситриптофана в серотонин / Г.Я. Фрайкин, М.Г. Страховская, Э.В. Иванова, А.Б. Рубин // *Биофизика*. – 1989. – 34. – № 6. – С. 933-937.

1133. Fraikin G.Ya. Near-UV activation of enzymatic conversion of 5-hydroxytryptophan to serotonin / G.Ya. Fraikin, M.G. Strakhovskaya, E.V. Ivanova, A.B. Rubin // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – 49. – P. 475-477.

1134. Пеннер В.М. Фотосенсибилизация у бесхлорофильных микроорганизмов активного ила очистных сооружений // В сб. *Микробиологические методы защиты окружающей среды*. 5-7 апреля 1988 г. Тезисы докладов. – Пушкино, 1988. – С. 49-50.

1135. Pretorius I.S. 2000. Tailoring wine for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking // *Yeast*. – 16. – P. 675-729.

1136. Carrasco P. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains / P. Carrasco, A. Querol, M. del Olmo // *Arch. Microbiol.* – 2001. – 175. – No 6. – P. 450-457. <https://doi.org/10.1007/s002030100289>

1137. Pérez-Torrado R. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making / R. Perez-Torrado, J.M. Bruno-Barcena, E. Matallana // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71. – Issue 11. – P. 6831-6837.

1138. Pérez-Torrado R. Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth / R. Pérez-Torrado, R. Gómez-Pastor, C. Larsson, E. Matallana // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – 81. – Issue 5. – P. 951–960.

1139. Ivorra C. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study / C. Ivorra, J.E. Pérez-Ortín, M. del Olmo // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – 64. – P. 698–708.

1140. Aranda A. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of *HSP* genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines / Aranda A., Querol A., del Olmo M. // *Arch. Microbiol.* – 2002. – 177. – P. 304-312.

1141. Zuzuarregui A. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behaviour / A. Zuzuarregui, M. del Olmo // *FEMS Yeast Res.* – 2004. – 4. – P. 699–710.

1142. Zuzuarregui A. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection / A. Zuzuarregui, M. del Olmo // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2004. – 85. – P. 271-280.

1143. Zuzuarregui A. Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification / A. Zuzuarregui, P. Carrasco, A. Palacios et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – 98. – P. 299–307.

1144. Квасников Е.И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е.И. Квасников, И.Ф. Щелокова. – Киев: Наук думка, 1991. – 328 с.

1145. Rosenfeld E. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: effect on fermentation kinetics / E. Rosenfeld, B. Beauvoit, B. Blondin, J.M. Salmon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – 69. – No. 1. – P. 113–121.

1146. Аркадьева З.А. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов / Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др. // Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

1147. Авакянц С.П., Шакарова Ф.И. Биохимические и микробиологические методы исследования дрожжей и вина. – М.: Наука, 1971. – с. 35-39.

1148. Pedersen M.B. The long and winding road from the research laboratory to industrial application of lactic acid bacteria / M.B. Pedersen, S.L. Iversen, K.I. Sorensen, E. Johansen // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – 29. – P. 611-624.

1149. Quatravaux S. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters / S. Quatravaux, F. Remize, E. Bryckaert et al. // J. Appl. Microbiol. – 2006. – 101. – 903-912.

1150. Mazzeo M.F. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: a proteomic perspective / M.F. Mazzeo, G. Cacace, A. Peluso et al. // J. Proteom. – 2012. – 75. – P. 4050-4061.

1151. Gibson B.R. The oxidative stress response along a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation / B.R. Gibson, S.J. Lawrence, C.A. Boulton et al. // FEMS Yeast Res. – 2008. – 8. – P. 574–584.

1152. US Patent 5728574. Viability of bacterial dried cells / M.J. Legg. – 17.03.1998.

1153. Barbosa J. Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice / J. Barbosa, S. Borges, P. Teixeira // Food Microbiology. – 2015. – 52. – P. 77-83.

1154. Briokhanov A.L. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review / A.L. Briokhanov, A.I. Netrusov // Appl. Biochem. Microbiol. – 2007. – 43. – No. 6. – P. 567-582. DOI: 10.1134/S0003683807060014

1155. Rau W. Photoregulation of carotenoid biosynthesis // Eds. J.W. Porter, S.L. Spurgeon. – John Willey & Son, 1983. – P. 123–157.

1156. Schroeder W.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma* / W.A. Schroeder, E.A. Johnson // J. Biol. Chem. – 1995. – 270. – No. 31. – P. 18374-18379.

1157. El-Sayed W.S.M. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids / W.S.M. El-Sayed, S. Takaichi, H. Saida et al. // Plant and Cell Physiology. – 2002. – 43. – No. 4. – P. 379-383.

1158. Mishra S. Increase in enzyme productivity by induced oxidative stress in *Bacillus subtilis* cultures and analysis of its mechanism using microarray data / S. Mishra, S.B. Noronha, G.K. Suraishkumar // Process Biochem. – 2005. – 40. – Issue 5. – P. 1863–1870.

1159. Kavitha S. Effect of vitamin E and menadione supplementation on riboflavin production and stress parameters in *Ashbya gossypii* / S. Kavitha, T.S. Chandra // Process Biochem. – 2009. – 44. – Issue 8. – P. 934-938.

1160. Batté M. Biofilms in drinking water distribution systems / M. Batté, B.M.R. Appenzeller, D. Grandjean et al. // Rev. in Environ. Sci. and Bio/Technology. – 2003. – 2. – P. 147-168.

1161. Sakamoto T. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus sp.* Strain PCC 7002 / T. Sakamoto, V.B. Delgaizo, D.A. Bryant // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – 64. – No. 7. – P.2361-2366.

1162. Chang I.S. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation / I.S. Chang, H.K. Byung, K.S. Pyong // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – 63. – No 1. – P. 1-6.

1163. Narendranath N.V. Urea hydrogen peroxide reduces the number of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation / N.V. Narendranath, K.C. Thomas, W.M. Ingledew // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – 66. – No 10. – P. 4187-4192.

1164. Liltved H. Effects of high intensity light on ultraviolet-irradiated and non-irradiated fish pathogenic bacteria / H. Liltved, B. Landfald // Water Research. – 2000. – 34. – Issue 2. – P. 481-486. doi:10.1016/S0043-1354(99)00159-1.

1165. Oguma K. Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay / K. Oguma, H. Katayama, S. Ohgaki // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – 12. – P. 6029–6035.

1166. Street C.N. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture / C.N. Street, A. Gibbs, L. Pedigo et al. // Photochem. Photobiol. – 2009. – 85 (1). – P. 137–143.

1167. Yamané T. Fed-batch techniques in microbial processes / T. Yamané, S. Shimizu // In: Fiechter A. (Ed). Bioprocess Parameter control. – Springer-Verlag. Berlin, 1984. – P. 147-194.

1168. Pan J.G. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air / J.G. Pan, M.Y. Kwak, J.S. Rhee // Biotechnol. Letters. – 1986. – 8. – No 10. – P. 715-718 / DOI 10.1007/BF01032568

1169. Minihane B.J. Fed-batch culture technology / B.J. Minihane, D.E. Brown // Biotechnol. Adv. – 1986. – 4. – No 2. – P. 207–218.

1170. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* // Trends Biotechnol. – 1996. – 14. – No 3. – P. 98-105.

1171. Riesenber D. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon- $\alpha$ 1 / D. Riesenber, K. Menzel, V. Schulz et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – 34. – P. 77-82.

1172. Riesenbergs D. High-cell-density cultivation of microorganisms / D. Riesenbergs and R. Guthke // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – 51. – No 4. – P. 422-430.

1173. Gregersen I. Supervision of fed-batch fermentations / I. Gregersen, S.B. Jorgensen // *Chem Eng. J.* – 1999. – 75. – P. 69-76.

1174. Shang F. High-cell-density cultivation for co-production of ergosterol and reduced glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* / F. Shang, Zh. Wang, T. Tianwei // *App. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – 77. – P. 1233-1240.

1175. Konstantinov K. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli* / K. Konstantinov, M. Kishimoto, T. Seki, T. Yoshida // *Biotechnol. Bioeng.* – 1990. – 36. – P. 750-758.

1176. Luli G.W. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations / G.W. Luli, W.R. Strohl // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – 56. – P. 1004-1011.

1177. Akesson M. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding / M. Akesson, P. Hagander, J.P. Axelsson // *Biotechnol. Bioeng.* – 2001. – 73. – P. 223-230.

1178. Cutayar J. High cell density of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator / J. Cutayar, D. Poillon // *Biotechnol. Lett.* – 1989. – 11. – P. 155-160.

1179. Paalme T. Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate / T. Paalme, K. Tiisma, A. Kahru et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1990. – 35. – P. 312-319.

1180. Castan A. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli* / A. Castan, S.-O. Enfors // *Bioproc. Biosyst. Engin.* – 2000. – 22. – No 6. – P. 509

1181. Tsai L.B. The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in high cell density *Escherichia coli* fermentations / L.B. Tsai, M. Mann, F. Morris et al. // *J. Ind. Microbiol.* – 1987. – 2. – P. 181-187.

1182. Alberghina L. Efficient production of recombinant DNA proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by controlled high-cell-density fermentation / L. Alberghina, D. Porro, E. Martegiani, M. Ranzi // *Biotechnol. Applied Biochem.* – 1991. – No 14. – P. 82- 92.

1183. Yee L. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli* / L. Yee, H.W. Blanch // *Bio/Technology.* – 1992. – No 10. – P. 1550-1556.

1184. Chen H.C. High-density *Escherichia coli* cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone / H.C. Chen, C.F. Hwang, D.G. Mou // *Enzyme Microb. Technol.* – 1992. – 14. – P. 321-326.

1185. Strandberg L. The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli* / L. Strandberg, L. Andersson, S-O. Enfors // FEMS Microbiol. Rev. – 1994. – 14. – No 1. – P. 53-56.

1186. Chen W. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines / W. Chen, C. Graham, R.B. Ciccarelli / J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – 18. – Issue 1. – P. 43-48.

1187. Argyropoulos D. Recombinant  $\beta$ -glucanase production and plasmid stability of *Bacillus subtilis* in cyclic fed batch culture / D. Argyropoulos, H.C. Lynch // Biotechnology Techniques – 1997. – 11. – No 3. – P. 187.

1188. Park S.J. Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain / S.J. Park, G. Georgiou, S.Y. Lee // Biotechnol. Prog. – 1999. – 15. – No 2. – P. 164-170.

1189. Li P.-Z. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris* / P.-Z. Li, A. Anumanthan, X.-G. Gao, V. Renugopalakrishnan // Appl. Biochem. Biotech. – 2007. – 142. – 2. – P. 105-124. DOI: 10.1007/s12010-007-0003-x

1190. Kim B.S. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat / B.S. Kim, S.C. Lee, S.Y. Lee et al. // Bioprocess and Biosystems Engineering – 2004. – 26. – No 3. – P. 147-150. DOI 10.1007/s00449-003-0347-8

1191. Kim Y.-H. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of  $\beta$ -glucan / Y.-H. Kim, S.W. Kang, J.H. Lee et al. // J. Ind. Eng. Chem. – 2007. – 13. – No. 1. – 2007. – 153-158.

1192. Ganuza E. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium sp.* in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system / E. Ganuza, A.J. Anderson, C. Ratledge // Biotechnol. Letters. – 2008. – 30. – No 9. – P. 1559-1564.

1193. Gnoth S. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review / S. Gnoth, M. Jenzsch, R. Simutis, A. Lübbert // Bioprocess Biosyst Eng. – 2008. – 31. – P. 21-39.

1194. Cino J. High yield protein production from *Pichia pastoris* yeast: a protocol for benchtop fermentation // [http://www.nbsc.com/papers/ABL\\_Pichia.htm](http://www.nbsc.com/papers/ABL_Pichia.htm)

1195. Lee J. Control of fed-batch fermentations / J. Lee, S.Y. Lee, S. Park et al. // Biotechnol. Adv. – 1999. – 17. – P. 29–48.

1196. Hayakava K. High density culture of *Lactobacillus casei* by a cross flow culture method based on kinetic properties of the microorganisms / K. Hayakava, H. Santawa, T. Nagamune, I. Endo // J of Fermentation and Bioengineering. – 1990. – 70. – No 6. – P. 404-408.

1197. Bidal B. High-concentration cultivation of *Lactococcus cremolus* in a cell-recycle reaction / B. Bidal, Y. Vayssiere, G. Game, A. Pareilleux // *Biotechnol. Bioeng.* – 1991. – 37. – P. 796-754.

1198. Schiraldi C. High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production / C. Schiraldi, V. Adduci, V. Valli et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – 82. – No 2. – P. 213-222.

1199. CN 101230323. Chemical stress removal technology in high-density culture process of probiotics. – 30.07.2008.

1200. *The Biotechnology of ethanol: Classical and future applications* // Edited by M. Roehr. – WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001. – 232 pp. ISBN: 3-527-30199-2.

1201. Производственный регламент на производство спирта из крахмалистого сырья для ФГУП "Биотехнологический завод", пос. Серебряные Пруды, 2001 г.

1202. Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 2001. – 256 с.

1203. Кухаренко А.А. Решение безотходной технологии спирта на основе логистики. / А.А. Кухаренко, Н.В. Сорокодумов, С.Н. Сорокодумов // В сб. Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 2001. – С. 132-139.

1204. Кухаренко А.А. Экологические проблемы производства этилового спирта / А.А. Кухаренко, С.Н. Сорокодумов, И.В. Бельчаков // *Экология и промышленность России.* – 2000. – № 8. – С. 4-6.

1205. Яровенко В.Л. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов и др.– М.: Колос, "Колос – Пресс" – 2002. – 464 с.

1206. Сорокодумов С.Н. Биотехнология спирта из зернового сырья / С.Н. Сорокодумов, А.Ю. Винаров, А.А. Кухаренко, Кузнецов А.Е. – М.: Новые технологии, 2004. – 76 с.

1207. Технологическая инструкция по ведению чистой культуры термотолерантных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 985 Т в спиртовом производстве. – М., 2000 г.

1208. ТУ 9182-400-00008064-2000. Чистая культура термотолерантных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 985Т.

1209. Jin Y.L. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* / Y.L. Jin, R.A. Speers // *Food. Res. Int.* – 1998. – 31. – P. 421–440.

1210. Seong K.T. Effect of flocculation on performance of arming yeast in direct ethanol fermentation / K.T. Seong, Y. Katakura, N. Kazuaki et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – 73. – P. 60-66. DOI 10.1007/s00253-006-0454-y

1211. Shojaosadati S.A. The use of biomass and stillage recycle in conventional ethanol fermentation / S.A. Shojaosadati, S.M. Fatenin // *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* – 1996. – 66. – No 4. – P. 362-366.

1212. Сорокодумов С.Н. Интенсификация процессов спиртообразования и утилизации отходов спиртового производства / Дисс... канд. техн. наук. – М., 2005, РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 182 с.

1213. Ngang J.J.E. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli / J.J.E. Ngang, F. Letourneau, E. Wolniewicz, P. Villa // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1990. – 33. – P. 490-493.

1214. Makanjuola D.B. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale fermentations / D.B. Makanjuola, A. Tymon, D.G. Springham // *Enz. Microbiol. Technol.* – 1992. – 14. – P. 350-357.

1215. Chang I.S. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation / I.S. Chang, B.H. Kim, P.K. Shin, W.K. Lee // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 1995. – 5. – P. 309-314.

1216. Забродский А.Г. Технология и контроль производства кормовых дрожжей на меласной барде. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 272 с.

1217. Drawert F. Gärungsverfahren – Ethanol, Wein, Bier, Primärmetabolite / F. Drawert, W. Klisch, G. Sommer // In: *Handbuch der Biotechnologie*, 1982. – S. 305-377.

1218. Narendranath N.V. Effect of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation / N.V. Narendranath, S.H. Hynes, K.C. Thomas, W.M. Ingledew // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – 63. – P. 4158-4163.

1219. Кунце В. Технология солода и пива. – СПб., Изд-во "Профессия", 2003. – 912 с.

1220. VickRoy T.B. Lactic acid // In: *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, M. Moo-Young (Ed.) – Pergamon Press, New York, USA, 1985. – P. 761-776.

1221. Wee Y.J. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications / Y.J. Wee, J.N. Kim, H.W. Ryu // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – 44(2). – P. 163-172.

1222. Datta R. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review / R. Datta, M.J. Henry // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2007. – 81(7). – P. 1119-1129. DOI: 10.1002/jctb

1223. Vijayakumar J. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid / J. Vijayakumar, R. Aravindan, T. Viruthagiri // *Chem. Biochem. Engin. Quarterly.* – 2008. – 22(2). – P. 245-264.

1224. From the Sugar Platform to biofuels and biochemical, Final report for the European Commission Directorate-General Energy, N° ENER/C2/423-2012/SI2.673791. – April 2015, V1.4.

1225. Dusselier M. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis / M. Dusselier, P. van Wouwe, A. Dewaele et al. // *Energy Environ. Sci.* – 2013. – 6. – P. 1415-1442.

1226. Mazzoli R. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries / R. Mazzoli, F. Bosco, I. Mizrahi et al. // *Biotechnol. Adv.* – 2014. – 32. – P. 1216-1236.

1227. Million Respectively by 2020: Grand View Research, Inc. Retrieved December 12, 2014. // <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>

1228. Juturu V. Microbial production of lactic acid: the latest development / V. Juturu, J. C. Wu // *Crit. Rev. in Biotechnology*. Early Online: Taylor & Francis. – 2015. – 1–11. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305

1229. Lunt J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers // *Polym. Degrad. Stab.* – 1998. – 59. – No 1-3. – P. 145–152.

1230. Garlotta, D. A literature review of poly (lactic acid) // *J. Polym. Environ.* – 2001. – 9. – No 2. – P. 63-84.

1231. Vaidya A.N. Production and recovery of lactic acid for polylactide – An overview / A.N. Vaidya, R.A. Pandey, S. Mudliar et al. // *Critical Rev. in Environ. Sci. and Technology*. – 2005. – 35. – 5. – P. 429 - 467.

1232. Jamshidian M. Poly-lactic acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies / M. Jamshidian, E.A. Tehrany, M. Imran et al. // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2010. – 9(5). – P. 552-571.

1233. Nampoothiri K.M. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research / K.M. Nampoothiri, N.R. Nair, R.P. John // *Bioresour. Technol.* – 2010. – 101. – P. 8493-8501.

1234. Pang X. Polylactic acid (PLA): research, development and industrialization / X. Pang, X. Zhuang, Z. Tang, X. Chen. // *Biotechnol. J.* – 2010. – 5(11). – P. 1125-1136.

1235. Polylactic Acid (PLA) - A Global Market Watch, 2011 – 2016 // Сайт Global Information: URL: <http://www.giiresearch.com/report/arm256244-poly-lactic-acid-pla-global-market-watch.html> (дата обращения: 26.09.2014).

1236. Global lactic acid and PLA market to reach US\$3831 mln by 2016 at a CAGR of 18.7% // Сайт Plastemart.com URL: <http://www.plastemart.com/Plastic-Technical-Article.asp?LiteratureID=1694&Paper=global-lactic-acid-PLA-market-pie-chart-world-consumption-lactic-acid-polyethylene-terephthalate#> (дата обращения: 26.09.2014).

1237. Sin L.T. Polylactic acid / L.T. Sin, A.R. Rahmat, W.A. Rahman // *Plast. Des. Libr.* – 2012. – P. 352.

1238. Benninga H. A history of lactic acid making: A chapter in the history of biotechnology. – Kluwer Academic Publishers, 1990. – 478 p.

1239. Litchfield J.H. Microbiological production of lactic acid // *Adv. Appl. Microbiol.* – 1996. – 42. – P. 45-95.

1240. Полянский К.К. Производство молочной кислоты / К.К. Полянский, Г.П. Шуваева, Н.Д. Деменко, В.Ф. Яковлев // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология.* – 1997. – № 1. – С. 8-14.

1241. Ghaffar T. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification / T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar et al. / *J. Radiation Research and Applied Sciences.* – 2014. – 7. – P. 222-229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>

1242. Teuber M. Lactic acid bacteria // In *Biotechnology*, vol. 1, 2nd Ed, eds. H.J. Rehm, G. Reed. – Weinheim: VCH, 1993. – P. 325–366.

1243. Åkerberg C. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour / C. Åkerberg, G. Zacchi // *Bioresour. Technol.* – 2000. – 75. – 119-126. Doi:10.1016/S0960-8524(00)00057-2

1244. Sauer M. 16 years research on lactic acid production with yeast – ready for the market? / M. Sauer, D. Porro, D. Mattanovich, P. Branduardi // *Biotechnol Genet. Eng. Rev.* – 2010. – 27. – P. 229–56.

1245. Tejayadi S. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor / S. Tejayadi, M. Cheryan // *Appl. Microbiol/ Biotechnol.* – 1995. – 43. – 242-248.

1246. Li Z. Fermentative production of L-LA from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus* / Z. Li, L. Han, Y. Ji et al. // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – 49. – 138-142.

1247. Hammes W.P. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / W.P. Hammes, C. Hertel // *Prokaryotes.* – 2006. – 4. – P. 320-403. DOI:10.1007/0-387-30744-3\_10

1248. EFSA Panel. The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed // *EFSA J.* – 2008. – 923. – P. 1-48.

1249. European Food Safety Authority. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use // *EFSA J.* – 2011. – 9. – 2193.

1250. Abdel-Rahman M.A. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes / M.A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – 31. – P. 877-909.

1251. The genera of Lactic Acid Bacteria / Eds. B.J.B. Woods, W.H. Holzappel – Gaith: Aspen Publishers, 1995. – 2 – P. 19-54.

1252. Carr F.J. The lactic acid bacteria: A literature survey / F.J. Carr, D. Chill, N. Maida // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2002. – 28. – P. 281-370.

1253. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology // *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* – New York: Marcel Dekker, 2004. – P. 1-66.

1254. Martinez F.A.C. Lactic acid properties, applications and production: A review / F.A.C. Martinez, E.M. Balciunas, J.M. Salgado et al. // *Trends in Food Science & Technology.* – 2013. – 30. – P. 70-83.

1255. Pintado J. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amyolytic bacterial strain / J. Pintado, J.P. Guyot, M. Raimbault // *Enzyme and Microbial Technol.* – 1999. – 24(8-9). – P. 590–598.

1256. Naveena B.J. Direct fermentation of starch to l(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM / B.J. Naveena, M. Altaf, K. Bhadrappa et al. // *Process Biochemistry.* – 2005. – 40(2). – P. 681–690. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.045

1257. Ohkouchi Y. Direct production of L+-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 / Y. Ohkouchi, Y. Inoue // *Bioresource Technol.* – 2006. – 97(13). – P. 1554–62. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.004

1258. Reddy G. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review /G. Reddy, M. Altaf, B.J. Naveena et al. // *Biotechnol. Adv.* – 2008. – 26. – P. 22-34.

1259. Gao M.T. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production / M.T. Gao, M. Kaneko, M. Hirata et al. // *Bioresour. Technol.* – 2008. – 99. – No 9. – P. 3659-3664.

1260. Abdel-Rahman M.A. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits / M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto // *J. Biotechnol.* – 2011. – 156. – No 3. – P. 286-301. Doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.017

1261. Nguyen C.M. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli / C.M. Nguyen, J-S. Kim, H.J. Hwang et al. // *Bioresour Technol.* – 2012. – 110. – P. 552-559.

1262. Pedersen M.B. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses on biotechnology / M.B. Pedersen, P. Caudu, D. Lechardeur et al. // *Ann. Rev. in Food Science and Technology.* – 2012. – 3(1). – 37-58. Doi: 10.1146/annurev-food-022811-101255.

1263. Ricciardi A. Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups / A. Ricciardi, R.G. Ianniello, E. Parente, T. Zotta // J. Applied Microbiol. – 2015. – 119. – No 3. – P. 776-785.

1264. Tashiro Y. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* QU 41 / Y. Tashiro, W. Kaneko, Y. Sun et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 89. – No 6. – P. 1741-1750.

1265. Hamamei H. Production of L(+)-lactic acid using immobilised *Rhizopus oryzae* / H. Hamamei, D.D.Y. Ryu // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1994. – 44. – P. 125-133.

1266. Bai D.M. L-(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor / D.M. Bai, M.Z. Jia, X.M. Zhao et al // Chem. Eng. Sci. – 2003. – 58. – P. 785–791.

1267. US patent 6849444. Strains of *Rhizopus oryzae* and uses thereof / Liaw H.J., Archer Daniels Midland Company. – 01.02.2005.

1268. Jin B. *Rhizopus arrhizus* – a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L-(+)-lactic acid / B. Jin, L.P. Huang, P. Lant // Biotechnol Lett. – 2003. – 25. – P. 1983–1987.

1269. Marták J. Fermentation for lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation / J. Marták, S. Schlosser, E Sabolová et al. // Process. Biochem. – 2003. – 38. – P. 1573–1583.

1270. Bulut S. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* / S. Bulut, M. Elibol, D. Ozer // Biochem. Eng. J. – 2004. – 21. – P. 33–37.

1271. Taskin M. Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61 / M. Taskin, N. Esim, S. Ortucu // Food Bioprod. Process. – 2012. – 90. – P. 773–779.

1272. Porro D. et al. Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid / Biotechnol. Prog. – 1995. – 11. – P. 294-298.

1273. Ishida N. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene / N. Ishida, S. Saitoh, K. Tokuhiko, E. Nagamori et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71(4). – P. 1964-1970.

1274. Ishida N. D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* / N. Ishida, T. Suzuki, K. Tokuhiko et al. // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – 101. – No 2. – P. 172-177.

1275. Valli M. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH / M. Valli, M. Sauer, P. Branduardi et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – 72(8). – P. 5492-5499.

1276. US patent 6429006. Yeast strains for the production of lactic acid transformed with a gene coding for lactic acid dehydrogenase // D. Porro, M. Bianchi, B.M. Ranzi et al., A.E. Staleg Manufacturing Co. – 06.08.2002.

1277. Liu T. Scale-up of L-Lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* Mk-96-1196 from 0,003 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors / T. Liu, S. Miura, M. Yaguchi et al. // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – 101. – P. 9-12.

1278. Narayanan N. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization / N. Narayanan, P.K. Roychoudhury, A. Srivastava // Electron. J. Biotechnol. – 2004. – 7. – No 2. – P. 167-179.

1279. Chotisubha-Anandha N. Improved oxygen transfer and increased L-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor / N. Chotisubha-Anandha, S. Thitiprasert, V. Tolieng et al. // Bioprocess. Biosyst. Eng. – 2011. – 34. – P. 163–172.

1280. Ленгелер Й., Древе Г., Шлегель Г. Современная микробиология. В 2-х томах. Т. 1. Прокариоты. – М.: Мир, 2005. – 656 с.

1281. Thomas T.D. Change from homo- and heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures / T.D. Thomas, D.C. Ellwood, M.C. Longyear // J. Bacteriol. 138 (1979), 109-117.

1282. Garrigues C. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio / C. Garrigues, P. Loubiere, N.D. Lindley, Coccagn-Bousquet M. // J. Bacteriol. – 179. – 1997. – 5282-5287.

1283. Hofvendahl K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources / K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal // Enzyme Microb. Technol. – 2000. – 26(2-4). – P. 87-107. Doi:10.1016/S0141-0229(99)00155-6.

1284. Moon S.K. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity L-lactic acid *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* CHB2121 / S.K. Moon, Y.J. Wee, G.W. Choi // J. Biosci. Bioeng. – 2012. – 114. – P. 155–159.

1285. Teusink B. Systems biology of lactic acid bacteria: a critical review / B. Teusink, H. Bachmann, D. Molenaar // Microb. Cell Fact. – 2011. – 10 (Suppl.1). – S. 11.

1286. De Vuyst L. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications / L. De Vuyst, F. Leroy // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 13. – P. 194-199.

1287. US patent 8563295. Lactic acid bacteria and their use in swine direct-fed microbials / DuPont Nutrition Biosciences ApS, USA. – 22.10.2013.

1288. De Man J. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. De Man, M. Rogosa, M. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – 23. – P. 130-135.

1289. Aksu Z. Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together / Z. Aksu, T. Kutsal // Biotechnol. Lett. – 1986. – 8. – P. 157-160.

1290. Kotzanmanidis C. Optimization of lactic acid production from beet molasses *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 / C. Kotzanmanidis, T. Roukas, G. Skaracis // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 18. – P. 442-448.

1291. Shukla V.B. Production of D(-)-lactic acid from sucrose and molasses / V.B. Shukla, S. Zhou, L.P. Yomano et al. // Biotechnol. Lett. – 2004. – 26. – P. 689-693.

