

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И ПРЕПАРАТОВ

УДК 576.12.095.1:577.3

Л. А. Бабурин, Ю. Э. Швинка

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ХЕМОСТАТНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ МАЛЫХ ВОЗМУЩЕНИЯХ

В настоящее время большинство работ по изучению физиологии микроорганизмов проводится методом непрерывного хемостатного культивирования. Это позволяет в некоторой степени стандартизировать экспериментальные данные, а также дает возможность проводить биохимические и биофизические исследования в естественных условиях культивирования [6, 9, 10, 14]. Метод хемостатного культивирования предполагает использование данных, полученных в стационарном состоянии культуры [10], или же изучение динамики переходного процесса от одного стационарного состояния к другому при изменении какого-либо параметра культивирования [7, 11]. Однако если величина и продолжительность изменения параметра относительно невелики, то культура может сохранять стационарное состояние по скорости роста. В этом случае ответная реакция на изменение параметра имеет компенсационный вид и в основном является следствием изменения функционирования энергетических систем микроорганизмов.

В настоящей работе обобщен метод малых возмущений стационарного состояния культуры, сформулированы его основные принципы, частично опубликованные ранее [3, 12, 13]. Приведены примеры использования метода для решения различных задач изучения физиологии микроорганизмов и условий культивирования.

В статье использованы следующие условные обозначения:

μ — удельная скорость роста, ч⁻¹;

D — скорость разбавления среды, ч⁻¹;

Q_{O_2} — удельная скорость потребления кислорода, моль/(г·ч);

Q_{CO_2} — удельная скорость выделения углекислого газа, моль/(г·ч);

Q — удельная скорость выделения тепла, Дж/(г·ч);

C — концентрация;
 Y_S — выход биомассы из субстрата, г/г;
 β — отношение количества потребленного кислорода к добавленному субстрату, моль/моль;
 γ — отношение выделившегося тепла к поглощенному кислороду, Дж/моль;
 δ, δ' — критерий величины воздействия;
 X — концентрация биомассы, г/л.

ТЕОРИЯ

Метод малых возмущений стационарного состояния используется для изучения релаксационных процессов в различных областях науки. Аналогичный подход применяется в некоторых микробиологических экспериментах (например, для качественной проверки факторов [4], лимитирующих оптимизацию состава питательной среды [14]) и является обычно вспомогательным.

Стационарное состояние в экспериментах по культивированию микроорганизмов в ферментере достигается реализацией режима хемостата. При этом задается постоянство скорости разбавления среды D и основных, внешних для клетки, воздействий (концентрация веществ в среде, pH, температура, аэрация и т. д.). После переходного процесса при смене режимов устанавливается стационарное состояние культуры с постоянной скоростью роста $\mu = D = \text{const}$. Кроме того, оно характеризуется постоянством скоростей обмена клетки с ферментационной средой (Q_{O_2} , Q_{CO_2} , Q , Q_S , Q_p и т. д.) и постоянством концентрации веществ в среде (S , P , H^+ , K^+ , O_2 , CO_2 и др.). Концентрация биомассы при этом не изменяется. Из этого можно сделать важное предположение о постоянстве скоростей

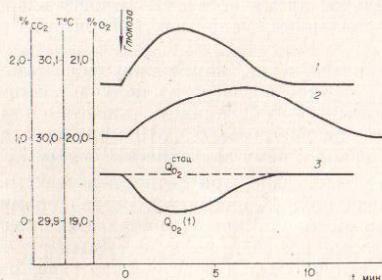


Рис. 1. Кинетика изменения концентрации углекислого газа (1) и кислорода (3) в выхodящем потоке воздуха, а также изменения температуры (2) в ферментере при добавлении 5 мл 10%-ного раствора глюкозы.

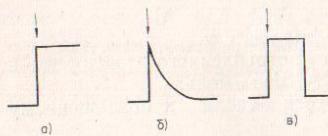


Рис. 2. Основные формы воздействий при изменении условий культивирования.

внутриклеточных процессов и концентрации веществ в клетке. В таких нормированных условиях значения экспериментальных данных имеют хорошую воспроизводимость и большую ценность в отличие от полученных в периодических процессах культивирования [10].

Предлагаемый нами подход представляет собой ана-

лиз ответной реакции культуры микроорганизмов, находящейся в стационарном состоянии, на малое возмущение, которое достигается импульсным добавлением небольшого количества исследуемого вещества в ферментационную жидкость или изменением параметров культивирования (аэрация, температура).

На рис. 1 представлена кинетика изменения основных параметров культуры в ответ на добавление глюкозы в ферментационную жидкость. На основе этих данных получают величины Q_{O_2} , Q_{CO_2} , Q .

Основными характеристиками воздействия являются форма, длительность и величина возмущения; они в основном определяют и форму ответной реакции. Воздействия, связанные с изменением концентрации какого-либо вещества в ферментационной жидкости, можно разделить на три класса, схематично представленных на рис. 2.

Ступенчатое воздействие (см. рис. 2, а) предполагает изменение концентрации $\Delta C = C_2 - C_1$; при этом величина конечной концентрации C_2 сохраняется в среде самопроизвольно или поддерживается постоянным равномерным добавлением данного вещества длительное время ($\tau \geq 1$ ч). Такое воздействие можно осуществить добавлением, например, ингибиторов и других веществ.

Импульсное воздействие, компенсируемое культурой, показано на рис. 2, б. Такое воздействие получается при изменении pH среды импульсным добавлением кислоты или щелочи в среду; при этом за время $\tau \sim 5 \dots 10$ мин восстанавливается прежнее или близкое к нему значение pH среды.

Импульсное воздействие, при котором эффект концентрации добавляемого вещества C_2 снимается через время Δt и устанавливается его исходная концентрация C_1 , представлено на рис. 2, в. Эта форма воздействия может быть реализована при временном изменении состава аэрируемого газа, например при изменении концентрации кислорода, углекислого газа, аммиака и др. во входящем потоке газа, вследствие чего изменяется их концентрация в растворе. При этом время воздействия τ является изменяемой величиной.

Отдельный класс воздействий составляют изменения усло-

вий культивирования — температуры, давления, аэрации. При таких воздействиях обычно отсутствует форма б (см. рис. 2).

Воздействия по их величине можно разделить на малые и сильные возмущения. Критерием такого деления может служить, на наш взгляд, отношение величины ответной реакции к стационарному значению этого параметра.

Например, по кислороду (см. рис. 1 и 3)

$$\delta = \frac{\int_0^\tau |Q_{O_2}(t) - Q_{O_2}^{\text{стаци}}| dt}{Q_{O_2}^{\text{стаци}} \tau} = \frac{\int_0^\tau |C_{O_2}(t) - C_{O_2}^{\text{стаци}}| dt}{C_{O_2}^{\text{стаци}} \tau}, \quad (1)$$

где $Q_{O_2}(t)$, $C_{O_2}(t)$ — соответственно изменение скорости потребления кислорода и его концентрации в выходящем газе вследствие воздействия;

$Q_{O_2}^{\text{стаци}}$, $C_{O_2}^{\text{стаци}}$ — стационарные значения этих параметров;

τ — длительность ответной реакции.

Для примера, представленного на рис. 1, по кислороду $\delta = 0,13$. Кроме того, можно использовать отношение скоростей:

$$\delta' = \frac{Q_{O_2}^{\text{max}} - Q_{O_2}^{\text{стаци}}}{Q_{O_2}^{\text{стаци}}}. \quad (2)$$

Этот критерий удобнее применять в случае, когда ответная реакция не является компенсационной. Он использован нами ранее [13] в качестве показателя разобщенности фосфорилирования. При этом до значения $\delta' = 0,5$ наблюдается линейная зависимость Q_{O_2} от удельной величины воздействия хлоркарбонилцианидингидразоном (ХКФ).