1292. John R.P. Solid-state fermentation for l-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii* / R.P. John, Nampoothiri K.M., Pandey A. // Process Biochemistry. – 2006. – 41(4). – 759–763. doi:10.1016/j.procbio.2005.09.013

1293. Dumbrepatil A. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation / A. Dumbrepatil, M. Adsul, S. Chaudhari et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – 74. – P. 333-335.

1294. Lunelli B.H. Production of lactic acid from sucrose: strain selection, fermentation and kinetic modeling / B.H. Lunelli, R.R. Andrade, D.I.P. Atala et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – 161. – 227-237.

1295. Nakano S. Efficient production of D(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)<sub>2</sub> as a neutralizing agent / S. Nakano, C.U. Ugwu, Y. Tokiwa // Bioresource Technology. – 2012. – 14. – P. 791-794.

1296. Berlowska J. Simultaneous saccharification and fermentation of sugar beet pulp with mixed bacterial cultures for lactic acid and propylene glycol production / J. Berlowska, W. Cieciora, S. Borowski et al. // MDPI. – 2016. – 21. – 1380; doi: 10.3390/molecules21101380

1297. Chiarini L. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* / L. Chiarini, L. Mara, S. Tabacchioni // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1992. – 36. – P. 461–464.

1298. Hujanen M. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* / M. Hujanen, Y.Y. Linko // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – 45. – P. 307-313.

1299. Arasaratnam V. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* / V. Arasaratnam, A. Senthuran, K. Balasubramaniam // Enzyme Microb. Technol. – 1996. – 19. – P. 482-486.

1300. Van Niel E.W.J. Nutrients requirements of lactococci in defined growth media / E.W.J. Van Niel, B. Hahn-Hägerdal // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – 52. – P. 617-627.

1301. Hujanen M. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRLB-441 / M. Hujanen, S. Linko, Y.Y. Linko, M. Leisola // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – 56 – P. 126-130.

1302. Kwon S. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate / S. Kwon, P.C. Lee, E.G. Lee et al. // Enzyme Microb. Technol. – 2001. – 78. – P. 209-215.

1303. Kurbanoglu E.B. Enhancement of lactic acid production with ram horn peptone by *Lactobacillus casei* // World J. of Microbiol. and Biotechnol. – 2004. – 20. – P. 37-42.

1304. Altaf M. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+)-lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation / M. Altaf, B.J. Naveeva, G. Reddy // Food Technol. Biotechnol. – 2005. – 43. – P. 235-239.

1305. Altaf M. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GVG in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – optimization by RSM / M. Altaf, B.J. Naveeva, M. Venkateshwar et al. // Process Biochem. – 2006. – 41. – P. 465-472.

1306. Altaf M. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation / M. Altaf, B.J. Naveena, G. Reddy // Biore-sour. Technol. – 2007. – 98. – No 3. – P. 498-503.

1307. De Lima C.B. Response surface optimization of D (-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source / C.B. De Lima, L.F. Coelho, K.C. Blanco, J. Contiero // African J. Biotechnology, – 2009. – 8(21).

1308. Liu B. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* at using alternative nitrogen sources with response surface method / B. Liu, M. Yang, B. Qia et al. // Biochem. Eng. J. – 2010. – 52. – P. 212-219.

1309. US patent 7682814. Method for producing lactic acid with high concentration and high yield using lactic acid bacteria. / Y.H. Park, K.M. Cho, H.W. Kim, D.C. Kim. CJ Cheiljedang Corp. – 23.03.2010.

1310. Amrane A. Evaluation of lactic acid bacteria autohydrolyzate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 16. – P. 207-209.

1311. Nancib N. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* / N. Nancib, A. Nancib, A. Boudjelal et al. // Bioresource Technology. – 2001. – 78(2). – P. 149-153.

1312. Xu G.Q. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401 / G.Q. Xu, J. Chu, Y.P. Zhuang et al. // Biochem. Eng. J. – 2008. – 38. – P. 189-197.

1313. Rivas B. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* / B. Rivas, A.B. Moldes, J.M. Dominguez, J.C. Parajo // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – 97. – P. 93–98.

1314. Yen H-W. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch / H-W. Yen, T-J. Chen, W-C. Pan, H-J. Wu // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 26. – P. 437-441.

1315. Zhao J-F. Effects of different neutralizing agents on D-(-)-lactic acid fermentation by *Escherichia coli* / J-F. Zhao, K-P. Li, Y-Z. Wang et al. // W. Adv. Mater. Res. – 2012. – 845. – P. 463-464.

1316. Gonçalves L.M.D. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus* / L.M.D. Gonçalves, A. Ramos, J.S. Almeida et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – 48. – P. 346-350.

1317. Loubiere P. Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis subsp. lactis* / P. Loubiere, M. Coccagn-Bousquet, J. Matos et al. // J. of Applied Microbiol. – 1997. – 82(1). – P. 95-100.

1318. Fu W. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen / W. Fu, A.P. Mathews // Biochemical Engin. J. – 1999. – 3. – No. 3. – P. 163–170.

1319. Amrane A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production // Enzyme and Microbial Technology. – 2001. – 28(9-10). – P. 827-834.

1320. Büyükkilci A.O. Batch production of L(+)-lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL, B-441) / A.O. Büyükkilci, S. Harsa // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2004. – 79. – 2004. – P. 1036-1040.

1321. Yun J.S. Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 / J.S. Yun, Y.J. Wee, H.W. Ryu // Enzyme Microb. Technol. – 2003. – 33. – P. 416–423.

1322. Kadam S.R. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production / S.R. Kadam, S.S. Patil, K.B. Bastawde et al. // Process Biochem. – 2006. – 41. – P. 120-126.

1323. Gonçalves L.M.D. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production / L.M.D. Gonçalves, A.M. Xavier, J.S. Almeida, M.J.T. Carrondo // *Enzyme*. – 1991. – 13(4). – P. 314-319.

1324. Burgos-Rubio C.N. Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus* / C.N. Burgos-Rubio, M.R. Okos, P.C. Wankat // *Biotechnol. Progress*. – 2000. – 16(3). – 305-314.

1325. De Vries W. Molar growth yield and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch culture and in continuous cultures / W. De Vries, W.M.C. Kapteijn, E.G. Van Der Beek, A.H. Stouthamer // *J. Gen. Microbiol.* – 1970. – 63. – P. 33–345.

1326. Kulozik U. High reaction rate continuous bioconversion process in a tubular reactor with narrow resident time distributions for the production of lactic acid / U. Kulozik, B. Hammelehle, J. Pfeifer, H.G. Kessler // *J. Biotechnol.* – 1992. – 22. – P. 107–116.

1327. Min-Tian G. Development of a continuous fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* / G. Min-Tian, M. Koide, R. Gotou et al. // *Process Biochem.* – 2005. – 40. – P. 1033-1036.

1328. Abbott D.A. Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* / D.A. Abbott, E. Suir, A.J. van Maris, J.T. Pronk // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – 74. – No 18. – P. 5759-5768.

1329. Adamberg K. Quasi steady state growth of *Lactococcus lactis* in glucose-limited acceleration stat (A-stat) cultures / K. Adamberg, P.J. Lahtvee, K. Valgepea et al. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2009. – 95. – No 3. – P. 219-226.

1330. US patent 8551745. Method of producing lactic acid by continuous fermentation / N. Sasaki, K. Morita, T. Mimitsuka et al. Toray Industries, Inc. – 08.10.2013.

1331. Lunelli B.H. Real-time optimization for lactic acid production from sucrose fermentation by *Lactobacillus plantarum* / B.H. Lunelli, D.N. Melo, E.R. de Moraes et al. // *Computers and Chemical Engineering*. – 2011. – 29. – P. 1396-1400.

1332. Itoh Y. Selective production of lactic acid in continuous anaerobic acidogenesis by extremely low pH operation / Y. Itoh, K. Tada, T. Kanno, J. Horiuchi // *J. Biosci. Bioeng.* – 2012. – 114. – No 5. – P. 537-539.

1333. Roukas. T. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fed-batch culture / T. Roukas, P. Kotzekidou // *Enzyme Microb. Technol.* – 1998. – 22. – P. 199–204.

1334. Ding S. L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies / S. Ding, T. Tan // *Process. Biochem.* – 2006. – 41. – P. 1451–1454.

1335. Zhang Y. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production / Y. Zhang, W. Cong, S. Shi // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – 162. – P. 2149–2156.

1336. Zhang Y. Repeated fed-batch lactic acid production in a packed bed-stirred fermentor system using a pH feedback feeding method / Y. Zhang, W. Cong, S.Y. Shi // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2011. – 34. – P. 67–73.

1337. Abdel-Rahman M. A. Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression / M. A. Abdel-Rahman, Y. Xiao, Y. Tashiro et al. // *J. Biosci. Bioeng.* – 2015. – 119. – P. 153-158. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.007

1338. Rangaswamy V. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor / V. Rangaswamy, S.V. Ramakrishna // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – 46. – P. 661–666.

1339. Chang H.N. Multistage high cell continuous fermentation for high productivity and titer / H.N. Chang, N.J. Kim, J. Kang et al. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2011. – 34. – P. 419-431.

1340. Bruno-Bárcena J.M. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems / J.M. Bruno-Bárcena, A.L. Ragout, P.R. Córdoba, F. Siñeriz // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – 51(3). – P. 316-324.

1341. Andrews G.F. A fluidized-bed continuous bioreactor for lactic acid production / G.F. Andrews, J.P. Fonta // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1989. – 20. – P. 375–390.

1342. Gonçalves L. M. D. Inert supports for lactic acid fermentation a technological assessment / L.M.D. Goncalves, M.T.O. Barreto, A.M.R.B. Xavier et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – 38. – P. 305–311.

1343. Guoqiang D. Immobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material pretreated with polyethylenimine / Guoqiang D., Kaul R., Mattiasson B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – 37. – P. 305–310.

1344. Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in biparticle fluidized-bed bioreactor / E.N. Kaufman, S.P. Cooper, M.K. Budner, G.R. Richardson // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1996. – 57-58(1). – P. 503-515.

1345. Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei* / A. Senthuran, V. Senthuran, B. Mattiasson, R. Kaul // *Biotechnol. Bioeng.*, 1997. – 55. – No 6. – P. 841-853.

1346. Cotton J.C. Continuous lactic acid fermentation using plastic composite support biofilm reactor / J.C. Cotton, A.L. Pometto III, J. Gvozdenovic-Jeremic // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – 57. – P. 626-630.

1347. Velázquez A.C. Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* / A. C. Velázquez, A.L. Pometto III, K.L. Ho et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – 55. – P. 434–441.

1348. Tango M.S. A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus* / M.S. Tango, A.E. Ghaly // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 58. – P. 712–720.

1349. Sirisansaneeyakul S. Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1 / S. Sirisansaneeyakul, T. Luangpipat, W. Vanichsriratana et al. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 34. – P. 381–391.

1350. Oh H. Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor / H. Oh, Y.J. Wee, J.S. Yun, H.W. Ryu // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2003. – 107. – P. 603–613.

1351. Mercan E. Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains / E. Mercan, H. Ispirli, D. Sert, M.T. Yilmaz // Arch. Microbiol. – 2015. – 197. – P. 1041–1049. DOI: 10.1007/s00203-015-1141-0

1352. Kim D.H. Effect of temperature on continuous fermentative lactic acid (LA) production and bacterial community, and development of LA-producing UASB reactor / D.H. Kim, W.T. Lim, M.K. Lee, M.S. Kim // Bioresour. Technol. – 2012. – 119. – P. 355–361.

1353. Kim D.H. Effect of hydraulic retention time on lactic acid production and granulation in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor / D.H. Kim, M.K. Lee, M. Chungman et al. // Bioresour. Technol. – 2014. – 165. – P. 158–161.

1354. Kim D.H. Microbial granulation for lactic acid production / D-H. Kim, M-K. Lee, Y. Hwang et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2016. – 113. – P. 101–111. DOI: 10.1002/bit.25540

1355. Linko Y.-Y. Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch / Y.-Y. Linko, P. Javanainen // Enzyme and Microbial Technol. – 1996. – 19(2). – P. 118–123. doi:10.1016/0141-0229(95)00189-1

1356. Parajó J.C. Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation / J.C. Parajó, J.L. Alonso, A.B. Moldes // Food Biotechnology. – 1997. – 11(1). – P. 45–58.

1357. Anuradha R. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid / R. Anuradha, A.K. Suresh, K.V. Venkatesh // Process Biochemistry. – 1999. – 35(3–4). – P. 367–375. doi:10.1016/S0032-9592(99)00080-1

1358. Sreenath H.K. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber / H.K. Sreenath, A.B. Moldes, R.G. Koegel, R.J. Straub // J. of Bioscience and Bioengineering. – 2001. – 92(6). – P. 518–523.

1359. Lee S. Production of lactic acid from paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation / S. Lee, Y. Koo, J. Lin // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* – 2004. – 87. – P. 173-194.

1360. John R.P. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(+)-lactic acid production using *Lactobacilli* / R.P. John., K.M. Nampoothiri, A. Pandey // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2006. – 134. – P. 263-272.

1361. Ohgren K. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover / K. Ohgren, R. Bura, G. Lesnicki, J. Saddler, G. Zacchi // *Process Biochem.* – 2007. – 42. – P. 834-839.

1362. Marques S. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation / S. Marques, J.A.L. Santos, F.M. Gírio, J.C. Roseiro // *Biochem. Engineering J.* – 2008. – 41(3). – P. 210–216. doi:10.1016/j.bej.2008.04.018

1363. Romani A. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges / A. Romani, R. Yáñez, G. Garrote, J.L. Alonso // *Bioresource Technology.* – 2008. – 99(10). – P. 4247-4254.

1364. John R.P. Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production / R.P. John, K.M. Nampoothiri, A. Pandey // *Biotechnol. Advances.* – 2009. – 27(2). – P. 145–152. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.004

1365. Nguyen C.M. D- and L-lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation / C.M. Nguyen, G.J. Choi, Y.H. Choi et al. // *Biochem. Eng. J.* – 2013. – 81. – P. 40-46.

1366. Wang Y. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits / Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto // *J. Biosci. Bioeng.* – 2015. – 119. – P. 10-18.

1367. Deutcher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – 11. – P. 87-93.

1368. Ishola M.M. Simultaneous glucose and xylose utilisation for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast / M.M. Ishola, T. Branbberg, M.J. Taherzadeh // *Biomass Bioenerg.* – 2015. – P. 77. – 192-199.

1369. Kurosawa H. R-Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis* / H. Kurosawa, H. Ishikawa, H. Tanaka // *Biotechnol. Bioengin.* – 1988. – 73(1). – P. 25-34.

1370. Iyer P.V. Simultaneous saccharification and extractive fermentation of lignocellulosic materials into lactic acid in a two-zone fermentor-extractor system / P.V. Iyer, Y.Y. Lee // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1999. – 78. – P. 409-419.

1371. Jarvinen M. Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction / M. Jarvinen, L. Myllykoski, R. Keiski, K.J. Sohlo // *Bioseparation*. – 2000. – 9. – P. 163.

1372. Wasewar K.L. et al. Reactive extraction of lactic acid using Alamine 336 in MIBK: equilibria and kinetics // *J. Biotechnology*. – 2002. – 97. – P. 59-68.

1373. Wasewar K.L. Separation of lactic acid: recent advances // *Chem. Biochem. Eng.* – 2005. – 19. – P. 159-172.

1374. Spiricheva O.V. Lactic acid production by immobilized cells of the fungus *Rhizopus oryzae* with simultaneous product extraction / O.V. Spiricheva, O.V. Sen'ko, D.V. Veremeenko, E.N. Efremenko // *Theor. Foundations of Chem. Engin.* – 2007. – 41. – No 2. – P. 150-153.

1375. Lin J. P. Mathematical model of L-lactic acid fermentation in a RDC coupled with product separation by ion exchange / J.P. Lin, S.D. Ruan, P.L. Cen // *Chem. Eng. Commun.* – 1998. – 168. – P. 59-79.

1376. Moldes A.B. Resin selection and single-step production and recovery of lactic acid from pretreated wood / A.B. Moldes, J.L. Alonso, J.C. Parajó // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2001. – 95(2). – P. 69-81.

1377. Steiber et al. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation: stimulated and experimental dialysate-feed, immobilized-cell systems // *Biotechnol. Bioengin.* – 1981. – 13. – P. 535-549.

1378. Ohashi R. Continuous production of lactic acid molasses by perfusion culture of *Lactococcus lactis* using a stirred ceramic membrane reactor / R. Ohashi, T. Yamamoto, J. Suzuki // *Bioscie. Bioengin.* – 1991. – 87. – No 5. – P. 647-654.

1379. US patent 6204362. Method of purifying whey of lactic acid fermentation by electro dialysis / Calpis Co. Ltd., Япония. – 20.03.2001.

1380. Kwon S. High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor / S. Kwon, I.K. Yoo, W.G. Lee et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2001. – 73. – No 1. – P. 25-34.

1381. EP WO2008EE00018. Process for producing organic acids by continuous fermentation / I. Ilushka, V. Rakitin, V. Shvets et al. – 15.01.2009.

1382. Jeantet R. Semicontinuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nanofiltration membranes / R. Jeantet, J.L. Maubois, P. Boyaval // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 1996. – 19. – P. 614-619.

1383. US patent 5503750. Membrane-based process for the recovery of lactic acid by fermentation of carbohydrate substrates containing sugars / Jr. Russo, J. Lawrence, H.S. Kim – 02.04.1996.

1384. Nishikawa A. Performance of a two-stage fermentor with cell recycle for continuous production of lactic acid / A. Nishikawa, I.L. Dunn // *Bioprocess Eng.* – 1999. – 21 – P. 299–305.

1385. Richter K. An empiric steady state model of lactate production in continuous fermentation with total cell retention / K. Richter, S. Nottelmann // *Engineering in Life Sciences.* – 2004. – 4(5). – P. 426-432.

1386. Maeda T. Enhanced production of lactic acid with reducing excess sludge by lactate fermentation / T. Maeda, T. Yoshimura, T. Shimazu et al. // *J. Hazard Mater.* – 2009. – 168. – No 2-3. – P. 656-663.

1387. Mimitsuka T. A membrane-integrated fermentation reactor system: its effects in reducing the amount of sub-raw materials for D-lactic acid continuous fermentation by *Sporolactobacillus laevolacticus* / T. Mimitsuka, K. Na, K. Morita et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2012. – 76. – P. 67-72. <https://doi.org/10.1271/bbb.110499>.

1388. Olmos-Dichara A. Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment / A. Olmos-Dichara, F. Ampe, J.L. Uribelar-rea et al. // *Biotechnol. Letters.* – 1997. – 19. – No 8. – P. 709-714.

1389. Xavier A.M. Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor / A.M. Xavier, L.M. Conçalves, J.L. Moreira, M.J. Carrondo // *Biotechnol. Bioengin.* – 1995. – 45. – No 4. – P. 320-327.

1390. Carrère H. Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration / H. Carrère, F. Blaszkow // *Process Biochem.* – 2001. – 36. – P. 751-756.

1391. Crespo J.P.S.G. Tangential flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria / J.P.S.G. Crespo, A.M.R.B. Xavier, M.T.O. Barreto et al. // *Chem. Eng. Sci.* – 1992. – 47. – P. 205-214.

1392. Lee R.K. Cell-recycle continuous fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 for economical production of lactic acid by reduction of yeast extract supplementation / R.K. Lee, H.W. Ryu, H. Oh et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – 24. – No 5. – P. 661-666.

1393. Stoeckenius W. Light energy conversion in *Halobacterium halobium* / W. Stoeckenius, Lozier R.H. // *J. Supramol. Struct.* – 1974. – 2. – P. 769–774.

1394. Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of *Halobacteria* / W. Stoeckenius, R.A. Bogomolni // *Annu. Rev. Biochem.* – 1982. – 51. – P. 587-616.

1395. Schulten K. A mechanism for the light-driven proton pump of *Halobacterium halobium* / K. Schulten, P. Tavan. // *Nature.* – 1978. – 212. – P. 85–86.

1396. Khorana H.G. Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons // *J. Biol. Chem.* – 1988. – 263. – No. 16. – P. 7439-7442.

1397. Khorana H.G. Two light-transducing membrane proteins: bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin // *PNAS.* – 1993. – 90. – P. 1166-1171.

1398. Stoeckenius W. Bacterial rhodopsins: evolution of a mechanistic model for the ion pumps // *Protein Sci.* – 1999. – 8. – No. 2. – P. 447-459.

1399. Lanyi J.K. Molecular mechanism of ion transport in bacteriorhodopsin: insights from crystallographic, spectroscopic, kinetic, and mutational studies // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – 104. – No 48. – P. 11441-11448.

1400. Lanyi J.K. Bacteriorhodopsin: a special issue // *Biochim. Biophys. Acta* – 2000. – 1460. – P. 1-239.

1401. Haupts U. Closing on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule / U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1999. – 28. – P. 367–399.

1402. Schafer G. Bioenergetics of the archaea / G. Schafer, M. Engelhardt, V. Müller // *Microbiol. and Molecul. Biol. Reviews.* – 1999. – P. 570-620.

1403. Balashov S.P. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin (Review) // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2000. – 1460. – P. 75-94.

1404. Oesterhelt D. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // *Nature New Biology.* – 1971. – 233(39). – P. 149-152.

1405. Oesterhelt D. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // In: *Methods in enzymology* (ed. S. Fleisher, L.Packer, D.W.Ecta ). – NY-L-Melbourne, Acad.Press, 1974. – 31, Biomembranes, Part A. – P. 667-678.

1406. Oesterhelt D. *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // *Meth. Enzymol.* – 1974. – 31. – P. 667–678.

1407. Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin and related pigments of *Halobacteria* / W. Stoeckenius, R.H. Lozier, R.A. Bogomolni // *Biochim. Biopys. Acta.* – 1979. – 505. – No 3. – P. 215-278.

1408. Konishi T. Biosynthesis and assembly of purple membrane of *Halobacterium halobium* S9: light stimulation of bacteriorhodopsin formation / T. Konishi, M. Seki // *Photochem. Photobiol.* – 1981. – 33. – No. 4. – P. 441-447.

1409. Миронова Е.В. Биосинтетическое получение аналогов бактериородопсина. / Дисс. ... канд. хим. наук. – М: МГАТХТ им. М.В. Ломоносова, 2002 г.

1410. Becher B.M. Improved isolation procedures for the purple membrane of *Halobacterium halobium* / B.M. Becher, J.Y. Cassi // Preparative Biochemistry. – 1975. – 5 (2). – P. 161-178.

1411. Складнев Д.А. Природные энергетические биосистемы галобактерий *Halobacterium salinarum* для нанобиофотоники / Д.А. Складнев, М.П. Темирязева, А.Б. Пшеничникова, В.И. Швец // Российские нанотехнологии. – 2010. – № 5. – С. 82-86.

1412. Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin as a light driven proton pump. In: Membrane proteins in transport and phosphorylation / G.S. Azzone, M.E. Klingenberg, E. Qiiagliariello, N. Siliprandi // Elsevier, North/Holland, Amsterdam. – 1974. – P. 79-84.

1413. Oesterhelt D. Reconstitution of the retinal proteins bacteriorhodopsin and halorhodopsin. // Methods. Enzymol. – 1982. – 88. (Pt. 2). – P. 10-17.

1414. Oesterhelt D. Photophosphorylation and reconstitution of photophosphorylation in halobacterial cells // Methods Enzymol. – 1982. – 88. – P. 349-355.

1415. Lozier R.H. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium* / R.H. Lozier, R.A. Bogomolni, W. Stoeckenius // Biophys. J. – 1975. – 15. – P. 955–962.

1416. Lanei J.K. Light energy conversion in *Halobacterium halobium* // Microbiol. Rev. – 1978. – 42. – N. 4. – P. 682-706.

1417. Lanyi J.K. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps // Nature – 1995. – 375. – P. 461– 463.

1418. Lanyi J.K. Mechanism of ion transport across membranes. Bacteriorhodopsin as a prototype for proton pumps // J. Biol. Chem. – 1997. – 272. – No 50. – P. 31209–31212.

1419. Lanyi J.K. Understanding structure and function in the light-driven proton pump bacteriorhodopsin // J. Struct. Biol. – 1998. – 124. – P. 164-178.

1420. Lanyi J.K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle // Biochimica et Biophysica Acta. – 2006. – P. 1012-1018.

1421. Krebs M. P. Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin / M.P. Krebs, Khorana H.J. // J. Bacteriol. – 1993. – 175. – P. 1555–1560.

1422. Govindjee R. The quantum efficiency of proton pumping by the purple membrane of *Halobacterium halobium* / R. Govindjee, T.G. Ebtrej, A.R. Crofts // Biophys. J. – 1980. – 30. – P. 231-242.

1423. Toth-Boconadi R. Electric signals of light exited bacteriorhodopsin mutant D96N / R. Toth-Boconadi, S.G. Taneva, L. Keszthelyi // J. Photochemistry and Photobiology. B. Biology. – 2001. – 65. – P. 122-126.

1424. Gergely C. Study of the photocycle and charge motions of the bacteriorhodopsin mutant D96N / C. Gergely, Ganea C., Groma G.I., G. Va'ro' // *Biophys. J.* – 1993. – 65. – P. 2478–2483.

1425. US Patent, 5518858 Photochromic compositions and materials containing bacteriorhodopsin / T.V. Dyukova, N.N. Vsevolodov. – 1994.

1426. Lukashov E.P. Bacteriorhodopsin retains its light-induced proton pumping function after being heated to 140°C / E.P. Lukashov, B. Robertson // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1995. – 37. – N. 2. – P. 157-160.

1427. Maeda A. Relocation of internal bound water in bacteriorhodopsin during the photoreaction of M at low temperatures: an FTIR study / A. Maeda, F.L. Tomson, R.B. Gennis et al. // *Biochemistry.* – 2000. – 39. – P. 10154-10162.

1428. Brown L.S. Proton transport mechanism of bacteriorhodopsin as revealed by site specific mutagenesis and protein sequence variability // *Biochemistry.* – 2001. – 66. – No. 11. – P. 1249-1255.

1429. Gillespie N.B. Characterization of the branched-photocycle intermediates P and Q of bacteriorhodopsin / N.B. Gillespie, K.J. Wise, L. Ren et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – 106. – P. 13352-13361.

1430. Szundi I. / I. Szundi, W. Stoeckenius. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. 84:3681-3684.

1431. Vsevolodov N.N. Biological light-sensitive complexes as technical information photocarriers / N.N. Vsevolodov, G.R. Ivanitskii // *Biophysics.* – 1985. – 30(5). – P. 962-967.

1432. F.T. Hong The Bacteriorhodopsin model membrane system as a prototype molecular computing element // *Biosystems.* – 1986. – 19. – P. 223-236.

1433. Birge R.R. Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins // *Annual Review of Physical Chemistry.* – 1990. – 41. – P. 683 -733.

1434. Hampp N. Bacteriorhodopsin wild type and variant aspartate-96-asparagine as reversible holographic media / N. Hampp, C. Brauchle, D. Oesterhelt // *Biophys. J.* – 1990. – 58. – N. 6. – P. 83-93.

1435. Conrad M. Molecular computing // In M.C. Yovits, editor. *Advances in Computers.* – Academic Press: San Diego, 1990. – 31. – P. 235-324.

1436. Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing / D. Oesterhelt, C. Bräuchle, N. Hampp // *Quarterly reviews of biophysics.* – 1991. – 24. – N 4. – P. 425-478.

1437. Brauchle C. Optical applications of bacteriorhodopsin and its mutated variants / C. Brauchle, N. Hampp, D. Oesterhelt // *Adv. Mater.* – 1991. – 3. – N 9. – P. 420-428.

1438. Gross R.B. Holographic thin films, spatial light modulators and optical associative memories based on bacteriorhodopsin / R.B. Gross, K. Can Izgi, R.R. Birge // *Proc. SPIE.* – 1992. – 1662. – P. 186-196.

1439. Hampp N. Mutated bacteriorhodopsins versatile media in optical image processing / N. Hampp, D. Zeisel // *IEEE Engineering in Medicine and Biology.* – 1994 – 13. – P. 67-111.

1440. Hillebrecht J.R. Optimizing photoactive proteins for optoelectronic environments by using directed evolution / J.R. Hillebrecht, J.F. Kosciielecki, K.J. Wise et al. // *NanoBioTechnology: BioInspired Devices and Materials of the Future.* Edited by: Oded Shoseyov and Ilan Levy. Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 1994. – P. 121-140.

1441. *Molecular and Biomolecular Electronics* // Birge R.R., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC. – 1994.

1442. Rothschild K.J. Bacteriorhodopsin: new biophysical perspectives / K.J. Rothschild, S. Sonar // In: W.M. Horspool, P.-S. Song (Eds.), *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, CRC Press, London, 1995 – P. 1521-1544.

1443. Nicolini C. From neural chip and engineering biomolecules to bioelectronic devices: an overview // *Biosensors and Bioelectronics.* – 1995. – 10. – P. 105-127.

1444. *Biomolecular Electronics.* – Springer-Verlag, 1997, 275 p.

1445. Birge R.R. Biomolecular electronics: protein-based associative processors and volumetric memory / R.R. Birge, N.B. Gillespie, E.W. Izaguirre et al. // *J. Phys. Chem.* – 1999. – 103 B. – N 49. – P. 10746-10766.

1446. Hampp N. Biotechnological applications and potentials of halophilic microorganisms. 11.1. Introduction. Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories // *Chem. Rev.* – 2000. – 100. – P. 1755-1776.

1447. Frydrych M. Color sensitive retina based on bacteriorhodopsin / M. Frydrych, P. Silfsten, S. Parkkinen et al. // *Biosystems.* – 2000. – 54(3). – P. 131-140.

1448. Korchemskaya E. Dynamic polarization holography for exploring photoinduced reactions in bacteriorhodopsin / E. Korchemskaya, D. Stepanchikov // *Optical Memory and Neural Networks.* – 2001. – 10. – P. 137-146.

1449. Wise K.J. Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices / K.J. Wise, N.B. Gillespie, J.A. Stuart et al // *Trends in Biotech.* – 2002. – 20. – N 9. – P. 387-394.

1451. Renugopalakrishnan V. BioFold's high performance bacteriorhodopsin 192-based storage devices / V. Renugopalakrishnan, A. Strzelczyk, A.A. Mokhnatyuk et al. // *Insight.* – 2002. – 11. – P. 14-19.

1452. Renugopalakrishnan V. Retroengineering bacteriorhodopsins: Design of smart proteins by bionanotechnology / V. Renugopalakrishnan, A. Strzelczyk, P. Li et al. // *Int. J. Quantum Chemistry*. – 2003. – 95 (4-5). – P. 627-631.

1453. Адамов Г.Е. Материалы на основе бактериородопсина как основа реверсивных сред для динамической голографии / Г.Е. Адамов, Л.Н. Гнатюк, И.С. Голдобин и др. // Материалы IX Международной научно-технической конференции «Высокие технологии в промышленности России (материалы и устройства электронной техники)», 2003. – С. 114-119.

1454. Hillebrecht J.R. Directed evolution of bacteriorhodopsin for device applications / J.R. Hillebrecht, K.J. Wise, R.R. Birge // *Meth. Enzymol.* – 2004. – 388. – P. 333-347.

1455. Hampp N. Chapter 11. Nanobiotechnology enables new opportunities in material sciences: bacteriorhodopsin as a first example // In *Bionanotechnology*. V. Renugopalakrishnan et al. (eds.). – 2006. – P. 209-216.

1456. Lindvold L. Chapter 6. A projection display based on a bacteriorhodopsin thin film / L. Lindvold, H. Luasen // In *Bionanotechnology*. V. Renugopalakrishnan et al. (eds.). – 2006. – P. 79-96.

1457. Xi B. Bacteriorhodopsin-based 3D optical memory / B. Xi, K.J. Wise, J.A. Stuart, R.R. Birge // In *Bionanotechnology*. V. Renugopalakrishnan (eds.): Springer Verlag. – 2005. – P. 39-59.

1458. Adamov G.E. Bacteriorhodopsin – perspective biomaterial for molecular nanophotonics / G.E. Adamov, A.G. Devyatkov, L.N. Gnatyuk et al. // *J. Photochem. Photobiol.* – 2008. – No 196. – P. 254-261.

1459. Складнев Д.А. Перспективы применения фоточувствительного белка бактериородопсина в наносистемах биоэлектронного и оптического назначения / Д.А. Складнев, Н.Ю. Шкарин, В.П. Садовников // *Экологические системы и приборы*. – 2008. – 10. – С. 3–8.

1460. Al-Arife Kh. Photo-responsive hydrogel valve for controlling flow through microchannels // Graduate Seminar, Dept. of Mechanical & Materials Engineering, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, Sept. 15. – 2008.

1461. Skladnev D.A. Natural bioenergetics systems of halobacteria *Halobacterium salinarum* for Nanobiophotonics / D.A. Skladnev, M.P. Temiryazeva, A.B. Pshenichnikova, V.I. Shvets // *Nanotechnologies in Russia*. – 2010. – 5(5–6). – 399–408.

1462. Ovchinnikov Y.A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview / Y.A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, M.Y. Feigina et al. // *FEBS Lett.* – 1979. – 100. – 219–224.

1463. Balashov S.P. Photochemical conversions of bacteriorhodopsin / S.P. Balashov, Litvin F.F. // *Biophysics*. – 1981. – 26. – P. 566–581.

1464. Munich Innovative Biomaterials GmbH (MIB), [www.mib-biotech.de](http://www.mib-biotech.de)

1465. [www.archiv.ub.uni-marburg.de](http://www.archiv.ub.uni-marburg.de)

1466. <http://nikofarm.ru/>

1467. Патент РФ № 2300202. Кормовая добавка для животных / Е.П. Гребенников, А.И. Климов, С.В. Сеницын, В.И. Аринович. – 10.06.2007.

1468. Патент РФ 2370957. Препарат «БИОС» – стимулятор роста и развития растений // С.А. Тюрин, М.С. Муха, О.В. Погорелов – 27.10.2009.

1469. Азизова О. Галофильные бактерии - новый источник биологически активных веществ // [www.cmjournal.com/rus\\_page404.htm](http://www.cmjournal.com/rus_page404.htm)

1470. Schiraldi C. Perspectives on biotechnological applications of archaea / C. Schiraldi, M. Giulliano, M. de Rosa // *Archaea*. – 2002. – 1. – P. 75–86.

1471. Ramos-Cormenzana A. Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms // In: M.C. Da Costa, J.C. Duarte, R.A.D. Williams (eds.). *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. – Elsevier Applied Science, London, 1989. – P. 289-309.

1472. Rodriguez-Valera F. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods / F. Rodriguez-Valera, G. Juez, D.J. Kushner // *Can. J. Microbiology*. – 1982. – 28. – P. 151-154.

1473. Rodriguez-Valera F. Biotechnological potential of halobacteria // In: M.J. Danson, D.W. Hough, G.G. Lund (Eds.). *The Archaeobacteria: biochemistry and biotechnology*. Biochemical Society Symposium no. 58. Biochemical Society. – High Holburn, London, 1992. – P. 135-147.

1474. Rodriguez-Valera F. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates / F. Rodriguez-Valera, J.G. Lillo // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1992. – 103. – No 2. – P. 181-186.

1475. Galinski E.A. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms / E.A. Galinski, B.J. Tindall // In: *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*, eds. Herbert R.D. and Sharp R.J. – London: Blackie, 1992. – P. 76-114.

1476. Ryu K. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile / K. Ryu, J. Kim, J.S. Dordick // *Enzyme Microb. Technol.* – 1994. – 16. – N. 4. – P. 266-275.

1477. Ventosa K. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms / K. Ventosa, J.J. Nieto // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – 11. – P. 85-94.

1478. Ventosa A. *Halobacterium salinarum* nom. corrig., a name to replace *Halobacterium salinarium* (Elazari-Volcani) and to include *Halobacterium halobium* and *Halobacterium cutirubrum* / A. Ventosa, A. Oren // Int. J. Syst. Microbiol. – 1996. – 46. – P. 347.

1479. Andreeva N.A. Inorganic polyphosphates and phosphohydrolases in *Halobacterium salinarium* / N.A. Andreeva, T.V. Kulakovskaya, I.S. Kulaev // Microbiology. – 69. – No. 4. – 2000. – P. 411-416.

1480. Margesin R. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology / R. Margesin, F. Schinner // Extremophiles. – 2001. – 5. – N. 2. – P. 73-83.

1481. O'Conner E.M. Halocins and sulfobiocins: the emerging study of archaeal protein and peptide antibiotics / O'Conner E.M., Shand R.F. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 28. – P. 381-386.

1482. Shand R.F. Detection, quantification and purification of halocins: peptide antibiotics from haloarchaeal extremophiles // In: Rainey F.A., Oren A. (eds.). Extremophiles. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Methods in Microbiology. – 2006. – 35. – P. 703-718.

1483. Seema T. Different proposed applications of bacteriorhodopsin / T. Seema, P. Ch. Om, G. Jitendra // Recent Patents on DNA & Gene Sequences. – 2011. – No 5. – P. 35-40.

1484. Rodrigo-Banos M. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology // Marine Drugs. – 2015. – 13. – No 9. – P. 5508–5532.

1485. Humphrey W. Photoproducts of bacteriorhodopsin mutants: a molecular dynamics study / W. Humphrey, E. Bamberg, K. Schulten // Biophysical J. – 1997. – 72. – P. 1347-1356.

1486. Isenbarger T.A. Role of helix-helix interactions in assembly of the bacteriorhodopsin lattice / T.A. Isenbarger, M.P. Krebs // Biochemistry. – 1999. – 38. – P. 9023-9030.

1487. US patent 5989587. Formation of stable liposomes from lipid extracts of archaeobacteria / C.G. Choquet, G.B. Patel, I. Ekiel, G.D. Sprott – 23.11.1999.

1488. Половникова О.Ю. Реконструкция пурпурных мембран из делипидированного бактериородопсина с использованием эндогенных и экзогенных липидов. Влияние структурных и внешних факторов / О.Ю. Половникова, Т.Н. Симонова, Ю.С. Тараховский и др. // Биол. мембраны. – 1995. – 12. – № 3. – С. 260-277.

1489. Чекулаева Л.Н. Технологический регламент выращивания галофильных микроорганизмов на установке "ГАЛОФИЛ".

1490. DasSarma S. High-frequency spontaneous mutation in the bacterioopsin gene in *Halobacterium halobium* is mediated by transposable elements / S. DasSarma, U.L. RajBhandry, H.G. Khorana // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – 80. – P. 2201-2205.

1491. Pfeifer F. Genetic variability in *Halohaclerium halobium* / F. Pfeifer, G. Weidinger, W. Goebel // J. Bacteriol. – 1981. – 145. – P. 375-381.

1492. Pfeifer F. Characterization of plasmids in halobacteria / F. Pfeifer, G. Weidinger, W. Goebel // J. Bacteriol. – 1981. – 145. – P. 369-374.

1493. Ghasemi M.F. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685 / M.F. Ghasemi, A. Shodjai-Arani, N. Moazami // Process Biochemistry. – 2008. – 43. – P. 1077-1082.

1494. Gibbons N.E. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria // Methods in Microbiology. B. – 1969. – 3. – P. 169-183.

1495. Kushner D.J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. // In Microbial life in extreme environments. / Eds. Kushner D.J. London: Academic Press. – 1978. – P. 317-368.

1496. Hochstein L.I. The physiology and metabolism of the extremely halophilic bacteria // In Halophilic Bacteria, ed Rodriguez-Valera P. – Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. – P. 67-83.

1497. Grant W.D., Gemmell R.T., McGenity T.J. Halophiles. Microbial life in extreme environments. – Wiley-Liss. New York, NY, 1998. – P. 93-132.

1498. Oren A. 1994. The ecology of the extremely halophile archaea // FEMS Microbiol. Rev. – 13. – P. 415-440.

1499. Oren A. Life at high salt concentration // Prokaryotes. – 2006. – 2. – P. 263-282. DOI: 10.1007/0-387-30742-7\_9.

1500. Larsen H. Biochemical aspects of extreme halophilism // Advan.Microbiol. – 1967. – 1. – P. 97-132.

1501. Fendrihan S. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival / S. Fendrihan, A. Legat, M. Pfaffenhuemer et al. // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2006. – No 5. – P. 203–218. DOI 10.1007/s11157-006-007-y

1502. Tindall B.J. The family *Halobacteriaceae* // The Prokaryotes, 2nd ed. / Eds. Balow A. et al. – New York: Springer-Verlag, 1992. – P. 782.

1503. DasSarma S. Genomic perspective on the photobiology of halobacterium species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. Minireview / S. DasSarma, S.P. Kennedy, B. Berquist et al. // Photosynthesis Research. – 2001. – 70. – P. 3-17.

1504. Kis-Paro T. Halocins: are they important in the competition between different types of halobacteria in saltern ponds? / T. Kis-Paro, A. Oren // Extremophiles. – 2000. – 4. – P. 35-41.

1505. Ng W.V. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 / W.V. Ng, S.P. Kennedy, G.G. Mahairas et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – 97. – P. 12176-12181.

1506. Kennedy S.P. Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its environment through computational analysis of its genome / S.P. Kennedy, W.V. Ng, S. Salzberg, L. Hood, S. DasSarma // *Genome Res.* – 2001. – 11. P. 1641-1650.

1507. Weber H.J. The Halobacterium group: Microbiological methods / H.J. Weber, S. Sarma, T. Leighton // *Method in enzymol.* – 1982. – 88. – P. 369-373 (Chapter 48).

1508. Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – 63. – No 2. – P. 334-348.

1509. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – 28. – No 1. – P. 56–63.

1510. Oesterhelt D. Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants / D. Oesterhelt, G. Krippahl // *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* – 1983. – 134 B. – No 1. – P. 137-150.

1511. Лобырева Л.Б. / Л.Б. Лобырева, Р.С. Фельдман, В.К. Плакунов // *Микробиология.* – 1987. – 56. – № 2. – С. 189-193.

1512. Лобырева Л.Б. / Л.Б. Лобырева, Р.С. Фельдман, В.К. Плакунов // *Микробиология.* – 1987. – 56. – № 1. – С. 16-20.

1513. Baryshev V.A. / V.A. Baryshev, A.N. Glagolev, V.P. Skulachev // *Nature.* – 1981. – 292. – P. 338-340.

1514. Синещеков В.А. / В.А. Синещеков, Ф.Ф. Литвин // *Биофизика.* – 1987. – 32. – № 3. – С. 540-553.

1515. Bayley S.T. Strategies of microbial life in extreme environments / S.T. Bayley, R.A. Morton // ed. M. Shilo. – Verlag Chemie, Weinheim, 1979. – P. 109-124.

1516. Kelly M. Bacterial carotenoids. XXXI. C<sub>50</sub>-carotenoids. 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially bacterioruberin / M. Kelly, S. Norgard, S. Liaaen-Jensen // *Acta Chem. Scand.* – 1970. – 24. – P. 2169-2182.

1517. Stoeckenius W. / Stoeckenius W., Rowen R. // *J. Cell. Biol.* – 1967. – 34. – P. 365-392.

1518. Shahmohammadi H.R. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents / H.R. Shahmohammadi, E. Asgarani, H. Terato et al. // *J. Radiat. Res. (Tokyo).* – 1998. – 39. – N. 4. – P. 251-262.

1519. Gochnauer M.B. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria / M.B. Gochnauer, D.J. Kushner // *Canad. J. Microbiol.* – 1969. – 15. – P. 1157-1165.

1520. Onishi H. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria / H. Onishi, M.E. McCance, N.E. Gibbons // *Canad. J. Microbiol.* – 1965. – 11. – P. 365-373.

1521. Kamekura M. Lysis of halobacteria in bacto peptone by bile acids / M. Kamekura, D. Oesterhelt, R. Wallace et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – 54. – P. 990-995.

1522. Dundas I.D. A chemically defined medium for *Halobacterium salinarium* strain 1 / I.D. Dundas, V.R. Srinivasan, H.O. Halvorsson // *Can. J. Microbiol.* – 1963. – 9. – P. 619-625.

1523. Kushner D.J. Halophilic bacteria // *Advances in Appl. Microbiol.* – 1968. – 10. – P. 73-99.

1524. Grey V.L. An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum* / V.L. Grey, P.S. Fitt // *Can. J. Microbiol.* – 1976. – 22. – No 3. – P. 440-442.

1525. Young S.U. The effects of glycerol and growth conditions on the production of bacteriorhodopsin by *Halobacterium halobium* R1 / S.U. Young, T.P. Joon, Y.L. Sang, N.C. Ho // *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* – 1997. – 3. – P. 309-313.

1526. Hartmann R. Anaerobic growth of halobacteria / R. Hartmann, H.-D. Sickinger, D. Oesterhelt // *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*. – 1980. – 77. – P. 3821-3825.

1527. Baliga N.S. Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp. Analyzed by a global systems approach / N.S. Baliga, M. Pan, Y.A. Goo et al. // *PNAS.* – 2002. – 99. – No. 23. – P. 14913-14918.  
[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192558999](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192558999)

1528. Yasuo M. Halobacterial rhodopsins / M. Yasuo, I. Kunio, T. Takeshi, S. Yasuo // *J. Biochem.* – 1999. – 125. – P. 649-657.

1529. Sherwood J.E. A standard table for predicting equilibrium dissolved oxygen concentrations in salt lakes dominated by sodium chloride / J.E. Sherwood, F. Stagnitti, M.J. Kokkinn, W.D. Williams // *Int. J. Salt Lake Res.* – 1992. – 1. – P. 1-6.

1530. Sumper M. Biosynthesis of the purple membrane of halobacteria / M. Sumper, W. Reitmeier, D. Oesterhelt // *Angew. Chemie, Intern. Ed. Engl.* – 1976. – 15. – P. 187-194.

1531. Rogers P.J. Regulation of bacteriorhodopsin synthesis by growth rate in continuous culture of *Halobacterium halobium* / P.J. Rogers, C.A. Morris // *Arch. Microbiol.* – 1978. – 119. – P. 323-325.

1532. Gropp F. The *bat* gene of *Halobacterium halobium* encodes a trans-acting oxygen inducibility factor / F. Gropp, M.C. Betlach // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – 91. – P. 5475-5479.

1533. Deshpande A. Bacteriorhodopsin-triggered Retinal Biosynthesis is inhibited by bacteriorhodopsin formation in *Halobacterium salinarum* / A. Deshpande, S. Sonar // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274. – No. 33. – P. 23535-23540.

1534. Baliga N.S. Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon / N.S. Baliga, S.P. Kennedy, W.V. Ng et al. // *PNAS.* – 2001. – 27(5). – P. 2521-2525.

1535. Manikandan M. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology / M. Manikandan, L. Pašić, V. Kannan // *Bioresource Technology*. – 2009. – 100. – P. 3107-3112.

1536. Oren A. Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in a solar saltern by the use of bile salts // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1990. – 73. – P. 41-48.

1537. Oren A. Starch counteracts the inhibitory action of bacto peptone and bile salts in media for the growth of halobacteria // *Can. J. Microbiol.* – 1990. – 36. – P. 299-301.

1538. Bardavid R.E. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in salten crystallizer ponds / R.E. Bardavid, P. Khristo, A. Oren // *Extremophiles*. – 2008. – 12. – P. 5-14. DOI 10.1007/s00792-006-0053-y

1539. Lee S.Y. Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of *Halobacterium halobium* / S.Y. Lee, H.N. Chang, Y.S. Um, S.H. Hong // *Biotechnol. Letters*. – 20. – No 8. – 1998. – P. 763–765.

1540. Shand R.F. Expression of the *bop* gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light / R.F. Shand, M.C. Betlach // *J. Bacteriol.* – 1991. – 173. – No. 15. – P. 4692-4699.

1541. Peck R.F. *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium* / R.F. Peck, C. Echavarri-Erasun, E.A. Johnson et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276. – P. 5739-5744

1542. Baliga N.S. Systems level insight into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1 / Baliga N.S., Bjork S.J., Bonneau R. et al. // *Genome Res.* – 2004. – 14. – P. 1025–1035.

1543. Kushner D.J. The Halobacteriaceae // In: *The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. VIII. Archaeobacteria.* C.R. Woese and R.S. Wolfe (eds). – Academic Press. Orlando, FL, 1985. – P. 171-214.

1544. Lanyi J. Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase / J. Lanyi, J. Stevenson // *J. of Bacteriology*. – 1969. – 98. – P. 611-616.

1545. Brown-Peterson N.J. Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium* / N.J. Brown-Peterson, M.L. Salin // *J. of Bacteriology*. – 1995. – 177. – 2. – P. 378-384.

1546. Reindel S. Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the archaeon *Halobacterium salinarum* / S. Reindel, C.L. Schmidt, S. Anemüller, B.F. Matzanke // *BioMetals*. – 2006. – 19. – P. 19-29. DOI: 10.1007/s10534-005-3682-1

1547. Berquist B.R. Comparative genomic survey of information transfer systems in two diverse extremely halophilic archaea, *Halobacterium* sp. strain NRC-1 and *Haloarcula*

*marismortui* / B.R. Berquist, J. Soneja, S. DasSarma // In: N. Gunde-Cimerman et al. (eds.). Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. – 2005. – P. 151-183.

1548. Wilson C. DNA-repair potential of *Halomonas* spp. from the salt plains microbial observatory of Oklahoma / C. Wilson, T.M. Caton, J.A. Buchheim et al. // Microbial Ecology. – 2004. – 48. – P. 541-549. DOI: 10.1007/s00248-004-0243-z

1549. Sharma N. Photoreactivation in pigmented and non-pigmented extreme halophiles / N. Sharma, D. Hepburn, P.S. Fitt // Biochem. Biophys. Acta. – 1984. – 799. – P. 135-142.

1550. Iwasa T. Photoreactivation of *Halobacterium halobium*: action spectrum and role of pigmentation / T. Iwasa, S. Tokutomi, F. Tokunaga // Photochem. Photobiol. – 198. – 47. – No 2. – P. 267-270.

1551. J. Huang. Effects of dietary riboflavin levels on antioxidant defense of the juvenile grouper *Epinephelus coioides* / J. Huang, L. Tian, X. Wu, H. Yang and Y. Liu. // Fish Physiology and Biochemistry. – 2008. – 36. – No 1. – P. 55-62.

1552. US patent 7022524. Increasing plant growth with luminol /D.A. Joseph, C.M. Sanborn, R. James – 04.04.2006.

1553. WO 9107168. Riboflavin as a tanning enhancer / P.A. Agin. – 30.05.1991.

1554. Shen L. Computational note on the photosensitization mechanisms of riboflavin / L. Shen, H.F. Ji, H.Y. Zhang / J. Mol. Struct. (Theochem) – 2007. – 821. – P. 171–172.

1555. Hong-Fang J. A DFT Study on deactivation of triplet excited state riboflavin by polyphenols / J. Hong-Fang, Shen L. // Int. J. Mol. Sci. – 2008. – 9(10). – P. 1908–1914.

1556 Алейников Т.Л. / Т.Л. Алейников, Л.В. Авдеева, Л.Е. Андрианова и др. // Биохимия: Учеб. для вузов, под ред. Е.С. Северина. – Гэотар-Медиа, 2003. – 779 с.

1557. Nudler E. The riboswitch control of bacterial metabolism / E. Nudler, A.S. Mironov // Trends in Biochem. Sci. – 2004. – 29. – P. 11-17.

1558. Миронов А.С. Фундаментальные и прикладные аспекты исследования регуляции оперона биосинтеза рибофлавина у бацилл / А.С. Миронов, С.Ю. Еремина // Биотехнология. – 2007. – No 5. – С. 7-13.

1559. Mironov A.S. / A.S. Mironov, D.V. Karelov, I.M. Solovieva et al. Relationship between the secondary structure and the regulatory activity of the leader region of the riboflavin biosynthesis operon in *Bacillus subtilis* // Russian Journal of Genetics. – 2008. – 44. – No. 4. – P. 467–473.

1560. Koh Y.S. The reversed *SoxS*-binding site upstream of the *ribA* promoter in *Escherichia coli* / Y.S. Koh, W.-H. Chung, J.-H. Lee, J.-H. Roe // Springer-verlag. – 1990. – P. 374-380.

1561. Koh Y.S. et al. Regulation of the *ribA* gene encoding GTP cyclohydrolase II by the *soxRS* locus in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. – 1996. – 251. – No 5. – P. 591-598.

1562. Cao M. *Bacillus subtilis* paraquat resistance is directed by *sigM*, an extracytoplasmic function sigma factor and is conferred by *YqjL* and *BcrC* / M. Cao, C.M. Moore, J.D. Helmann // J. of Bacteriology. – 2005. – 187. – No. 9. – P. 2948–2956.

1563. <http://subtiwiki.uni-goettingen.de/wiki/index.php/YqjL>

1564. Stahmann K.P. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production / K.P. Stahmann, J.L. Revuelta, H. Seulberger // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 53(5). – P. 509-516.

1565. Schlösser T. Growth stress triggers riboflavin overproduction in *Ashbya gossypii* / T. Schlösser, A. Wiesenburg, C. Gätgens et al. // Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 76. – 569-578. DOI: 10.1007/s00253-007-1075-9

1566. WO9201060. A fermentation process for riboflavin-producing organisms / Daley R.B., Lauderdale G. W., Heefner D.L. et al. – 23.01.1992.

1567. US patent 2005244919. Method of producing riboflavin / Abe K., Nitta H., Park E.

1568. Bretzel W. Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis / W. Bretzel, W. Schurter, B. Ludwig et al. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – 22. – P. 19-26.

1569. EP1426450. Microorganisms and process for the production of riboflavin by fermentation / Lee K.H., Choi H., Lee K.H. et al. – 09.06.2004.

1570. Патент РФ 2261273. Способ получения рибофлавина, штамм *Bacillus subtilis* – продуцент рибофлавина (варианты) / А.С. Миронов, Н.В. Королькова, Л.Л. Эррайс и др. – 2002.

1571. Биоценоз в природе и промышленных условиях. Сб. научн. Трудов. / АН СССР. Науч. центр биол. исслед. ИБФМ. – Пущино, 1987. – 114 с.

1572. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высш. шк., 1974. – 214 с.

1573. Фонкен Г. Джонсон Р. Микробиологическое окисление. / Пер. с англ. кандидатов хим. наук Л. В. Модяновой и П. Б. Терентьева; Под ред. проф. А. Н. Коста. – М.: Мир, 1976. – 238 с.

1574. Загорная Н.Б. и др. Микробиологическая очистка надсмольных сточных вод // Биотехнология. – 1993. – № 2. – С. 45-50.

1575. Справочник коксохимика. – М.: Metallургия, 1966. – 391с.

1576. Харлампович Г.Д., Чуркин Ю.В. Фенолы. – М.: Химия, 1974. – 376 с.

1577. Делягин Н.Е. Очистка фенольных сточных вод. – М.: Стройиздат, 1965. – 96 с.
1578. Vázquez I. Simultaneous removal of phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation / I. Vázquez, J. Rodríguez, E. Marañón et al. // *J. Hazard Mater.* – 2006. – 137(3). – P. 1773-80.
1579. Гринберг А.М. Обесфеноливание сточных вод коксохимических производств. – М.: Металлургия, 1968. – 211 с.
1580. Куликов Н.И. Использование специфических культур микроорганизмов для интенсификации очистки сточных вод коксохимического производства / Н.И. Куликов, В.И. Нездойминов, В.А. Пикалова, А.Г. Шевченко // В сб.: Микробиологические методы защиты окружающей среды, Пущино, 1988. – С. 97.
1581. Головлева Л.А. Микробная детоксикация сточных вод коксохимического производства / Л.А. Головлева, З.И. Финкельштейн // *Микробиология.* – 1995. – 64. – № 2. – С. 197-200.
1582. Herrmann A.P. Cofermentation of rutin and hesperidin during two-stage anaerobic pre-treatment of high-loaded brewery wastewater / A.P. Herrmann, H.D. Janke // *Wat. Res.* – 2001. – 35. – No.11. – P. 2583–2588.
1583. Aerobic granular sludge. /Eds: S. Bathe, M.K. de Kreuk, B.S. McSwain, N. Schwarzenbeck. – IWA Publishing, 2005. – 178 p.
1584. de Kreuk M.K. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures / M.K. de Kreuk, M. Pronk, M.C.M. van Loosdrecht // *Water Research.* – 2005. – 39 (18). – P. 4476-4484.
1585. de Kreuk M. Formation of aerobic granules with domestic sewage / M. de Kreuk, M. van Loosdrecht // *J. Environ. Engineering.* – 2006 – 132(6). – P. 694. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2006\)132:6\(694\)](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:6(694))
1586. Ni B.J. Growth and storage processes in aerobic granules grown on soybean wastewater / B.J. Ni, H.Q. Yu // *Biotechnol. Bioeng.* – 2008. – 100. – P. 664–672.
1587. Aerobic Granulation, <http://www.iwawaterwiki.org/xwiki/bin/view/Articles/aerobicgranulation>
1588. Jiang H.L. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol / H.L. Jiang, J.H. Tay, S.T.L. Tay // *Letters in Applied Microbiology.* – 2002. – 35. – P. 439–445.
1589. Norhayati A. Aerobic granular sludge formation for high strength agro-based wastewater treatment / A. Norhayati, U. Zaini, Y. Adibah // *Bioresource Technology.* – 2011. – 102. – N 12. – P. 6778–6781.