К типу малых возмущений мы относили воздействия, которые соответствовали следующим условиям:

а) при ответной реакции компенсационного характера — возвращение культуры в исходное, стационарное состояние; при этом $\delta \leq 0,2$;

б) при ответной реакции некомпенсационного вида — линейная зависимость реакции от величины воздействия; это условие обычно выполняется

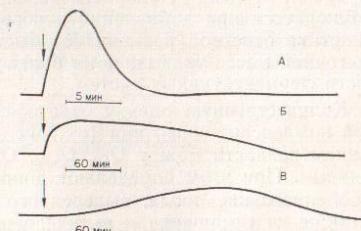


Рис. 3. Кинетика ответной реакции (Q_{O_2}) культуры микроорганизмов при различных воздействиях: А — добавление лимитирующего компонента; Б — действие разобщителя фосфорилирования; В — изменение температуры культивирования; $D = \text{const}$, $X = \text{const}$. См. пояснения в тексте.

ется при $\delta' \leq 0,25$, а в некоторых случаях и при более высоких значениях δ' .

Следует отметить, что этих условий все же недостаточно и в каждом случае необходим конкретный анализ глубины воздействия на культуру.

Возмущение стационарного состояния культуры каким-либо воздействием проявляется прежде всего в ответной реакции изменения малоинерционных параметров культуры (см. рис. 1). Кинетика ответной реакции культуры при действии возмущения может иметь три основных вида, схематично представленных на рис. 3.

В случае А (см. рис. 3) длительность ответной реакции культуры не превышает 10 мин, после чего происходит установление прежнего, стационарного состояния. Этот возврат осуществляется либо за счет потребления добавляемого вещества, либо вследствие компенсации культурой внешнего воздействия. Такой вид ответной реакции имеет при добавлении лимитирующего субстрата, воздействии некоторыми микроэлементами, изменении рН среды [12].

В втором случае (см. рис. 3, Б) воздействие приводит к установлению нового стационарного состояния за 5–10 мин. Длительность этого состояния определяется скоростью разбавления среды, т. е. снижением концентрации добавляемого вещества, и составляет несколько часов. Примером такого воздействия может служить добавление разобщителей фосфорилирования или ингибиторов дыхания.

В третьем случае (см. рис. 3, В) ответная реакция культуры не имеет быстрой фазы. Выход в новое стационарное состояние происходит за 1–2 ч, а длительность этого состояния, как и в случае Б, зависит от скорости разбавления среды. Этот эффект наблюдается при добавлении пенообразителя и некоторых солей. Кинетика ответной реакции без быстрой фазы при постоянной клеточной массе указывает на более сложные изменения активности ферментативных систем.

Количественную оценку ответной реакции культуры, имеющей компенсационный вид (см. рис. 3, А), проводят интегрированием разности между Q_{O_2} , Q_{CO_2} , Q и их стационарными значениями. При этом определяют дополнительное количество потребленного кислорода, выделенного углекислого газа и тепла, а также их отношения к величине воздействия. Если ответная реакция имеет вид Б и В, то для расчетов используется соотношение (2).

Предлагаемый метод возмущений стационарного состояния культуры в условиях хемостата использован нами для решения задач трех классов:

1) исследования энергетических процессов в микроорганизмах;

2) определения лимитирующих и стимулирующих факторов и состава среды;

3) оптимизации условий культивирования.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКА

Эксперименты проводились с прототипным штаммом *Brevibacterium flavum* из коллекции Института микробиологии им. Августа Кирхенштейна АН ЛатвССР с использованием среды стандартного состава.

В некоторых экспериментах была использована также культура *Achromobacter delicatulus* [1], выращиваемая на среде следующего состава (г/л): глюкоза — 30; дрожжевой экстракт — 0,75; $FeCl_3$ — 0,07; $CaCl_2$ — 0,075; $NaCl$ — 0,075; $MgSO_4$ — 0,15; KNO_3 — 0,375; K_2HPO_4 — 0,75.

Культивирование осуществляли в аппарате АНКУМ-2, снабженном системой для измерения тепловыделения микроорганизмов [8], при температуре $30,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Стационарное состояние режима хемостата поддерживали непрерывной подачей среды с помощью перистальтического насоса ELMED (ПНР) и сохранением постоянного объема в аппарате — 1,2 л. Изменение скорости потребления кислорода и скорости выделения углекислого газа проводили балансовым методом с помощью пульта газоанализаторов ПГА-2 (Экспериментальный электромеханический завод Физико-энергетического института АН ЛатвССР) по ранее описанной методике [13]. Время установления стационарного состояния при смене скорости протока составляло 6 ч. После этого осуществляли возмущение стационарного состояния импульсным давлением в ферментере небольших количеств различных веществ или изменением условий культивирования.

Общее количество потребленного кислорода, выделенного углекислого газа и тепла в результате действия возмущения (см. рис. 1) определяли интегрированием ответной реакции по формулам

$$m_{O_2, CO_2} = \int_0^{\tau} |C(t) - C_{стаци}| q_{п, y} dt \quad [\text{моль}] ; \\ q = \int_0^{\tau} |N(t) - N_{стаци}| dt = K \int_0^{\tau} |T(t) T_{стаци}| dt \quad [\text{Дж}] , \quad (3)$$

где $C_{стаци}$, $N_{стаци}$, $T_{стаци}$ — стационарные значения соответственно концентрации O_2 и CO_2 на выходе, мощности тепловыделения и температуры;

$C(t)$, $N(t)$, $T(t)$ — изменение этих же параметров во времени при импульсном возмущении;

$q_{\text{н.у}}$ — расход газа, приведенный к нормальным условиям;
 K — калибровочный коэффициент;
 τ — время ответной реакции.

Вследствие того что ответная реакция может приводить не только к стимуляции процесса (см. рис. 1), в выражениях (3) использовали абсолютную величину разности, аналогично формулам (1) и (2).

Если ответная реакция имела некомпенсационный вид (см. рис. 3, Б и В), то использовали относительное изменение соответствующей величины δ' , например определяемое по скорости потребления кислорода (см. формулу (2)).

В расчетах применяли также некоторые физиологические коэффициенты, инвариантные относительно количества клеток: β — отношение количества кислорода, потребленного при окислении добавляемого вещества, к количеству этого вещества (моль/моль); γ — отношение выделенного тепла к поглощенному кислороду (Дж/моль).

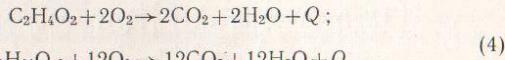
В экспериментах по оптимизации состава среды и условий культивирования качественно оценивали ингибирующее и стимулирующее действие исследуемых факторов на три основных показателя метаболизма культуры — Q_{O_2} , Q_{CO_2} , Q .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование энергетических процессов микроорганизмов

При культивировании прототрофного штамма *Brevibacterium flavum* в условиях субстратного лимитирования осуществлялось импульсное возмущение стационарного состояния культуры добавлением в ферментационную жидкость раствора ацетата и сахарозы. Ответная реакция культуры при этом воздействии имеет вид, аналогичный представленному на рис. 1. Эти данные позволяют определить показатель, отражающий энергетические процессы в клетке, а именно отношение количества потребленного кислорода к количеству добавленного субстрата — β .

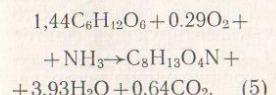
Так, при полном окислении субстрата, которое для ацетата и сахарозы имеет вид



значения $\beta^{\text{п}}$ составляют соответственно $\beta_{\text{ац}}^{\text{п}}=2$ и $\beta_{\text{сах}}^{\text{п}}=12$ моль/моль.

При метаболическом окислении полностью окисляется только часть субстрата, остальная часть используется для биосинтеза [5]. Зная максимальное теоретическое значение выхода био-

массы из глюкозы $Y_S=0,72$ г/г [16], можно определить теоретическое значение $\beta^{\text{т}}$ для других субстратов:



Например, для перечисленных выше веществ это значение составляет: для глюкозы — $\beta_{\text{gl}}^{\text{т}}=0,201$, для ацетата — $\beta_{\text{ац}}^{\text{т}}=0,134$, для сахарозы — $\beta_{\text{сах}}^{\text{т}}=0,402$.

Экспериментальные значения величин $\beta_{\text{ац}}$ и $\beta_{\text{сах}}$ в зависимости от скорости роста представлены в табл. 1.