1590. Lewandowski G.A. Analysis of sequencing batch bioreactors in large-scale denitrifying applications / G.A. Lewandowski, B.C. Baltzis // *Chem. Eng. Sci.* – 1992. – 47. – P. 2389–2394.

1591. Kuba T. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor / T. Kuba, G.J.F. Smolders, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen // *Wat. Sci. Tech.* – 1993. – 27. – P. 241-252.

1592. Kuba T. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system / T. Kuba, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen // *Water Res.* – 1996. – 30(7). – P. 1702-1710.

1593. Keller J. Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors / J. Keller, K. Subramanian, J. Gosswein, P.F. Greenfield // *Water Sci Technol.* – 1997. – 35(6). – P. 137-144.

1594. Surampalli R.Y. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors / R.Y. Surampalli, R.D. Tyagi, O.K. Scheible, J.A. Heidman // *Biores. Technol.* – 1997. – 61(2). – P. 151-157.

1595. Fernandes Callado N.H. Removal of organic carbon, nitrogen and phosphorus in sequential batch reactors integrating the aerobic/anaerobic processes / N.H. Fernandes Callado, E. Foresti // *Water Sci. Technol.* – 2001. – 44(4). – P. 263-270.

1596. Zeng R.J. Simultaneous nitrification and denitrification and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor / R.J. Zeng, R. Lamaire, Z. Yuan, J. Keller // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – 84(2). – P. 170-178.

1597. Yang S-F. A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater / S-F. Yang, J-H. Tay, Y. Liu // *J. of Biotechnology.* – 2003. – 106. – P. 77-86.

1598. Wantawin C. Autotrophic nitrogen removal in sequencing batch biofilm reactors at different oxygen supply modes // C. Wantawin, J. Juathea, P.L. Noophan, J. Munakata-Marr // *Water Sci Technol.* – 2008. – 58(10). – P. 1889-94.

1599. Zhu G. Biological removal of nitrogen from wastewater / G. Zhu, Y. Peng, B. Li et al. // *Rev Environ Contam Toxicol.* – 2008. – 192. – P. 159-95.

1600. Yilmaz G. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge / G. Yilmaz, R. Lemaire, J. Keller, Z. Yuan // *Biotechnol. Bioengin.* – 2008. – 100. – No. 3. – P. 529-541.

1601. Gobi K. Development and utilization of aerobic granules for the palm oil mill (POM) wastewater treatment / K. Gobi, M.D. Mashitah, V.M. Vadivelu // *Chem. Engin. J.* – 2011. – 174. – P. 213–220.

1602. Wei D. Aerobic granules formation and simultaneous nitrogen and phosphorus removal treating high strength ammonia wastewater in sequencing batch reactor/ D. Wei, L. Shi, T. Yan et al. // *Bioresource Technology*. – 2014. – 171. – P. 211-216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.001>.

1603. Hao T.W. Example study for granular bioreactor stratification: Three-dimensional evaluation of a sulfate-reducing granular bioreactor / T.W. Hao, J.H. Luo, K.Z. Su et al. // *Sci Rep*. – 2016. – 6. – P. 31718.

1604. Zhang D. The anaerobic treatment of nitrite containing wastewater using an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor / D. Zhang, W. Verstraete // *Environ Technol*. – 2001. – 22(8). – P. 905-13.

1605. Imajo U. Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors / U. Imajo, T. Tokutomi, K. Furukawa // *Water Sci. Technol*. – 2004. – 49(5-6). – P. 155-163.

1606. Schmidt J.E. Improved nitrogen removal in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by incorporation of Anammox bacteria into the granular sludge / J.E. Schmidt, D.J. Batstone, I. Angelidaki // *Water Sci. Technol*. – 2004. – 49(11-12). – P. 69-76.

1607. Morgenroth E. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor / E. Morgenroth, T. Sherden, M.C.M. Van Loosdrecht et al. // *Water Res*. – 1997. – 31. – No 12. – P. 3191-3194.

1608. Peng D.C. Aerobic granular sludge – A case report / D.C. Peng, B. Nicolas, D. Jean-Philippe, M. Rene // *Water Resour*. – 1999. – 33(10). – P. 2283-2290.

1609. Wang S-G. Aerobic granules for low-strength wastewater treatment: formation, structure, and microbial community / S-G. Wang, L-H. Gai, L-J. Zhao et al. // *J. Chem. Technol. and Biotechnol*. – 2009. – 84. – N 7. – P. 1015–1020.

1610. Tolker-Nielsen T. Spatial organization of microbial biofilm communities / T. Tolker-Nielsen, S. Molin // *Microbial Ecol*. – 2000. – 40. – P. 75-84.

1611. Bond P.L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors / P.L. Bond, P. Hugenholtz, J. Keller, L. Blackall // *Appl. Environ. Microbiol*. – 1995. – 61. – P. 1910-1916.

1612. Bellouti M. Flocs vs. granules: differentiation by fractal dimension / M. Bellouti, M.M. Alves, J.M. Novais, M. Mota // *Wat. Res*. – 1997. – 31. – P. 1227-1231.

1613. Merzouki M. Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors / M. Merzouki, J.P. Delgenes, N. Bernet et al. // *Curr. Microbiol*. – 1999. – 38. – P. 9-17.

1614. Tay J.H. Specific layers in aerobically grown microbial granules / J.H. Tay, V. Ivanov, S. Pan, S.T.L. Tay // *Lett. Appl. Microbiol*. – 2002. – 34. – P. 254-257.

1615. Yi S. A culture-independent approach for studying microbial diversity in aerobic granules / S. Yi, J.H. Tay, A.M. Maszenan, S.T.L. Tay // *Water Sci. Technology*. – 2003. – 47(1). – P. 283-290.
1616. Li J. Morphological and structural characteristics of aerobic granulation / J. Li, Y. Chen, J. Li et al. // *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* – 2006. – 81. – P. 823–830.
1617. Weber S.D. Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms / S.D. Weber, G. Wanner, W. Ludwig et al. // *Appl. Environ. Microb.* – 2007. – 73. – P. 6233–6240.
1618. Lemaire R. Microbial distribution of *Accumulibacter spp.* and *Competibacter spp.* in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system / R. Lemaire, Z. Yuan, L.L. Blackall, G.R. Crocetti // *Environ. Microbiol.* – 2008. – 10(2). – P. 354–363.
1619. Weber S.D. The diversity of fungi in aerobic sewage granules assessed by 18S rRNA gene and ITS sequence analyses / S.D. Weber, A. Hofmann, M. Pilhofer et al. // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. – 68. – P. 246–254.
1620. Bouhabila E.H. Fouling characterization in membrane bioreactors / E.H. Bouhabila, R. Ben Aim, H. Buisson // *Separation Purification Technology*. – 2001. – No 22-23. – P. 123-132.
1621. Jiang T. The role of blocking and cake filtration in MBR fouling / T. Jiang, M.D. Kennedy, W.G.J. van der Meer // *Desalination*. – 2003. – No 157. – P. 335-343.
1622. Jang N. Comparison of membrane biofouling in nitrification and denitrification for the membrane bioreactor (MBR) / N. Jang, X. Ren, K. Choi, I.S. Kim // *Water Sci. Technology*. – 2005. – 53(6). – P. 43-49.
1623. Oh H.S. Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane / Oh H.S., Yeon K.M., Yang C.S. et al. // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – 46(9). – P. 4877–4884.
1624. Cheong W.S. Isolation and identification of indigenous quorum quenching bacteria, *Pseudomonas sp.* 1A1, for biofouling control in MBR / W.S. Cheong, C.H. Lee, Y.H. Moon et al. // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2013. – 52. – P. 10544–10560.
1625. Oh H-S. Quorum quenching bacteria can be used to inhibit the biofouling of reverse osmosis membranes / H-S. Oh, C.H. Tan, J.H. Low et al. // *Water Research*. – 2017. – 112. DOI:10.1016/j.watres.2017.01.028
1626. Zhang C. Isolation and characterization of seven quorum quenching bacteria for biofouling control in MBR / C. Zhang, S. Zhan, J. Wang et al. // *Clean Techn. Environ. Policy*. – 2017. – 19. – No 4. – P. 991-1001. doi:10.1007/s10098-016-1294-9
1627. Bossier P. Triggers for microbial aggregation in activated sludge / P. Bossier, W. Verstraete // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – 45. – P. 1-6.

1628. O'Flaherty V. Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors / V. O'Flaherty, P.N. Lens, D. de Beer, E. Collesan // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – 47. – P. 102-107.

1629. Wiegant W.M. The Spagetti theory on anaerobic granular sludge fermentation, or the inevitability of granulation // *Processing of the Granular Anaerobic Sludge*. Wageningen, 1998. – P. 146-152.

1630. Liu Y. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor / Y. Liu, H-L. Xu, Sh-F. Yang, J-H. Tay // *Wat. Res.*, 2003. – 37. – P. 661-673.

1631. Schmidt J.E. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors / J.E. Schmidt, B.K. Ahring // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – P. 42. – P. 457-462.

1632. Fang H.H.P. Microbial structure and activity of UASB-granules treating different wastewaters / H.H.P. Fang, H.K. Chui, Y.Y. Li // *Wat.Sci.Tech.* – 1994. – 30(12). – P. 87-96.

1633. Fukuzaki S. High rate performance and characterization of granular methanogenic sludges in upflow anaerobic sludge blanket reactors fed with various defined substrates / S. Fukuzaki, N. Nishio, S. Nagai // *J. of Ferment. and Bioengin.* – 1995. – 79. – No.4. – P. 354-359.

1634. El-Mamouni R. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process / R. El-Mamouni, R. Leduc, S.R. Guiot // *Water Sci. Technol.* – 1998. – 38. – P. 341-347.

1635. Sheng G.P. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review / G.P. Sheng, H.Q. Yu, X.Y. Li // *Biotechnol Adv.* – 2010. – 28. – P. 882-894.

1636. Kalyuzhnyi S.V. Organic removal and microbiological features of UASB-reactor under various organic loading rates / S.V. Kalyuzhnyi, V.I. Sklyar, M.A. Davlyatshina et al. // *Bioresource Technology.* – 1996. – 55. – P. 47-54.

1637. Shen C.F. Long-term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules / C.F. Shen, S.R. Guiot // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – 49. – P. 611-620.

1638. Fang H.H.P. Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects // *Water Sci. Technol.* – 2000. – 42. – P. 201-208.

1639. Ren T.-T. Quantification of the shear stresses in a microbial granular sludge reactor / T.-T. Ren, Y. Mu, L. Liu, X.-Y. Li, H.-Q. Yu // *Water Research.* – 2009. – 43. – Issue 18. – P. 4643-4651.

1640. Schmidt J.E. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors / J.E. Schmidt, B.K. Ahring // *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – 49. – P. 229–246.

1641. MacLeod F.A. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor / F.A. MacLeod, S.R. Guiot, J.W. Costerton // *Appl. Environ. Microbil.* – 1990. – 56. – P. 1598-1607.

1642. Morgan J.W. Internal architecture of anaerobic sludge granules / J.W. Morgan, L.M. Evison, C.F. Forster // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1991. – 50. – P. 211-226.

1643. Guiot S.R. A structured model of the anaerobic granule consortium / S.R. Guiot, A. Pauss, J.W. Costerton // *Water Sci. Technol.* – 1992. – 25. – P. 1-10.

1644. Quarmby J. A comparative study of the structure of thermophilic and mesophilic anaerobic granules / J. Quarmby, C.F. Forster // *Enzyme and Microbial Technology.* – 1995. – 17. – P. 493–498.

1645. Bae J.W. Layered structure of granules in upflow anaerobic sludge blanket reactor gives microbial populations resistance to metal ions / J.W. Bae, S.K. Rhee, S.H. Hyun et al. // *Biotechnol. Lett.* – 2000. – 22. – P. 1935-1940.

1646. Pearson J.P. A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa* / J.P. Pearson, L. Passador, B.H. Iglewski, E.P. Greenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – 92. – P. 1490-1494.

1647. Davies D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson et al. // *Science.* – 1998. – 280. – P. 295-298.

1648. Parsek M.R. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms / M.R. Parsek, E.P. Greenberg // *Trends Microbiol.* – 2005. – 13. – P. 27-33.

1649. Schleypen P. Sequencing batch reactors with continuous inflow for small communities in rural areas in Bavaria / P. Schleypen, I. Michel, H.E. Siewert // *Water Science and Technology.* – 1997. – 35 (1). – P. 269-276.

1650. Beun J.J. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor / J.J. Beun, A. Hendriks, M.C.M. Van Loosdrecht et al. // *Water Res.* – 1999. – 33. – P. 2283–2290.

1651. Beun J.J. Aerobic Granulation in a Sequencing Batch Airlift Reactor / J.J. Beun, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen // *Wat. Res.* – 2000. – 36(3). – P. 702-712.

1652. Shaw C.B. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors / C.B. Shaw, C.M. Carliell, A.D. Wheatley // *Water Research.* – 2002. – 36. – P. 1993-2001.

1653. Шагинурова Г.И. Получение и культивирование гранул аэробных микроорганизмов в отъемно-доливном процессе очистки сточных вод / Г.И. Шагинурова, А.С. Сироткин, В.М. Емельянов, Т. Эггерер // *Биотехнология.* – 2003. – № 3. – С. 80-89.

1654. Fernandes H. Full-scale sequencing batch reactor (SBR) for domestic wastewater: Performance and diversity of microbial communities / H. Fernandes, M.K. Jungles, H. Hoffmann et al. // *Bioresource Technology*. – 2013. – 132. – P. 262-268.

1655. Ketchum J. L. Design and physical features of sequencing batch reactors / J.L. Ketchum // *Water Sci. Technology*. – 1997. – 35 (1). – P. 8-11.

1656. Shin H.-S. Effect of shear stress on granulation in oxygen aerobic upflow sludge blanket reactors / H.-S. Shin, K.-H. Lim, H.-S. Park // *Water Science and Technology*. – 1992. – 26(3-4). – P. 601-605.

1657. Tay J.H. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge reactor / J.H. Tay, Q.S. Liu, Y. Liu // *J. Appl. Microbiol.* – 2001. – 91. – P. 168-175.

1658. Tay J.-H. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules / J.-H. Tay, Q.-S. Liu, Y. Liu // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – 57. – P. 227–233.

1659. Etterer T. Generation and properties of aerobic granular sludge / T. Etterer, P.A. Wilderer // *Water Sci Technol.* – 2001. – 43. – 3. – P. 19-26.

1660. Moy B.Y.P. High organic loading influences the physical characteristics of aerobic granules / B.Y.P. Moy, J.H. Tay, S.K. Toh et al. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2002. – 34. – P. 407-412.

1661. Lin Y.M. Development and characteristics of phosphorous-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors / Y.M. Lin, Y. Liu, J.H. Tay // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003 – 62. – P. 430-435.

1662. Tay J.H. Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance / J.H. Tay, S. Pan, Y.-X. He, S.T.L. Tay // *J. Environ. Eng.* – 2004 – 130. – P. 1094–1101.

1663. Liu Y. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation / Y. Liu, S-F. Yang, J-H. Tay et al. // *Enzyme and Microbial Technol.* – 2004. – 34. – P. 371-379.

1664. Liu Y.-Q. Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules / Y. Liu, J.-H. Tay // *Letters in Applied Microbiology*. – 2005. – 40. – P. 312–315.

1665. Koh K.Y. Effect of seeding sludge type and hydrodynamic shear force on the aerobic sludge granulation in sequencing batch airlift reactors / K.Y. Koh, K.H. Kueh, K.T. Loh // *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* – 2009. – 4. – P. 826–831.

1666. Li A-J. Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules / A-J. Li, X-Y. Li, H-Q. Yuc // *Process Biochem.* – 2011. – 46. – P. 2269–2276.

1667. Bin Z. Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic–aerobic biological phosphorus removal system / Z. Bin, J. Min, Q. Zhigang et al. // *Bioresource Technol.* – 2011. – 102. – Issue 3. – P. 2474-2480.

1668. Wana J. Evolution of bioaggregate strength during aerobic granular sludge formation / J. Wana, I. Mozoa, A. Filali et al. // *Biochem. Engin. J.* – 2011. – 58–59. – P. 69–78.

1669. Lim J.X. Treatment of agro based industrial wastewater in sequencing batch reactor: Performance evaluation and growth kinetics of aerobic biomass / J.X. Lim, V.M. Vaidivelu // *J. Environ. Management.* – 2014. – 146. – P. 217-225.

1670. Dahalan F.A. A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process / F.A. Dahalan, N. Abdullah, A. Yuzir et al. // *Bioresource Technol.* – 2015. – 181. – P. 291-296.

1671. Banas J. SBR technology used for advanced combined municipal and tannery wastewater treatment with high receiving water standards / J. Banas, E. Plaza, W. Styka, J. Trela // *Water Sci. Technol.* – 1999. – 40 (4-5). – P. 451-458.

1672. Bernet N. Combined anaerobic-aerobic SBR for the treatment of piggery wastewater / N. Bernet, N. Delgenes, J.C. Akunna et al.. // *Wat. Res.* – 2000. – 34. – No. 2. – P. 611–619.

1673. Strous M. The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing microorganisms / M. Strous, J.J. Heijnen, J.G. Kuenen, M.S.M. Jetten // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – 50. – P. 589-596.

1674. Tay J.H. Molecular mechanism of granulation. I: H<sup>+</sup> translocation-dehydration theory / J.H. Tay, H.L. Xu, K.C. Teo // *J. Environ. Eng.* – 2000. – 126. – P. 403-410.

1675. Teo K.C. Molecular mechanism of granulation – II: proton translocating activity / K.C. Teo, H.L. Xu, J.H. Tay // *J. Environ. Eng.* – 2000. – 126. – 411-418.

1676. Tay J.H. Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors / J.H. Tay, S.F. Yang, Y. Liu // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – 59. – P. 332-337.

1677. Liu Y. Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria / Y. Liu, S-F. Yang, J-H. Tay // *J. Biotechnol.* – 2004. – 108. – P. 161-169.

1678. Qin L. Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors / L. Qin, J.-H., Tay L.Y. // *Process Biochemistry.* – 2004. – 39. – P. 579-584.

1679. Wang Q. Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force / Q. Wang, G. Du, Chen J. // *Process Biochem.* – 2004. – 39. – P. 557-563.

1680. Wan J. Evolution of bioaggregate strength during aerobic granular sludge formation / J. Wan, I. Mozo, A. Filali et al. // *Biochem. Eng. J.* – 2011. – No 58–59(0). – P. 69-78.

1681. Verawaty M. Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment / M. Verawaty, M. Pijuan, Z. Yuan, P.L. Bond // *Water Research.* – 2012. – 46. – Issue 3. – P. 761-771.

1682. Mishima K. Self-immobilization of aerobic activated sludge – A pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment / K. Mishima, M. Nakamura // *Water Sci. Technol.* – 1991. – 23. – No 4-6. – P. 981-990.

1683. Watnick P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kotler // *J. Bacteriol.* – 2000. – 182. – P. 2675-2679.

1684. Kwok W.K. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor / W.K. Kwok, C. Picioreanu, S.L. Ong et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – 58. – P. 400-407.

1685. Sales C.M. Performance of an aerobic/anaerobic hybrid bioreactor under the nitrogen deficient and low F/M conditions / C.M. Sales, W.K. Shieh // *Water Res.* – 2006. – 40. – P. 1442-1448.

1686. Kjelleberg S. Starvation-induced affects on bacterial surface characteristics / S. Kjelleberg, M. Hermansson // *Appl Environ. Microbiol.* – 1984. – 48. – P. 497-503.

1687. Dangcong P. Aerobic granular sludge – a case report / P. Dangcong, N. Bernet, J. Philippe Delgenes, R. Moletta // *Water Research.* – 1999. – 33. – Issue 3. – P. 890-893.

1688. Bryers J.D. Biofilms in biotechnology // In: W.G. Characklis and K.C. Marshall (Eds.). *Biofilms.* – John Wiley New York, NY, 1990. – P. 733–773.

1689. Bryers J.D. Biofilms in water and wastewater treatment / J.D. Bryers, W.G. Characklis // In: W.G. Characklis and K.C. Marshall (Eds.). *Biofilms.* – John Wiley New York, NY, 1990. – P. 671-696.

1690. Flemming H.C. Biofilms and environmental protection // *Water Sci. Technol.* – 1993. – 27. – P. 1-10.

1691. Bryers J.D. Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion // *Colloid Surf. B: Biointerf.* – 1994. – 2. – P. 9-23.

1692. Van Benthum W.A.J. Formation and detachment of biofilms and granules in a nitrifying biofilm airlift suspension reactor / W.A.J. Van Benthum, J.M. Garrido-Fernandez, L. Tjihuis et al. // *Biotechnol. Prog.* – 1996. – 12(6). – P. 764-772.

1693. *Biofilms in wastewater treatment. An interdisciplinary approach* / Eds: S. Wuertz, P.L. Bishop, P.A. Wilderer. – IWA Publishing, 2003. – 400 p.

1694. *Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology. Characteristics, analysis and control* / Eds: P. Lens, V. O'Flaherty, A.P. Moran et al. – IWA Publishing, 2003. – 608 p.

1695. Von Sperling M. *Activated sludge and aerobic biofilm reactors* // *Biological Wastewater Treatment Series (Volume 5).* – IWA Publishing, 2007 – 328 pp.

1696. Николаев Ю.А. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – 76. – № 2. – С. 149–163.

1697. Плакунов В.К. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев // Вода: химия и экология. – 2008. – № 2. – С. 11–13.

1698. Ehlers G.A.C. Biofilms in wastewater treatment systems / G.A.C. Ehlers, S. Turner // In *Microbial Biofilms – Current Research and Applications* (G. Lear, G. Lewis, eds). – Caister Academic Press, 2012. – P. 99-110.

1699. Pastorella G. Biofilms: application in bioremediation / G. Pastorella, G.C. Gazzola, S. Guadarrama, E. Marsili // In *Microbial Biofilms – Current Research and Applications* (G. Lear, G. Lewis, eds). – Caister Academic Press, 2012. – P. 73-98.

1700. Costerton J.W. Bacterial biofilms in nature and disease / J.W. Costerton, K.J. Cheng, G.G. Geesey et al. // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1987. – 41. – P. 435-464.

1701. Lappin-Scott H. Biofilms and biofouling / H. Lappin-Scott, J.W. Costerton, T.J. Marrie // *Encyclopedia of Microbiology.* – 1992. – Vol. 1. – P. 277–284.

1702. Wolfaardt G.M. Multicellular organization in degradative biofilm community / G.M. Wolfaardt, J.R. Lawrence, R.D. Robarts et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – 60. – P. 434-46.

1703. Costerton J.W. Biofilms: the customized microniches / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell et al. // *J. Bacteriol.* – 1994. – 176. – P. 2137-2142.

1704. Costerton J.W. Microbial biofilms / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell et al. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1995. – 49. – P. 711-745.

1705. Davey M. E. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* – 2000. – 64. – P. 847-867.

1706. O'Toole G. Biofilm formation as microbial development / G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – 54. – P. 49-79.

1707. Moran A.P. Recent advances in understanding biofilms of mucosae / A.P. Moran, H. Annuk // *Rev. in Environ. Sci. and Bio/Technology.* – 2003. – 2. – P. 121-140.

1708. Ильина Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина, феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Генетика.* – 2004. – 40. – С. 1445-1456.

1709. *Bacterial Biofilms* // Ed. Romeo T. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 322 – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – 292 pp. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

1710. Романова Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. – 2011. – № 3. – С. 99–109.

1711. Haussler S. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field / S. Haussler, C. Fuqua // J Bacteriol. – 2013. – 195. – P. 2947-2958.

1712. Ножевникова А.Н. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии / А.Н. Ножевникова, Е.А. Бочкова, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2015. – 84. – №6. – С. 623-644.

1713. Bryers J.D. Medical biofilms // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 100 (1). – P. 1–18.

1714. Van Loosdrecht M.C.M. Influence of interfaces on microbial activity / M.C.M. Van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, A.J.B. Zehnder // Microbiol. Rev. – 1990. – 54(1). – P. 75–87.

1715. De Beer D. Microbial biofilms / De Beer D., Stoodley P. // The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community. 3rd Edition. (Release 3.4). – New York, Springer-Verlag, 2000. www.prokaryotes.com.

1716. Folsom J.P. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis / J.P. Folsom, L. Richards, B. Pitts, et al. // BMC Microbiol. – 2010. – 10. – P. 294.

1717. Gilbert P. Biofilms susceptibility to antimicrobials / P. Gilbert, J. Das, I. Foley // Adv. Dent. Res. – 1997. – 11. – P. 160-167.

1718. Anderson G.G. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms / G.G. Anderson, G.A. O'Toole // In: Bacterial Biofilms. (Ed. Romeo T.). Current Topics in Microbiology and Immunology. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 322, 292 pp. – 2008. – P. 85-107. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

1719. Allison K.R. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them / K.R. Allison, M.P. Brynildsen, J.J. Collins // Curr. Opin. Microbiol. – 2011. – 14. – P. 593–598.

1720. Burmølle M. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? / M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, S.J. Sorensen // Trends in Microbiology. – 2014. – 22. – No 2. – P. 84-91.

1721. Hoiby N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov et al. // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – 35. – P. 322–332.

1722. Kim J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents / J. Kim, J.S. Hahn, M.J. Franklin et al. // J. Antimicrob. Chemoth. – 2009. – 63. – P. 129–135.

1723. Marshall K.C. Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces // *ASM News*. – 1992. – 58. – P. 202–207.

1724. Beveridge T.J. Interactions between biofilms and the environment / T.J. Beveridge, S.A. Makin, J.L. Kadurugamuwa, Z. Li // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1997. – 20. – P. 291-303.

1725. Wilderer P.A. Structure and function of biofilms / P.A. Wilderer, W.G. Characklis // In: W.G. Characklis and P.A. Wilderer (Eds.). *Structure and function of biofilms*. – John Wiley and Sons New York, NY, 1989. – P. 5–17.

1726. van Loosdrecht M.C.M. Biofilm structure / M.C.M. van Loosdrecht, D. Eikelboom, A. Gjaltema et al. // *Water Sci Technol.* – 1995. – 32.– P. 35–43.

1727. van Loosdrecht M.C.M. A more unifying hypothesis for biofilm structures / M.C.M. van Loosdrecht, C. Picioreanu, J.J. Heijnen // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1997. – 24. – P. 181–183.

1728. Stoodley P. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley, R. Sauer, D. Davies, J.W. Costerton // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – 56. – P. 187–209.

1729. Смирнова А.Т. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / А.Т. Смирнова, Л.В. Диденко, Ю.М. Романова, Р.Р. Азизбеян // *Микробиология*. – 2010. – 79. – № 4. – С. 435-446.

1730. Stewart P.S. Physiological heterogeneity in biofilms / P.S. Stewart, M.J. Franklin // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – 6. – P. 199-210.

1731. Monds R. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review / R. Monds, G. O’Toole // *Trends Microbiol.* – 2009. – 17 (2). – P. 73–87.

1732. Lazar V. Architecture and physiology of microbial biofilms / V. Lazar, M.C. Chifiriuc // *Roum Arch. Microbiol. Immunol.* – 2010. – 69 (2). – P. 95–107.

1733. Asally M. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm / M. Asally, M. Kittisopikul, P. Rue, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – 109. – P. 18891-18896.

1734. Røder H.L. Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? / H.L. Røder, S.J. Sørensen, M. Burmølle // *Trends in Microbiology*. – 2016. – 24. – No 6. – P. 503-513.

1735. Zhang T.C. Density, porosity, and pore structure of biofilms / T.C. Zhang, and P.L. Bishop // *Wat. Res.* – 1994. – P. 2267–2277.

1736. Massol-Deya A.A. Channel structure in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater / A.A. Massol-Deya, J. Whallon, R.F. Hickey, J.M. Tiedje // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – 61(2). – P. 769-777.

1737. Shapiro J.A. Thing about bacterial populations as multicellular organisms // Annu. Rev. Microbiol. – 1998. – 52. – P. 81-104.

1738. Jetten M.S. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds / M.S. Jetten, S. Logemann, G. Muyzer et al. // Antonie van Leeuwenhoek. – 1997. – 71(1–2). – P. 75–93.

1739. Strous M. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations / M. Strous, E. van Gerven, P. Zheng et al. // Wat. Res. – 1997. – 31. – No 8. – P. 1955-1962.