Экспериментальная величина β может характеризовать распределение потребленного субстрата между процессами биосинтеза и получением энергии при окислении. Снижение $\beta_{\text{ац}}$ и $\beta_{\text{сах}}$ с возрастанием скорости роста обусловлено, возможно, повышением сопряженности энергетических процессов и увеличением потребности субстрата для синтеза биомассы.

Второй характеристикой энергетических процессов аэробного метаболизма является отношение выделенного тепла к поглощенному кислороду — $q/O_2=\gamma$. В стационарных условиях метаболического окисления эта величина составляет: для ацетата $\gamma_{\text{ац}}=438,7$ кДж/моль, для глюкозы $\gamma_{\text{gl}}=470,0$ кДж/моль, для сахарозы $\gamma_{\text{сах}}=470,9$ кДж/моль [15].

В табл. 2 приведены экспериментальные данные для величины γ , полученные при добавлении ацетата и сахарозы.

Для ацетата величина $\gamma_{\text{ац}}$ значительно ниже теоретической. По-видимому, в этом случае происходит частичная аккумуляция энергии в форме макроэргических соединений. Их дальнейшее использование — процесс более медленный, чем время ответной реакции ($\tau \sim 10$ мин) при возмущении стационарного состояния. При добавлении сахарозы величина $\gamma_{\text{сах}}$ (табл. 2) с погрешностью, не превышающей 10%, соответствует приведенному выше значению. Таким образом, за время $\tau \sim 10$ мин энергия окисления сахарозы полностью переходит в тепловую форму.

Таблица 1
Зависимость коэффициента β (моль/моль)
от скорости роста
для прототрофного штамма
Brevibacterium flavum

$D, \text{ч}^{-1}$	$\beta_{\text{ац}}$	$\beta_{\text{ац}}^{\text{п}} \text{ в \%}$ от $\beta_{\text{ац}}^{\text{п}}$	$\beta_{\text{сах}}$	$\beta_{\text{сах}}^{\text{п}} \text{ в \%}$ от $\beta_{\text{сах}}^{\text{п}}$
0,152	0,362	18,1	3,18	26,5
0,241	0,317	15,8	2,73	22,7
0,287	0,272	13,6	2,33	19,4
0,308	0,264	13,2	2,21	18,4

Таблица 2

Зависимость коэффициента γ
от скорости роста для прототрофного
штамма *Brevibacterium flavum*

$D, \text{ч}^{-1}$	$\gamma_{\text{ац}}, \text{кДж/моль}$	$\gamma_{\text{сах}}, \text{кДж/моль}$
0,152	358,6	422,3
0,241	300,0	458,4
0,287	280,9	411,5
0,308	275,5	454,6

2. Определение лимитирующих и стимулирующих факторов и состава среды

При возмущении стационарного состояния культуры различными компонентами питательной среды ответная реакция проявляется в виде ускорения или подавления процесса. Это позволяет достаточно быстро определить лимитирующий фактор [4] и установить сбалансированность среды. В отдельных случаях можно определить оптимальную концентрацию исследуемого вещества. На рис. 4 представлены результаты влияния различных веществ на скорость потребления кислорода при культивировании *Achromobacter delicatus*.

Из данных, представленных на рис. 4, можно заключить, что исходная питательная среда не является оптимальной. Добавление мелассы и глюкозы приводит к увеличению скорости потребления кислорода. При первом добавлении 50 мл 30%-ного раствора мелассы или глюкозы ее концентрация в среде возрастает на 1%, следствием чего является стимулирующее действие, которое вызывает увеличение скорости потребления кислорода. При повторном добавлении глюкозы после воздействия дрожжевым экстрактом стимулирующего действия практически не наблюдается. Наибольший стимулирующий эффект дает добавление дрожжевого экстракта, при котором возможно, снимается какое-либо лимитирование, так как вид ответной реакции совпадает с приведенным на рис. 1, когда возмущение осуществлялось лимитирующим субстратом.

В отличие от исследования энергетических процессов при оптимизации состава питательной среды возмущение стационарного состояния не всегда имеет характер малого возмущения.

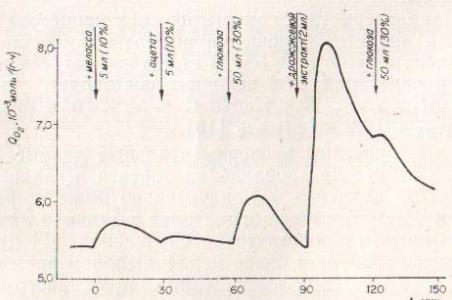


Рис. 4. Изменение скорости потребления кислорода при различных воздействиях на культуру *Achromobacter delicatus*. $D=0,07 \text{ ч}^{-1}$.

В таких случаях следует обратить особое внимание на то, следствием каких изменений, метаболических или энергетических, является ответная реакция культуры.

3. Оптимизация условий культивирования

К внешним регулируемым параметрам культивирования можно отнести скорость массопередачи кислорода и температуру. Снабжение клеток кислородом в условиях глубинного культивирования обычно контролируется датчиком растворенного кислорода. При отсутствии датчика, например в условиях

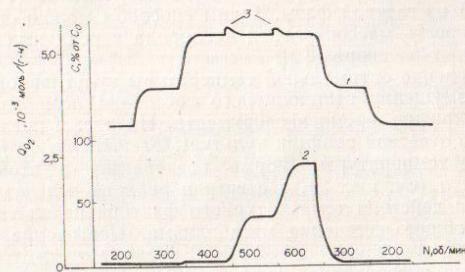


Рис. 5. Изменение скорости потребления кислорода (1) в условиях изменения концентрации растворенного кислорода (2) при изменении скорости оборотов мешалки через каждые 10 мин. См. пояснения в тексте.

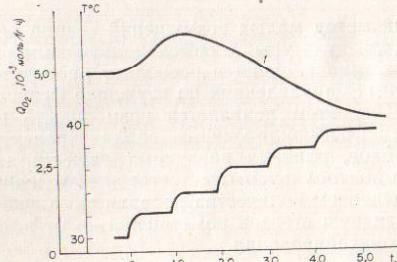


Рис. 6. Изменение скорости потребления кислорода (1) культурой *Brevibacterium flavum* при изменении температуры (2) при $X=\text{const}$, $D=0,150 \text{ ч}^{-1}$.

поверхностного культивирования или при низкой концентрации кислорода в среде (менее 5% от равновесной), наличие лимитирования можно установить по ответной реакции на кратковременное изменение скорости расхода аэрируемого газа или скорости перемешивания в аппарате.

На рис. 5 представлены данные об изменении скорости потребления кислорода и концентрации его в среде при увеличении скорости его растворения в результате изменения скорости вращения мешалки.

При снятии кислородного лимитирования величина Q_{O_2} не возрастает с увеличением оборотов мешалки. Однако в начальный момент увеличение концентрации растворенного кислорода в среде вызывает дополнительное его потребление (см. пики 3 на рис. 5) из газовой фазы. Таким способом можно определить также скорость массопередачи кислорода в реальных условиях и модельных растворах [2].

Определение оптимальной температуры культивирования методом возмущения стационарного состояния позволяет значительно сократить время эксперимента. На рис. 6 представлены данные об ответной реакции культуры *Brevibacterium flavum* на изменение температуры. Форма воздействия в этом случае имеет вид a (см. рис. 2), а ответная реакция вследствие интегральности действия температурного фактора на клетку характеризует общее изменение метаболизма. Повышение температуры культивирования до 32–34°C оказывает стимулирующее действие на потребление кислорода микроорганизмами; при этом Q_{O_2} возрастает, а относительное ее увеличение составляет $\delta' = 0,135$. Дальнейшее нагревание — выше 34°C — приводит к уменьшению скорости потребления кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный метод малых возмущений стационарного состояния хемостатной культуры является дальнейшим развитием хемостатного культивирования и позволяет проводить исследования в различных направлениях по изучению физиологии микроорганизмов. При этом появляется возможность исследования сопряженности фосфорилирования, сбалансированности энергетических потоков, влияния различных веществ на клеточный метаболизм в контролируемых естественных условиях культивирования. Изменением количества добавляемого вещества можно получить различную степень возмущения — от эффекта стимулирования до ингибирования.