1740. Strous M. The Anammox case - A new experimental manifesto for microbiological ecophysiology / M. Strous, J.G. Kuenen, J.A. Fuerst et al. // Antonie van Leeuwenhoek. – 2002. – 81 (1-4) – P. 693-702.

1741. Jetten M.S.M. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria / M.S.M. Jetten, M. Schmid, I. Schmid et al. // Rev. in Environ. Sci. and Biotechnology. – 2002. – 1 – P. 51-63.

1742. Schmidt I. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater / I. Schmidt, O. Sliemers, M. Schmidt et al. // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – 27. – P. 481-492.

1743. Kindaichi T. In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in biofilms / T. Kindaichi, I. Tsushima, Y. Ogasawara et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – 73. – No 15. – P. 4931-4939.

1744. Lemon K.P. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis* / K.P. Lemon, A.M. Earl, H.C. Vlamakis et al. // In: Bacterial Biofilms. / Ed. Romeo T. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 322. – 292 pp. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – P. 1-17.

1745. Tjhuis L. Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors / L. Tjhuis, B. Hijman, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – 45. – P. 7-17.

1746. Miller M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – 55. – P. 165-199.

1747. Гинцбург А.Л. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Ж. микроб., эпидемиол., иммунобиол. – 2003. – № 5. – С. 86-93.

1748. Henke J.M. Bacterial social engagements / J.M. Henke, B.L. Bassler // Trends Cell Biol. – 2004. – 14. – P. 648-656.

1749. Waters C. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria / C. Waters, B. Bassler // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2005. – 21. – P. 319-346. Doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

1750. Хмель И.А. Quorum Sensing регуляция экспрессии генов, фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // *Микробиология.* – 2006. – С. 457-464.

1751. Хмель И.А. Quorum sensing регуляция экспрессии генов - перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий / И.А. Хмель, А.З. Метлицкая // *Молекулярная биология.* – 2006. – 40. – № 2. – С. 195-210.

1752. Irie Y. Quorum Sensing and microbial biofilms / Y. Irie, M.R. Parsek // In: *Bacterial Biofilms.* / Ed. Romeo T. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 322. – 292 pp. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – P. 67-85. DOI 10.1007/978-3-540-75418-3

1753. Li Y.H. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms / Y.H. Li, X. Tian // *Sensors.* – 2012. – 12. – P. 2519-2538.

1754. Parsek M.R. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation / M.R. Parsek, D.L. Val, B.L. Hanzelka et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – 96. – P. 4360-4365.

1755. Parsek M.R. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms / M.R. Parsek, E.P. Greenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – 97. – No 16. – P. 8789-8793.

1756. De Kievit T.R. Bacterial Quorum Sensing in pathogenic relationships / T.R. De Kievit, B.H. Iglewski // *Infection and Immunity.* – 2000. – 68. – P. 4839-4849.

1757. Riedel K. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms / K. Riedel, M. Hentzer, O. Geisenberger et al. // *Microbiology.* – 2001. – 147. – P. 3249-3262.

1758. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development // *Intern. Microbiol.* – 2006. – 9 (1). – P. 21–28.

1759. Gobbetti M. Cell-cell communication in food related bacteria / M. Gobbetti, M. De Angelis, R. Di Cagno et al. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2007. – 120. – P. 34-45.

1760. Pugsley A. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol. Microbiol.* – 2008. – 69 (3). – P. 780.

1761. De Kievit T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Environ. Microbiol.* – 2009. – 11 (2). – P. 279–288.

1762. Karatan E. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnick // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2009. – 73 (2). – P. 310-347.

1763. Vu B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova // *Molecules.* – 2009. – 14. – P. 2535-2554. doi:10.3390/molecules14072535

1764. Brackman G. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo* / G. Brackman, P. Cos, L. Maes et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2011. – 55. – P. 2655-2661.

1765. Di Cagno R. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing / R. Di Cagno, M. De Angelis, M. Calasso, M. Gobbetti // *J. Proteomics.* – 2011. – 74. – P. 19-34.

1766. Lee K.W. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm / K.W. Lee, S. Periasamy, M. Mukherjee et al. // *ISME J.* – 2014. – 8. – P. 894-907.

1767. Greenberg E.P. Quorum sensing in gram-negative bacteria // *ASM News.* – 1997. – 63(7). – P. 371-377.

1768. Завильгельский Г.Б. «Quorum sensing», или как бактерии «разговаривают» друг с другом / Г.Б. Завильгельский, И.В. Манухов // *Молекуляр. Биология.* – 2001. – 35. – P. 268-277.

1769. Schauder S. The languages of bacteria / S. Schauder, B.L. Bassler // *Genes Development.* – 2001. – 15. – P. 1468-1480.

1770. Taga M.E. Chemical communication among bacteria / M.E. Taga, B.L. Bassler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – suppl. 2. – P. 14549-14554.

1771. Ahmer B.M.M. Cell-to-cell signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* // *Mol. Microbiol.* – 2004. – 52. – P. 933-945.

1772. March J.C. Quorum Sensing and bacterial cross-talk in biotechnology / J.C. March, W.E. Bentley // *Current Opin. Biotechnol.* – 2004. – 15. – P. 495-502.

1773. Bassler B.L. Bacterially speaking / B.L. Bassler, R. Losick // *Cell.* – 2006. – 125. – P. 237–246.

1774. Lee J. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response / J. Lee, J. Wu, Y. Deng et al. // *Nat Chem Biol.* – 2013. – 9 (5). – P. 339-343.

1775. Rasmussen T.B. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects / T.B. Rasmussen, M. Givskov // *Microbiology.* – 2006. – 152 (4). – P. 895–904.

1776. Morohoshi T. Novel *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties / T. Morohoshi, N. Someya, T. Ikeda // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2009. – 73. – P. 2124–2127.

1777. Amara N. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies and beyond / N. Amara, B.P. Krom, G.F. Kaufmann, M.M. Meijler // *Chem. Rev.* – 2011. – 111. – P. 195-208.

1778. Steven E.A. Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples / E.A. Steven, G.B. Christiaen, J.N. Hans, C. Tom // *J. Microbiol. Methods* – 2011. – 87. – P. 213–219.

1779. Kim A.L. Quorum quenching bacteria isolated from the sludge of a wastewater treatment plant and their application for controlling biofilm formation / A.L. Kim, S.K. Park, C.H. Lee, J.K. Lee // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – 24(11). – P. 1574–1582.

1780. Landini P. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal / P. Landini, D. Antoniani, J.G. Burgess, R. Nijland // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – 86 (3). – P. 813-823.

1781. Sintim H.O. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules / H.O. Sintim, J.A. Smith, J. Wang et al. // *Future Med. Chem.* – 2010. – 2 (6). – P. 1005-1035.

1782. Cha C. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria / C. Cha, P. Gao, Y. Chen et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1998. – 11. – P. 1119-1129.

1783. Whitehead N.A. Quorum sensing in gram-negative bacteria / N.A. Whitehead, A.M. Barnard, H. Slater et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – 25. – P. 365-404.

1784. Walters M. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella* / M. Walters, V. Sperandio // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2006. – 296. – P. 125-131.

1785. Fuqua W.C. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1996. – 50. – P. 727-751.

1786. Galloway W.R. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways / W.R. Galloway, J.T. Hodgkinson, S.D. Bowden et al. // *Chem. Rev.* – 2011. – 111. – P. 28-67.

1787. Steindler L. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors / L. Steindler, V. Venturi // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – 266. – P. 1-9.

1788. Degrassi G. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors / G. Degrassi, C. Aguilar, M. Bosco et al. // *Current Microbiol.* – 2002. – 45. – P. 250-254.

1789. Шпаков А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. – 2009. – 78. – № 2. – С. 163-175.

1790. Surette M.G. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production / M.G. Surette, M. Miller, B. Bassler // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – 96. – P. 1639-1644.

1791. Chen X. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron / X. Chen, S. Schauder, N. Potler et al. // Nature. – 2002. – 415. – P. 545-549.

1792. Маянский А.Н. Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь // Журнал Инфектологии. – 2012. – 4. – № 3. – С. 5-15.

1793. Njoroge J. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases / J. Njoroge, V. Sperandio // EMBO Mol.Microbiol. – 2009. – 1 (4). – P. 201–210.

1794. Dobretsov S. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling / S. Dobretsov, M. Teplitski, V. Paul // Biofouling. – 2009. – 25. – P. 413–427.

1795. Jakobsen T.H. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors / T.H. Jakobsen, T. Bjarnsholt, P.Ø. Jensen et al. // Future Microbiol. – 2013. – 8 (7). – P. 901-921.

1796. Wilder C.N. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the *las*, *rhl* and *pqs* quorum-sensing systems / C.N. Wilder, S.P. Diggle, M. Schuster // ISME J. – 2011. – 5 (8). – P. 1332-1343.

1797. Hjelmgard T. Synthesis of furanone-based natural product analogues with quorum sensing antagonist activity / T. Hjelmgard, T. Persson, T.B. Rasmussen et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2003. – 11 (15). – P. 3261-3271.

1798. Smith K.M. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs / K.M. Smith, Y. Bu, H. Suga // Chem. Biol. – 2003. – 10. – P. 81-89.

1799. Lin Y.N. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes / Y.N. Lin, J.L. Xu, J. Hu et al. // Mol. Microbiol. – 2003. – 47. – P. 849-860.

1800. Brackman G. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia* / G. Brackman, U. Hillaert, S. Van Calenbergh et al. // Res. Microbiol. – 2009. – 160. – P. 144–151.

1801. Czajkowski R. Quenching of *N*-acyl homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules / R. Czajkowski, S. Jafra // *Acta Biochim. Pol.* – 2009. – 56. – P. 1-16.

1802. Loh J. Quorum sensing in plant-associated bacteria / J. Loh, E.A. Pierson, L.S. Pierson et al. // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – 5. – P. 285-290.

1803. Von Bodman S.B. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria / S.B. Von Bodman, W.D. Bauer, D.L. Coplin // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2003. – 41. – P. 455-482.

1804. Huber B. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing / B. Huber, L. Eberl, W. Feucht, J. Polster // *Z. Naturforsch.* – 2003. – 58. – P. 879-884.

1805. Gao M. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing / M. Gao, M. Teplitski, J.B. Robinson, W.D. Bauer // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2003. – 16. – P. 827-834.

1806. Teplitski M. *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with Quorum sensing regulation in bacteria / M. Teplitski, H. Chen, S. Rajamani et al. // *Plant Physiology.* – 2004. – 134. – P. 137-146.

1807. Jagani S. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* / S. Jagani, R. Chelikani, D.S. Kim // *Biofouling.* – 2009. – 25. – P. 321-324.

1808. Mandal S.M. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses / S.M. Mandal, D. Chakraborty, S. Dey // *Plant Signaling Behavior.* – 2009. – 5. – P. 359-368.

1809. Plyuta V. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* / V. Plyuta, J. Zaitseva, E. Lobakova et al. // *APMIS.* – 2013. – 171. – P. 1073-1081.

1810. Коган В.А. Промышленное внедрение новой технологии биологической очистки сточных вод свинокомплексов / В.А. Коган, Ю.А. Коган, В.Н. Швецов // *Исслед. в обл. мех. и биол. очистки произв. сточ. вод.* – М., ВНИИ ВОДГЕО, 1991. – С. 112-124.

1811. Waste magazine – special. Проспект Департамента окружающей среды Муниципалитета г. Вены. – 28 с.

1812. Wentzel M.C. Process and modelling of nitrification-denitrification biological excess phosphorus removal systems: a review / M.C. Wentzel, G.A. Ekama, G.R. Marais // *Water Sci. Technol.* – 1992. – 25. – P. 59-82.

1813. Fass S. Volatile fatty acids as carbon sources in denitrification / S. Fass, V. Ganaye, J. Manem, J.C. Block // *Environ. Technol.* – 1994. – 15. – P. 459-467.

1814. Christensson M. Comparison between ethanol and methanol as a carbon source for denitrification / M. Christensson, E. Lie, T. Welander // *Water Sci. Technol.* – 1994. – 30. – P. 83-90.

1815. Шак У. Российско-Датская установка удаления азота из сточных вод в Курьянове // В. сб. "Современные методы очистки сточных вод и обработки осадка". – М. МГП "Мосводоканал", 1996. – С. 22-26.

1816. Liao C.M. Removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by intermittent aeration processes / C.M. Liao, T. Maekawa, H.C. Chiang, C.F. Wu // *J. Environ. Sci. and Health – Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes.* – 1993. – 28. – No 3. – P. 335-374.

1817. Janssen P.M.J. Biological phosphorus removal. / P.M.J. Janssen, K. Meinema, H.F. van der Roest // *Manual for Design and Operation.* – IWA Publishing, 2002. – 224 pp.

1818. Швецов В.Н. Нитрификация и денитрификация сточных вод / В.Н. Швецов, К.М. Морозова, И.А. Нечаев, П.А. Петрова // *Водоснабж. и сан. техн. – Haustechn.* – 1995. – № 11. – С. 16-18.

1819. Zart D. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO / D. Zart, E. Bock // *Archives of Microbiology.* – 1998. – 169(4). – P. 282-286.

1820. Batchelor B. Стехиометрия автотрофной денитрификации с использованием элементов серы / B. Batchelor, A.W.M. Lawrence // В кн. *Химия промышленных сточных вод.* – М.: Химия, 1983. – С. 299-315.

1821. Jetten M.S.M. The anaerobic oxidation of ammonium / M.S.M. Jetten, M. Strous, K.T. van de Pas-Schoonen et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1999. – 22. – P. 421-437.

1822. Gao D.W. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. Review / D.W. Gao, Y. Tao // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – 91(4). – P. 887-894.

1823. Ножевникова А.Н. Анаммокс-бактерии в природе и экобиотехнологии / А.Н. Ножевникова, Ю.В. Литти, Е.А. Бочкова и др. / под общ. ред. А.Н. Ножевниковой. – М.: Университетская книга, 2017. – 280 с.

1824. US patent 427849(5078884). Anoxic Ammonium Oxidation / A. Mulder – 1992.

1825. Mulder A. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor / A. Mulder, A.A. van de Graaf, L.A. Robertson, J.G. Kuenen // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1995 – 16. – P. 177-184.

1826. Van de Graaf A.A. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process / A.A. Van de Graaf, A. Mulder, P. de Bruijn et al. // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1995. – 61. – No 4. – P. 1246–1251.

1827. Van de Graaf A.A. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor / A.A. Van de Graaf, P. de Bruijn, L.A. Robertson et al. // *Microbiology*. – 1996. – 142. – P. 2187-2196.

1828. Jetten M.S.M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process / M.S.M. Jetten, M. Wagner, J. Fuerst et al. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2001. – 12(3). – P. 283-288.

1829. Helmer C. Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems / C. Helmer, C. Tromm, A. Hippen et al. // *Water Sci. Technol.* – 2001. – 43(1). – P. 311-320.

1830. Степаненков В.А. Нормализация работы системы удаления азота из сточных вод коксо-химического производства АО "Северсталь" / В.А. Степаненков, А.Е. Кузнецов, Фу Йиганг, М.Н. Манаков // Тезисы докладов III Международного конгресса "Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес и экологическое образование", Самара – Астрахань – Самара, 1998. – Самара, СГТУ. – 1998. – С. 36, 37

1831. Fu Yigang. Minimization of the secondary contaminants in biological clean-up systems with phenolic pollutants by optimization of the nitrogen factor. / Fu Yigang, A. Kouznetsov, N. Gradova, I. Gornova // In: *Proceedings of the Seventh International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil*. 18-22 September 2000, Leipzig, Germany. V.2. – P.1485, 1486.

1832. Фу Йиганг. Биотрансформация неорганических форм азота в системах биологической очистки фенолзагрязненных сред / Дисс... канд. биол. наук. – М., 2000, РХТУ им. Д.И. Менделеева.

1833. Kouznetsov A.Ye. An Anammox-like process in the waste water treatment of the coke-chemical plant. / A.Ye. Kouznetsov, V.A. Stepanenkov // *European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004)*, Oostende (Belgium), April 25-28, 2004. – P. 653-656.

1834. Фу Йиганг. Протекание процесса типа "Анаммокс" при очистке сточных вод коксохимического производства / Фу Йиганг, А.Е. Кузнецов, В.А. Степаненков // В сб. *Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Международного конгресса (Москва, 14-18 марта 2005г.)*. – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2005, т.2. – С. 51,52.

1835. Fu Yigang. An anammox-like process in the waste water treatment of the coke-chemical plant / Fu Yigang, A.Ye. Kouznetsov, V.A. Stepanenkov // In *New Research on the Environment and Biotechnology*, Nova Science Publishers Inc, New York, 2006. – P. 92-97.

1836. Strous M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge / M. Strous, E. van Gerven, J.G. Kuenen, M. Jetten // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – 63. – P. 2446-2448.

1837. Schmid M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation / M. Schmid, U. Twachtmann, M. Klein et al. // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2000. – 23. – P. 93-106.

1838. Egli K. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate / K. Egli, U. Fanger, P.J. Alvarez et al. // *Arch Microbiol.* – 2001. – 175(3). – P. 198-207.

1839. Schmid M. *Candidatus “Scalindua brodae”*, sp.nov., *Candidatus “Scalindua wagneri”*, sp.nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria / M. Schmid, K. Walsh, R. Webb et al. // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2003. – 26. – P. 529-538.

1840. Van Niftrik L.A. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria / L.A. Van Niftrik, J.A. Fuerst, J.S. Sinninghe Damste et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – 233. – P. 7-13.

1841. Strous M. Missing lithotroph identified as new planctomycete / M. Strous, J.A. Fuerst, E.H.M. Kramer et al. // *Nature.* – 1999. – 400. – P. 446-449.

1842. Kartal B. Application, eco-physiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria / B. Kartal, L. van Niftrik, O. Sliemers et al. / *Rev. in Environ. Sci. and Bio/Technology.* – 2004. – 3. – P. 255-264.

1843. Jetten M. Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis / M. Jetten, M. Schmid, K. van de Pas-Schoonen et al. // *Methods Enzymol.* – 2005. – 397. – P. 34-57.

1844. Quan Z.X. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor / Z.X. Quan, S.K. Rhee, J.E. Zuo et al. // *Environ Microbiol.* – 2008. – 10(11). – P. 3130-3139.

1845. Cho S. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor / S. Cho, Y. Takahashi, N. Fujii et al. // *Chemosphere.* – 2010. – 78(9). – P. 1129-1135.

1846. Javanaud C. Anaerobic ammonium oxidation mediated by Mn-oxides: from sediment to strain level / C. Javanaud, V. Michotey, S. Guasco et al. // *Microbiol.* – 2011. – 162(9). – P. 848-857.

1847. Kartal B. Cultivation, detection, and ecophysiology of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria / B. Kartal, W. Geerts, M.S. Jetten // *Methods Enzymol.* – 2011. – 486. – P. 89-108.

1848. Kartal B. Anammox growth physiology, cell biology, and metabolism / B. Kartal, L. van Niftrik, J.T. Keltjens et al. // *Adv. Microb. Physiol.* – 2012. – 60. – P. 211-262.

1849. Speth D.R. Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system / D.R. Speth, M.H. In't Zandt, S. Guerrero-Cruz et al. // *Nat. Commun.* – 2016. – 31. – 7. – P. 11172.

1850. Kuypers M.M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea / M.M. Kuypers, A.O. Sliemers, G. Lavik et al. // *Nature.* – 2003. – 10. – 422(6932). – P. 608-611. DOI: 10.1038/nature01472

1851. Op den Camp H.J. Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. Review / H.J. Op den Camp, B. Kartal, D. Guven et al. // *Biochem Soc Trans.* – 2006. – 34(Pt 1). – P. 174-178.

1852. Sonthiphand P. Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria / P. Sonthiphand, M.W. Hall, J.D. Neufeld // *Front Microbiol.* – 2014. – 6. – 5. – P. 399.

1853. Lipssew Y.A. Abundance and diversity of denitrifying and anammox bacteria in seasonally hypoxic and sulfidic sediments of the Saline Lake Grevelingen / Y.A. Lipssew, E.C. Hopmans, F.J. Meysman et al. // *Front Microbiol.* – 2016. – 20. – 7. – P. 1661.

1854. Wang S. Nitrogen loss by anaerobic ammonium oxidation in unconfined aquifer soils / S. Wang, D. Radny, S. Huang et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – 10. – 7. – P. 40173.

1855. Siegrist H. Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium rich leachate without organic carbon / H. Siegrist, S. Reithaar, P. Lais // *Wat.Sci.Tech.* – 1998. – 37. – P. 589-591.

1856. Toh S.K. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater / S.K. Toh, N.J. Ashbolt // *Appl.Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – 59(2-3). – P. 344-352. DOI: 10.1007/s00253-002-1007-7

1857. Dong X. Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure / X. Dong, E.W. Tollner // *Bioresource Technology.* – 2003. – 86. – 2. – P. 139.

1858. Fux C. Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors / C. Fux, V. Marchesi, I. Brunner, H. Siegrist // *Water Sci. Technol.* – 2004. – 49(11-12). – P. 77-82.

1859. Tal Y. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system / Y. Tal, J.E. Watts, H.J. Schreier // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – 72(4). – P. 2896-2904.

1860. Sumino T. Nitrogen removal from wastewater using simultaneous nitrate reduction and anaerobic ammonium oxidation in single reactor / T. Sumino, K. Isaka, H. Ikuta et al. // *J. Biosci Bioeng.* – 2006. – 102(4). – P. 346-51.

1861. Szatkowska B. A one-stage system with partial nitritation and anammox processes in the moving-bed biofilm reactor / B. Szatkowska, G. Cema, E. Plaza et al. // *Water Sci. Technol.* – 2007. – 55(8-9). – P. 19-26.

1862. Fernandes I. Biofilm and granular systems to improve Anammox biomass retention / I. Fernandes, J.R. VazquespPadin, A. Mosquera-Corral et al. // *Biochem. Eng. J.* – 2008. – 42. – P. 308-313.

1863. Dapena-Mora A. Improvement of the settling properties of Anammox sludge in an SBR / A. Dapena-Mora, B. Arrojo, J.L. Campos et al. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2004. – 79. – P. 1417-1420.

1864. Dapena-Mora A. Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR / A. Dapena-Mora, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral et al. // *J. Biotechnol.* – 2004. – 110(2). – P. 159-70.

1865. Terada A. Sequencing batch membrane biofilm reactor for simultaneous nitrogen and phosphorus removal: novel application of membrane-aerated biofilm / A. Terada, T. Yamamoto, S. Tsuneda, A. Hirata // *Biotechnol Bioeng.* – 2006. – 94. – P. 730-739.

1866. Lek Noophan P. Anaerobic ammonium oxidation by *Nitrosomonas spp.* and anammox bacteria in a sequencing batch reactor / P. Lek Noophan, S. Sripiboon, M. Damrongsri, J. Munakata-Marr // *J. Environ. Manage.* – 2009. – 90(2). – P. 967-972.

1867. Kuai L. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system / L. Kuai, W. Verstraete // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – 64. – No. 11. – P. 4500-4506.

1868. Hellings C. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water / C. Hellings, A.A.J.C. Schellen, J.W. Mulder et al. // *Wat. Sci. Tech.* – 1998. – 37. – P. 135-142.

1869. Mulder J.W. Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering / J.W. Mulder, M.C.M. Van Loosdrecht, C. Hellings, R. Van Kempen // *Water Sci. Technol.* – 2001. – 43. – P. 127-134.

1870. Van Dongen U. The Sharon-anammox process for the treatment of ammonium rich wastewater / U. Van Dongen, M.S.M. Jetten, M.C.M. van Loosdrecht // *Wat. Sci. Technol.* – 2001. – 44. – P. 153-160.

1871. Third K.A. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria / K.A. Third, A.O. Sliemers, J.G. Kuenen, M.S. Jetten // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2001. – 24(4). – P. 588-596.

1872. Sliekers A.O. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor / A.O. Sliekers, N. Derwort, J.L. Campos Gomez et al. // *Water Research*. – 36. – Issue 10. – 2002. – P. 2475-2482. doi:10.1016/S0043-1354(01)00476-6

1873. Sliekers A.O. CANON and Anammox in a gas-lift reactor / A.O. Sliekers, K.A. Third, W. Abma et al. // *FEMS Microbiol Lett*. – 2003. – 28. – 218(2). – P. 339-344.

1874. Foresti E. Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges / E. Foresti, M. Zaiat, M. Vallero // *Rev. in Environ. Sci. and Bio/Technology*. – 2006. – 5. – P. 3-19. DOI 10.1007/s11157-005-4630-9

1875. Poth M.  $^{15}\text{N}$  kinetic analysis of  $\text{N}_2\text{O}$  production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification / M. Poth, D.D. Focht // *Appl. Environ. Microbiol*. – 1985. – 49. – P. 1134-1141.

1876. Poth M. Dinitrogen production from nitrite by *Nitrosomonas* isolate // *Appl. Environ. Microbiol*. – 1986. – 52. – Pp. 957-959.

1877. Abeliovich A. Transformation of ammonia and the environmental impact of nitrifying bacteria // *Biodegradation*. – 1992. – 3. – P. 255-264.

1878. Fdz-Polanco F. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphate under anaerobic conditions / F. Fdz-Polanco, M. Fdz-Polanco, N. Fernandez et al. // *Wat. Res*. – 2001. – 35(4). – P. 1111-1114.

1879. Battistoni P. Phosphate removal in anaerobic liquors by struvite crystallization without addition of chemicals: preliminary results / P. Battistoni, G. Fava, P. Pavan et al. // *Wat. Res*. – 1997. – 31 (11). – P. 2925-2929.

1880. Williams S. Struvite precipitation in the sludge stream at slough wastewater treatment plant and opportunities for phosphorus recovery // *Environ. Technol*. – 1999. – 20 (7). – P. 743-747.

1881. Münch E.V. Controlled struvite crystallisation for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams / E.V. Münch, K. Barr // *Wat. Res*. – 2001. – 35 (1). – P. 151-159.

1882. Van Groenestijn J.W. Polyphosphate degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. and activated sludge / J.W. Van Groenestijn, M.M.A. Bentvelsen, M.H. Deinema, A.J.B. Zehnder // *Appl. Environ. Microbiol*. – 1989. – 55. – P. 219-223.

1883. Streichan M. Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage treatment plants with different processes for biological phosphorus removal / M. Streichan, J.R. Golecki, G. Schön // *FEMS Microbiol. Ecol*. – 1990. – 73. – P. 113-124.

1884. Van Loosdrecht M.C.M. Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater – Use of dynamic enrichment cul-

tures / M.C.M. Van Loosdrecht, G.J. Smolders, T. Kuba, J.J. Heijnen // Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M. – 1997. – 71. – P. 109-116.

1885. Mao Y. Dominant and novel clades of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants / Mao Y., Graham D.W., Tamaki H., Zhang T. // Water Research. – 1993. – 27. – Issue 5. – P. 821-827.

1886. Kernn-Jespersen J.P. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions / J.P. Kernn-Jespersen, M. Henze // Wat. Res. – 1993. – 27. – P. 617-624.

1887. Mino T. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process / T. Mino, M.C.M. Loosdrecht, J.J. Heijnen // Wat. Res. – 1998. – 32. – P. 3193-3207.

1888. Bond P.L. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems / P.L. Bond, R. Erhart, M. Wagber et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65. – P. 4077-4084.

1889. Hesselmann R.P.X. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge / R.P.X. Hesselmann, C. Werlen, D. Hahn et al. // Syst. Appl. Microbiol. – 1999. – 22. – P. 454-465.

1890. Nielsen A.T. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor / A.T. Nielsen, W.-T. Liu, C. Filipe et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65. – P. 1251-1258.

1891. Zeng R.J. Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms / R.J. Zeng, A.M. Saunders, Z. Yuan et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2003. – 83(2). – P. 140-148.

1892. Wentzel M.C. Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal / M.C. Wentzel, L.H. Lotter, G.A. Ekama, G.v.R. Marais // Water Sci. Technol. – 1991. – 23(4-6). – P. 567-76.

1893. Smolders G.J.F. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process; stoichiometry and pH influence / G.J.F. Smolders, J. Van der Meij, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen // Biotechn. Bioeng. – 1994. – 43. – P. 461-470.

1894. Smolders G.J.F. A metabolic model for the biological phosphorus removal process / G.J.F. Smolders, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen // Wat. Sci. Techn. – 1994. – 31. – P. 79-93.

1895. Environmental Biotechnology. Concepts and Applications / Edited by H.-J. Jördening and J. Winter. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005. – 463 p.

1896. Comeau Y. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal / Y. Comeau, K.J. Hall, R.E.W. Hancock, W.K. Oldham // Wat.Res. – 1986. – 20. – P. 1511-1521.