Количественное определение процессов обмена клетки с внешней средой интегрированием ответной реакции Q_{O_2} , Q_{CO_2} , Q при импульсных возмущениях стационарного состояния позволяет значительно уменьшить методическую погрешность, а также стандартизировать условия экспериментов.

Изложенный метод существенно упрощает решение таких практически важных вопросов, как идентификация факторов, лимитирующих и стимулирующих рост культуры, оптимизация состава питательной среды и условий культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреюк Е. И., Рышави П., Ласик Я., Иутинская Г. А. Разложение бактериальных полисахаридов в почве и в условиях непрерывного проточного культивирования. — Микробиол. журн., 1981, т. 43, вып. 5, с. 547—551.
2. Бабурин Л. А., Швянка Ю. Э., Прокопенко В. Д. Определение массообмена в ферментационных аппаратах по балансу кислорода. — Микробиол. пром-сть, 1983, № 3, с. 3—4.
3. Бабурин Л. А. Физическая методология биологических исследований. — В кн.: Тез. докл. конф. молодых ученых. Рига, Зинатне, 1981, с. 49—50.
4. Дудина Л. П., Ерошин В. К. Проверка лимитирующего компонента среды в процессе непрерывного культивирования микроорганизмов. — Прикл. биохимия и микробиология, 1979, т. 15, с. 817—821.
5. Иванов В. Н. Энергетика роста микроорганизмов. Киев, Наукова думка, 1981. 139 с.
6. Малек И., Фенца З. Непрерывное культивирование микроорганизмов. М., Пищевая пром-сть, 1968. 440 с.
7. Минкевич И. Г. Переходные процессы при установлении стационарных режимов роста микроорганизмов в хемостатной культуре. — В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования. М., Наука, 1980, с. 47—58.
8. Николаев И. А. Измерение количества теплоты, выделяемой микроорганизмами в процессе культивирования в лабораторном ферментаторе. — В кн.: Ферментационная аппаратура. Рига, Зинатне, 1980, с. 81—88.
9. Работнова И. Л. Исследование физиологического состояния микроорганизмов при хемостатном культивировании. — Итоги науки и техники. Микробиология, 1975, т. 4, с. 5—51.
10. Работнова И. Л., Позмогова И. Н., Баснакьян И. А. Хемостатное и периодическое культивирование при изучении физиологии микроорганизмов. — Итоги науки и техники. Микробиология, 1981, т. 11, с. 3—54.
11. Уткина Л. И., Шкидченко А. Н., Уткин И. С. Динамика переходных процессов при различных лимитирующих факторах в проточной культуре. — В кн.: Лимитирование и ингибирование процессов микробиологического синтеза. Пущино, 1976, с. 188—192.
12. Швянка Ю. Э., Бабурин Л. А., Кристапсон М. Ж. Изучение энергетического метаболизма в хемостатной культуре при нарушении стационарности изменением pH и концентрации компонентов среды. — В кн.: Тез. докл. III Всесоюз. конф. «Теория и практика управляемого культивирования микроорганизмов». Киев, Наукова думка, 1981, т. 1, с. 49.
13. Швянка Ю. Э., Бабурин Л. А., Виестур У. Э. Чувствительность процесса поглощения кислорода у *Brevibacterium flavum* к изменениям pH среды и действию разобщителя окисления и фосфорилирования. — Микробиология, 1982, т. 51, вып. 6, с. 926—931.
14. Goldberg I., Er-el Z. The Chemostat — an efficient technique for medium optimization. — Process Biochem., 1981, vol. 5, p. 2—8.
15. Patel S. A., Erickson L. E. Estimation of heats of combustion of biomass from elemental analysis using available electron concepts. — Biotechnol. and Bioeng., 1981, vol. 23, p. 2051—2067.
16. Solomon B. O., Erickson L. E. Biomass yields and maintenance requirements for growth on carbohydrates. — Process Biochem., 1981, vol. 16, N 2, p. 44—49.