1897. Comeau Y. Biological nutrient removal from a phosphorus-rich pre-fermented industrial wastewater / Y. Comeau, D. Lamarre, F. Roberge et al. // *Wat. Sci. Tech.* – 1996. – 34. – No 1-2. – P. 169-177.

1898. Meinhold J. Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal / J. Meinhold, C.D.M. Filipe, G.T. Daigger, S. Isaacs // *Water Sci. Technol.* – 1999. – 39. – P. 31-42.

1899. Dabert P. Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration / P. Dabert, B. Sialve, J-P. Delgenes et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – 55. – No 4. – P. 500-509. DOI:10.1007/s002530000529

1900. Zeng R.J. Improved understanding of the interactions and complexities of biological and nitrogen phosphorus removal processes / Zeng R.J., Zhiguo Y., Keller J // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* – 2004. – 3(3). – P. 265-272.

1901. Sorm R. Phosphate uptake under anoxic conditions and fixed film nitrification in nutrient removal activated sludge system / R. Sorm, G. Bortone, R. Saltarelli et al. // *Wat. Res.* – 1996. – 30. – P. 1573-1585.

1902. Rustrian E. Phosphate release and uptake by pure cultures of *Acinetobacter sp.*: effect of the volatile fatty acids concentration / E. Rustrian, J.P. Delgenes, R. Moletta // *Current Microbiol.* – 1997. – 34. – P. 43-48.

1903. Toerien D.F. Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge systems / D.F. Toerien, A. Gerber, L.H. Lotter, T.E. Cloete // *Adv. in Microbial. Ecology* (K.C. Marshall, Ed.). – Plenum Press, NY, 1999, vol.11. – P.173-230.

1904. Paerl H.W. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria / H.W. Paerl, R.S. Fulton, P.H. Moisaner, J. Dyble // *The Scientific World.* – 2001. – 1. – P. 76–113.

1905. Anderson D.M. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences / D.M. Anderson, P.M. Gilbert, J.M. Burkholder // *Estuaries.* – 2002. – 25. – No. 4b. – P. 704-726.

1906. Daft M.J. Ecological studies on algal lysing bacteria in fresh waters / M.J. Daft, S.B. McCord, W.D. Stewart // *Freshwater Biology* – 1975. – 5. – P. 577-596.

1907. Daft M.J. Algal blooms: consequences and potential cures / M.J. Daft, J.C. Burnham, Y. Yamamoto // *J. of Appl. Bacteriol.* – 1985. – P. 175-186.

1908. Sigeo D.C. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities / D.C. Sigeo, R. Glenn, M.J. Andrews et al. // *Hydrobiologia.* – 1999. – 395/396. – P. 161-172.

1909. Reim R.L. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity / R.L. Reim, M.S. Shane, R.E. Cannon // *Can. J. Microbiol.* – 1974. – 20. – P. 981-986.

1910. Shi S. Effects of an algicidal bacterium *Pseudomonas mendocina* on the growth and antioxidant system of *Aphanizomenon flos-aquae* / S. Shi, D.S. Tang, Y.D. Liu // Curr. Microbiol. – 2009. – 59. – P. 107-112.

1911. Ren H.Q. The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake / H.Q. Ren, P. Zhang, C.H. Liu et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – 26. – P. 465-472.

1912. Gusev M.V. Application of dialysis cultivation method for matching the symbiotic algobacterial pairs / M.V. Gusev, M.M. Vol'berg, A.F. Lebedeva, I.B. Savel'ev // Nauchnye Doklady Vysshei Shkoly. Ser. Biologicheskie Nauki. – 1988. – No. 1. – P. 103-106.

1913. Саванина Я.В. Диализное культивирование цианобактерий / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский // Вестник Московского университета, серия 16. Биология. – 2008. – № 2. – С. 16-25.

1914. Калёнов С. В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса / Дисс... канд. техн. наук. – М: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2007 г.

1915. Карасевич Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. – М.: Наука, 1982 – 144 с.

1916. Методы общей бактериологии. Том 2 / Герхардт Ф. (ред). – М.: Мир, 1984. – 536 с.

1917. Практикум по биохимии. – М.: МГУ, 1989. – 510 с.

1918. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2005. – 528 с.

1919. Теселкин Ю.О. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода / Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, О.Б. Любицкий и др. // Вопр. Мед. Химии. – 1997. – 43. – № 2. – С. 87-93.

1920. Тренкеншу Р.П. Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование // Прикладная альгология. – 1999. – №1. – с. 7–10.

1921. Dertli E. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785 / E. Dertli, M.J. Mayer, A. Narbad // Microbiology. – 2015. – 15. – P. 8. DOI 10.1186/s12866-015-0347-2

1922. Stone M.C. Color gamut mapping and the printing of digital color images / M.C. Stone, W.B. Cowan, and J.C. Beatty // ACM TOG. – 1988. – 3(7). – P. 249-292.

1923. Рыбаков М. Фотошопинг. Как управиться с цветом // Цифровая фотография. – 2005. – № 14 (2). – С. 56-65.

1924. Rozzi A. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: a literature review / A. Rozzi, E. Remigi / Rev. in Environ. Sci. and Bio/Technology. – 2004. – 3. – P. 93-115.

1925. Хохлов А.С. Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. – М.: Наука, 1988. – 272 с.

1926. Швайкова М.Д. Токсикологическая химия. – М.: Медицина, 1975. – 376 с.

1927. Griffith K.L. Measuring b-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays / K.L. Griffith, R.E. Wolf // Biochem. Biophys. Research Communic. – 2002. – 290. – P. 397–402.

1928. Joung J.K. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions / J.K. Joung, E.I. Ramm, C.O. Pabo // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – 97(13). – P. 7382-7387.

1929. Федоров А.Ю. Комплексная очистка сточных вод при производстве фенола / А.Ю. Федоров, А.П. Гуменюк и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – 30. – № 4-5. – С. 728-732.

1930. Zaitseva J. Effect of nitrofurans and generators on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cenocepacia* 370 / J. Zaitseva, V. Granik, A. Belik et al. // Res. Microbiol. – 2009. – 160. – P. 353-357.

1931. Brencic A. Signal quenching, detoxication and mineralization of *vir* gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* / A. Brencic, A. Eberhard, S.C. Winans // Mol. Microbiol. – 2004. – 51. – P. 1103-1115.

1932. Danhorn T. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR–PhoB regulatory system / T. Danhorn, M. Hentzer, M. Givskov et al. // J. Bacteriol. – 2004. – 186. – P. 4492–4501.

1933. Walker T.S. *Pseudomonas aeruginosa* – plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation / T.S. Walker, H.P. Bais, E. Deziel et al. // Plant Physiol. – 2004. – 134. – P. 320-331.

1934. Wei Q. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen / Q. Wei, P.N. Minh, A. Dötsch et al. // Nucleic Acids Res. – 2012. – 40. – P. 4320–4333.

1935. Breidenstein E.B. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance / E.B. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, R.E. Hancock // Trends Microbiol. – 2011. – 19. – P. 419-426.

1936. Pliuta V.A. Formation of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the presence of hydrogen peroxide; the effect of the *AiiA* gene / V.A. Pliuta, Iu.V. Andreenko, A.E. Kuznetsov, I.A. Khmel' // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2013. – 4. – P. 10-14.

1937. Хохлачев Н. С. Технология биологической очистки сточных вод с применением оксидативного воздействия. / Дисс... канд. технич. наук. – М.: Щелково: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2015 г.

1938. Li X.F. Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system / X.F. Li, Y.J. Li, H. Liu et al. // J. Membr. Sci. – 2007. – 287. – Issue 2. – P. 294-299.

1939. Shi S. The algae-lytic ability of bacterium DC10 and the influence of environmental factors on the ability / S. Shi, Y.D. Liu, Y.W. Shen, G.B. Li // Science in China, Ser. C. Life Sciences. – 2005. – 48. – No. 3. – P. 250-255.

1940. Заявка № 2020118749 от 7.06.2020. Способ биологической очистки сточных вод с регулируемым оксидативным воздействием (Кузнецов А.Е., Мелиоранский А.В.)

1941. Справочник по инфракрасной технике / Под ред. У. Волфа, Г. Цисиса. – М.: Мир, 1995. – 606 с.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

УТВЕРЖДАЮ:

Директор

МУП «Тепло Коломны»

Герлиньский Н.Б.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

**опытных испытаний технологии биологической очистки  
сточных вод с регулируемым окислительным воздействием  
Московская обл., Коломенский район, Черкизовские очистные  
сооружения, февраль-июнь 2020 г.**

В период с 20.02.2020 по 18.06.2020 при поддержке администрации Коломенского района Московской области и Министерства жилищно-коммунального хозяйства Московской области были проведены испытания разработанной технологии биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков с регулируемым окислительным воздействием (РОВ-технологии) по согласованной программе на поселковых Черкизовских очистных сооружениях Коломенского района (Московская обл.).

Цель испытаний: определение эффективности предложенной технологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод в отношении улучшения показателей очистки и достижения нормативных требований по показателю ХПК в выходящей сточной воде менее 15 мг/л, соответствующих требованиям к водоемам хозяйственно-питьевого назначения, установленным Санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.5.980-00, а также повышения эффективности очистки сточных вод по показателям содержания аммонийного и нитратного азота и фосфатов.

**1. Общая характеристика очистных сооружений**

Место локализации – д. Черкизово, Коломенский р-н, Московская обл.

Схема биологической очистки – аэротенк-смеситель с вторичным отстойником.

Объем очистных сооружений (ОС) – 150 м<sup>3</sup>.

Глубина толщ воды в аэротенке – 3,5 м.

Поток сточной воды – 160–240 м<sup>3</sup>/сут.

Время пребывания воды в очистных сооружениях – 15–23 час.

Подача сточной воды – в автоматическом отъемно-доливном режиме с включением подачи новой порции воды в течение 20 мин через каждый час в объеме 8-10 м<sup>3</sup> на вход в очистные сооружения и отводом соответствующего количества воды из вторичного отстойника.

Среднее содержание загрязнений в период испытаний:

- взвешенные вещества  $ВВ_{ср.сут.}$  – 257 мг/л,

- ХПК<sub>ср.сут.</sub> – 609 мг/л,

- аммонийный азот  $N-NH_{ср.сут.}$  – 19,4 мг/л,

- азот нитратов  $N-NO_{ср.сут.}$  – 0,3 мг/л,

- фосфор фосфатов  $P-PO_{ср.сут.}$  – 4,3 мг/л.

## 2. Подготовительные работы

В ходе подготовительных работ было проведено следующее дооснащение очистных сооружений:

- заменен электропривод воздуходувок для обеспечения требуемого расхода воздуха для аэрации перед опытными испытаниями;

- завезен и загружен активный ил с центральных коммунальных очистных сооружений г. Коломны 20.02.2020 в количестве 5 м<sup>3</sup>;

- установлены и подключены к электросети пять светодиодных фонарей (световые активаторы) освещения мощностью по 100 Вт каждый на высоте 1,5-2,5 м от поверхности воды в аэротенке;

- изготовлена и доставлена к месту назначения товарная форма РОВ-активатора биологической очистки на основе пероксида водорода в пластиковых канистрах объемом по 30 л;

- подготовлена емкость объемом 200 л для приготовления 5%-го рабочего раствора РОВ-активатора.

## 3. Технологический и химико-аналитический контроль

В ходе испытаний дозировка активатора осуществлялась порционно в виде 5%-го раствора в течение 2 часов с интервалом 15 минут в утреннее время с 10.00 до 12.00.

Осветительные фонари включались в ночное время. Освещенность зеркала воды аэротенка видимым светом в ночное время составляла от 100 до 800 Лк в зависимости от расстояния точки освещения на поверхности воды в аэротенке от источника освещения.

На всех этапах испытаний непосредственно на очистных сооружениях осуществлялся контроль следующих параметров:

- технологические параметры работы ОС: расход сточной воды, режимы работы воздуходувок;
- температура воды в аэротенке с помощью погружного термометра;
- уровень освещенности над аэротенком на расстоянии 50 см от поверхности воды с помощью люксметра/УФ-радиометра;
- объем осадка активного ила в пробе, отобранной перед внесением пероксида водорода, после осаждения в мерном цилиндре объемом 100 мл – для последующего определения индекса ила;
- прочие особенности в случае отклонений в работе очистных сооружений (изменения режима работы воздуходувок, резкие изменения в состоянии активного ила, резкие изменения в расходе сточной воды, отбор избыточного активного ила, особенности погоды – дождь/снег, ясно, пасмурно и т.п.).

Отбор проб для определения качества очистки сточной воды проводился ежесуточно в утреннее время в интервале с 9.00 до 10.00 до внесения активатора биологической очистки согласно утвержденному плану работ и существующей на очистных сооружениях методике.

Отбирались:

- проба №1 – вода на входе в аэротенк после песколовки;
- проба №2 – вода непосредственно с активным илом из зоны аэрации;
- проба №3 – осветленная вода на выходе сточной воды из вторичного отстойника.

Пробы доставлялись в течение не более 1 часа в аналитическую лабораторию сооружений очистки городских хозяйственно-бытовых стоков для определения следующих показателей:

- взвешенные вещества, мг/л;
- ХПК, мг/л; в воде на входе и выходе из очистных сооружений определялось по ПНД Ф 14.1:2:4.210-2005 без отстаивания пробы сточной воды; ХПК в

аэротенке определялось по аналогичной методике, но в осветленной воде после отстаивания пробы в течение 30 мин;

- азот аммонийный N-NH<sub>4</sub>, мг/л в отфильтрованной пробе;
- азот нитратный N-NO<sub>3</sub>, мг/л в отфильтрованной пробе;
- фосфор общий PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, мг/л в отфильтрованной пробе.

#### 4. Изменение показателей очистки в ходе испытаний

Испытания были проведены в 3 этапа.

Этап 1 – без внесения активатора, в период от 1 до 33 суток от начала испытаний.

Этап 2 – с внесением активатора в дозах от 3 л до 20 л 5% раствора в сутки, что эквивалентно внесению от 1 до 7 г/м<sup>3</sup> в сутки в пересчете на 100% перексид водорода, в период от 34 до 99 суток от начала испытаний.

Этап 3 – без внесения активатора, в период от 100 до 120 суток от начала испытаний.

Общая сводная таблица показателей за весь период испытаний дана в Приложении 1 к настоящему отчету.

На рис. 1-3 представлены изменения основных показателей биологической очистки сточных вод, в табл. 1 приведены результаты испытаний в обобщенном виде.

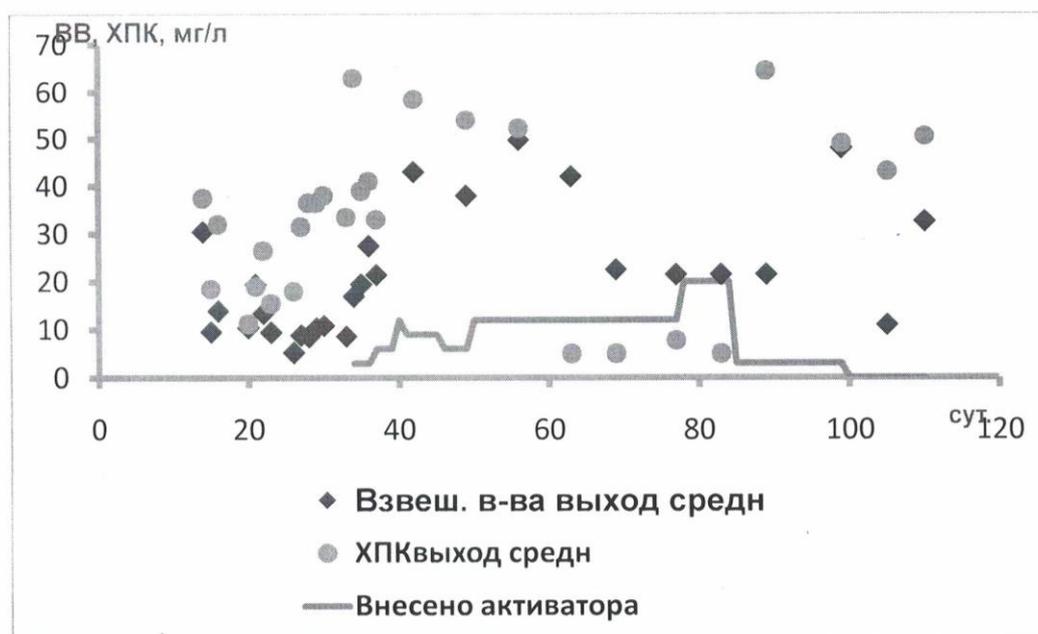


Рисунок 1. Изменение во времени содержания взвешенных веществ и ХПК на выходе из очистных сооружений.

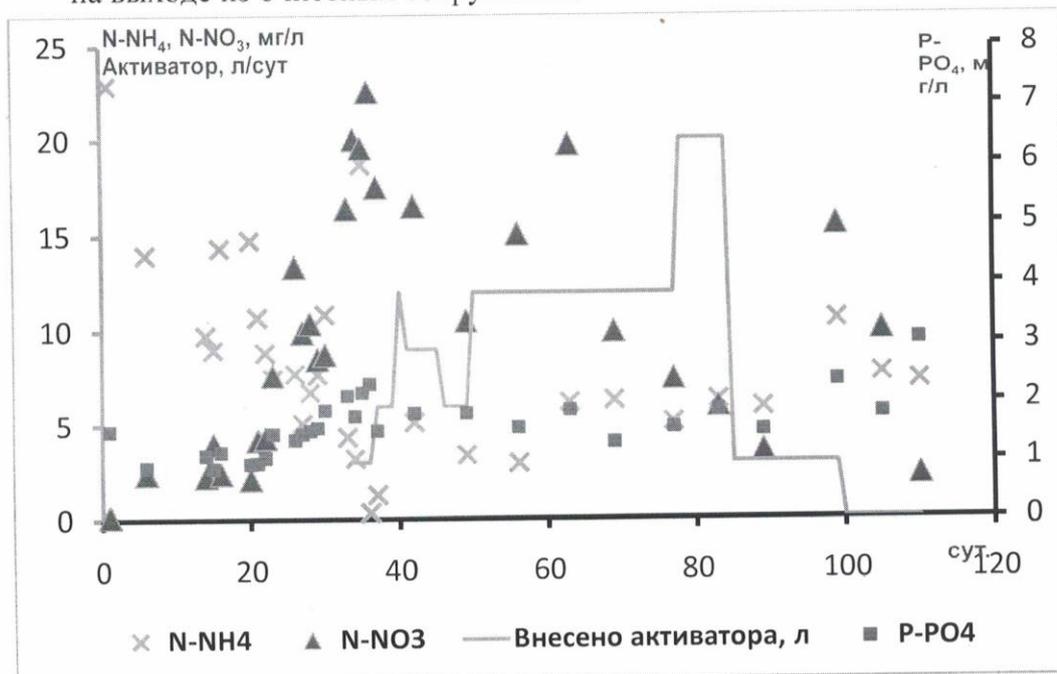


Рисунок 2. Изменение содержания азота и фосфора на выходе из очистных сооружений.

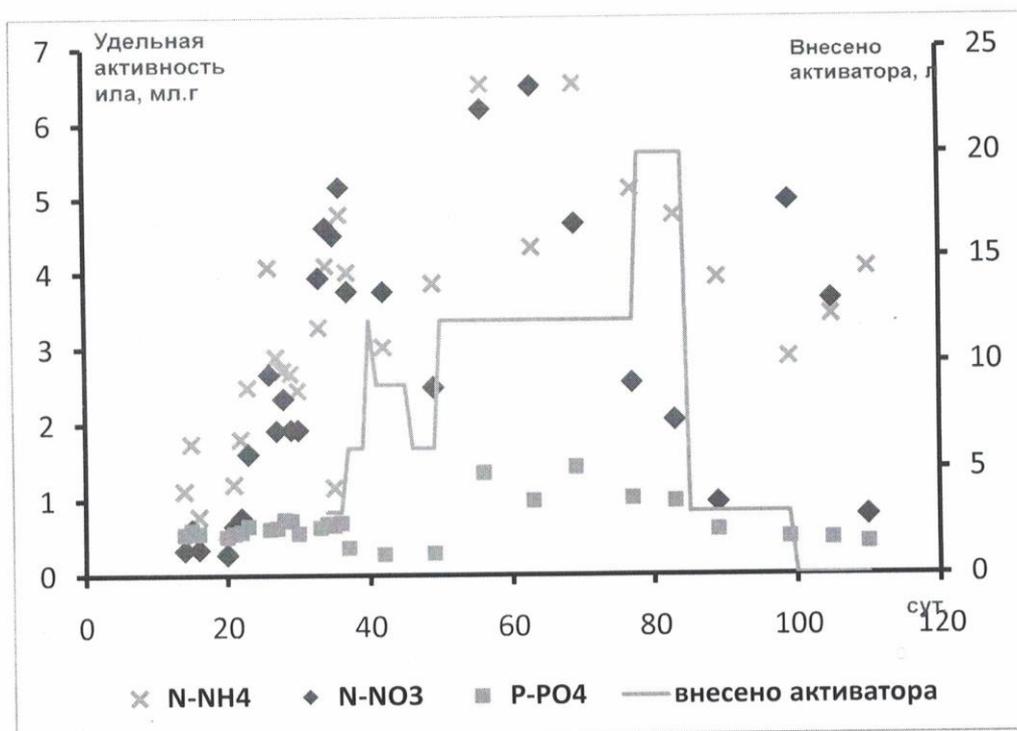


Рисунок 3. Изменение удельной активности ила по удалению азота и фосфора.

Таблица 1. Усредненные показатели очистки на выходе из ОС

Вариант	ВВ <sub>вых</sub>	ХПК <sub>вых</sub>	N- NH <sub>4</sub> <sub>вых</sub>	N- NO <sub>3</sub> <sub>вых</sub>	P- PO <sub>4</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт-ть ила по удалению N-NH <sub>4</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт-ть ила по нитрифи- кации N-NO <sub>3</sub> <sub>вых</sub>	Уд. акт-ть ила по дефосфа- тации P-PO <sub>4</sub> <sub>вых</sub>
Без реаген- та, среднее, мг/л	28,3	51,8	7,9	7,9	2,2	3,6	7,7	0,5
С реаген- том, среднее, мг/л	26,9	<b>5,7</b>	<b>6,0</b>	<b>10,8</b>	<b>1,6</b>	<b>5,2</b>	<b>10,5</b>	<b>1,1</b>

Из рис. 1 видно, что внесение РОВ-активатора с постепенным увеличением суточной дозы приводит к адаптации активного ила к оксидативному воздействию реагента. После адаптации ила внесение активатора в дозах 12 л/сут (в пересчете на активное вещество - 4 г/м<sup>3</sup>.сут), приводит к снижению показателя ХПК в выходной воде до недетектируемых величин (менее 10 мг/л), т.е. до значений, близких к нулю. Эффект снижения ХПК до минимально возможных значений был стабилен и наблюдался на протяжении более чем 30 суток, когда активатор вносился в оптимальных дозах.

Одновременно наблюдалось повышение скорости и степени нитрификации и снижение содержания фосфатов в выходящей воде (рис. 2), а также возрастание удельной активности ила (рис. 3) по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды. При прекращении внесения активатора (этап 3 испытаний) показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до его внесения (на этапе 1 испытаний).

Испытания показали, что внесение активатора в оптимальных дозах приводит к снижению остаточного содержания загрязнений в выходящей сточной воде: по ХПК – оценочно в 8-10 раз, по фосфатам – в 1,3-1,5 раз с одновременным повышением нитрифицирующей и денитрифицирующей активности в 1,1-1,3 раз, возрастанием скорости денитрификации, удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды.

## 5. Технологические особенности очистных сооружений

### и их влияние на качество очистки

1. Невозможность качественного разделения активного ила в отстойнике из-за отъемно-доливного режима подачи сточной воды приводила к периодическому всплыванию легкой фракции ила.
2. В отстойнике наблюдалось выделение пузырьков газа вследствие протекания процесса денитрификации.
3. Суточная неравномерность подачи сточной воды в очистные сооружения (в ночное время приход воды минимален).

### 6. Выводы

Проведены испытания технологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод на поселковых очистных сооружениях с потоком сточной воды 160-240 м<sup>3</sup>/сут с регулируемым окислительным воздействием (РОВ-технологии). Установлено, что РОВ-технология показала свою высокую эффективность в отношении удаления органических загрязнений с возможностью достижения степени очистки в одностадийном процессе по показателю ХПК 99,2%, что обеспечивает абсолютные значения ХПК в очищенной воде близкие к нулю с одновременным повышением степени удаления биогенных элементов из сточных вод.

### 7. Участники и испытаний:

Директор МП «Тепло Коломны»  
объединенных инженерных систем

Н.Б. Герлинский

Начальник Черкизовских ОС

Р.А. Ахматов

Оператор Черкизовских ОС

А.Н. Князьков

Заведующая аналитической лабораторией  
городских очистных сооружений г. Коломны

М.В. Мишутова

Заместитель заведующего кафедрой  
биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева

А.Е. Кузнецов

Помощник министра ЖКХ Московской обл.

А.В. Мелиоранский

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор  
 ООО «Водоканал»  
 Кядиков Э. М.  
 2020 г.



«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор  
 ООО «ТДС»  
 Мелиоранский А. В.  
 2020 г.



**ОТЧЕТ**

**по результатам опытных испытаний технологии биологической  
 очистки сточных вод с регулируемым окислительным воздействием  
 Московская обл., г. Клин, городские очистные сооружения,  
 15 июня – 17 августа 2020 г.**

В период с 15.06.2020 по 17.08.2020 при поддержке администрации г. Клин Московской области и Министерства жилищно-коммунального хозяйства Московской области были проведены испытания разработанной технологии биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков с регулируемым окислительным воздействием (РОВ-технологии) по согласованной программе на городских очистных сооружениях г. Клин, Московская обл.

Цель испытаний: определение эффективности предложенной технологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод в отношении улучшения показателей очистки, снижения количества избыточного активного ила.

**1. Общая характеристика очистных сооружений**

Место локализации – деревня Ямуга Клинского района, Московская обл.

Схема биологической очистки очистных сооружений (ОС) – 2 линии аэротенков одинаковой конструкции с общим вторичным отстойником.

Конструкция аэротенка – трехкоридорный аэротенк вытеснительного типа объемом 6500 м<sup>3</sup> с зоной интенсивного смешения объемом 430 м<sup>3</sup> и усиленной аэрации поступающей с первичного отстойника сточной воды и поступающего с вторичного отстойника возвратного активного ила с очисткой в режиме вытеснения.

Особенность схемы очистки – очищенная вода с обеих линий аэротенков поступает в общий вторичный отстойник, откуда часть осевшего активного ила направляется на вход аэротенков обеих линий.

Проектная суточная производительность ОС – 30000 м<sup>3</sup>.

Фактическое поступление- 22000-25000 м<sup>3</sup>/сутки.

Поток сточной воды на каждый аэротенк– 11000-13000 м<sup>3</sup>/сутки.

Состав сточной воды – хозяйственно-бытовой сток (около 60% от суммарного потока) с частично очищенными промышленными стоками (около 40% от суммарного потока).

Время пребывания воды в ОС – 10–12 часов.

Глубина водной толщи воды в аэротенке – 4,5 м.

Среднее содержание загрязнений во входной воде после первичного отстойника перед входом в аэротенки в период испытаний:

- взвешенные вещества  $ВВ_{ср.вход}$  – 81,9 мг/л,
- ХПК<sub>ср.вход</sub> – 173,8 мг/л,
- аммонийный азот  $N-NH_4_{ср.вход}$  – 13,5 мг/л,
- нитраты  $N-NO_3_{ср.вход}$  – 0,4 мг/л,
- фосфор фосфатов  $P-PO_4_{ср.вход}$  – 10,0 мг/л.

Особо отметим, что испытания проводились в период ограничений, вызванных пандемией коронавирусной инфекции, в том числе и Московской области. В это время наиболее интенсивно применялись различные дезинфицирующие средства, что могло оказать пагубное влияние на активный ил ОС. Кроме того, химический состав стоков в течение суток сильно менялся, о чем можно судить по цвету и мутности сточной воды на входящем коллекторе и на первичных отстойниках.

## 2. Подготовительные работы

В ходе подготовительных работ было проведено следующее дооснащение очистных сооружений:

- установлены и подключены к электросети 10 светодиодных фонарей (по 5 штук на каждый аэротенк) – источников света мощностью по 200 Вт каждый для активации биологической очистки, два из которых установлены над поверхностью воды в камере интенсивного смешения и аэрации аэротенка (места поступления воды из первичного отстойника и возвратного ила из вторичного отстойника) и по одному – над каждым из трех коридоров аэротенка. Прожекторы включались в темное время суток;

- изготовлена и доставлена к месту назначения концентрированная товарная форма РОВ-активатора биологической очистки, разлитая для удобства обращения в пластиковые канистры объемом по 10 л;

- подготовлена и установлена по месту емкость объемом 200 л для приготовления 5%-го рабочего раствора РОВ-активатора и его дозирования в камеру смешения и интенсивной аэрации;

- подведен планг технологической воды для приготовления рабочего раствора РОВ-активатора в емкостях дозирования реагента перед подачей в аэротенк. Нижняя часть емкости имела сливной кран с патрубком для подачи и внесения реагента самотеком непосредственно в зоны смешения обоих аэротенков.

### **3. Технологический и химико-аналитический контроль**

В ходе испытаний дозировка рабочего раствора РОВ-активатора осуществлялась непрерывно в аэротенки обеих линий в виде 5%-го раствора с 10.00 до 16.00 часов.

Осветительные фонари включались в ночное время. Освещенность зеркала воды аэротенка видимым светом в ночное время составляла от 100 до 800 Лк в зависимости от расстояния точки освещения на поверхности воды в аэротенке от источника освещения.

На всех этапах испытаний непосредственно на очистных сооружениях осуществлялся контроль следующих параметров:

- технологические параметры работы ОС: расход сточной воды, режимы работы воздуходувок;
- уровень освещенности над аэротенком на расстоянии 50 см от поверхности воды с помощью люксметра;
- прочие особенности в случае отклонений в работе очистных сооружений (изменения режима работы воздуходувок, резкие изменения в состоянии активного ила, резкие изменения в расходе сточной воды, отбор избыточного активного ила, особенности погоды – дождь, ясно, пасмурно и т.п.).

Отбор проб для определения качества очистки сточной воды проводился ежедневно в утреннее время в интервале с 9.00 до 10.00 до внесения активатора биологической очистки согласно утвержденному плану работ и существующей на очистных сооружениях методике.

Отбирались:

Проба №1 – вода на входе в очистные сооружения (в соответствии с регламентом технологического контроля работы ОС).

Проба №2 – вода после первичного отстойника на входе в аэротенк (дополнительно к регламентным измерениям).

Проба №3 – вода с активным илом на выходе из аэротенка № 1 перед коллектором (в соответствии с регламентом технологического контроля работы ОС).

Проба №4 – вода с активным илом на выходе из аэротенка № 2 перед коллектором (в соответствии с регламентом технологического контроля работы ОС).

Проба №5 – осветленная вода на выходе сточной воды из вторичного отстойника (в соответствии с регламентом технологического контроля работы ОС).

После отбора пробы доставлялись в лабораторию для определения следующих показателей:

- взвешенные вещества, мг/л – в пробах №№ 1,2 – без предварительного отстаивания воды, в пробах №№ 3,4 – после отстаивания воды в течение 30 мин, в пробе № 5 без предварительного отстаивания и с отстаиванием воды в течение 30 мин;

- ХПК, мг/л – в пробах №№ 1,2 – без предварительного отстаивания воды, в пробах №№ 3,4 – после отстаивания воды в течение 30 мин, в пробе № 5 без предварительного фильтрования и с фильтрованием воды в течение 30 мин;

- азот аммонийный N-NH<sub>4</sub>, мг/л – во всех отфильтрованных пробах;

- азот нитратный N-NO<sub>3</sub>, мг/л – во всех отфильтрованных пробах;

- фосфор фосфатов P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, мг/л – во всех отфильтрованных пробах;

- содержание ила в аэротенке, г/л (по сухим веществам) – в пробах №№ 3,4;

- индекс ила в аэротенке, мл/г абс. сух. в-ва ила – в пробах №№ 3,4.

Все результаты испытаний заносились в общую сводную таблицу.

#### **4. Изменение показателей очистки в ходе испытаний**

Испытания были проведены в 2 этапа.

Этап 1 – с внесением РОВ-активатора в дозах от 10 л до 80 л концентрата в сутки с внесением в виде 5% после его разбавления, что эквивалентно внесению от 0,3 до 2,4 г/м<sup>3</sup> в сутки в пересчете на 100% активное вещество, в течение 35 суток от начала испытаний.

Этап 2 – без внесения активатора, в период от 36 до 64 суток от начала испытаний.

На всем протяжении испытаний очистка проводилась в режиме полного возврата ила (в режиме самоокисления), т.е. нарастающий избыточный ил не выводился целенаправленно из очистных сооружений, однако незначительная доля ила выносилась из очистных сооружений как составляющая взвешенных веществ.

Общая сводная таблица показателей за весь период испытаний дана в Приложении 1 к настоящему отчету.

В табл. 1 приведены сведения о показателях загрязненности сточной воды на входе и выходе из очистных сооружений, усредненные за весь период испытаний.

Таблица 1 – Средние показатели загрязненности сточной воды на входе и выходе из очистных сооружений (ОС).

№ п/п	Технологическая стадия очистки	Содержание, мг/л				
		Взвеш. в-ва	ХПК	N-NH <sub>4</sub>	N-NO <sub>3</sub>	P-PO <sub>4</sub>
1	Вход в ОС	130,9	195,4	11,3		
2	Вход после первичного отстойника	81,9	173,8	13,5	0,39	6,5
3	Выход из вторичного отстойника без дополнительного отстаивания (ВВ)/фильтрования (ХПК)	83,0	68,0			10,0
4	Выход из вторичного отстойника после дополнительного отстаивания в течение 30 мин (ВВ)/фильтрования (ХПК)	23,7	40,4	0,51	20,9	11,0

Видно, что в первичном отстойнике удаляется около 37% загрязнений по ХПК. В нем, очевидно, протекают процессы аммонификации и гидролиза полифосфатов, что приводит к некоторому росту аммонийного азота и растворенных фосфатов в воде, выходящей из первичного отстойника.

В процессе прохождения азротенка и вторичного отстойника удаляется около 77% загрязнений по ХПК и 96,2% аммонийного азота, основная часть которого окисляется в нитраты. Нитрификация протекает очень эффективно, о чем свидетельствует низкое содержание аммонийного азота и высокое содержание нитратов в выходящей воде. При отсутствии существенного прироста и

отвода активного ила в режиме самоокисления ила фосфаты практически не удаляются (табл. 1).

Во время пребывания воды во вторичном отстойнике наблюдается выделение пузырьков газа, что объясняется протеканием денитрификации с выделением молекулярного азота. Это приводит к всплыванию части ила во вторичном отстойнике и росту содержания взвешенных веществ в воде, выходящей из вторичного отстойника. По этой причине целесообразно было дополнительно определять содержание взвешенных веществ в воде, выходящей из вторичного отстойника, после отстаивания в течение 30 мин.

На рис. 1-4 представлены изменения основных показателей биологической очистки сточных вод по ходу испытаний.

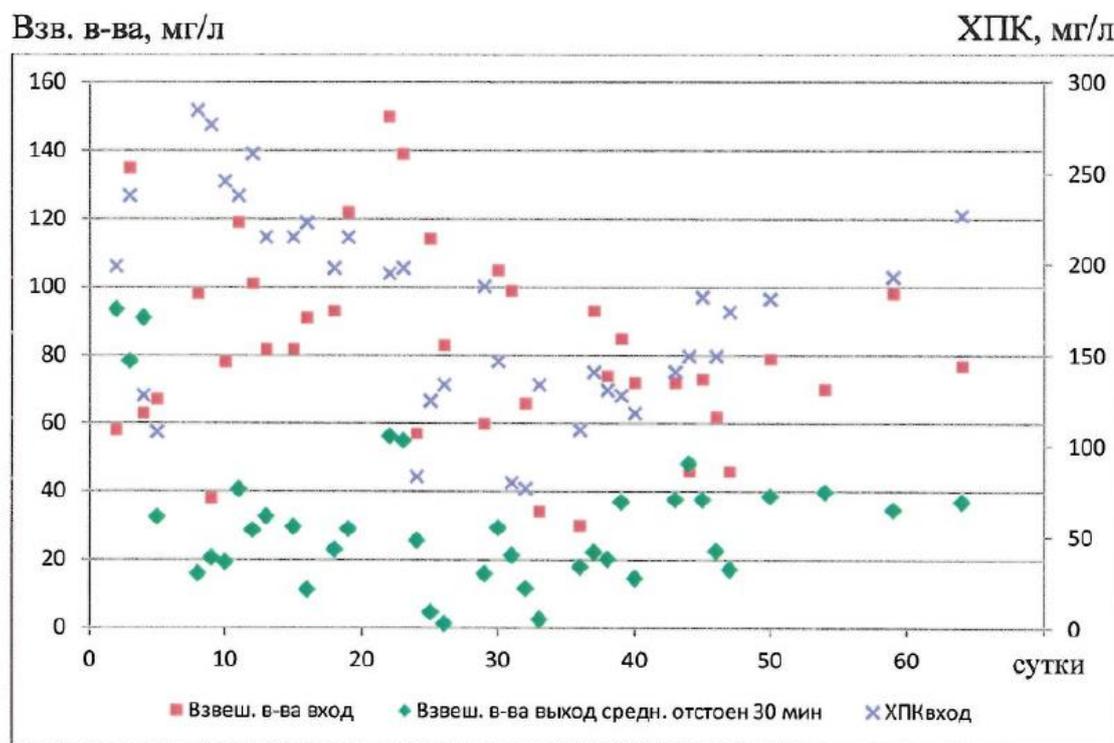


Рис. 1. Изменение содержания взвешенных веществ на входе в аэротенк, выходе из вторичного отстойника и ХПК на входе в аэротенк.

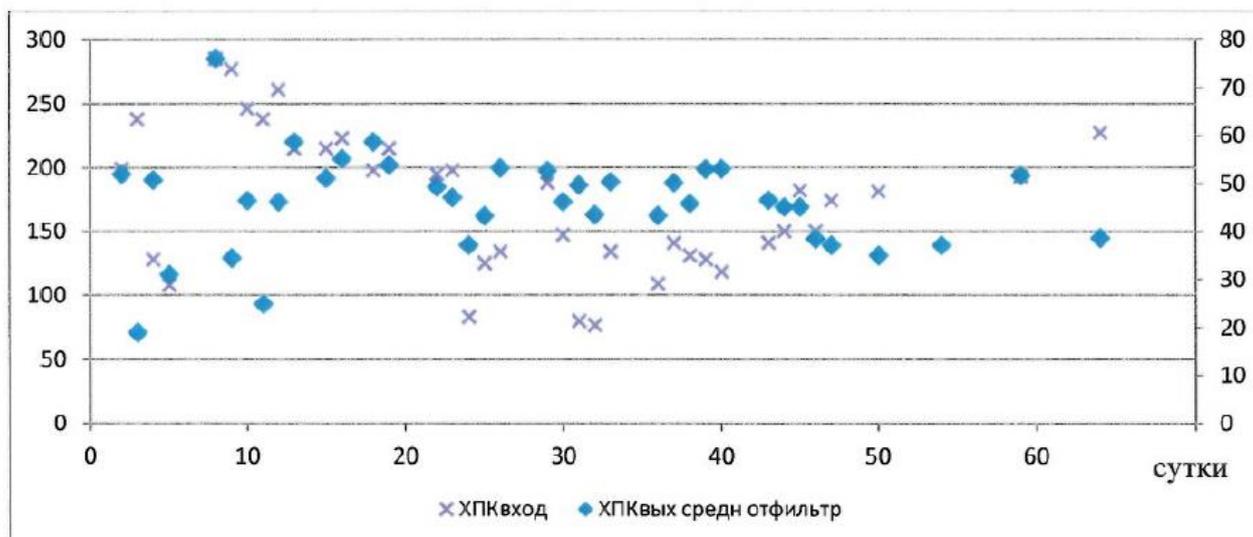


Рис. 2. Изменение содержания ХПК (неотфильтрованное) на входе в аэротенк и ХПК (отфильтрованное) на выходе из аэротенка.

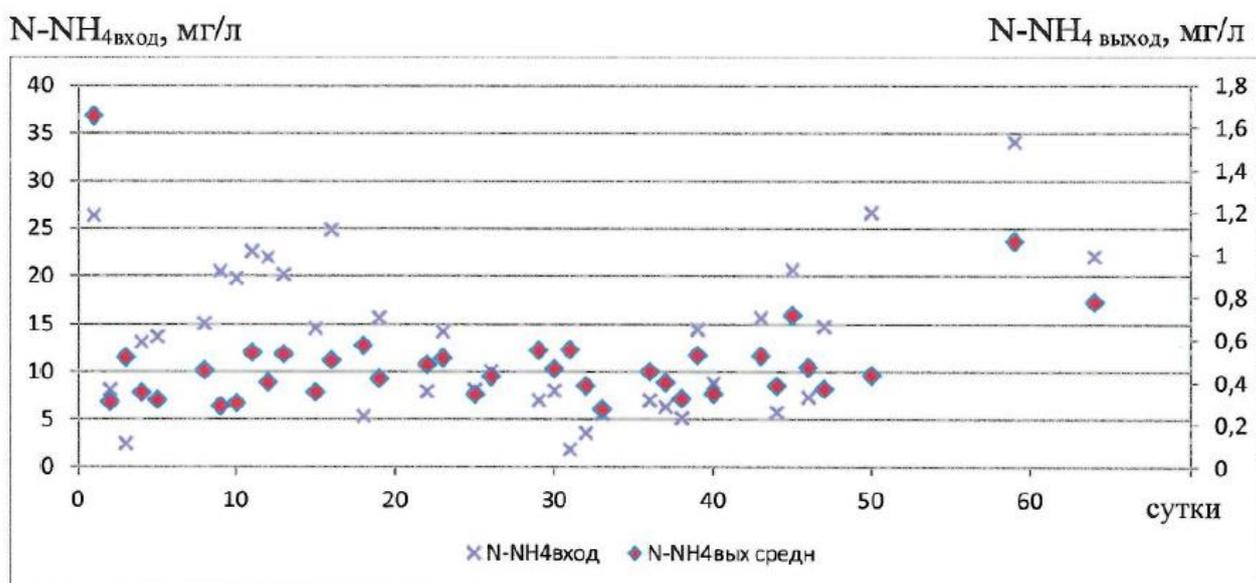


Рис. 3. Изменение содержания  $N-NH_4$  на входе после первичного отстойника и в выходящей из вторичного отстойника сточной воде.

Сопоставление изменений содержания взвешенных веществ, ХПК и  $N-NH_4$  не выявило явных корреляций между этими величинами (рис. 1, 2, 3). Однако явная корреляция наблюдается между содержанием фосфатов на входе и выходе из аэротенка (рис. 4). Изменения в содержании фосфатов на входе и выходе обусловлены скорее всего разбавлением загрязнений ливневой водой, поступающей на очистные сооружения вместе с хозяйственно-бытовыми и промышленными стоками (рис. 5), что видно из рис. 5 по изменению показателя

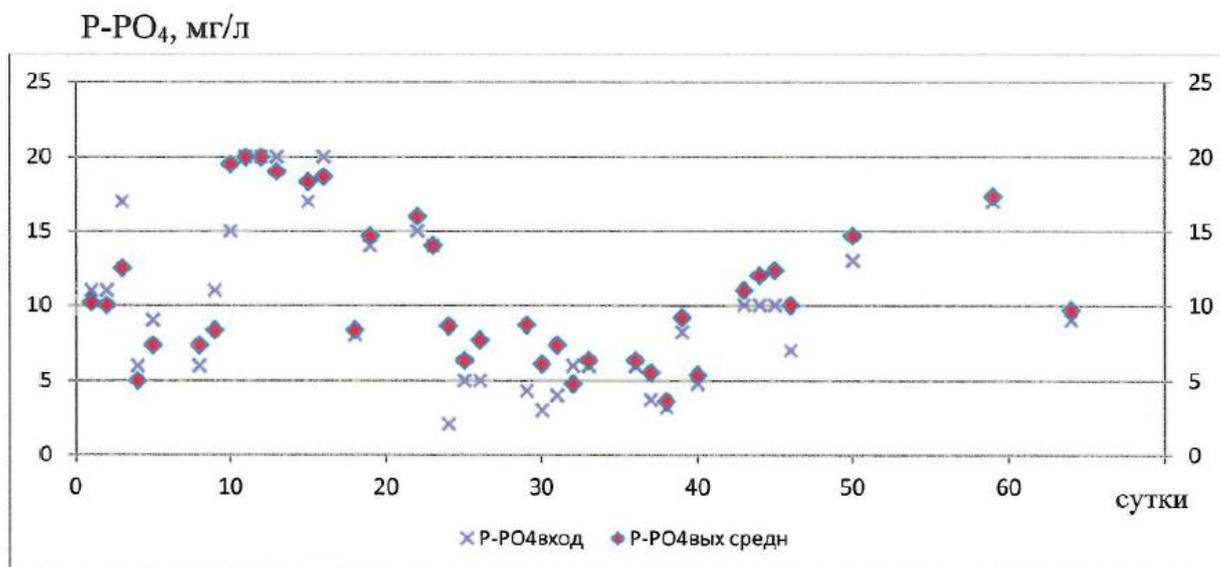


Рис. 4. Изменение содержания P-PO<sub>4</sub> на входе после первичного отстойника и в выходящей из вторичного отстойника сточной воде.

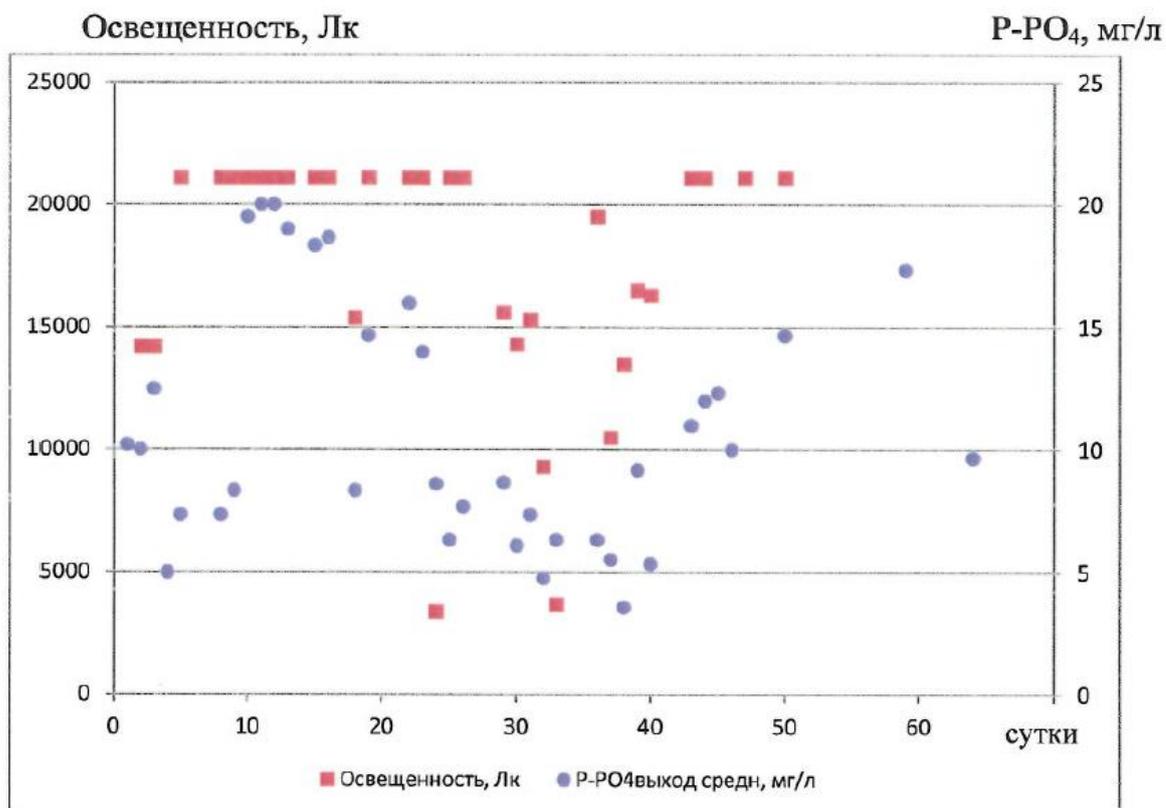


Рис. 5. Сопоставление показателя P-PO<sub>4</sub> на выходе из ОС с изменением показателя освещенности.

освещенности зеркала воды. В дождливую погоду освещенность существенно ниже. В то же время фактор дождливой погоды мало сказывается на выходных показателях ХПК и  $N-NH_4$ .

На рис. 6-10 сопоставлены изменения в основных выходных показателях биологической очистки сточных вод по ходу испытаний с вносимым ежесуточно количеством реагента. Не наблюдается явной корреляции между дозой реагента при внесении последнего в количестве до 2,4 мг/л и показателями  $XPK_{вых}$  (рис. 7) и  $N-NO_3_{вых}$  (рис. 9). В то же время обращает на себя внимание явная корреляция между дозой реагента и показателем содержания взвешенных веществ на выходе из ОС (рис. 6). Так, при внесении реагента в количестве 1,5-2,4 мг/л наблюдается снижение взвешенных веществ на выходе вплоть до величин 0,5-1,5 мг/л. Аналогичная корреляция наблюдается между дозой реагента и  $N-NH_{4_{вых}}$  (рис. 8). Среднее содержание  $N-NH_4$  по данным аналитической лаборатории очистных сооружений, предоставленным до начала испытаний, в выходящей сточной воде составляло около 1,6 мг/л. Внесение же реагента в период испытаний приводило к снижению  $N-NH_4$  до величин 0,3-0,5 мг/л.

Взвеш. в-ва, мг/л

Суточная доза реагента, л

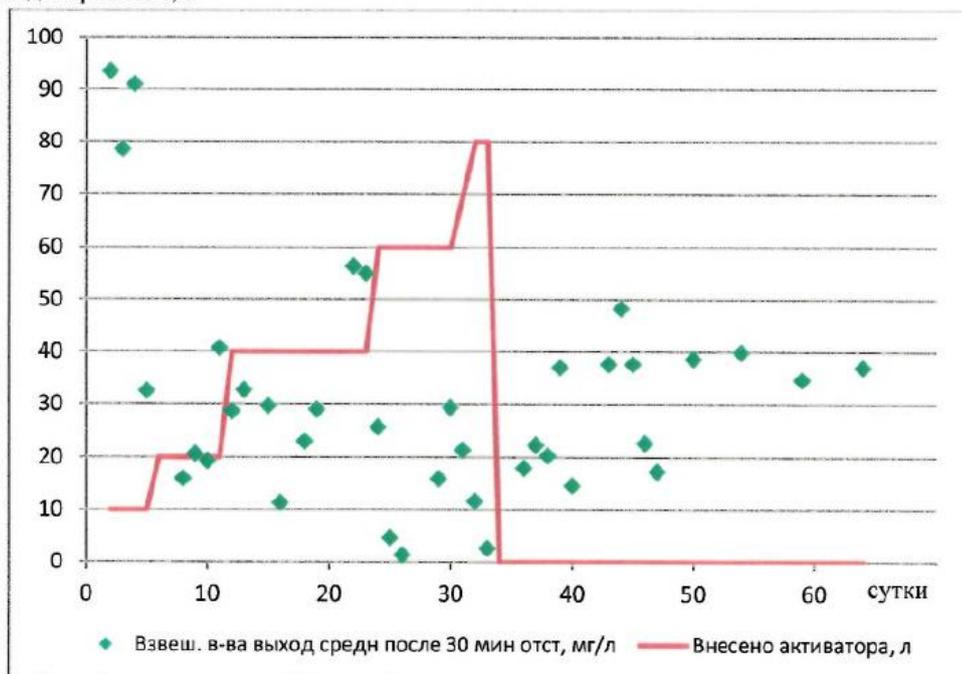


Рис. 6. Сопоставление изменения содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений с изменением суточной дозы реагента.

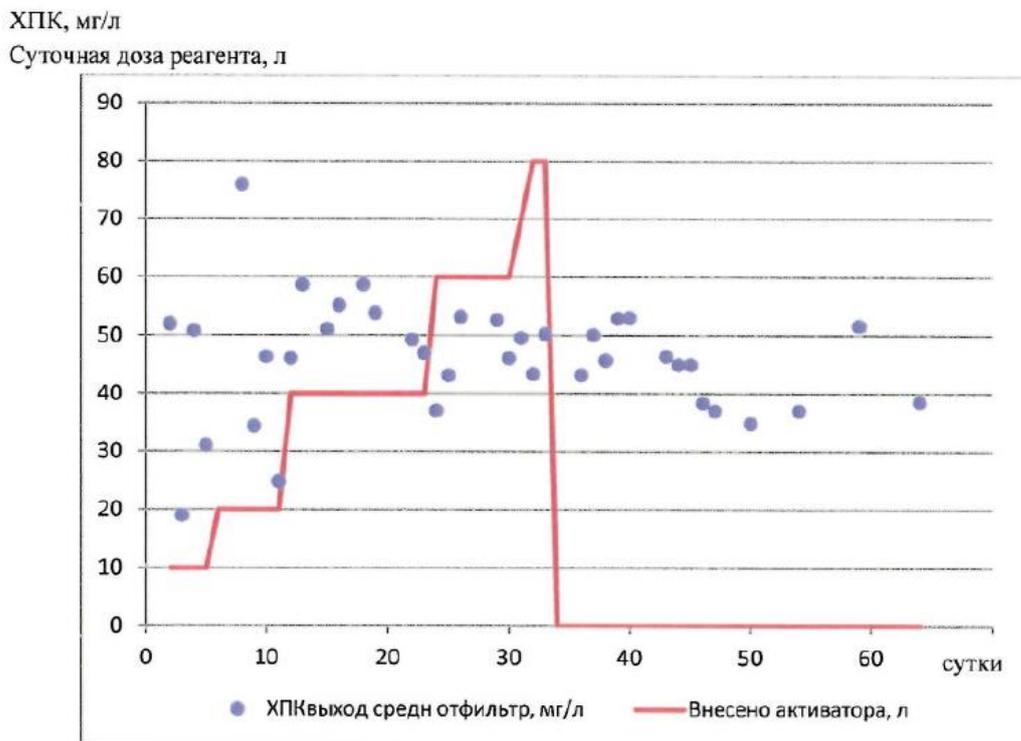


Рис. 7. Сопоставление изменения содержания ХПК на выходе из очистных сооружений с изменением суточной дозы реагента

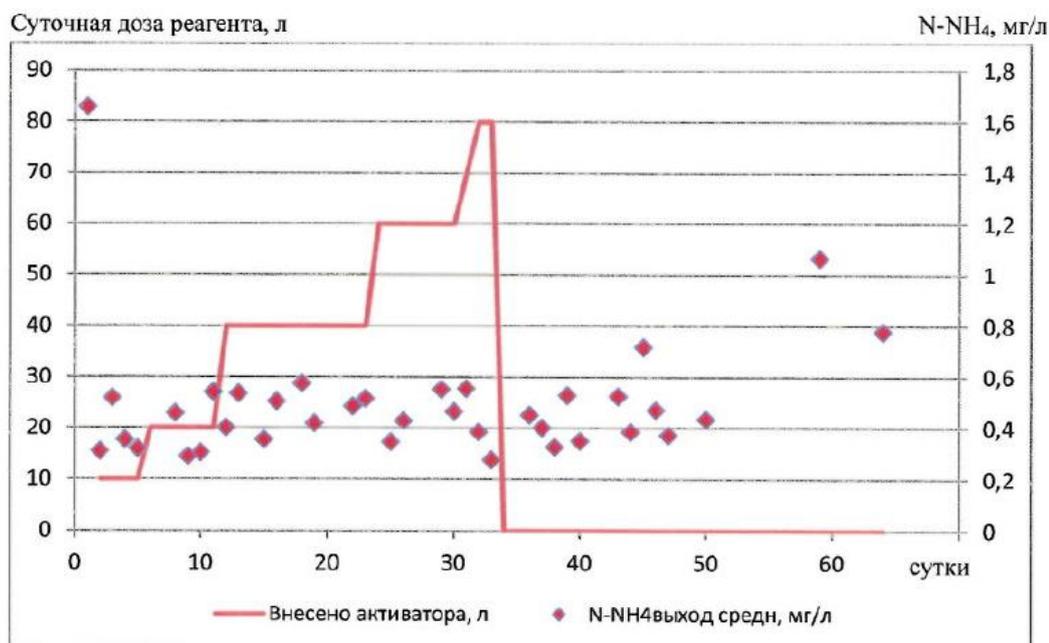


Рис. 8. Сопоставление изменения содержания N-NH<sub>4</sub> на выходе из очистных сооружений с изменением суточной дозы реагента.

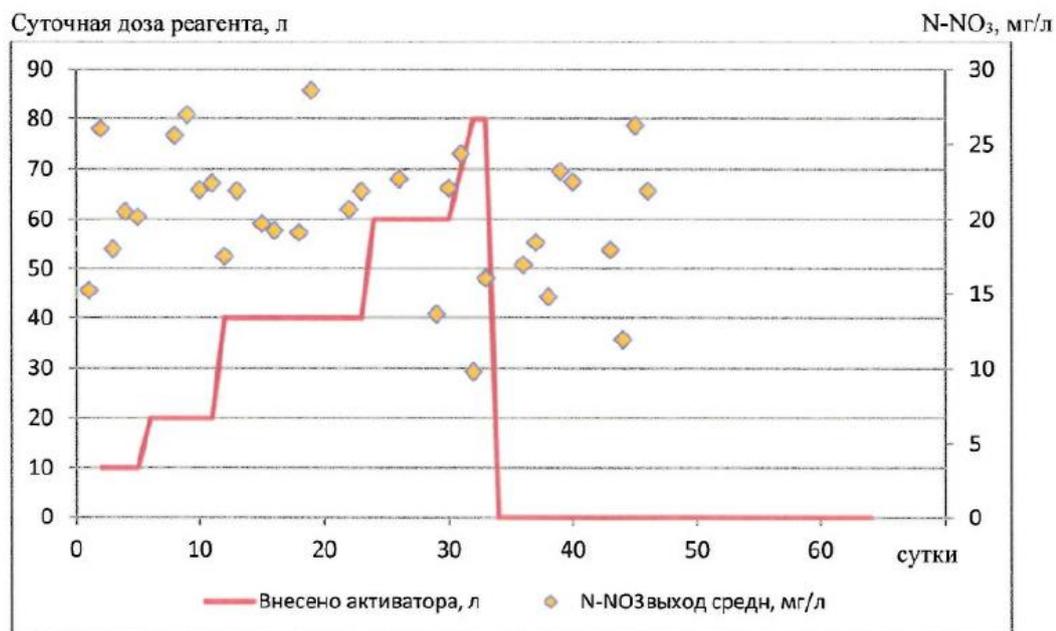


Рис. 9. Сопоставление изменения содержания N-NO<sub>3</sub> на выходе из очистных сооружений с изменением суточной дозы реагента.

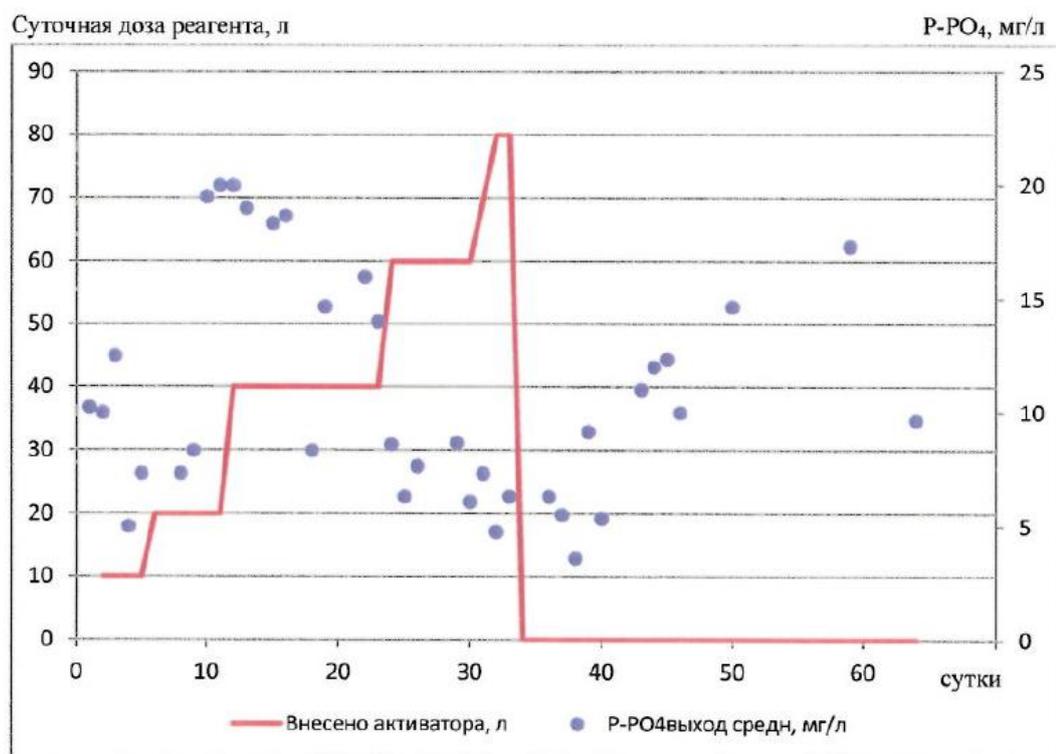


Рис. 10. Сопоставление изменения содержания P-PO<sub>4</sub> на выходе из очистных сооружений с изменением суточной дозы реагента.

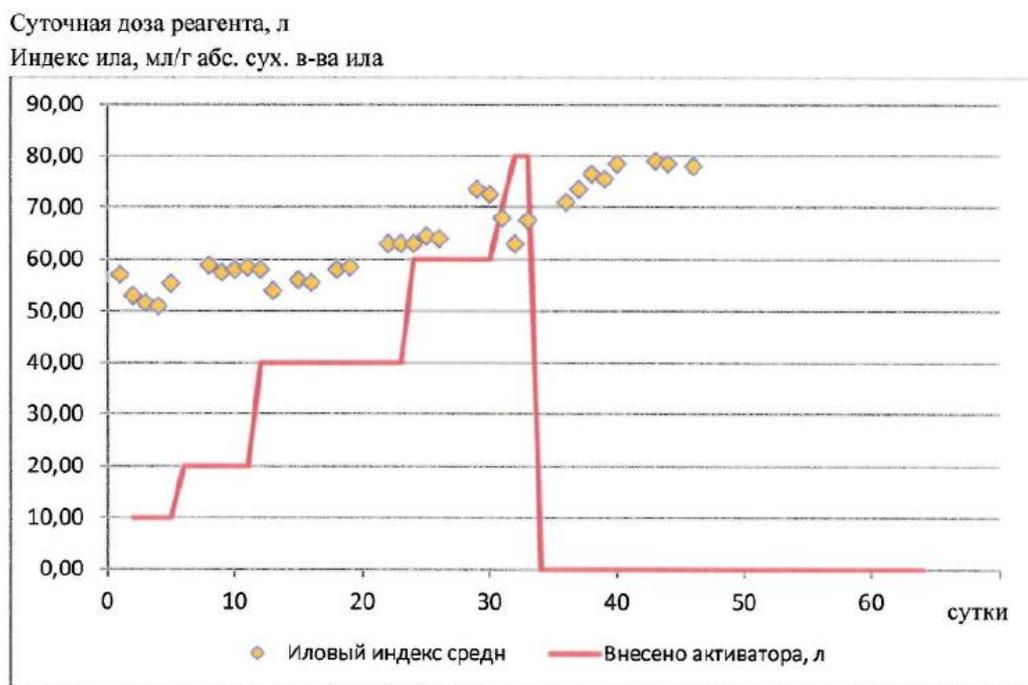


Рис. 11. Сопоставление изменения илового индекса с изменением суточной дозы реагента.

Также наблюдается явная корреляция между дозой реагента и  $P-PO_{4\text{вых}}$  (рис. 10). Однако учитывая, что поглощение фосфора, как уже было отмечено, в ходе испытаний не происходило (см. табл. 1), наблюдаемая корреляция мнимая и обусловлена разбавлением сточной воды ливневыми водами (см. рис. 5).

По ходу испытаний наблюдалось постепенное незначительное возрастание индекса ила (рис. 11).

Непосредственное сопоставление изменения выходных показателей очистки в зависимости от суточной дозы внесенного реагента убедительно доказывает факт позитивного влияния РОВ-активатора на снижение на выходе из очистных сооружений содержания взвешенных веществ (рис. 12) и аммонийного азота (рис. 14). Наблюдается тенденция к незначительному снижению (рис. 7) выходного показателя по ХПК. На выходные показатели очистки по  $N-NO_3$  и  $P-PO_4$  явного влияния реагента в суточных дозах до  $2,4 \text{ г/м}^3$  не прослеживается (рис. 13, 15, 16). Также не наблюдается существенного изменения индекса ила с ростом суточного количества внесенного реагента (рис. 17).

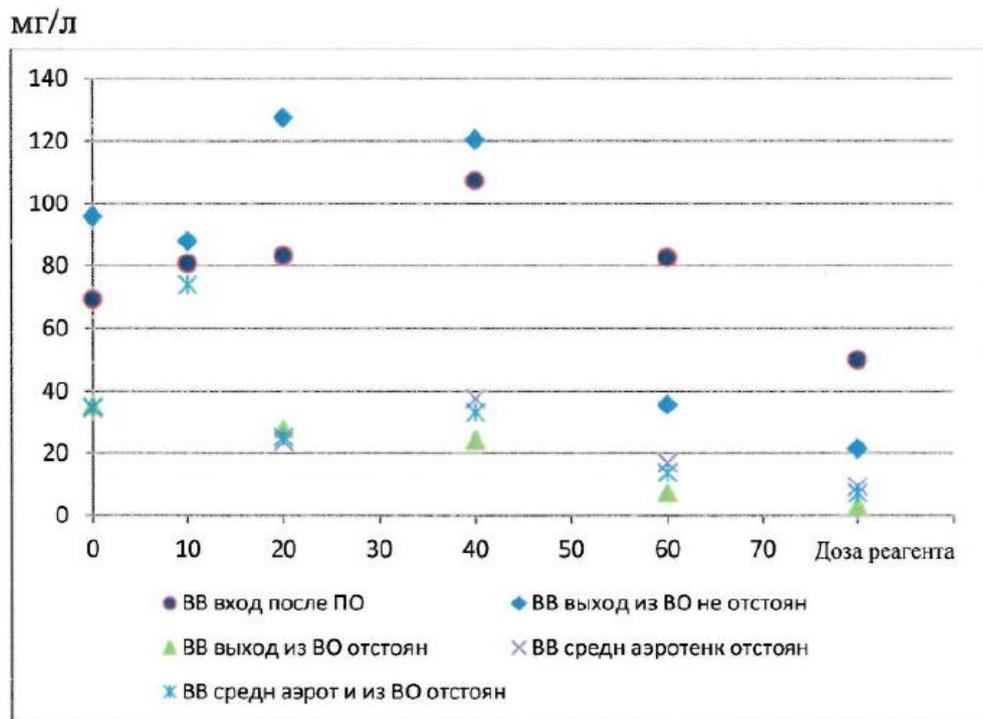


Рис. 12. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

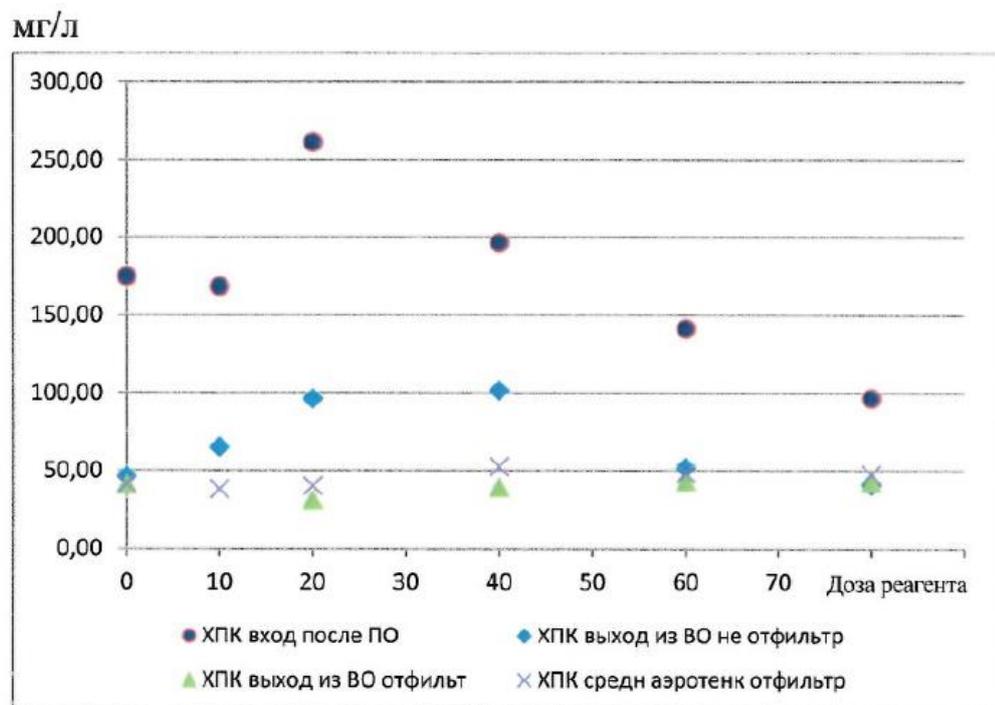


Рис. 13. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение ХПК на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

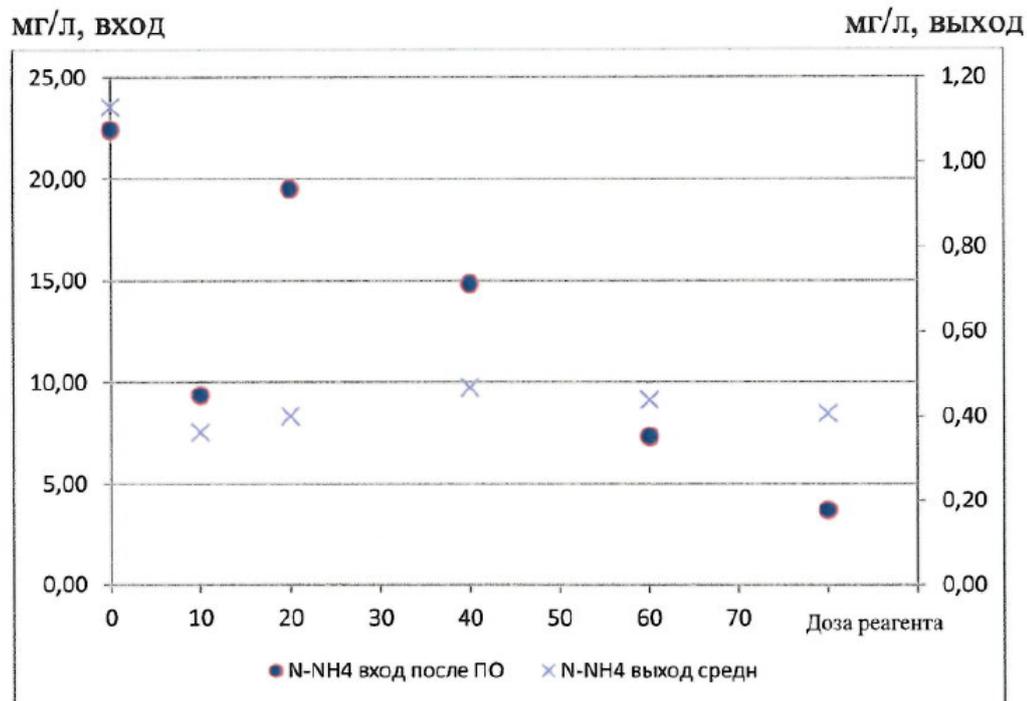


Рис. 14. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания N-NH<sub>4</sub> на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

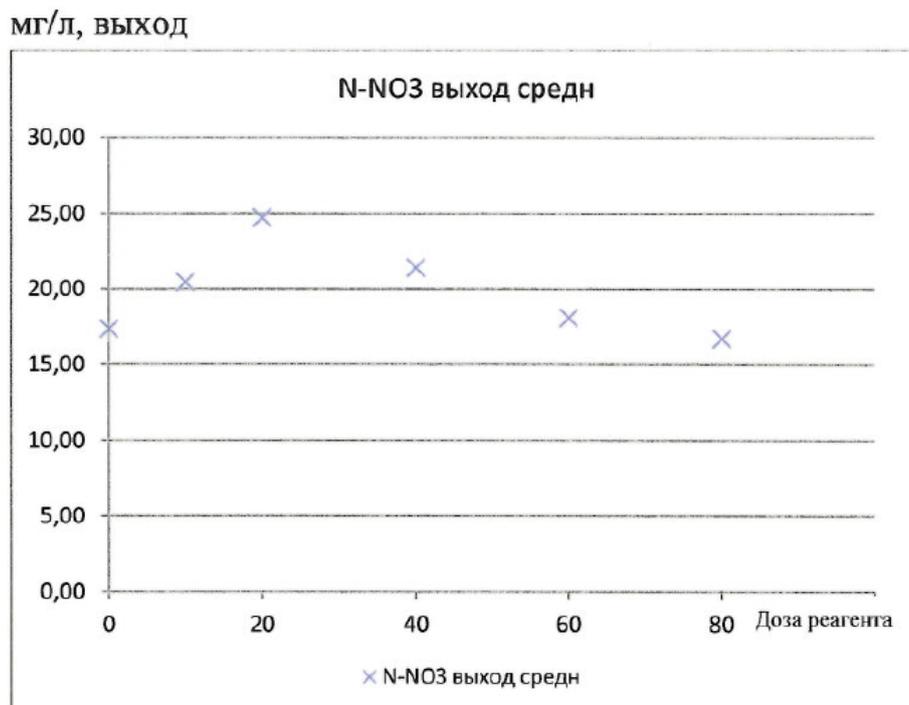


Рис. 15. Влияние суточной дозы реагента на изменение содержания N-NO<sub>3</sub> на выходе из очистных сооружений.

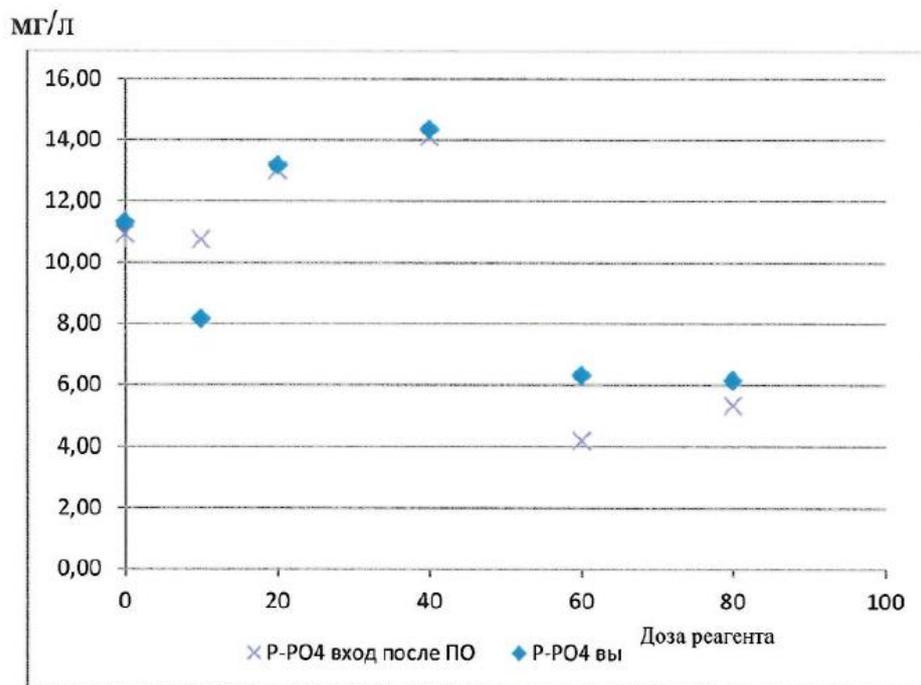


Рис. 16. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания Р-РО<sub>4</sub> на выходе из очистных сооружений в сопоставлении с входными показателями во время внесения реагента.

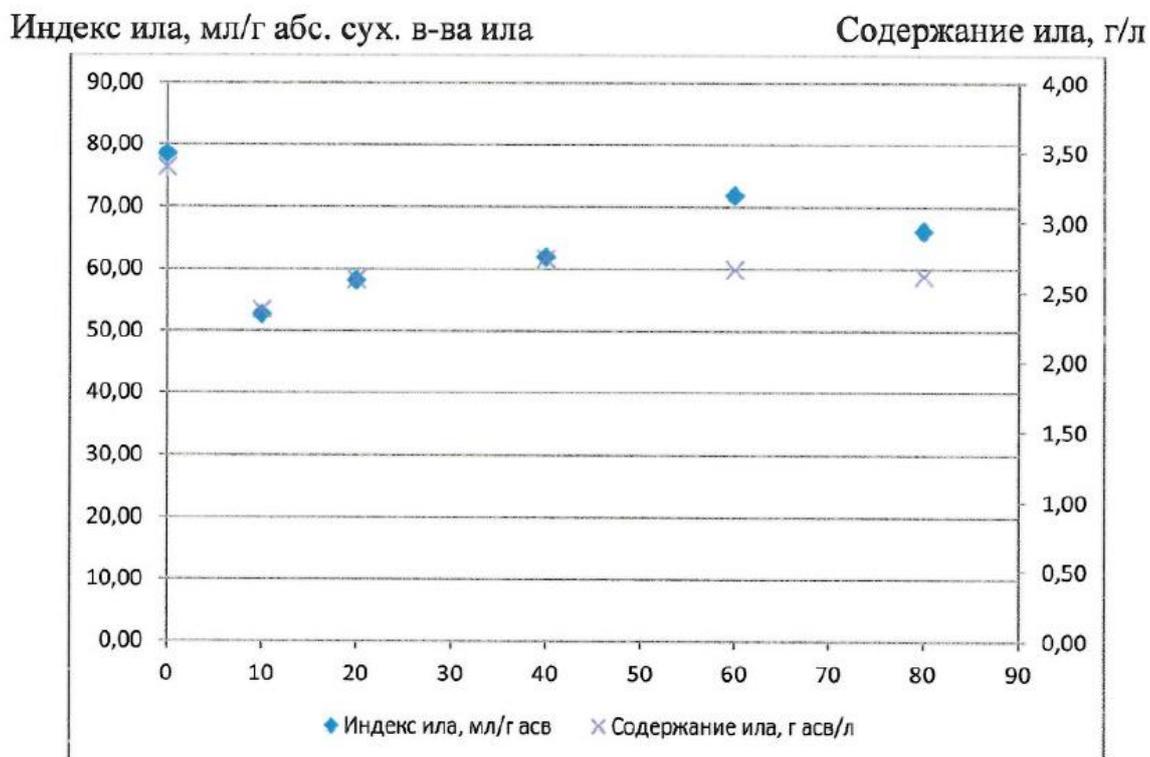


Рис. 17. Влияние суточной дозы РОВ-активатора на изменение содержания ила и индекс ила.

Таким образом, внесение РОВ-активатора в режиме постепенного увеличения суточной дозы от 0,3 до 2,4 г/м<sup>3</sup> с учетом значимости фактора освещения содержимого аэротенка видимым светом – в дневное время и искусственным светом – в ночное время не привело к чрезмерному угнетению и выносу активного ила из очистных сооружений, а напротив, способствовало улучшению выходных показателей очистки по взвешенным веществам – вплоть до снижения их содержания в выходящей воде до 0,5-1,5 мг/л, а содержания ионов аммония с 1,6 мг/л до 0,3 мг/л. Эффект снижения содержания N-NH<sub>4</sub> в выходящей воде был стабилен и наблюдался на протяжении всего периода внесения реагента. При прекращении внесения реагента (этап 2 испытаний) показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до его внесения.

Существенных изменений в содержании остальных измеряемых показателей загрязненности выходящей воды не наблюдалось, что может быть обусловлено недостаточными дозами внесения реагента во время испытаний. Кроме того, необходимо учитывать недостаточное количество питательной среды вследствие невысоких величин ХПК входящей воды.

Необходимо отметить, что в период дозирования РОВ-активатора, особенно при повышенной (40-80 литров) дозировке, наблюдалось значительное снижение интенсивности запахов дурно пахнущих веществ в аэротенках и вторичных отстойниках.

## 5. Выводы и рекомендации

Проведены испытания технологии биологической очистки сточных вод (хозяйственно-бытовые и промышленные стоки) с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) на городских очистных сооружениях в аэротенке вытеснительного типа, работающем на полную нитрификацию, с вторичным отстойником, с потоком сточной воды 22000-25000 м<sup>3</sup>/сут. Установлено, что применение РОВ-технологии в случае режима биологической очистки сточной воды в аэротенке с полной нитрификацией и без отвода избыточного ила обеспечивает свою эффективность в отношении снижения содержания взвешенных веществ в выходящей воде до величин менее 1,5 мг/л, а также снижения содержания аммонийного азота в выходном потоке с 1,6 мг/л до 0,3 мг/л, что соответствует нормативным требованиям для сброса очищенной воды в водоемы рыбохозяйственного назначения по показателям содержания взвешенных веществ и аммонийного азота и одновременно может способствовать значи-

тельному снижению количества образующегося в ходе очистки избыточного активного ила.

В качестве рекомендации для улучшения качества очистки сточных вод целесообразно в дальнейшем апробировать РОВ-технологию в течение более длительного периода с отводом избыточного активного ила, что с большой долей вероятности позволит обеспечить дополнительное снижение показателей по ХПК и фосфору в очищенной воде.

#### 6. Участники и испытаний

Генеральный директор ЗАО «Водоканал»

Э. М. Кядиков

Главный технолог ОС

А. В. Дюкова

Инженер -технолог ОС

В. Д. Чубарова

Заместитель заведующего кафедрой  
биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева

А. Е. Кузнецов

Генеральный директор ООО «ТДС»,  
помощник министра ЖКХ МО

А. В. Мелиоранский

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Утверждаю

Заместитель Генерального директора  
по науке ООО «Газпром ВНИИГАЗ».  
В.Н. Воронин

1» 2015



**АКТ**  
**о внедрении изобретения «Способ биологической**  
**очистки сточных вод и устройство для его осуществления»**

Изобретение по заявке № 2015107707 с приоритетом от 5.03.2015, внедрено с 07.04.2015 в цехе № 1 корпуса № 010 опытно-экспериментальной базы, где используется для обезвреживания локально образующихся хозяйственно-бытовых сточных вод, в соответствии с формулой изобретения.

Директор центра экологической безопасности,  
энергоэффективности и охраны труда

 Н.Б. Пыстина

Заместитель директора центра экологической  
безопасности, энергоэффективности и охраны труда

 Н.В. Попадько

Начальник лаборатории охраны окружающей среды и  
ресурсосбережения

 Г.С. Аكوпова

Утверждаю

Генеральный директор  
ООО «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ  
КОМПАНИЯ «КРЕАХИМ»



П.А. Нефёдов

АКТ

об опытно промышленных испытаниях.

Изобретение по заявке № 2015107707 с приоритетом от 5.03.2015, было предоставлено в ООО «НПК «КРЕАХИМ» для проведения независимых опытных испытаний, которые осуществлялись в период с апреля по май 2015 г. Испытания показали эффективность предлагаемой технологии на модельных хозяйственных бытовых стоках с исходным ХПК 600 мгО<sub>2</sub>/л, фосфатов 15 мг/л, общего азота 38 мг/л. Технология позволила добиться очистки сточных вод до действующих нормативов в области охраны водных ресурсов

Наша компания планирует дальнейшее использование предлагаемой технологии для создания компактных высокоэффективных локальных очистных сооружений.

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования «Российский  
химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»**

**«Утверждаю»**

Проректор по научной и  
инновационной деятельности

РХТУ им. Д.И. Менделеева,

доктор технических наук,

профессор



В. И. Панфилов

2015г.

**Временная инструкция**

по применению оксидативного воздействия для интенсификации  
стадии аэробной биологической очистки сточных вод установки

КОС-30

Москва 2015

**ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический  
университет имени Д.И. Менделеева»**

**«Утверждаю»**

Проректор по научной и  
инновационной деятельности  
РХТУ им. Д.И. Менделеева,  
доктор технических наук,  
профессор



В. И. Панфилов  
2015г.

**Опытно промышленный регламент**  
эксплуатации автоматизированного комплекса с мембранным  
биореактором.

Москва 2015

УДК 661.74

№ госрегистрации: 114111140107

Инв. №

**УТВЕРЖДАЮ**  
ООО «Башкир-Агроинвест»



«01» декабря 2016 г.

**СОГЛАСОВАНО**

Генеральный директор  
ООО «ОРЦ Уфа»



П.В. Авдонин

«01» декабря 2016 г.  
М.П.

**СОГЛАСОВАНО**

И.о. проректора  
РХТУ им. Д.И. Менделеева



В.М. Непочатов

«01» декабря 2016 г.  
М.П.

## **РАЗОВЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ**

производства молочной кислоты (в виде лактата аммония)

(ПРОЕКТ)

Срок действия регламента до "31" декабря 2017 г.